

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-507629

(P2014-507629A)

(43) 公表日 平成26年3月27日(2014.3.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/574 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/574 A	2 G O 4 5
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 3
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 4
<b>CO 7 K 16/18 (2006.01)</b>	CO 7 K 16/18	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 57 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-543278 (P2013-543278)  
 (86) (22) 出願日 平成23年12月6日 (2011.12.6)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年7月23日 (2013.7.23)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/063553  
 (87) 国際公開番号 W02012/078648  
 (87) 国際公開日 平成24年6月14日 (2012.6.14)  
 (31) 優先権主張番号 61/419,975  
 (32) 優先日 平成22年12月6日 (2010.12.6)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512099655  
 ユニバーシティ オブ メディスン アン  
 ド デンティストリー オブ ニュー ジ  
 ャージー  
 アメリカ合衆国, 08873 ニュージャ  
 ー州, サマセット, 1 ワールズ フ  
 ェア ドライブ  
 (74) 代理人 100083806  
 弁理士 三好 秀和  
 (74) 代理人 100095500  
 弁理士 伊藤 正和  
 (74) 代理人 100111235  
 弁理士 原 裕子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の診断および予後ならびに治療応答予測の新規方法

(57) 【要約】

本発明は、FRYのポリペプチドおよびヌクレオチドを含む薬学組成物、癌を治療する方法、癌を診断する方法、癌の治療の有効性を決定する方法、ならびに幹細胞を分化させる方法に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

対象者における癌を診断する方法であって、

- a. 前記対象者由来の生物学的試料における、FRYポリペプチドのレベルまたはFRYポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのレベルを検出すること、
- b. 前記対象者の試料において検出されたレベルを、対応する非癌性試料における基準レベルと比較すること、
- c. 前記対象者由来の試料におけるレベルが前記基準レベルよりも低い場合に、癌であると診断することを含む方法。

10

## 【請求項2】

前記FRYポリペプチドのレベルが、FRYポリペプチドに特異的に結合する抗体に対する前記試料中のFRYポリペプチドの結合を検出することによって決定される、請求項1に記載の方法。

## 【請求項3】

前記抗体が、FRYポリペプチド中のペプチド配列WGVRRRSLDSLDKC（配列番号3）を含むエピトープに結合するものである、請求項2に記載の方法。

## 【請求項4】

前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項2に記載の方法。

## 【請求項5】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項2に記載の方法。

20

## 【請求項6】

前記FRYポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのレベルが、前記ポリヌクレオチドに対する、配列番号1の配列もしくはその断片、または配列番号1の相補配列もしくはその断片を含む第2のポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出することにより決定される、請求項1に記載の方法。

## 【請求項7】

前記癌は、上皮細胞癌、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、肺癌、脳癌、および血液癌からなる群から選択されるものである、請求項1に記載の方法。

## 【請求項8】

前記癌の細胞は幹細胞表現型を有する、請求項1に記載の方法。

30

## 【請求項9】

前記乳癌は、ホルモン受容体陰性の癌である、請求項7に記載の方法。

## 【請求項10】

前記ホルモン受容体は、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、およびヒト上皮成長因子受容体2からなる群から選択されるものであるか、またはそれらのいずれかの組合せである、請求項9に記載の方法。

## 【請求項11】

前記ホルモン受容体陰性の癌は三重陰性乳癌である、請求項9に記載の方法。

## 【請求項12】

幹細胞表現型を有する細胞の分化を誘導する化合物をスクリーニングする方法であって、

40

- a. 前記細胞のFRYポリペプチドのレベルを測定して、FRYポリペプチドのベースラインレベルを決定すること、
  - b. 細胞を候補物質に接触させること、
  - c. 前記接触させた細胞のFRYポリペプチドのレベルを測定すること、
- を含み、前記ベースラインレベルと比較したFRYポリペプチドのレベルの上昇により、前記候補物質が幹細胞表現型を有する細胞の分化を誘導する化合物として同定される方法。

## 【請求項13】

50

前記細胞が、幹細胞表現型を有する癌細胞である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記細胞が乳癌細胞である、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

癌を発生する危険性を有する対象者を同定する方法であって、前記対象者のFRY遺伝子における易罹患性多型を検出することを含み、前記易罹患性多型の存在により癌を発生する危険性が高いことが予測される方法。

