

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4644489号
(P4644489)

(45) 発行日 平成23年3月2日(2011.3.2)

(24) 登録日 平成22年12月10日(2010.12.10)

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68 Z N A A
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 A
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N	33/53 D
A 6 1 K	31/19	(2006.01)	G O 1 N	33/53 M
			A 6 1 K	31/19

請求項の数 10 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2004-537124 (P2004-537124)
 (86) (22) 出願日 平成15年9月18日(2003.9.18)
 (65) 公表番号 特表2006-517782 (P2006-517782A)
 (43) 公表日 平成18年8月3日(2006.8.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2003/010404
 (87) 国際公開番号 W02004/027418
 (87) 国際公開日 平成16年4月1日(2004.4.1)
 審査請求日 平成18年8月8日(2006.8.8)
 (31) 優先権主張番号 02021228.8
 (32) 優先日 平成14年9月18日(2002.9.18)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 505098915
 トポターゲット ジャーマニー アーゲー
 ドイツ連邦共和国 60596, フランク
 フルト アム メイン, ポールーアーリッ
 ヒーシュトラーセ 42-44
 (73) 特許権者 505098926
 フォルシュングスツェントラム カールス
 ルア ゲーエムベーハー
 ドイツ連邦共和国 76131 カールス
 ルーエ, カイザーシュトラーセ 12, カ
 ルルスルーエ インスティテュート フォ
 ー テクノロジル
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒストンデアセチラーゼ活性を有する酵素のインヒビターの前臨床および臨床プロファイリングのための分子マーカーの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

バルプロ酸を用いた療法に应答する患者または腫瘍実体の識別方法であって、前記バルプロ酸によって処理された細胞に由来するサンプル中の、HDAC-2 RNA、HDAC-2 タンパク質、Ubc8 RNA、UBC8 タンパク質、RLIM RNA、RLIM タンパク質、TRAIL RNA および TRAIL タンパク質から成る群より選択される分子マーカーの量を決定することを含む方法。

【請求項 2】

前記サンプルが、皮膚癌、メラノーマ、エストロゲンレセプタ依存性および非依存性乳癌、卵巣癌、前立腺癌、腎臓癌、結腸および結腸直腸癌、膵臓癌、頭部および頸部癌、小細胞および非小細胞肺癌、白血病および他の血液細胞癌ならびに甲状腺耐性症候群から成る群より選択される障害によって影響を受けた組織に由来する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記障害が結腸および結腸直腸癌である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記サンプル中の細胞分化および/またはアポトーシスを測定する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記分子マーカーがリボ核酸であり、分子マーカーの量が RT-PCR またはハイブリダイゼーションによって決定される、請求項 4 に記載の方法。

10

20

【請求項 6】

前記分子マーカーがタンパク質であり、分子マーカーの量が分子マーカーに対する抗体の使用によって決定される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記分子マーカーの量がウェスタンブロッティング法、ELISA法、免疫組織化学および/またはフローサイトメトリー法によって決定される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

インヒビターが分子マーカーの発現を調節する活性を持つ場合、インヒビターを選択するステップをさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記分子マーカーの量を決定するステップであって、参照サンプルが前記HDACインヒビターまたは潜在的なHDACインヒビターによって処置されていない細胞由来である、参照サンプル中の前記分子マーカーの量を決定するステップをさらに含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

(i) HDAC - 2 RNA、HDAC - 2 タンパク質、Ubc8 RNA、UBC8 タンパク質、RLIM RNA、RLIM タンパク質、TRAIL RNA および TRAIL タンパク質から成る群より選択される分子マーカーの量を決定する手段であって、該手段が、

HDAC - 2 タンパク質、UBC8 タンパク質、RLIM タンパク質、TRAIL RNA および TRAIL タンパク質からなる群より選択されるタンパク質に対する抗体、または

RLIM mRNA、RLIM cDNA、Ubc8 mRNA、Ubc8 cDNA、TRAIL mRNA、TRAIL cDNA、HDAC - 2 mRNA、HDAC - 2 cDNA およびその相補鎖から成る群より選択されるポリヌクレオチド

である手段、ならびに

(ii) バルプロ酸

を含有する、バルプロ酸を用いた療法に応答する患者または腫瘍実体の識別のための診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒストンデアセチラーゼ活性を有する酵素のインヒビターの前臨床および臨床プロファイリングのための、分子マーカーおよび関連シグナル伝達機構の使用に関する。本発明は、このようなインヒビターを用いた腫瘍患者の処置のための、診断および/または予後ツールとしてのこのようなマーカーの使用にも関する。

【背景技術】

【0002】

クロマチンの局所リモデリングは、遺伝子の転写活性化における重要なステップである。DNAのヌクレオソームパッケージングにおける動的変化は、転写タンパク質をDNAの鑄型と接触させるために発生する必要がある。クロマチンのリモデリングおよび遺伝子の転写に影響する最も重要な機構のひとつは、アセチル化によるヒストンおよび他の細胞タンパク質の翻訳後修飾およびそれに続くクロマチン構造の変化である (Davie, 1998, Curr Opin Genet Dev 8,173-8 ; Kouzarides, 1999, Curr Opin Genet Dev 9,40-8 ; Strahl and Allis, 2000, Nature 403,41-4)。ヒストン過剰アセチル化の場合、DNAへの静電気引力の変化および疎水性アセチル基によって導入された立体異性は、ヒストンのDNAとの相互作用の不安定化を引き起こす。結果としてヒストンのアセチル化は、ヌクレオソームを破壊し、DNAが転写機構へアクセスできる。アセチル基の除去は、ヒストンをDNAへ、および隣接するヌクレオソームへさらにしっかりと結合させ、それゆえ転写的に抑制されたクロマチン構造を維持することができる。アセチル化は、ヒストンアセチル

10

20

30

40

50

トランスフェラーゼ (HAT) 活性を持つ一連の酵素によって仲介される。反対にアセチル基は、特異的ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 酵素によって除去される。これらの機構の破壊は転写調節不全を生じさせ、腫瘍化を引き起こす。

【 0 0 0 3 】

加えて、転写因子などの他の分子は、アセチル化状態に応じてその活性および安定性を変化させる。たとえば急性前骨髄球性白血病 (APL) に関連する融合タンパク質である PML-RAR は、p53 の脱アセチル化および分解を仲介することによって p53 を阻害し、それゆえ APL 芽細胞に p53 依存性癌調査経路を回避させる。造血前駆物質における PML-RAR の発現は、p53 仲介転写活性化の抑制、および遺伝毒性ストレス (X線、酸化ストレス) が引き起こす p53 依存性アポトーシスからの保護を生じさせる。しかしながら p53 の機能は、HDAC の活性補充に關与する HDAC インヒビターの存在下で、p53 阻害の基礎を成す機構としての PML-RAR によって、p53 に再組み込みされる (Insinga et al. 2002, 投稿中)。したがって因子アセチル化は、HDAC インヒビターの抗腫瘍活性において決定的な役割を果たす。

10

【 0 0 0 4 】

核ホルモンレセプタは、遺伝子発現の正および負の対照の両方を通じて発生およびホメオスタシスを制御する、リガンド依存性転写因子である。これらのレギュレータプロセスの欠陥は、多くの疾患の原因の基礎を成し、癌の発生で重要な役割を果たす。T3R、RAR および PPAR を含む多くの核レセプタは、リガンドの非存在下でコリプレッサ N-CoR および SMRT と相互作用し、それによって転写を阻害することができる。さらに N-CoR は、アンタゴニストに占有されたプロゲステロンおよびエストロゲンレセプタと相互作用することも報告されている。N-CoR および SMRT は、mSin3 タンパク質およびヒストンデアセチラーゼも含有する大型のタンパク質複合体中に存在することが示されている (Pazin and Kadonaga, 1997; Cell 89,325-8)。それゆえ抑制から活性化への核レセプタのリガンド誘導スイッチは、アンタゴニスト酵素活性を用いた、コリプレッサおよびコアクチベータ複合体の交換を反映している。

20

【 0 0 0 5 】

N-CoR コリプレッサ複合体は、核レセプタによる抑制を仲介するだけでなく、Mad-1、BCL-6 および ETO を含むさらなる転写因子と相互作用もする。これらのタンパク質の多くは、細胞増殖および分化の障害において重要な役割を果たす (Pazin and Kadonaga, 1997, Cell 89,325-8; Huynh and Bardwell, 1998, Oncogene 17,2473-84; Wang, J. et al., 1998, Proc Natl Acad Sci U S A 95,10860-5)。たとえば T3R は、当初はウイルス発癌遺伝子 v-erbA との相同性に基づいて同定され、野生種レセプタとは対照的にウイルス発癌遺伝子 v-erbA はリガンドを結合せず、転写の構成リプレッサとして機能する。さらに RAR における突然変異は、多くのヒト癌、特に急性前骨髄球性白血病 (APL) および肝細胞癌に関連付けられている。APL 患者では、染色体転座から生じる RAR 融合タンパク質が、前骨髄球性白血病タンパク質 (PML) または前骨髄球性ジンクフィンガータンパク質 (PLZF) のどちらかを包含する。どちらの融合タンパク質もコリプレッサ複合体の成分と相互作用できるが、レチノイン酸の添加は PML-RAR からコリプレッサ複合体を退けるのに対して、PLZF-RAR は構成的に相互作用する。これらの発見結果は、PML-RAR APL 患者がレチノイン酸処置後に完全な寛解を実現するのに対して、PLZF-RAR APL 患者が非常に乏しい応答をする理由の説明となる (Grignani et al., 1998, Nature 391,815-8; Guidez et al., 1998, Blood 91,2634-42; He et al., 1998, Nat Genet 18,126-35; Lin et al., 1998, Nature 391,811-4)。さらに、レチノイン酸による処置後に複数回の再発を経験した PML-RAR 患者は最近、HDAC インヒビターのフェニルブチラートによって処置され、白血病の完全寛解を生じている (Warrell et al., 1998, J.Natl. Cancer Inst. 90,1621-1625)。

30

40

【 0 0 0 6 】

現在までに、密接に関連した酪酸誘導体の Pivane x (Titan Pharmaceuticals)

50

を単剤療法として用いた臨床第 I I 相試験が完了し、I I I / I V 期非小細胞肺癌において活性を示している (Keer et al., 2002, ASCO, Abstract No. 1253)。さらなる H D A C インヒビターが同定され、N V P - L A Q 8 2 4 (Novartis) および S A H A (Aton Pharma Inc.) は、第 I 相臨床試験において試験されたヒドロキサム酸の構造クラスの構成要素である (Marks et al., 2001, Nature Reviews Cancer 1,194-202)。別のクラスは、環状テトラペプチド、たとえば、T 細胞リンパ腫の処置の第 I I 相試験で成功裏に使用されたデブシペプチド (FR901228-藤沢) を含む (Piekarz et al., 2001, Blood 98,2865-8)。さらに、ベンズアミドのクラスに関連する化合物である M S - 2 7 - 2 7 5 (三井製薬) は、血液悪性腫瘍を持つ第 I 相試験の患者で現在試験中である。