【請求項16】

前記癌は、上皮細胞癌、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、肺癌、脳癌、および血液癌からなる群から選択されるものである、請求項16に記載の方法。

10

【請求項17】

FRYポリペプチドを低いレベルで発現する細胞を分化させる方法であって、前記細胞にFRYポリペプチド、またはFRYポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを導入することを含む方法。

【請求項18】

FRYポリペプチド、またはFRYポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および薬学的に許容される担体を含む、薬学組成物。

【請求項19】

前記FRYポリペプチドが組換えポリペプチドである、請求項18に記載の薬学組成物。

【請求項20】

前記FRYポリペプチドが融合ポリペプチドである、請求項19に記載の薬学組成物。

20

【請求項21】

前記FRYをコードするポリヌクレオチドがベクターに包含されている、請求項18に記載の薬学組成物。

【請求項22】

請求項18に記載の薬学組成物の有効量を、必要とする対象者に投与することを含む、癌を治療する方法。

【請求項23】

前記薬学組成物がFRYポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、FRYポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを使用して癌細胞に送達される、請求項22に記載の方法。

30

【請求項24】

前記ベクターが発現ベクターである、請求項21に記載の薬学組成物。

【請求項25】

前記ベクターが、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アルファウイルスベクター、およびヘルペスウイルスベクターからなる群から選択されるものである、請求項23に記載の方法。

【請求項26】

前記癌の種類が、上皮細胞癌、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、肺癌、脳癌、および血液癌からなる群から選択されるものである、請求項22に記載の方法。

40

【請求項27】

前記癌細胞が、予め定められた基準と比較して低いレベルのFRYポリペプチドまたはFRYポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

前記癌細胞が幹細胞表現型を有する、請求項22に記載の方法。

【請求項29】

前記乳癌は、ホルモン受容体陰性の癌である、請求項26に記載の方法。

【請求項30】

前記ホルモン受容体は、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、およびヒト上皮成長因子受容体2からなる群から選択されるものであるか、またはそれらのいずれかの組

50

合せである、請求項29に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記ホルモン受容体陰性の癌は三重陰性乳癌である、請求項29に記載の方法。

【請求項 3 2】

FRYポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体。

【請求項 3 3】

ポリクローナル抗体である、請求項32に記載の抗体。

【請求項 3 4】

モノクローナル抗体である、請求項32に記載の抗体。

【請求項 3 5】

FRYポリペプチド中のペプチド配列WGVERRSLDSLDKC (配列番号3) を含むエピトープに結合する抗体である、請求項32に記載の抗体。

【請求項 3 6】

癌に罹患した対象者における治療の有効性を決定する方法であって、

- a. 対象者由来の癌細胞を含む治療前生物学的試料を得ること、
- b. 癌細胞を含む治療後生物学的試料を得ること、
- c. 前記試料中に存在するFRYポリペプチドのレベルを検出すること、
- d. 前記治療前生物学的試料と前記治療後生物学的試料におけるFRYポリペプチドのレベルを比較すること、

を含み、前記治療後生物学的試料中のFRYポリペプチドのレベルが、前記治療前生物学的試料中のFRYポリペプチドのレベルと比較して上昇した場合に、前記治療が有効であると決定される方法。

【請求項 3 7】

FRYポリペプチドに結合する抗体を使用してFRYポリペプチドを検出する、請求項36に記載の方法。

【請求項 3 8】

請求項35に記載の抗体を使用してFRYポリペプチドを検出する、請求項36に記載の方法

【請求項 3 9】

対象者由来の生物学的試料中のFRYポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはFRYポリペプチドに特異的に結合する1つ以上の検出試薬を含む、癌の診断、予後、または治療監視のためのキット。

【請求項 4 0】

核酸ハイブリダイゼーションを行うための試薬をさらに含む、請求項39に記載のキット

【請求項 4 1】

PCRを行うための試薬をさらに含む、請求項39に記載のキット。

【請求項 4 2】

免疫組織化学的検査のための試薬をさらに含む、請求項39に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[ 関連出願への言及 ]

本出願は、2010年12月6日に提出された米国仮出願第61/419,975号に基づく優先権を主張する。上記出願の内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

[ 政府の補助 ]

本明細書に記述される研究は、全体的または部分的に、米国立衛生研究所からの助成金付与番号NCI CA 77222により助成されたものである。合衆国政府は本発明に一定の権利を有する。

10

20

30

40

50

## 【0003】

本発明は、FRYのポリペプチドおよびポリヌクレオチドを含む薬学組成物、癌を治療する方法、癌の診断および予後のための方法、ならびに癌治療の有効性を決定する方法に関し、幹細胞を分化させる方法にも関する。

## 【背景技術】

## 【0004】

乳癌は米国の女性の間で最も多い癌であり続けており、2010年には207,090件の新たな事例が生じ39,840件の死亡が起こったと推定されている（国立癌研究所SEER癌統計）。数多くの遺伝的変異および分子経路が乳癌の病理に関与しているが、遺伝的易罹患性についての我々の知識には大きな空白が残されている。高リスク家系における遺伝連鎖解析研究ではBRCA1およびBRCA2が同定された。しかしながら、これらの乳癌易罹患性遺伝子が関与するのは全ての癌の10%未満であり、家系性乳癌のごく一部の要因となっているにすぎない。家系に基づくその後の研究では、ヒト13番染色体上でBRCA2の遠位側に存在する推定抑制因子（BRCA3）が同定された。しかしながら後者の研究は追加的なコホートでは検証されておらず、高リスク癌家系においてさえも連鎖解析が難しいことを実証している。

10

## 【0005】

癌易罹患性遺伝子を同定するための代替アプローチとして、研究者らは、同系交配された遺伝性癌の動物モデルにおける連鎖解析を行ってきた。例えば、異なる易罹患性を有するラット系統群における遺伝学的研究によって、20個を超える乳癌易罹患性（Mcs）遺伝子座が同定された（ただし、これらの遺伝子座内にある推定抑制因子の遺伝子はいまだに同定され検証されていない）。過去の分離比分析では、抵抗性コペンハーゲン（Cop）系統と中程度に感受性であるフィッシャー344（F344）系統との間の交配でごく少数の遺伝的変異因子を生じたことが示された。

20

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

乳癌および上皮細胞から生じるその他の癌の診断および予後のためのさらなる予測マーカーを同定する必要性が現に存在する。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

本発明は、一般的に、FRYポリペプチドまたはFRYポリヌクレオチドを含有する薬学組成物に関し、癌を治療する方法、癌を診断する方法、癌の表現型を決定する方法、癌治療の有効性を決定する方法、および幹細胞を分化させる方法、ならびに本発明の方法を実施するためのキットにも関する。

30

## 【0008】

一側面において本発明は、FRYポリペプチド、またはFRYポリペプチドをコードするFRYポリヌクレオチドと、薬学的に許容される担体とを含む薬学組成物を提供する。ある実施態様では、FRYポリペプチドは組換えポリペプチドであり、融合ポリペプチドであってもよい。別の実施態様では、上記FRYポリヌクレオチドはベクターに含有される。そのようなベクターとしては発現ベクターが含まれ、FRYポリヌクレオチドを癌細胞に送達する能力を有するウイルスベクターも含まれる。

40

## 【0009】

第2の側面では、本発明は、癌を治療するための方法であって、FRYポリペプチドまたはそれをコードするFRYポリヌクレオチドを含む薬学組成物の有効量を、必要とする対象者に投与する工程を含む方法を提供する。ある実施態様では、この方法は、腫瘍における癌細胞の数を減少させること、腫瘍の大きさを減少させること、化学療法剤の効力を増強させること、および/または癌の周辺器官への拡散を減少させることを含む。

## 【0010】

本明細書に記載される薬学組成物を使用して治療し得る癌の種類としては、上皮細胞癌、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、肺癌、脳癌、および血液癌が含まれる。上記癌細胞は一般的

50

に、同種類の非癌性組織由来の正常細胞と比べて低いレベルのFRYポリペプチドおよびFRY mRNAを含むか、または機能的なFRYのポリペプチドもしくは遺伝子を欠いている。上記癌細胞は一般的に幹細胞表現型を有する。上記癌は、乳癌、ホルモン受容体陰性乳癌、または、三重陰性乳癌（その乳癌細胞はエストロゲン受容体（ER）、プロゲステロン受容体（PR）、およびヒト上皮成長因子受容体2（Her2）が欠如している）であり得る。