【 0 0 0 7 】

ヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) およびヒストンデアセチラーゼ (HDAC) の補充は、細胞増殖および分化において重要な役割を果たしている多くの遺伝子の動的調節の主要な要素と考えられている。ヒストン H 3 および H 4 の N 末端テールの過剰アセチル化は、遺伝子活性化と関連しているが、これに対して脱アセチル化は、転写抑制を仲介できる。結果として、多くの疾患が、転写因子に影響する突然変異によって引き起こされた遺伝子発現における変化に結び付けられてきた。白血病融合タンパク質、たとえば P M L - R A R、P L Z F - R A R、A M L - E T O および S t a t 5 - R A R による異常抑制は、この点でプロトタイプ例である。これらの場合のすべてにおいて、染色体転座は転写アクチベータをリプレッサに変換し、リプレッサは H D A C の補充を介して、造血分化に重要な標的遺伝子を構成的に抑制する。同様の事象が多くの他の種類の癌における病原にも寄与することが信頼できる。

【 0 0 0 8 】

哺乳動物ヒストンデアセチラーゼは、3つのサブクラスに分類できる (Gray and Ekstrom, 2001)。酵母 R P D 3 タンパク質のホモログである H D A C 1、2、3、および 8 は、クラス I を構成する。H D A C 4、5、6、7、9、および 10 は、酵母 H d a 1 タンパク質に関連し、クラス II を形成する。最近、酵母 S i r 2 タンパク質の複数の哺乳動物ホモログが、N A D 依存性であるデアセチラーゼの第 3 のクラスを形成することが確認された。これらの H D A C はすべて、大量の多タンパク質複合体のサブユニットとして、細胞中に存在すると思われる。特にクラス I および II H D A C は、転写因子への H D A C の補充に必要な架橋因子として作用する転写コリプレッサの m S i n 3、N - C o R および S M R T と相互作用することが示されている。

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 9 】

癌療法における分子マーカー ヒト癌の診断およびステージングのための新たな分子マーカーの発見は、なお進行中の作業であり、正しい治療方法の選択には必須である。乳癌の場合、分子マーカー、たとえば H E R 2 / n e u、p 5 3、B C L - 2 および エストロゲン / プロゲステロンレセプタ発現レベルが、疾患の状態および進行と関連することが明確に示されている。転移性乳癌患者の血清中の H E R 2 濃度を測定する、新たに承認されたキットは現在、これらの患者の追跡調査およびモニタリングに使用できる。複数の大規模な研究が、H E R 2 血清濃度が疾患の重症度に関連付けられ、さらに重要なことには - 療法に应答する患者において、療法の種類とは無関係に H E R 2 濃度が低下することを示した。この例は、癌療法での診断および予後マーカーの価値を証明する。

【 0 0 1 0 】

H D A C インヒビターに関連する新しい診断および予後ツールに対する医療上の必要性
癌療法での H D A C 阻害およびその関連の臨床上の利益は、最近複数の場所で調査されている。初期の研究による結果は、H D A C インヒビターが急性骨髄性白血病、T 細胞リンパ腫、および肺癌の処置において有益であることを示しているが、他の癌の実体が効果的に処置されることが大いに考えられる。今までのところは、調査中の H D A C インヒビターの多くが、副作用を有することが多く、新世代の H D A C インヒビターのさらなる開

10

20

30

40

50

発が要求されている。したがって、HDACインヒビターとして成功する候補の特徴的な特性を識別することが必須である。このことは、新たな化合物の開発における費用および時間の節約に劇的な因果関係を持つ。第二の主な作業は次に、これらのHDACインヒビターを用いた療法から利益を得る患者を早期に識別して、療法の間にこれらの患者をモニタリングすることである。どちらの問題も、本特許出願で取り扱う。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、HDACインヒビターの開発および使用のための診断および予後ツールを提供することを目的とする。驚くべきことに、HDACインヒビターであるバルプロ酸(VPA)によって処置された細胞でのあるタンパク質のレベルが、VPA処置に応じてアップレギュレートまたはダウンレギュレートされることが見出されている。これらのタンパク質またはそれをコード化するRNAは、分子マーカーとして使用できる。したがって、本発明の1つの態様は、HDACインヒビターのプロファイリングのための特異的分子マーカーの使用である。

10

【0012】

本発明は、サンプル中の分子マーカーの量を決定することを含む、HDACインヒビターまたは潜在的なHDACインヒビターのキャラクタリゼーションの方法に関し、ここでサンプルは、前記HDACインヒビターまたは潜在的なHDACインヒビターによって処置された細胞に由来する。

【発明を実施するための最良の形態】

20

【0013】

「分子マーカー」という用語は本明細書で使用されるように、遺伝子産物、すなわちタンパク質または前記遺伝子から発現されたmRNAを含むリボ核酸を指し、細胞中の前記遺伝子産物の量は、HEK293T、F9、K562、HL60、および白血病骨髄などの細胞系中のHDACインヒビターVPAによって、アップレギュレートまたはダウンレギュレートされる。たとえばVPAは、HDAC-2およびBCL-XL、p21(WAF)、UBC8、RLIM、CASPASE 8、ならびにTRAILの発現を調節する。本発明による好ましいマーカーは、HDAC-2タンパク質、Ubc8 RNA、UBC8タンパク質、RLIMタンパク質、TRAIL RNAおよびTRAILタンパク質である。

30

【0014】

「HDACインヒビターまたは潜在的なHDACインヒビターのキャラクタリゼーション」は、前記HDACインヒビターまたは潜在的なHDACインヒビターを用いた療法に応答する患者および腫瘍実体の識別と；患者のHDACインヒビター処置の有効性をモニタリングすることと；HDACインヒビターに対する治療応答を予測することと；HDACインヒビターまたは潜在的なHDACインヒビターをプロファイルすることと；および疾患、たとえば結腸癌を診断することと；を含む。

【0015】

サンプルは、HDACインヒビターまたは潜在的なHDACインヒビターによって処置された細胞に由来する組成物である。細胞は、前記HDACインヒビターまたは潜在的なHDACインヒビターに接触させられた細胞培養細胞である。インヒビターは、細胞の生育培地に添加できる。この実施形態は、HDACインヒビターまたは潜在的なHDACインヒビターのプロファイリングに特に適している。

40

【0016】

本発明の別の態様は、これらのHDACインヒビターを用いた療法に応答する患者および腫瘍実体を識別するための、上に挙げた分子マーカーの使用である。さらにこれらのマーカーは、患者におけるHDACインヒビター処置の有効性をモニタリングするために使用できる。予後および診断のモニタリングは、ヒストンまたは他の分子の過剰アセチル化の誘導が患者の腫瘍細胞の分化および/またはアポトーシスを生じさせ、それゆえ患者の症状の臨床的改善を引き起こす有益な効果を有する疾患に適している。

50

【0017】

したがって細胞は、HDACインヒビターによって処置した個人の組織にも由来する。この実施形態において、サンプルは好ましくは、障害に影響される組織から由来する。障害に影響される障害は、健常者の対応組織とは異なる組織である。相違は、形態、組織、遺伝子発現、処置またはタンパク質組成物に対する応答などにおける相違である。障害によって影響される組織は、これに限定されるわけではないが、骨髄、結腸、皮膚、胸、卵巣、前立腺、腎臓、膀胱、食道、胃、脳、肺、リンパ節、および膵臓に由来する癌疾患の症例における腫瘍組織である。そのような疾患の例は、これに限定されるわけではないが、皮膚癌、メラノーマ、エストロゲンレセプタ依存性および非依存性乳癌、卵巣癌、テストステロンレセプタ依存性および非依存性前立腺癌、腎臓癌、結腸および結腸直腸癌、膵臓癌、膀胱癌、食道癌、胃癌、泌尿生殖器癌、消化管癌、子宮癌、星状細胞腫、神経膠腫、基底細胞癌ならびに扁平上皮癌、カポジ肉腫および骨肉腫などの肉腫、頭部および頸部癌、小細胞および非小細胞肺癌、白血病、リンパ腫および他の血液細胞癌を含む。

10

【0018】

本発明は、最小残存腫瘍疾患または腫瘍転移の処置をモニタリングするための、これらのマーカーの使用も含む。

【0019】

本発明のもう1つの態様は、ヒストンデアセチラーゼ活性の異常補充を示す疾患、たとえば甲状腺抵抗性症候群、または異常遺伝子発現と関連する他の症状、たとえば炎症性障害、糖尿病、サラセミア、肝硬変、原虫感染などおよびあらゆる種類の自己免疫疾患、特に関節リウマチ、リウマチ様脊椎炎、あらゆる形のリウマチ、骨関節炎、痛風性関節炎、多発性硬化症、インスリン依存性真性糖尿病および非インスリン依存性糖尿病、喘息、鼻炎、ブドウ膜炎、紅斑性狼瘡、潰瘍性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患および、他の慢性炎症、慢性下痢における、これらのマーカーの使用である。

20

【0020】

さらに本発明は、他の増殖性疾患、たとえば乾癬、線維症および他の皮膚障害での、上述のマーカーの診断および予後使用に関する。「増殖性疾患」および「細胞増殖」という用語は、本明細書では互換的に使用され、インビトロまたはインビボにかかわらず、望ましくない過剰または異常細胞の望ましくないまたは制御されない細胞増殖、たとえば腫瘍性または過形成性成長に関する。増殖性症状の例は、これに限定されるわけではないが、悪性新生物および腫瘍を含む前悪性および悪性細胞増殖、癌、白血病、乾癬、骨疾患、線維増殖性障害（たとえば結合組織）、ならびにアテローム性動脈硬化を含む。これに限定されるわけではないが、肺、結腸、胸、卵巣、前立腺、肝臓、膵臓、脳、および皮膚を含むどの種の細胞も処置され、再生不良性貧血およびディジョーニ症候群、グレーブズ病などの障害のどの処置も、T細胞を包含する。

30

【0021】

細胞は通常、分子マーカーの量の決定に利用される方法に適した状態に処理される。処理は、均質化、抽出、固定化、洗浄および/または透過処理を含む。処理の方法は主として、分子マーカーの量の決定に使用される方法によって変わる。サンプルは、患者の生検に由来する。生検は、分子マーカーの量を決定するために使用する方法に適した条件のサンプルを生成するために、さらに処理される。

40

【0022】

各種の方法を利用して、サンプル中の分子マーカーの量を決定することができる。使用される方法の種類は、分子マーカーの性質によって変わる。分子マーカーがタンパク質である場合、分子マーカーの量は好ましくは、分子マーカーに対する抗体の使用によって決定される。

【0023】

本明細書で使用されるように、「抗体」という用語は、免疫グロブリンまたは同じ結合特異性を有するその誘導体を指す。本発明によって使用される抗体は、モノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗血清に由来するまたはそれに含まれる抗体であるが、モノク