#### 【0011】

ある実施態様では、FRYポリペプチドをコードするFRYポリヌクレオチドは、ベクターを使用して癌細胞に送達される。ある実施態様では、ベクターは発現ベクターであるか、または、FRYポリヌクレオチドを癌細胞に送達する能力を有するウイルスベクターである。ベクターは、癌細胞において発現するのに適した形態で核酸を含む。好ましくはベクターは、発現されるべき核酸配列に作用できるように連結された1つ以上の制御配列を含む。制御配列という用語は、プロモーター、エンハンサー、およびその他の発現制御エレメント（例えば、スプライシング・シグナル、非翻訳領域、ポリアデニル化シグナル）を含む。制御配列は、ヌクレオチド配列の恒常的発現を導くもの、ならびに組織特異的な制御配列および/または誘導可能な配列を含む。発現ベクターの設計は、形質転換する癌細胞の選択、望まれるRNA転写レベルその他の要素に依存し得る。ある実施態様では、ウイルスベクターはアデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アルファウイルスベクター、またはヘルペスウイルスベクターである。

10

#### 【0012】

第3の側面において本発明は、FRYポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体を提供する。ある実施態様では、この抗体はFRYポリペプチド中のWGVRRRSLDSLDKC（配列番号3）を含むエピトープに結合する。

20

#### 【0013】

第4の側面において本発明は、癌に罹患した対象者における治療の有効性を決定するための方法であって、その対象者由来の癌細胞を含有する治療前試料を得ること、癌細胞を含有する治療後試料を得ること、試料中に存在するFRYポリペプチドのレベルを検出すること、治療前試料におけるFRYポリペプチドのレベルを治療後試料と比較することを含む方法を提供し、ここで、治療後試料中に存在するFRYポリペプチドのレベルが、治療前試料中に存在するFRYポリペプチドのレベルと比較して上昇している場合に、治療が有効であると決定される。ある実施態様では、癌細胞中のFRYポリペプチドは、FRYポリペプチドに結合する抗体を使用して検出することができる。ある実施態様では、上記FRY抗体は、WGVRRRSLDSLDKC（配列番号3）に結合する抗体である。

30

#### 【0014】

第5の側面において本発明は、対象者において癌を診断するための方法であって、対象者からの試料におけるFRYポリペプチドのレベルまたはFRYポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのレベルを検出すること、および、上記対象者の試料において検出されたレベルを、同種類の非癌性組織由来の正常細胞において発現されるFRYポリペプチドのレベルと比較することを含む方法を提供する。ある実施態様では、癌細胞中のFRYポリペプチドは、FRYポリペプチドに結合する抗体を使用して検出される。ある実施態様では、上記FRY抗体は、WGVRRRSLDSLDKC（配列番号3）に結合する抗体である。

40

#### 【0015】

第6の側面において本発明は、対象者において癌の予後を評価する方法であって、対象者からの生物学的試料におけるFRYポリペプチドのレベルまたはFRYポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのレベルを検出すること、および、上記対象者の試料で検出されたレベルを癌のグレード化システムと比較する方法を提供し、ここで、FRYポリペプチドのレベルおよび癌のグレードによってその癌の予後が決定される。ある実施態様では、癌細胞中のFRYポリペプチドは、FRYポリペプチドに結合する抗体を使用して検出することができる。ある実施態様では、上記FRY抗体は、WGVRRRSLDSLDKC（配列番号3）に結合する抗体である。

50

## 【0016】

本明細書に記載される方法を使用して診断し、進行を評価し、治療の有効性を決定することができる癌の種類としては、上皮細胞癌、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、肺癌、脳癌、および血液癌が含まれる。上記癌細胞は一般的に、同種類の非癌性組織由来の正常細胞と比べて低いレベルのFRYポリペプチドおよびFRY mRNAを含むか、または機能的なFRYのポリペプチドもしくは遺伝子を欠いている。上記癌細胞は一般的に幹細胞表現型を有する。上記癌は、乳癌、ホルモン受容体陰性乳癌、または、三重陰性乳癌（その乳癌細胞はエストロゲン受容体（ER）、プロゲステロン受容体（PR）、およびヒト上皮成長因子受容体2（Her 2）が欠如している）であり得る。