50

ローナル抗体が好ましい。「抗体」という用語は、本明細書で使用されるように、誘導体、たとえばF a b、F (a b ')₂、F v、またはs c F v断片をさらに含む：たとえばHarlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" CSH Press 1988, Cold Spring Harbor N.Y.を参照。抗体またはその誘導体は天然起源であるか、あるいは(半)合成的に産生できる。そのような合成産物は、本発明の抗体と同じまたは本質的に同じ結合特異性を有する、タンパク質または半タンパク質物質も含む。そのような産物はたとえば、ペプチドミメティックスによって得られる。分子マーカータンパク質に対する抗体を産生する方法は、当該分野で既知である(Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" CSH Press 1988, Cold Spring Harbor N. Y.)。分子マーカーであるH D A C - 2タンパク質、U B C 8タンパク質、R L I Mタンパク質およびT R A I Lタンパク質のアミノ酸配列は、Yang, W. M. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93,12845-12850 ; Kaiser, P. et al., 1994, J.Biol. Chem. 269,8797-8802 ; Ostendorff, H. P et al., 2000, Genomics 69,120-130 ; Wiley, S. R. et al., 1995, Immunity 3 (6), 673-682; Mariari, S. M. et al., 1997, J Cell Biol 137,221-229にそれぞれ述べられている。分子マーカーであるH D A C - 2タンパク質、U B C 8タンパク質、R L I Mタンパク質およびT R A I Lタンパク質のアミノ酸配列を、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3および配列番号：4にそれぞれ示す。抗体は、当業者に既知である方法、たとえばウェスタンブロットティング、E L I S A、免疫組織化学および/またはフローサイトメトリーで使用される。

10

【 0 0 2 4 】

20

当該分野で一般に既知であるウェスタンブロットティングが使用できる。細胞物質または組織をホモジナイズし、変性および/または還元剤によって処理してサンプルを得る。サンプルをポリアクリルアミドゲルに装填してタンパク質を分離し、続いて膜に移すか、固相に直接スポットする。次に抗体をサンプルに接触させる。1回以上の洗浄ステップの後、当該分野で既知の技法を使用して、結合した抗体を検出する。タンパク質のゲル電気泳動およびウェスタンブロットティングは、Golemis, "Protein-Protein Interactions : A Laboratory Manual", CSH Press 2002, Cold Spring Harbor N. Y.で述べられている。

【 0 0 2 5 】

免疫組織化学は、組織材料、たとえば固形腫瘍片の固定化および透過処理の後に使用できる。次に抗体をサンプルとともにインキュベートし、1回以上の洗浄ステップの後に、結合抗体を検出する。技法は、Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" CSH Press 1988, Cold Spring Harbor N. Y.に概説されている。

30

【 0 0 2 6 】

好ましい実施形態において、分子マーカーの量は、E L I S Aによって決定される。多様な形式のE L I S Aが考えられる。1つの形式において、抗体がマイクロタイタープレートなどの固相に固定化され、非特異的結合部位のブロッキングおよびサンプルによるインキュベーションが続く。別の形式では、サンプル中に含有された分子マーカータンパク質を固定化するために、サンプルを最初に固相に接触させる。ブロッキングおよび場合により洗浄の後で、抗体を固定化サンプルと接触させる。E L I S A技法は、Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" CSH Press 1988, Cold Spring Harbor N. Y.に述べられている。

40

【 0 0 2 7 】

最も好ましくは、分子マーカーの量は、フローサイトメトリーによって決定される。細胞、たとえば細胞培養細胞または血液細胞または骨髄からの細胞は、固定化および透過処理されて、抗体を分子マーカータンパク質に到達させる。任意の洗浄およびブロッキングステップの後、抗体を細胞に接触させる。次に分子マーカータンパク質に結合した抗体を有する細胞を判定するために、当該分野で既知の手順に従ってフローサイトメトリーを実施する。各種のフローサイトメトリー法がRobinson "Current Protocols in Cytometry" John Wiley & Sons Inc., New Yorkに述べられている。

【 0 0 2 8 】

50

分子マーカが mRNA などのリボ核酸である場合、サンプル中の分子マーカの量を決定するために、通常、核酸技術が使用される。好ましくはハイブリダイゼーション技法および/または PCR 技法が利用される。サンプル中の RNA マーカの量を決定するには、ノザンプロット技法が使用できる。好ましい実施形態において、RT-PCR が使用される。当業者は、各マーカのヌクレオチド配列に基づいて、これらの方法で使用される適切なプライマーおよび/またはプローブを設計することができる。Ubc8, RLIM and TRAIL の cDNA 配列は、Wiley, S. R. et al., 1995, Immunity 3 (6), 673-682; Mariani, S. M. et al., 1997, J Cell. Biol. 137,221-229 ; Kaiser, P. et al., 1994, J.Biol. Chem. 269,8797-8802, Ostendorff, H. P et al., 2000, Genomics 69,120-130 ;にそれぞれ述べられている。プライマーおよびプローブを設計する方法は、Dieffenbach"PCR Primer: A Laboratory Manual" CSH Press 1995, Cold Spring Harbor N. Y. に述べられている。HDAC-2、Ubc8、RLIM および TRAIL の cDNA 配列は、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7 および配列番号：8 にそれぞれ示されている。

10

【0029】

さらなる実施形態において、インヒビターが分子マーカの発現を調節する活性を有するならば、方法はインヒビターを選択するステップを含む。本明細書で使用されるように「分子マーカの発現を調節する」は、細胞との接触時に細胞中の分子マーカの量の増加または減少を引き起こす、化合物の能力または活性を指す。HDAC インヒビターまたは潜在的な HDAC インヒビターがこの活性を持つかどうかを判定するために、通常、参照サンプル中の分子マーカの量が決定され、ここで参照サンプルは前記 HDAC インヒビターまたは潜在的な HDAC インヒビターによって処置されていない細胞に由来する。サンプル中および参照サンプル中の分子マーカの量の決定は、並行して実施できる。細胞培養細胞の場合、2つの細胞組成物が提供され、その一方を HDAC インヒビターまたは潜在的な HDAC インヒビターによって処置し、それに対して他方を未処置のまま放置する。続いて両方の組成物をさらに処理し、分子マーカのそれぞれの量を決定する。

20

【0030】

患者の場合、サンプルは、HDAC インヒビターまたは潜在的な HDAC インヒビターによって処置された患者に由来する。参照サンプルは、前記 HDAC インヒビターまたは潜在的な HDAC インヒビターによって処置されていない、同じ障害に苦しむ別の患者に、または健常者に由来する。この参照サンプルが由来する組織は、サンプルが由来する組織に一致する。たとえばサンプルが乳癌患者からの腫瘍組織に由来する場合、参照サンプルも乳癌患者からの腫瘍組織または健常者からの胸組織に由来する。サンプルおよび参照サンプルが同じ個人に由来することも考えられる。この場合、参照サンプルが由来する組織は、HDAC インヒビターによる個人の処置の前または後に個人から入手した。好ましくは組織は、処置の中止後に分子マーカの発現に対するインヒビター処置の考えられる後効果を除外するために、処置の前に入手した。

30

【0031】

本発明の別の態様は、HDAC インヒビターまたは潜在的な HDAC インヒビターをプロファイルするための、分子マーカの量を決定する手段の使用である。

40

【0032】

分子マーカの量を決定するための方法は、上で述べた。それゆえ分子マーカの量を決定するための好ましい手段は、分子マーカタンパク質に対する抗体、それに由来する分子マーカ RNA または cDNA を増幅するために使用できるプライマー、それに由来する分子マーカ RNA または cDNA に特異的にハイブリダイズできるプローブである。もっとも好ましい手段は、TRAIL タンパク質、HDAC-2 タンパク質、RLIM または Ubc8 タンパク質に対する抗体；TRAIL RNA、TRAIL cDNA、Ubc8 RNA または Ubc8 cDNA を特異的に増幅できるプライマー；および標準条件下で TRAIL RNA、TRAIL cDNA、Ubc8 RNA または Ubc8 cDNA に特異的にハイブリダイズできるプローブを含む。プライマーおよびブ

50

ローブは通常、10～50ヌクレオチド長、好ましくは15～30ヌクレオチド長、より好ましくは15～24ヌクレオチド長を有するオリゴヌクレオチドである。1つの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、0.1×SSC、0.1% SDSおよび65などの条件下で各標的配列にハイブリダイズする。適切な条件の設定は、Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1989; or Hames and Higgins "Nucleic acid hybridization, a practical approach", IRL press, 1985に述べられている。

【0033】

特定の実施形態において、本発明によって使用したオリゴヌクレオチドは、HDAC-2 cDNA、Ubc8 cDNA、RLIM cDNA、TRAIL cDNA、およびその相補鎖からなる群より選択されるポリヌクレオチドの、10～50個の、好ましくは15～24個の近接ヌクレオチドを含むか、またはそれより成る。例は、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8およびその相補鎖からなる群より選択される配列の10～50個の近接ヌクレオチドを含むか、またはそれより成るオリゴヌクレオチドである。

10

【0034】

分子マーカーを増幅できるプライマーの具体例は以下のとおりである：

HDAC-2：

フォワード 5' - ggagaa gattgtccagcgtt - 3'

リバーズ 5' - ctataccatcacacattgga - 3'

UBC8：

フォワード 5' - ggtcaagctcatcgagagta - 3'

リバーズ 5' - tcagcgcctcctccgtggcg - 3'

RLIM：

フォワード 5' - cagagg tcccacc taccaga - 3'

リバーズ 5' - ctatgctatctctctgcccga - 3'

TRAIL：

フォワード 5' - gggacagacctgctgctga - 3'

リバーズ 5' - ctcccttgatgat tcccagga - 3'

20

【0035】

もう1つの態様において、本発明は、疾患を診断するための、分子マーカーの量を決定する手段の使用に関する。好ましくはHDAC-2タンパク質の量を決定する手段は、結腸癌を診断するために使用される。特に本発明は、結腸癌を診断するための、HDAC-2タンパク質に対する抗体の使用に関する。

30

【0036】

本発明はさらに、障害のHDACインヒビターを用いた処置が開始/継続されるかどうかを判断するための、分子マーカーの量を決定する手段の使用に関する。この態様は、前記HDACインヒビターまたは潜在的なHDACインヒビターを用いた療法に应答する患者および腫瘍実体の識別と、患者におけるHDAC処置の有効性をモニタリングすることと；HDACインヒビターへの治療应答を予測することと；疾患、たとえば結腸癌を診断することと、を含む。

40

【0037】

本発明は、(i)分子マーカーの量を決定する手段；および(ii)HDACインヒビターを含有する診断キットにも関する。キットの好ましい実施形態は、上述したような本発明の方法または使用の好ましい実施形態に一致する。

【0038】

好ましくは本発明の使用または方法は、インビトロで実施されるステップのみを含む。したがってこの実施形態により、ヒトまたは動物の体から組織材料を入手するステップは、本発明には含まれない。

【0039】

HDACインヒビターによるHDAC-2の選択的プロテオソーム分解

50

H D A C インヒビターを用いる癌療法は、腫瘍細胞における分化および/またはアポトーシスを誘導する。これはH D A C 依存性物質、たとえばヒストンおよび転写因子(たとえば腫瘍サプレッサ p 5 3) の過剰アセチル化を包含するプロセスで実現され、次に分化またはアポトーシスを促進する遺伝子の発現を調節する。したがって本発明は、あるH D A C インヒビターが、E 2 ユビキチン結合酵素U b c 8 の発現、およびE 3 ユビキチンリガーゼR L I M による、イソ酵素H D A C - 2 の同時に起こる特異的プロテアソーム分解を誘導する能力にも関し、このことはヒストンデアセチラーゼの酵素阻害と相乗的に作用する、特定のH D A C インヒビター、たとえばバルプロ酸の活性に新規な態様を加える。