## 【0017】

第7の側面において本発明は、細胞におけるFRY遺伝子の発現または活性を増加させる候補化合物をスクリーニングする方法を提供し、この方法は、上記接触させた細胞のFRY遺伝子発現レベルまたはFRYポリペプチド活性を測定し、ここで、FRYポリペプチドのレベルが上昇した場合は、未処置細胞と比較してFRY遺伝子の発現または活性を増加させる化合物としてその候補物質が同定される。ある実施態様では上記細胞は、癌細胞、低いレベルのFRYポリペプチドを発現する癌細胞、幹細胞表現型を有する癌細胞、および乳癌細胞である。

## 【0018】

第8の側面において本発明は、低いレベルのFRYポリペプチドを発現する細胞を分化させる方法であって、FRYポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはFRYポリペプチドを上記細胞に導入することを含む方法を提供する。

## 【0019】

第9の側面において本発明は、本発明の方法を実施するためのキットを提供する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0020】

【図1】図1a~bは、異なる種由来のFRY遺伝子ホモログのタンパク質配列比較アラインメントを図示する。図1(a)は、F344ラットのFRYアシルの第661コドンにおける非同義SNPが、Copタンパク質におけるアスパラギン酸（D）残基を、F344タンパク質においてはグルタミン酸（E）に置換していることを示す。このアスパラギン酸残基は種間で高度に保存されていることに注意。図1(b)は、F344ラットのFRYアシルの第2170コドンにおける非同義SNPが、Copタンパク質における非極性アラニン（A）を、F344タンパク質においては極性のセリン（S）残基に置換していることを示す。このアラニン残基は種間で高度に保存されていることに注意。

## 【0021】

【図2】図2a~eは、乳癌細胞株および非形質転換ヒト乳腺上皮細胞株におけるFRY発現を示す。非腫瘍原性MCF10Aヒト乳腺上皮細胞株と、いくつかのER陰性（HCC 1954、MDA-MB-231）およびER陽性（T47D、MCF7）ヒト乳腺上皮癌細胞株とにおける、FRY mRNA発現レベル（a）およびFRYポリペプチド発現レベル（b）を示す。（c、d）は、wt Cop Fryの異所性発現あり（231wCFry）およびFryの異所性発現なし（MDA-MB-231）のヒト乳癌細胞株におけるFry発現レベルを示す。（c）は、各細胞株におけるwt Cop Fry（ラットFry）またはヒトFRYのmRNAレベルを表すサザンプロット、ならびに、ラットおよびヒトFRY mRNA発現を合わせたもの（各動物種のアクチンの発現に対して標準化した）を図示するグラフである。（d）は、上記細胞株におけるFRYポリペプチド総量（ラットおよびヒト）を表すウェスタンプロットである。（e）は、非標的指向化shRNA（10A-CV）またはFRY標的指向化shRNA（10A-shFRY：10A-1.1、10A-1.2）で安定的にトランスフェクトしたMCF10A細胞株におけるFRYポリペプチド発現である。

## 【0022】

【図3】図3は、注射後の経過時間の関数としての腫瘍サイズを比較したものを示す。

## 【0023】

【図4】図4a~kは、臨床的乳癌コホートにおけるFRY発現を示す。（a）オンコマイン（On

10

20

30

40

50

comine) 3.0癌プロファイリング・データベース(20)で入手できるマイクロアレイ・データの解析(癌=40、正常=7)( $p<0.0001$ )。(b)核FRY染色についての病理学者評点の違い(癌=69、正常=9)( $p<0.02$ )。(d)上皮細胞の核染色を病理学者がスコア化した。陰を付けた棒グラフのそれぞれが、各組織表現型で「4」と評点された(その試料中の核の70~100%がFRYの染色について陽性であったことを示す)ものの%を示す。(g)定量的画像解析ソフトウェアを使用したFRYポリペプチドレベルの定量化。(k)エストロゲン受容体陽性( $ER^+$ )乳癌腫と比較してエストロゲン受容体陰性( $ER^-$ )ヒト乳腺腫瘍の方がFRYポリペプチド発現レベルがより低い( $p<0.05$ )。