【 0 0 4 0 】

本発明は、U b c 8 をアップレギュレートして、H D A C - 2 発現をダウンレギュレートするH D A C インヒビター、たとえばバルプロ酸に対する治療応答を予測するための、患者からの腫瘍におけるU b c 8 およびH D A C - 2 発現の診断使用にも関する。特定のH D A C インヒビター、たとえばバルプロ酸の治療中の有効性をモニタリングするために、腫瘍中のH D A C - 2 発現の使用も含む。

10

【 0 0 4 1 】

さらに本発明の詳細な態様は、H D A C インヒビターまたは推定されるH D A C インヒビター活性を備えた化合物の、H D A C - 2 および/またはR L I M 発現をダウンレギュレートして、U b c 8 発現をアップレギュレートする能力についてのプロファイリングに関する。H D A C - 2 、R L I M およびU b c 8 の発現を分析する方法は、検出のための核酸技術の、好ましくはハイブリダイゼーションまたはポリメラーゼ連鎖反応の使用を含む。しかしながら他の種類の核酸技術も利用できる。本発明の別の実施形態は、検出のための上述のタンパク質に対する特異的抗体の使用を含む。

20

【 0 0 4 2 】

H D A C インヒビターによって誘導されたアポトーシス経路の分子マーカー

正常細胞は、プログラムされた細胞死またはアポトーシスと呼ばれる自己破壊の固有機構を有する。このバランスは、多すぎる成長および少なすぎる死を誘導する癌細胞において妨害されることが多い(Igney and Kramer, 2002, Nature Reviews Cancer 2: 277-288)。これらの機構の分子レベルでの理解は最終的に、アポトーシス感受性の調節に基づく新しい治療手法に至る。アポトーシスは、腫瘍壊死因子(TNF) レセプタスーパーファミリーに属する、いわゆるデスレセプターの活性化によって誘導できる。デスレセプターは、その天然リガンドである、T N F アルファ、C D 9 5 L およびT R A I L を含むT N F ファミリーによって活性化される。このことは、次にアポトーシスを誘導するカスパーゼ8 を含有する、死誘導シグナル伝達複合体(DISC) の活性化を引き起こす。この経路のいずれかの構成要素のアップレギュレーションは、アポトーシス促進性シグナルの効果を向上させる。

30

【 0 0 4 3 】

アポトーシスプロセスは、各種のレギュレータータンパク質、たとえば中でも最も重要なミトコンドリアB C L 2 ファミリー構成要素によって厳密に制御される。B C L 2 ファミリーの構成要素は、抗アポトーシス性、たとえばB C L 2 、B C L - X L 、B C L - w、および前アポトーシス性タンパク質、たとえばB A X 、B A K 、B I D 、B A D に分類できる。抗アポトーシス性B C L 2 ファミリー構成要素は、腫瘍のアポトーシスに対する耐性に関与するように思われる。たとえばB C L - X L は、癌細胞における複数のアポトーシス誘導経路への耐性を付与することが可能であり、構成的活性上皮成長因子レセプタによってアップレギュレートされるように思われる。B C L - X L の高発現は、多くのヒト癌に見いだされ、しばしば負の予後因子である。したがって、特定の癌細胞におけるB C L - X L 発現のダウンレギュレーションは、アポトーシスを直接誘導するか、アポトーシス性刺激に対して細胞を感作させるかのどちらかである。

40

【 0 0 4 4 】

本発明は、特定のH D A C インヒビター、たとえばバルプロ酸の、癌細胞においてアポトーシス促進性分子T R A I L およびカスパーゼ8 の発現を特異的に誘導させて、抗アポ

50

トーシス性分子 BCL - XL の発現をダウンレギュレートする能力に関し、これらの HDAC インヒビターによって誘導されるアポトーシスの誘導およびアポトーシス性刺激に対する感作の機構へのより深い洞察を提供する。加えて本発明は、TRAIL およびカスパーゼ 8 発現をアップレギュレートし、BCL - XL 発現をダウンレギュレートする HDAC インヒビター、たとえばバルプロ酸への治療応答を予測するために、患者からの腫瘍における TRAIL、カスパーゼ 8 および BCL - XL 発現の診断使用に関する。治療の途中での特定の HDAC インヒビター、たとえばバルプロ酸の有効性をモニタリングするための、腫瘍における TRAIL、カスパーゼ 8 および BCL - XL 発現の使用も含む。

【0045】

もう 1 つの実施形態において、本発明は、HDAC インヒビターまたは推定される HDAC インヒビター活性を備えた化合物の、BCL - XL 発現をダウンレギュレートして、TRAIL およびカスパーゼ 8 発現をアップレギュレートする能力についてのプロファイリングに関する。TRAIL、カスパーゼ 8、および BCL - XL 発現を分析する方法は、検出のための核酸技術の、好ましくはハイブリダイゼーションまたはポリメラーゼ連鎖反応の使用を含む。しかしながら他の種類の核酸技術も利用できる。別の実施形態において、方法は、検出のための上述のタンパク質に対する特異的抗体の使用を含む。

【0046】

以下の実施例は、本発明をさらに説明する：

【実施例 1】

【0047】

HDAC インヒビターは正常血液細胞においてではなく、癌細胞において、TRAIL 発現、カスパーゼ 8 活性化およびアポトーシスを誘導する (図 1 ~ 5)。

【0048】

別個の作用機構が変化するが、癌療法はなお、最終経路として、癌細胞でアポトーシスを引き起こす能力に依存している。HDAC インヒビターは、抗アポトーシス性分子、たとえば BCL - XL および BCL - 2 のダウンレギュレーションによって、特定の癌細胞におけるアポトーシスを誘導することがすでに示されている。一般にアポトーシスの誘導は、癌療法において HDAC インヒビターを用いて、治療的に活用できる。我々は、HDAC インヒビター (すなわちバルプロ酸 - VPA) が、急性前骨髄球性白血病 (APL; 図 1) のマウス白血病モデルを使用した癌処置に使用できるという、新たな証拠を示す。我々は、HDAC インヒビター、たとえば VPA が APL を有するマウスの白血病細胞中のヒストン過剰アセチル化 (図 2) およびアポトーシス (図 3) を誘導することを証明する。本発明により、HDAC インヒビター (すなわちバルプロ酸) は、TRAIL 発現をアップレギュレートし、カスパーゼ 8 を活性化することによって、白血病細胞癌細胞におけるアポトーシスを誘導する。このプロセスは、正常細胞には見られない。

【0049】

方法

図 1 : (A) 二次急性前骨髄球性白血病をマウスに誘導した。簡単には、一次白血病を PML - RAR 発現骨髄細胞を尾静脈に注入することによって、マウスに誘導した。顕性白血病を持つマウスを安楽死させ、白血病細胞を脾臓から収集した。白血病細胞 (1×10^7 細胞 / マウス) を、非照射同系レシピエントマウスに再度静脈内注射した。二次レシピエントマウスは、2 ~ 3 週間後に顕性白血病を発症した。次に白血病マウスおよび健常マウス (対照) を、プラセボ (レーン 1、2) または VPA (12 時間ごとに 400 mg / kg) で連続 2 週間処置した。(B) 白血病マウスをプラセボ (より少量、対照) または VPA (12 時間ごとに 400 mg / kg、上) で 1 週間処置した。処置の終了時に、マウスを殺処分し、脾臓を写真撮影した。

【0050】

図 2 : (A) 二次急性前骨髄球性白血病を上述のように、マウスに誘導させた。次に (A) 白血病マウスまたは健常マウス (対照) をプラセボまたは VPA (400 mg / kg) によって 3 時間および 6 時間処置した。次にマウスを殺処分して、脾臓から全細胞抽出

10

20

30

40

50

物を調製し (>70%白血病浸潤を用いて)、SDS-PAGE、続いてアセチル化ヒストンH3に対する市販の抗体を使用したウェスタンブロット分析によって分析した。(B)アセチル化ヒストンに対するモノクローナル抗体を使用する、VPA処置白血病マウスの免疫組織化学分析。

【0051】

図3(A)二次急性前骨髄球性白血病を上述のように、マウスに誘導させた。次に白血病患者マウスを、プラセボ(対照)、またはVPA(12時間ごとに400mg/kg)で処置した。処置開始の48時間後にマウスを殺処分して、次に白血病患者脾臓を固定化し、組織検査のために染色するか(ヘマトキシリン-エオシン、左パネル)、あるいはアポトーシス細胞の存在について分析した(TUNELアッセイ、右パネル)。(B)二次白血病患者を上のように得た。末梢器官の白血病患者による浸潤が>75%(脾臓)であるときに、マウスを殺処分した。健常マウスからの脾細胞(対照として採取、左パネル)、または白血病患者マウスからの脾細胞(>75%芽細胞、右パネル)を、培地に置き、次にVPA(1mM)で48時間処置した。処置の終了時に、ヨウ化プロピジウム染色によってアポトーシスを測定した。これらのサブG1エリアは、アポトーシスを受けている断片化DNAを備えた細胞に相当する、低二倍体DNAピークを示す。

10

【0052】

図4:(A)二次急性前骨髄球性白血病患者を上述のように、マウスに誘導させた。次に白血病患者マウスまたは健常マウス(対照)を、プラセボ(レーン1、3)、VPA(12時間ごとに400mg/kg)、全トランスレチノイン酸(RA 5mgを含有する21日間放出ペレットまたはプラセボ:レーン8-9)、およびVPA+レチノイン酸(レーン10-11)で処置した。マウスは、処置の開始の18時間後(レーン4-5)、または36時間後(レーン3、6-7、10-11)に殺処分した:全RNAを脾臓(Giems染色によって評価されたように、白血病患者芽細胞の>75%浸潤)から収集し、RNAセットンパク質保護アッセイによって分析して、TRAILの発現を確認した。FafおよびGAPDHは、これらの処置によって影響されない対照として使用した。(B)Calu-3細胞(ヒト、非小細胞肺癌由来細胞系)を、VPA(1mM)によって指示した回数処置した。RNAを抽出し、TRAILに対して特異的なプライマーを使用して定量PCR(Perkin-Elmer)によって分析した。GAPDHを使用して正規化した。

20

【0053】

図5:白血病患者芽細胞は、組織検査によって評価されたように、腫瘍細胞の>75%浸潤を有する二次白血病患者マウスの脾臓から採取した。細胞を培地に置き、指示したように、指示されたTRAILおよび/またはカスパーゼ8インヒビターの非存在下または存在下でVPA(1mM)を用いて48時間処置した。処置の終了時に、アポトーシスを上述のように測定した。

30

【0054】

結果

HDACインヒビター処置の有効性をマウス白血病患者モデルにおいて試験した。顕性二次白血病患者マウスの生存曲線は、VPA処置が白血病患者マウスの生存を統計的に有意な方法で延長することを示した($P < 0.01$ 、図1A)。加えてVPAは、芽細胞浸潤によって引き起こされた脾腫の劇的な減少を引き起こした(プラセボをVPA処置と比較、図1B)。HDACインヒビター処置の活性をさらに分析するために、我々は、脾臓(正常脾臓または>70%白血病患者浸潤を有する白血病患者脾臓のどちらか)から調製した全細胞抽出物を使用した。VPAは、正常マウスと、白血病患者マウスの両方でヒストンアセチル化のレベル上昇を誘起した(図2A)。さらにアセチル化ヒストンに対するモノクローナル抗体を使用したVPA処置白血病患者マウスの免疫組織化学分析はVPA処置時に、白血病患者芽細胞を含むすべての細胞においてヒストンアセチル化の劇的な上昇を示す(図2B)。次に白血病患者脾臓から得た細胞をVPAを用いた、または用いない処置後にアポトーシス細胞の存在について分析した(TUNELアッセイ、図3A、右パネル)。結果は、VPAが白血病患者脾臓内で広範囲のアポトーシスを誘導することを示している。これらのデータを確認するた

40

50

めに、健常マウス（対照として採取、図3B、左パネル）からの、または白血病マウス（>75%芽細胞、図3B、右パネル）の脾細胞を培地に置き、次にVPA（1mM）を用いて48時間処置した。処置の終了時に、アポトーシスをヨウ化プロピジウムで測定し、VPAは、白血病細胞の広範囲のアポトーシスを誘導するが、正常脾細胞のアポトーシスを誘導できないことが示された。

【0055】

癌細胞におけるアポトーシスの選択的誘導の病理機構を理解するために、我々はHDACインヒビター処置がTRAIL発現を向上させるかどうかを調査した。図4Aに示すように、インビボVPA処置は、健常マウスの脾臓においてTRAIL発現の誘導を引き起こさなかった（レーン1-2）のに対して、分析した白血病マウスの2つの独立のセットにおける処置の全期間に渡って、レチノイン酸処置96時間（レーン8-9）と同じ強さで、TRAILを発現した（レーン3-5、実験1；レーン6-7、実験2）組合せRA+VPA処置は、TRAIL発現をさらに上昇させなかった（レーン10-11）。さらに図4Bに示すように、TRAILはVPAによる処置によって、ヒトCalu-3癌細胞において強力に誘導され、TRAILも非白血病癌細胞におけるVPAの標的であることが示され、VPA処置の結果として、TRAIL誘導が腫瘍細胞における細胞死の誘導に幅広く寄与するという原則が拡張される。このことは、白血病細胞をTRAILまたはカスパーゼ8のインヒビターによりアポトーシスから救出できた実験において確認された。図5のデータからわかるように、TRAILレセプタ/Fcキメラ活性（TRAILを滴定可能であり、内在性レセプタを通じたシグナル伝達を阻害する）による、またはカスパーゼ8インヒビター（活性化TRAIL下流のカスパーゼ8の活性化を直接ブロック）によるTRAILの阻害が、VPAの効果の一部（単一処置）、または全体的に（複合処置）ブロックできた実験において、TRAIL経路がVPA作用の重要なエフェクタであることを示す。

【実施例2】

【0056】

バルプロ酸が、HDAC-2のプロテアソーム分解を誘導するHDACインヒビターのクラスを定義する（図6-10）。

【0057】

ヒストンアセチルトランスフェラーゼ（HAT）およびヒストンデアセチラーゼ（HDAC）の補充は、細胞増殖および分化において重要な役割を果たしている多くの遺伝子の動的調節の主要な要素と考えられている。ヒストンH3およびH4のN末端テールの過剰アセチル化は、遺伝子活性化と関連しているが、これに対して脱アセチル化は、転写抑制を仲介することができる。結果として多くの疾患が、転写因子に影響する突然変異によって引き起こされた遺伝子発現における変化に結び付けられてきた。白血病融合タンパク質、たとえばPML-RAR、PLZF-RAR、AML-ETOおよびStat5-RARによる異常抑制は、この点でプロトタイプ例を勤めるが、同様の事象が多くの他の種類の癌における病原にも寄与することがますます明白になっている。

【0058】

哺乳動物ヒストンデアセチラーゼは、3つのサブクラスに分類できる（Gray and Ekstrom, 2001）。酵母RPD3タンパク質のホモログであるHDAC1、2、3、および8は、クラスIを構成する。HDAC4、5、6、7、9、および10は、酵母Hda1タンパク質に関連し、クラスIIを形成する。最近、酵母Sir2タンパク質の複数の哺乳動物ホモログが、NAD依存性であるデアセチラーゼの第3のクラスを形成することが確認された。これらのHDACはすべて、大量の多タンパク質複合体のサブユニットとして、細胞中に存在すると思われる。特にクラスIおよびII HDACは、転写因子へのHDACの補充に必要な架橋因子として作用する転写コリプレッサのmSin3、N-CoRおよびSMRTと相互作用することが示されている。

【0059】

プロテアソームは、多くの律速酵素、転写レギュレータおよび重要な調節タンパク質の

10

20

30

40

50

迅速な分解を触媒するATP依存性タンパク質分解経路の不可欠な成分である、非リソソームタンパク質分解の中心酵素複合体として幅広く認識されている。プロテアソームは、突然変異または翻訳後損傷を介して生じる高度に異常なタンパク質の除去に必須であり、哺乳動物細胞中のタンパク質塊のより低速の分解において主要な役割を果たす。プロテアソームは、より高等な真核生物で抗原プロセッシングに決定的に関与している。

【0060】

本発明は、特定のHDACインヒビター、特にバルプロ酸がHDAC-2タンパク質の分解を選択的に誘導する能力を、そのHDAC阻害活性に加えて示す。HDAC-2タンパク質レベルのこの選択的低下は、バルプロ酸および酪酸による刺激の後に見られるが、他のHDACインヒビター、たとえばトリコスタチンA、トラボキシシン、およびMS-275による刺激の後には見られない。それゆえHDACインヒビター、たとえばバルプロ酸は、2つの異なる作用方式によってHDAC-2を不活化する：それらはHDAC-2活性を阻害し、プロテアソーム分解を誘導させる。これらの複合活性の測定は、HDAC活性を有する酵素の、新規な、そして潜在的にさらに強力なインヒビターの同定のためのプロファイリングツールとして役立つ。

【0061】

方法

図6：(A) F9奇形癌またはHEK293T胚性腎臓細胞を、1mM VPAに指示された時間暴露した。HDAC-2および参照のためのHDAC-1または3(HDAC8; N-CoRおよびSin3、データは示さず)のタンパク質レベルを、ウェスタンブロット分析によって決定した。(B) HDAC-2タンパク質低下のVPA用量への依存性は、暴露36時間後にF9またはHEK293T細胞中で決定した。(C) HDAC-2タンパク質の量に対する他のHDACインヒビターの効果は、F9細胞中の経時分析でTSA(100nM)を用いて決定した(左パネル)。HDACインヒビターTSA(100nM)、トラボキシシン(TPX、10nM)、ブチラート(1.5mM)またはMS275(5μM)をHEK293T細胞での単回暴露で試験した(右パネル)。

【0062】

図7：F9細胞またはHEK293T細胞は、1mM VPAによって指示された時間だけ処置して、HDAC-2 mRNAのレベルをポリA⁺RNA 5μgからノザンブロット分析によって決定した。

【0063】

図8：HDAC-2の合成および分解速度は、³⁵S-メチオニンによるパルス代謝標識およびパルス追跡分析によって分析した。³⁵S標識HDAC-2はHDAC-2特異的免疫沈降によって検出し、SDS-PAGE分離およびオートラジオグラフィーを続けた。(A) パルス標識は、未処置のままか、または1mM VPAで24時間処置したF9およびHEK293T細胞中で1時間実施した。(B) パルス追跡分析の場合、細胞は未処置のままか、1mM VPAで24時間処置し、VPAの存在下または非存在下で³⁵S-メチオニンによってさらに1時間標識した。³⁵S-メチオニンの除去および非標識メチオニンの添加の後に、放射性標HDAC-2の除去を6時間に渡って続けた。パルス追跡分析も、VPA前処置なしで、追跡期間が開始したときのみVPAを添加して((+)列によって示す)HEK293T細胞中で実施した。HEK293T細胞抽出物からHDAC-3も参照のために沈降させた。

【0064】

図9：(A) HEK293T細胞をVPAで24時間処置するか、または未処置のままとした。細胞浸透性プロテアーゼインヒビターのペプスタチンA、ロイペプチン、またはALLMをVPA添加時に指定通りに添加した。(B) プロテアソームインヒビターALLNまたはMG-132を指定された濃度で、細胞を収集する4時間前に添加した。HDAC-2のタンパク質レベルは、ウェスタンブロット分析によって決定した。

【0065】

図10：(A) 高分子量ポリユビキチン化タンパク質の総量は、細胞のVPA処置によ

10

20

30

40

50

って変化しなかった（左2レーン）。抗HDAC-2免疫沈降物中のユビキチン化タンパク質の存在を、パネルの右部分に示す。細胞は未処置のままか、VPA（1.5 mM、24時間）またはプロテアソームインヒビターALLN（5 μM、24時間）またはその両方に暴露させた。沈降物中のユビキチン化タンパク質は、ウェスタンブロット分析によって検出した。レーンNでは、抗HDAC-2抗体の代わりに非免疫血清を使用した。（B）HEK293T細胞のVPA処置時のモノ-および/またはオリゴ-ユビキチン化HDAC-2の存在は、His6標識ユビキチンの異所性発現によって決定し、VPA処置を指示された通りに36時間に渡って続けた。分析の4時間前にプロテアソームインヒビターMG-132を添加して、ユビキチン化タンパク質の蓄積を向上させた。非ユビキチン化HDAC-2の電気泳動移動度および不変の存在は、全細胞抽出物のウェスタンブロット分析によって決定した（左パネル）。ユビキチン化タンパク質は、Ni²⁺-NTA-アガロースを用いて沈降させ、ユビキチン化HDAC-2の存在について、沈降物のウェスタンブロット分析によって分析した（中央パネル）。モノ-またはポリ-ユビキチン化HDAC-2の予想された移動度を持つ抗HDAC-2免疫反応性バンドを、カッコによって示す。沈降物のウェスタンブロットも、標識ユビキチンの匹敵する発現および対照およびVPA処置細胞のユビキチン化タンパク質の一般細胞プール内への標識ユビキチンの等しい取込み効率を確保するために、ポリヒスチジンタグに対する抗体によって（右パネル）プローブした。