【0024】

【図5】図5は、FRY応答性遺伝子のベン図を示す。

10

【0025】

【図6】図6a~bは、アイソジェニックな細胞株の対(MDA-MB-231/231wCFry、および10A-CV/10-shFRY)におけるタンパク質発現レベルの定量化を図示する。(a)アイソジェニックな細胞株の対におけるカテニン(Wntシグナル伝達において重要なタンパク質である)の定常状態発現レベルの比較。(b)アイソジェニックな細胞株の対における4インテグリンの定常状態発現レベルの比較。

【0026】

【図7】図7は、前立腺癌、卵巣癌、肺癌、脳癌、および血液癌においてFRY mRNA発現が減少していることを示す。

【0027】

20

【図8】図8a~cは、悪性病変と比較して良性の乳腺病変の方が核FRYタンパク質発現が有意に高いことを示す。(a)および(b)は浮動棒グラフであり、各群における最小値から最大値までを示し、中央値を線で示す。病理学者スコアは0~3である(0:上皮細胞核の<10%がFRYについて陽性であった。1:上皮細胞核の10~40%がFRY染色について陽性であった。2:上皮細胞核の40~70%がFRY染色について陽性であった。3:上皮細胞核の70~100%がFRY染色について陽性であった)。

【発明を実施するための形態】

【0028】

## 1. 概要

本発明は、一般的に、FRYのポリペプチドおよびポリヌクレオチドを含み癌の治療に有用な薬学組成物に関する。本発明はさらに、癌の治療のための上記薬学組成物の使用、癌の治療の有効性を決定するための方法、癌の診断および予後のための方法、ならびに幹細胞を分化させる方法にも関する。

30

【0029】

ほとんどの乳癌は、正常な上皮細胞から生じ、上皮系から間葉系への移行過程において細胞間接着性を喪失する。本発明によれば、FRY発現が改変されたアイソジェニックな乳腺上皮細胞株の対のインビトロ、インビボ、およびインシリコ解析によって、FRYが、上皮細胞分化、細胞間接着、および細胞移動性、ならびに上皮細胞の発生と機能とに關与するその他の多くの経路に影響を与えることが確認された。

【0030】

40

85%を超える癌は上皮細胞から生じる。インシリコ、インビトロ、およびインビボにおける観察は、FRYが上皮細胞分化において役割を果たしていることを支持している。オンコマイン3.0癌プロファイリング・データベースで入手可能な800を超えるヒトの癌組織および正常組織(乳癌を含まない)からのmRNA発現プロファイルにより、FRYは、乳腺腫瘍において正常乳腺組織と比べて減少しているだけでなく、ヒトの前立腺癌、卵巣癌、肺癌、および脳癌を含むさらなる上皮細胞癌においても正常組織と比べて減少しており、血液癌でも減少していることが明らかになった(図6、表S10)。これらの結果は、FRYは乳腺腫瘍抑制遺伝子および乳癌易罹患性遺伝子であるだけでなく、より一般的に上皮細胞の腫瘍抑制因子であり易罹患性遺伝子であることを実証している。FRYの発現は、細胞の極性化、接着、および分化を増進させ、腫瘍の増殖と浸潤性を低減させ得る。

50

## 【0031】

## 2. 定義

本明細書で使用される単数形の「a」、「an」、および「the」は、複数でないことが内容から明らかでない限り、複数への言及を含む。

## 【0032】

「約」という用語は、数値の+/- 10%を表す。

## 【0033】

本明細書で使用される「FRY」という用語は、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) のfurry遺伝子の哺乳類ホモログを意味し、機能的なFRYポリペプチドの全てのアイソフォームおよび変異体、ならびに機能的なFRYポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを表す。

10

## 【0034】

「機能的」という用語は、遺伝子によりコードされたポリペプチドの構造的特性を表し、野生型遺伝子によりコードされるポリペプチドの活性を奏するために必要な構造的特性を維持するポリペプチドを含む。例えば、ある特定の塩基多型に起因したある特定のアミノ酸置換を有する突然変異型FRYポリペプチドは、腫瘍抑制因子ポリペプチドとして作用・機能せず、従って機能的FRYポリペプチドではない。

## 【0035】

「賦形剤」という用語は、最終的な投与形態において存在し得る、本質的に付随的な物質を表す。例えば「賦形剤」という用語は媒体、結合剤、崩壊剤、充填剤（希釈剤）、懸濁/分散剤等を含む。