10

【0066】

結果

20

細胞およびマウスのVPA処置によるHDAC-2タンパク質レベルの低下
VPAまたは他のHDACインヒビターがまた、HDAC酵素活性を阻害することに加えて、たとえば代償性フィードバックループにおいて発現またはHDACタンパク質レベルに影響を及ぼすかどうかを試験する間に、我々は、VPA処置細胞におけるHDAC-2タンパク質レベルの一貫したダウンレギュレーションを見出した。タンパク質レベルの、未処置細胞の約30%までの低下は、VPA暴露の24時間後に見出され、少なくとも48時間まで持続する（図6A）。HDAC-2タンパク質レベルは、ネズミF9奇形癌、ヒト胚性腎臓HEK293T細胞（図6A）、ヒトK562白血病細胞およびマウスNIH3T3細胞で低下する。HDAC-1、HDAC-3のタンパク質レベルは低下しないが、一部の試験で一時的な誘導を示す（図6A）。HDAC-2タンパク質レベルは、VPA暴露に対して遅延応答を示し、中間ステップ、たとえば中間遺伝子産物の誘導の必要性を示唆する。HDAC-2タンパク質レベルの低下に必要なVPA用量は、HDAC酵素活性の阻害に必要な用量と同様であり、たとえば明確な効果は0.5~1 mMで検出される。VPAのより高い容量に耐える一部の細胞、たとえばHEK293Tにおいて、VPA濃度を5または10 mMに上昇させると、わずかにより顕著な低下が見られる（図6B）。

30

【0067】

HDAC-2タンパク質レベルの低下は、カルボン酸HDACインヒビター、たとえばVPA、ブチラートおよびEXHAに特異的である。ヒドロキサム酸TSAによる48時間までの処置は、HDAC-2レベルをF9またはHEK293T細胞のどちらにおいても低下させない（図6C）。F9細胞において、48時間TSAは、細胞消失およびアクチン負荷対照における低下によって示されるように毒性である。HDACを阻害しないVPA由来アミドのバルプロミドは、HDAC-2タンパク質レベルに影響を与えない。環状テトラペプチドHDACインヒビターのトラボキシンも、アニリドベースのHDACインヒビターのMS-275も、HDAC-2タンパク質レベルの低下を誘導しない。

40

【0068】

しかしながら、HDAC-2タンパク質レベルの低下を引き起こす条件下では、HDAC-2 mRNAレベルの応答は、F9細胞でも、HEK293T細胞のどちらでも見られなかった（図7）。

【0069】

50

HDAC - 2 タンパク質の誘導されたプロテアソーム分解

定常状態 mRNA レベルの変化の非存在下で変化したタンパク質レベルは、タンパク質合成またはタンパク質分解の速度に対する効果を強く示唆している。VPA 前処置 (24 時間) ありおよびなしの HDAC - 2 タンパク質合成速度は、F9 細胞または HEK293T 細胞における ^{35}S - メチオニンを用いたパルス標識によって比較した。対照と VPA 処置細胞との間の HDAC - 2 合成速度の実質的な相違は、見出されなかった (図 8 A)。

【0070】

タンパク質の半減時間は、F9 細胞および HEK293T 細胞の両方において、パルス追跡分析によって決定した。HDAC - 2 の半減期は、VPA を用いた細胞の前処理によって実質的に短縮された (図 8 B)。VPA は、追跡時間においてのみ添加した場合、HDAC - 2 タンパク質分解速度に対する影響を持たず (図 8 B で (+) が付いたパネル)、VPA へに対する HDAC - 2 タンパク質レベルの応答がたとえば HDAC - 2 の立体配座変化に対する直接応答というよりはむしろ、間接応答であるというさらなる示唆を与える。HDAC - 3 の分解は、HEK293T 細胞の VPA 前処置によって影響を受けず (図 8 B)、VPA 処置時の定常状態 HDAC - 3 タンパク質レベルの低下の欠如と一致していた。

【0071】

HDAC - 2 分解がプロテアーゼ依存性またはプロテアソーム分解のどちらによるかを判定するため、プロテアーゼ (図 9 A) またはプロテアソーム (図 9 B) の複数のインヒビターを、VPA と合わせて利用した。プロテアーゼインヒビターのペプスタチン A、ロイペプチンまたは ALLM のいずれも、対照または VPA 抑制 HDAC - 2 タンパク質レベル (図 9 A) に対して効果を持たなかった。プロテアソームインヒビター ALLN または MG - 132 を用いた HEK293T 細胞の同時処置は、HDAC - 2 の VPA 誘導性分解を完全に消滅させた (図 9 B)。それゆえ中間因子の合成を含む間接機構によるプロテアソーム分解の増加は、HDAC - 2 タンパク質の VPA 誘導性分解の最も適した機構と考えられる。

【0072】

プロテアソーム分解の必要条件は、プロテアソームによる認識のための、基質タンパク質の「標識付け」である。プロテアソーム標的化の最も一般的な機構は、ポリユビキチン化に依存し、したがってユビキチン化 HDAC - 2 の存在および VPA 依存性誘導を試験した。第一に HDAC - 2 に対する抗体を用いて調製した免疫沈降物を、高分子量ユビキチン化タンパク質の存在について、ユビキチンに対するウェスタンブロットによって分析した。未処置細胞は、HDAC - 2 に対する抗体によって沈降するタンパク質を含有する少量のユビキチンを含有している (図 10 A)。ユビキチン化タンパク質の分解を防止するためのプロテアソームインヒビター ALLN による、あるいは VPA による、細胞の前処置は、この抗ユビキチン反応性タンパク質の量を増加させる。VPA および ALLN による同時処置は、高分子量ユビキチン化タンパク質の量をさらにもっと増加させる。これに対して、細胞ユビキチン化タンパク質の全量は、VPA 処置によって適度に減少される。TSA は、免疫沈降抗ユビキチン反応性物質の量に対して効果を持たない。これらのデータは、VPA 処置が HDAC - 2 に対する抗体によって沈降するタンパク質のユビキチン化を誘導することを示唆する。

【0073】

HDAC - 2 のユビキチン化の形態を検出することを狙った後者の種類のアッセイは、His₆ - 標識ユビキチンの一時的発現によって、沈殿のための Ni²⁺ - NTA アガロースを使用してさらに改良される (図 10 B)。組換えユビキチンの発現は、HDAC - 2 の全細胞量に実質的に影響を与えず、仮にも存在する場合は、HDAC - 2 のユビキチン化形は、全細胞抽出物からのウェスタンブロット分析の検出限界以下である (左パネル)。Ni²⁺ - NTA アガロース沈降物は、ウェスタンブロットが抗 His - tag 抗体によってプローブされるときに、分離されたタンパク質サイズのほぼ全範囲に渡るユビキチン

10

20

30

40

50

化タンパク質を含有する（右パネル）。ユビキチン化タンパク質の検出は、標識ユビキチンを発現するために形質転換されないならばシグナルが見られないので、特異的である。全体的に多量なユビキチン化タンパク質は、細胞のVPA処置によって変化しない。約60 kDにおける顕著なバンドはたいてい、発現ベクターによってコード化されたユビキチンコンカテマーを表す。HDAC-2の存在についてプローブされた場合、Ni²⁺-NTAアガロース沈降物は、オリゴ-およびポリユビキチン化HDAC-2の存在を明らかに示す（中間パネル）。64および81 kDaの間で移動する顕著なバンドはたいてい、モノユビキチン化HDAC-2を示し、高分子量ポリユビキチン化までの任意の程度のHDAC-2ユビキチン化の予想移動度と一致する、バンドのラダーが見いだされる。これらのバンドは、未処置細胞からの沈降物中の少ない量においても見られ、細胞がVPAによって前処置される場合には、はるかに豊富である。His標識ユビキチンを発現しない場合にはそのようなバンドは見られないため、検出はユビキチン化HDAC-2に対して特異的である。HDAC-2特異性は、固有の抗体の使用によって確立される。64 kDaのすぐ下でHDAC-2と同時移動するバンドはたいてい、すべてがユビキチン化される必要のない複数のHDAC-2分子を含有するより大きなコリプレッサ複合体と共によく同時沈降できる非修飾HDAC-2に一致する。要約すれば、データのこの部分は、TSAによってではなく、VPAによって誘起できる機構によりプロテアソームによって、HDAC-2がユビキチン化および分解できることを示している。

10

【実施例3】

【0074】

20

バルプロ酸は、E2ユビキチン結合酵素Ubc8の発現を誘導し、E3ユビキチンリガーゼ、RLIMによるHDAC1-3のユビキチン化を引き起こす、HDACインヒビターのクラスを定義する（図11~13）。

【0075】

ユビキチン経路を介したタンパク質の分解は、2つの連続ステップ：（1）複数のユビキチン分子の共有結合による基質の標識化、そして（2）遊離および再利用可能なユビキチンの放出による26Sプロテアソーム複合体による標識タンパク質の分解、を包含する。

26Sプロテアソームは、タンパク質分解のユビキチン/ATP依存性経路の主要な酵素複合体である。26S複合体はATPを結合し、ユビキチンとの結合による分解を標的としたタンパク質の分解の原因である。ユビキチンは、一連のユビキチン結合酵素E1、E2およびE3によって標的上のリジンのイプシロン-アミノ基とユビキチンのC末端グリシン残基との間に形成されたイソペプチド結合によって、標的タンパク質に結合される。ユビキチン結合酵素は、ユビキチン鎖を1つの酵素から次の酵素に移動させ、続いてE2酵素からの活性化ユビキチン鎖を標的タンパク質へ移動させることによって連続して作用する。次にモノユビキチン化タンパク質に対して再度作用され、同じ酵素が追加のユビキチン分子を前の酵素に結合させる。ユビキチン結合は継続して、高分子量タンパク質複合体を生じさせる。次にこのポリユビキチン化産物は、イソペプチダーゼによって触媒されたユビキチンの付随する再生利用により、26Sプロテアソームによる迅速な分解の標的となる（Ciechanover and Schwartz, 2002, Hepatology 35 : 3-6）。

30

40

【0076】

本発明は、特定のHDACインヒビター、すなわちバルプロ酸が、E3ユビキチンリガーゼ、RLIMの発現を変更することなく、E2ユビキチン結合酵素Ubc8の発現を選択的に誘導する能力を示す。Ubc8の誘導は、RLIM関連タンパク質、たとえばHDAC-2のユビキチン化を向上させる。これに対して、一部のHDACインヒビター（たとえばTSA）が、E3リガーゼRLIMの向上したプロテアソーム分解を誘導させ、これが結果的にHDAC-2ターンオーバーの限定要因となる。これらの観察は、異なるHDACインヒビターによる処置時に見られたHDAC-2タンパク質レベルに対する差次的効果についての、説得力のある説明を提供する。

【0077】

50

方法

図11(A) F9細胞を1mM VPAによって指示された回数だけ処置し、ポリA⁺ mRNA 5μgから、cDNAの3'-UTRに由来するプローブを用いてUbc8 mRNAの存在量をノザンプロット分析によって決定した。GAPDH mRNAは参照として決定された。定量評価のためにPhosphorimager分析を実施し、GAPDHに正規化された相対値をグラフの下に示す。同じ結果の2つの実験の一方を示す。(B) Ubc8 mRNAは、1サイクル当たり1.5倍増幅と仮定して、リアルタイムPCRによっても決定した。アンプリコンは、Ubc8 mRNAのコード化配列の一部であった。F9細胞を1mM VPA(V)または100nM TSA(T)を用いて17時間処置した。結果は、GAPDH発現について正規化した。2回の測定の平均値 ± 10

【0078】

図12(A) RLIMタンパク質レベルは、HDACインヒビターVPA(0.5、1.5、または5mM)、TSA(30、100または300nM)またはVPA(1.5mM) およびTSA(100nM)の組合せを用いたHEK293T細胞の処置の24時間後に、ウェスタンプロット分析によって決定した。アクチンタンパク質レベルを、等しい負荷の対照として示す。(B) RLIMタンパク質レベルは、HDACインヒビターTSA(100nM)、プロテアソームインヒビターALLN(2.5μM)または両方の組合せを用いたHEK293T細胞の処置の24時間後に、ウェスタンプロット分析によって決定した。アクチンタンパク質レベルは、等しい負荷の対照として示す。 20

【0079】

図13: インビトロ翻訳³⁵S-メチオニン標識HDAC1-3は、E1ユビキチンリガーゼおよびユビキチンのみを含む緩衝液中で、またはnE3リガーゼRLIMなしの、E3リガーゼRLIMを含む、組換え発現されたE2ユビキチンリガーゼUbc8を含有する反応物中で、2時間インキュベートした。対照(左レーン)では、反応をユビキチンおよびE1リガーゼの添加直後に停止させた。インプットHDACの消失および高分子量の放射性標識タンパク質の出現は、SDS-PAGEによって、続いてオートラジオグラフィによって決定した。

【0080】

結果

HDAC1-3のユビキチンリガーゼの同定

HDAC-2分解を仲介できるユビキチン化機構のタンパク質は、2つの手法によって同定した。F9細胞中でのVPA誘導性遺伝子の体系的な探索は、E2結合酵素Ubc8をコード化する遺伝子の発現が、VPAによって誘導されることを明らかにした(図11)。RLIMのmSin3コリプレッサとの結合(Ostendorff et al., 2002, Nature 416: 99-103)は、E3ユビキチンリガーゼを、コリプレッサ複合体の他の成分、たとえばHDACに対しても活性となる第一の候補として同定した。興味深いことに、Ubc8はRLIMリガーゼに対してE2結合酵素として作用するため、両方のタンパク質が相乗的に作用する。 30

【0081】

VPAとは対照的に、一部のHDACインヒビター、たとえばTSAは、26SプロテアソームインヒビターALLNによって遮断することができるE3リガーゼRLIMのプロテアソーム分解の向上を誘導する(図12)。結果として、RLIMは、TSAの存在下で、HDAC-2ターンオーバーの限定因子となる。したがって、異なるHDACインヒビターによる処置時に、HDAC-2タンパク質レベルに対する異なる効果が見られる。 40

【0082】

Ubc8をE2ユビキチンリガーゼとして、RLIMをE3ユビキチンリガーゼとして用いたインビトロユビキチン化アッセイは、複数のクラスI HDAC、たとえばHDAC1-3(図13)、およびクラスII HDAC-4がUbc8/RLIMの基質であ 50

ることを示した。非修飾インビトロ翻訳HDACの消失は、モノ -、オリゴ -、およびポリ - ユビキチン化HDACの予想移動度の低速移動タンパク質の出現と同様にどちらも観察できる。効果的なユビキチン化は、両方の組換え発現タンパク質、Ubc8およびRLIMが反応に含まれる場合のみに見られるが、ユビキチンおよびE1リガーゼのみが存在する場合には見られない。HDAC - 2の場合、未修飾タンパク質の消失および低速移動ポリ - ユビキチン化形の出現が最も顕著であった。モノ - およびオリゴ - ユビキチン化の各種の形をおそらく表すラダーの形成は、HDAC - 1の場合によく見られた。どちらの場合も、データは、Ubc8およびRLIMが、細胞を含まないインビトロ反応において、HDAC1、2、および3をユビキチン化できることを明確に示している。

【実施例4】

【0083】

HDAC - 2は、ヒト結腸癌で過剰発現される(図14、表1)。

【0084】

結腸癌は、米国で2番目に頻繁に診断される悪性腫瘍であるとともに、癌死の2番目に多い原因である。外科手術が主要な処置であり、患者の約50%に治癒をもたらす。外科手術後の再発が大きな問題であり、しばしば最終的な死因である。癌胎児性抗原(CEA)の前処置血清レベルの上昇は、負の予後の関連を有する。ここで我々は、HDAC - 2がこれまで調査した結腸癌プローブの80%超で過剰発現される証拠を示す。

【0085】

本発明の1つの態様は、HDACインヒビターを用いた療法に反応する患者および腫瘍実体を識別するための、分子マーカーとしてのHDAC - 2発現の使用である。さらに腫瘍細胞におけるHDAC - 2発現は、患者におけるHDACインヒビター処置の有効性をモニタリングするために使用できる。

【0086】

方法

図14：結腸癌および適合正常組織パラフィンアレイ(Biocat, Heidelberg)は、キシレンおよび下降エタノール濃度勾配(エタノール濃度:100% 2x5分; 95% 3分; 70% 3分)の取替え2回によって脱パラフィン化して、PBS中で洗浄した。ブロッキングは、PBS中の10%正常ヤギ血清(DAKO Diagnostika, Hamburg)内で15分間実施した。HDAC - 2 - ウサギポリクローナル抗体(Zymed, San Francisco)の10% FCS/PBS中での10µg/mlによるインキュベーションを1時間実施した。スライドをPBSで3回洗浄した後、切片をCy3結合ヤギ - ウサギIgG F(ab')₂-フラグメント(10% FCS/PBS中、1:500)(Dianova, Hamburg)によって30分間、インキュベートした。PBS中での最終洗浄(3回)の後、切片をカバースリップで覆った。すべての写真は、Cy3に適したフィルタを用いてZeiss LSM 510レーザスキャニング倒立共焦点顕微鏡をによって撮影した。

【0087】

結果

ヒト組織におけるHDAC - 2発現を調査するために、各患者からの腫瘍組織および正常結腸組織の療法を含有する結腸癌患者46名からの生検をヒトHDAC - 2に対する抗体および免疫蛍光検査のための二次抗体によって染色した。図14に見られるように、HDAC - 2発現の非常にわずかな染色が正常組織で検出できるが、腫瘍組織からの生検の80%超がHDAC - 2の強力な発現を示した(図14および表1)。これは、HDAC - 2過剰発現が結腸癌の非常に一般的な特徴であり、結腸癌患者での予後および診断として使用できることを示している。さらにこれらの結果は、結腸癌患者が腫瘍組織でのHDAC - 2発現を低下させることを狙った処置から利益を得るという期待を向上させる。

【0088】

10

20

30

40

【表 1】

表 1：結腸癌患者の腫瘍生検における
HDAC-2発現の免疫蛍光検出の結果
(適合正常組織との比較)

	正常 HDAC-2 発現	過剰発現した HDAC-2	合計
サンプル数	8	38	46
% サンプル	17	83	100

10

【図面の簡単な説明】

【0089】

【図 1】VPA は、急性前骨髄球性白血病マウスの生存を向上させ（図 1 A）、VPA による処置後に急性前骨髄球性白血病マウスの脾腫を低下させた（図 1 B）（実施例 1）。

【図 2】VPA による処置（400 mg / kg）後の正常および白血病マウスにおける脾細胞でのヒストン過剰アセチル（図 2 A および B）（実施例 1）。

【図 3】VPA は、インビボ（図 3 A）およびインビトロ（図 3 B）で白血病細胞でのアポトーシスを誘導するが、正常脾細胞では誘導しない（実施例 1）。

【図 4】VPA は、インビボでの白血病細胞における（図 4 A）、および非白血病腫瘍細胞系における（図 4 B）、TRAIL 発現を誘導する（実施例 1）。

20

【図 5】TRAIL およびカスパーゼ 8 の阻害が、ネズミ APL 芽細胞の VPA 誘導アポトーシスを損なう（実施例 1）。

【図 6】TSA でなく、VPA が HDAC - 2 タンパク質レベルの低下を誘導する（実施例 2）。

【図 7】VPA は、HDAC - 2 mRNA レベルを変化させない（実施例 2）。

【図 8】VPA による HDAC - 2 タンパク質分解の誘導（実施例 2）。

【図 9】プロテアーゼインヒビターではなく、プロテアソームインヒビターが VPA 誘導 HDAC - 2 分解を抑制する（実施例 2）。

【図 10】HDAC - 2 が、VPA 処置に应答してユビキチン化される（実施例 2）。

【図 11】VPA は、E2 ユビキチンコンジュガーゼ Ubc8 の発現を誘導する（実施例 3）。

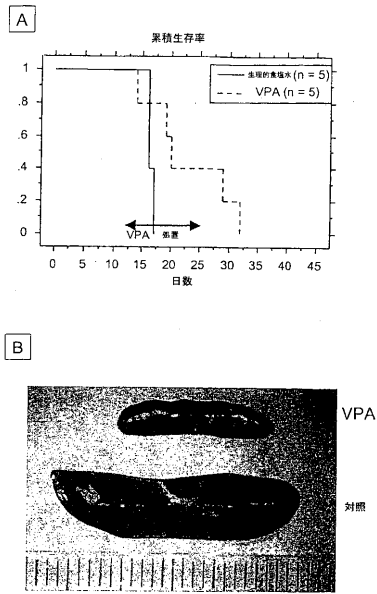
30

【図 12】VPA ではなく、HDAC インヒビター TSA が E3 ユビキチン化酵素 RLI M のプロテアソーム分解を誘導する（実施例 3）。

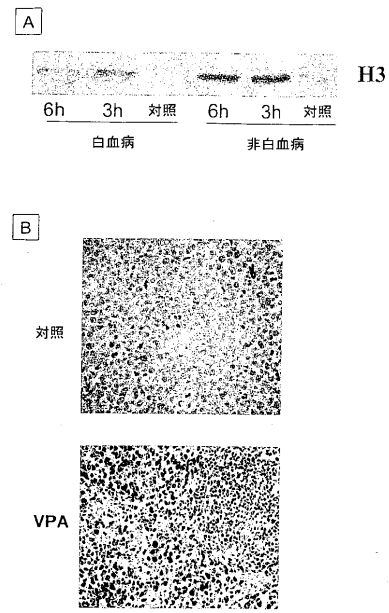
【図 13】HDAC の 1 - 3 のユビキチン化を誘導する、E3 ユビキチン化酵素、RLI M の同定（実施例 3）。

【図 14】ヒト結腸癌組織でアップレギュレートされる（実施例 4）。

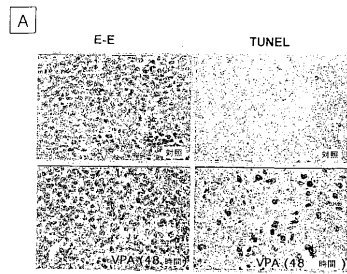
【 図 1 】



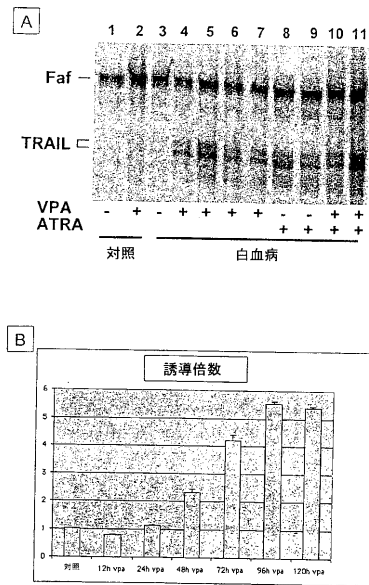
【 図 2 】



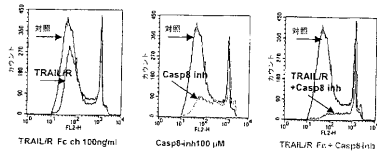
【 図 3 】



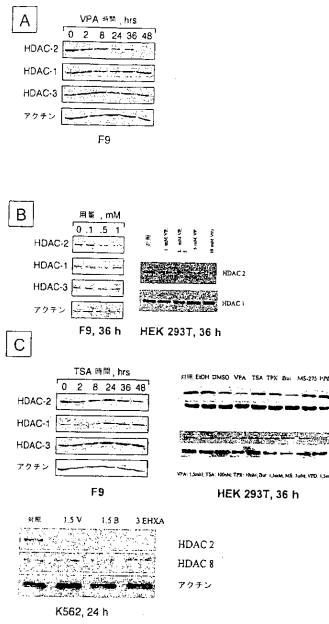
【 図 4 】



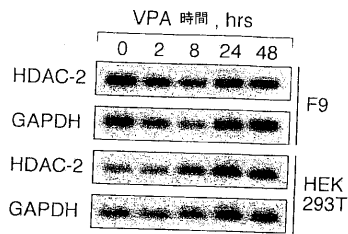
【図5】



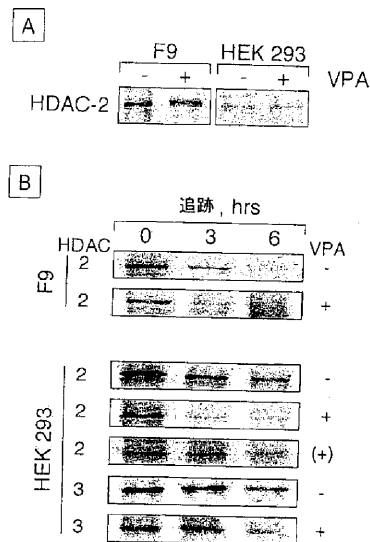
【図6】



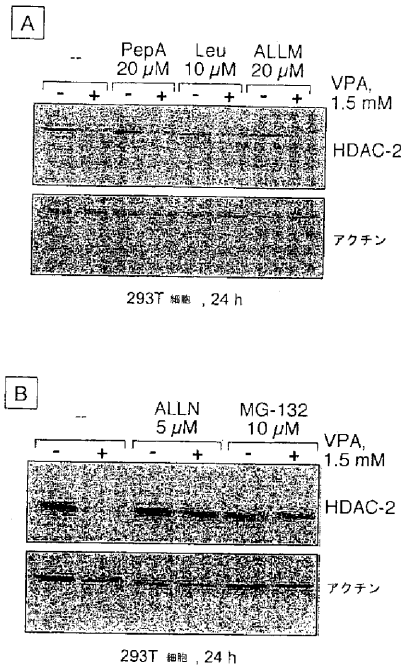
【図7】



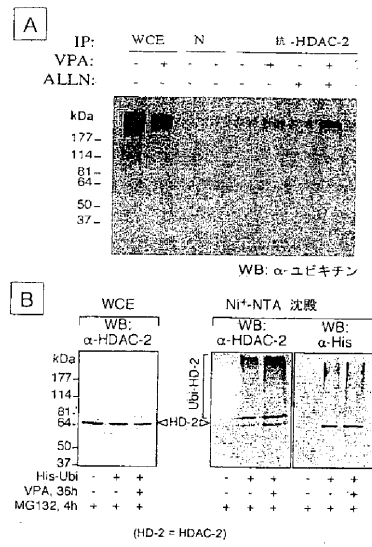
【図8】



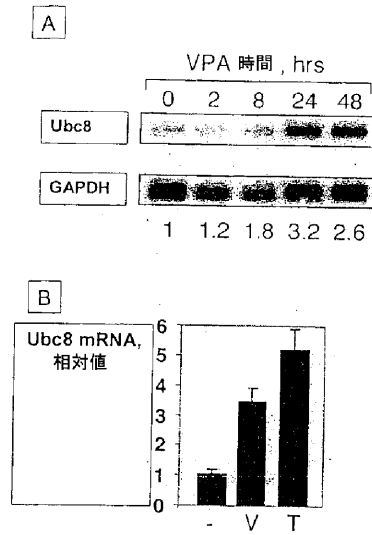
【図 9】



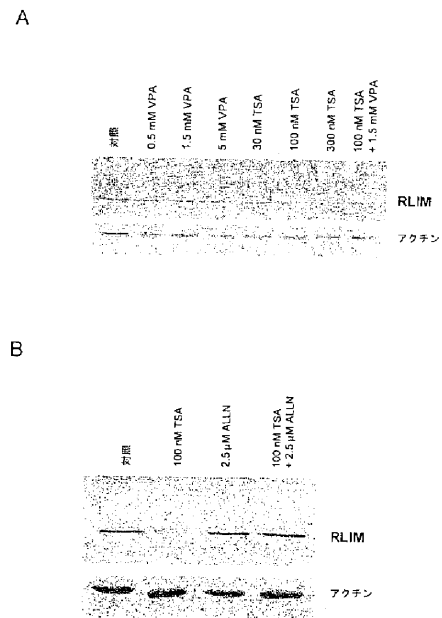
【図 10】



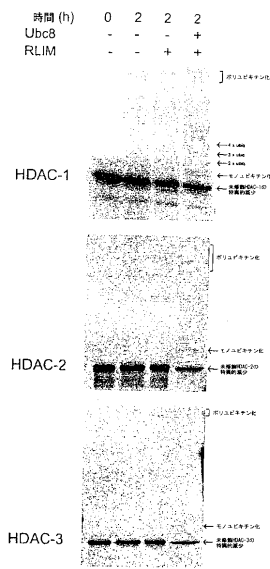
【図 11】



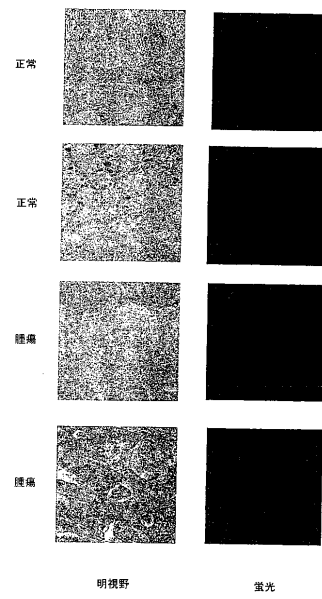
【図 12】



【図 13】



【図 14】



【配列表】

[0004644489000001.xml](#)

フロントページの続き

- (74)代理人 100095360
弁理士 片山 英二
- (74)代理人 100093676
弁理士 小林 純子
- (74)代理人 100120134
弁理士 大森 規雄
- (72)発明者 ヘインツェル, ソーステン
ドイツ連邦共和国 6 0 5 2 9 , フランクフルト アム メイン, リベレンウエグ 1 0
- (72)発明者 クラマー, オリバー, エイチ.
ドイツ連邦共和国 6 0 3 1 8 , フランクフルト アム メイン, コセルシュトラッセ 3 8
- (72)発明者 ゴットリシエル, マーチン
ドイツ連邦共和国 8 0 6 3 8 , ミュンヘン, マレーシュトラッセ 1
- (72)発明者 ズ, ピン
ドイツ連邦共和国 7 6 3 5 1 , リンケンハイム, エイチ. - ヘッセ - シュトラッセ 1 3
- (72)発明者 ゴレビウスキー, マーチン
ドイツ連邦共和国 7 6 1 3 1 , カールスルー, パーンハードシュトラッセ 9
- (72)発明者 ペリッチ, ビア, ジウスツベ
イタリア国 ミラノ, アイ - 2 0 0 9 0 オペラ, ビア エミリア 1 0
- (72)発明者 モウラー, アレキサンダー, ピー.
ドイツ連邦共和国 6 1 3 5 2 , バッド ホムバーク, レインウエグ 3
- (72)発明者 ヘンツック, バート
ドイツ連邦共和国 6 0 3 2 2 , フランクフルト アム メイン, ガービヌシュトラッセ 8
- (72)発明者 ミヌッチ, サヴェリオ
イタリア国 ミラノ, アイ - 2 0 0 9 0 オペラ, ビア ドン ミンゾニ 1

審査官 松原 寛子

- (56)参考文献 国際公開第99/036532(WO, A1)
EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC PATENTS, 英国, ASHLEY PUBLICATIONS, 2002年, V12 N6, P943-947
GREENBERG V L, THYROID, 米国, MARY ANN LIEBERT, 2001年 4月, V11 N4, P315-325
KWON H J, PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, 米国, 1999年 3月, V40, P581
MARKS PAUL A, NATURE REVIEWS CANCER, 2001年12月20日, V1 N3, P194-202
Cancer Research, 2000年, Vol.60, p.3137-3142
Clinical Cancer Research, 2001年, Vol.7, p.962-970

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00-3/00
C12N 15/00
A61K 31/19
CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	分子标记用于具有组蛋白脱乙酰酶活性的酶抑制剂的临床前和临床分析的用途		
公开(公告)号	JP4644489B2	公开(公告)日	2011-03-02
申请号	JP2004537124	申请日	2003-09-18
[标]申请(专利权)人(译)	GAME 2 EM抗癌药物AG 文件夹顺控股曾电车卷曲年龄的Em-基于硬		
申请(专利权)人(译)	GAME 2 EM抗癌药物AG		
当前申请(专利权)人(译)	地形目标德国AG		
[标]发明人	ヘインツェルソーステン クラマーオリバーエイチ ゴットリシエルマーチン ズピン ゴレビウスキーマーチン ペリッチピアジウスッペ モウラーアレキサンダービー ヘンツックバーンド ミヌッチサヴェリオ		
发明人	ヘインツェル,ソーステン クラマー,オリバー,エイチ. ゴットリシエル,マーチン ズ,ピン ゴレビウスキー,マーチン ペリッチ,ピア,ジウスッペ モウラー,アレキサンダー,ビー. ヘンツック,バーンド ミヌッチ,サヴェリオ		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53 A61K31/19 G01N33/48 G01N33/573 G01N33/574		
CPC分类号	A61P35/00 A61P43/00 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/136 G01N33/573 G01N33/574 G01N2333/70578 G01N2333/9015 G01N2333/916 G01N2500/04 C12Q1/6883 G01N33/6875		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A G01N33/53.D G01N33/53.M A61K31/19		
代理人(译)	小林 浩 片山英二 小林顺子		
优先权	2002021228 2002-09-18 EP		
其他公开文献	JP2006517782A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及分子标记和相关信号传导机制用于具有组蛋白脱乙酰酶活性的酶抑制剂的临床前和临床分析的用途。本发明还涉及这些标志物作为诊断和/或预后工具用于治疗患有此类抑制剂的肿瘤患者的用途。

表 1 : 結腸癌患者の腫瘍生検における
HDAC-2発現の免疫蛍光検出の結果
(適台正常組織との比較)

	正常 HDAC-2 発現	過剰発現した HDAC-2	合計
サンプル数	8	38	46
%サンプル	17	83	100