20

## 【0036】

「抗体」という用語は、免疫グロブリンまたはその抗原結合断片を表し、抗体の抗原結合断片を含有するあらゆるポリペプチドを包含する。この用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単一特異性抗体、多特異性抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、単一鎖抗体、単一ドメイン抗体、キメラ抗体、合成抗体、組換え抗体、ハイブリッド抗体、変異導入抗体、移植抗体、およびインビトロ生成抗体を含むが、これらに限定されない。「抗体」という用語は、抗体の抗原結合断片も含む。抗原結合断片の例としては、Fab断片 ( $V_L$ 、 $V_H$ 、 $C_L$ 、および $C_H1$ ドメインからなる)、Fd断片 ( $V_H$ および $C_H1$ ドメインからなる)、Fv断片 (固く非共有結合された1つの重鎖と1つの軽鎖の可変ドメインのダイマーを表す) dAb断片 ( $V_H$ ドメインからなる)、単一ドメイン断片 ( $V_H$ ドメイン、 $V_L$ ドメイン、 $V_{HH}$ ドメイン、または $V_{NAR}$ ドメイン)、単離CDR領域、(Fab')<sub>2</sub>断片、二価断片 (ヒンジ領域でジスルフィド架橋により結合された2つのFab断片を含む)、scFv (短いリンカーで結合された $V_L$ および $V_H$ ドメインの融合体を表す)、および抗原結合機能を維持しているその他の抗体断片が含まれるが、これらに限定されない。

30

## 【0037】

本明細書で使用される「エピトープ」という用語は、Bおよび/またはT細胞が応答する抗原上の部位、あるいは、抗体が産生される対象および/または抗体が結合する対象となる分子上の部位を表す。例えば、エピトープは、そのエピトープを定義づける抗体によって認識され得る。エピトープは「直線のエピトープ」であるか (この場合、アミノ酸の一次配列がエピトープを含む。典型的には、固有の配列中少なくとも3個の連続するアミノ酸残基、より一般的には少なくとも5個、最大約8個から約10個のアミノ酸である。)、または、「立体構造的エピトープ」 (連続するアミノ酸の一次配列が唯一の規定要素ではないエピトープ) のいずれかであり得る。立体構造的エピトープは、直線のエピトープと比較してより多数のアミノ酸を含み得るが、これは、この立体構造的エピトープはペプチドまたはタンパク質の三次元構造を認識するものであるからである。例えば、タンパク質分子が折り畳まれて三次元構造を形成するときに、立体構造的エピトープを形成する一定のアミノ酸および/またはポリペプチド骨格が並置されるようになって、抗体がそのエピトープを認識することを可能とする。エピトープの立体構造を決定する方法としては、例えば、x線結晶解析、二次元核磁気共鳴分光法、および部位特異的スピンラベル電子常磁性

40

50

共鳴分光法が含まれるが、これらに限定されない。例えばEpitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996)を参照されたい(この文献の開示は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる)。

【0038】

「癌」という用語は、哺乳類における生理学的状態であって、細胞の一集団が無制御の細胞増殖をすることによって特徴付けられるものを表し、またはそれを記述する。癌の例としては、上皮細胞癌、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、肺癌、脳癌、血液癌、癌腫、リンパ腫、芽腫、肉腫、および白血病が含まれるが、これらに限定されない。そのような癌のより具体的な例としては、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、肺の扁平上皮癌、腹膜の癌、肝細胞癌、胃腸癌、膵臓癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞腫、大腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜または子宮癌、唾液腺癌腫、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝細胞癌、および多様な種類の頭頸部癌が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0039】

本明細書で使用される「腫瘍」という用語は、良性(非癌性)であるか悪性(癌性)であるかを問わず、過剰な細胞の成長または増殖に起因するあらゆる組織塊を表し、前癌性病変を含む。

【0040】

本明細書で使用される「転移」という用語は、癌がその発生部位から身体の他の領域へと拡散または移動し、その新たな位置において同様の癌性病変を発生させる過程を表す。「転移性」または「転移する」細胞とは、隣接する細胞との接着性接触を喪失して、疾患の第一次的部位から血流またはリンパ液を通じて移動し、近隣の身体的構造を侵す細胞である。

20

【0041】

「癌細胞」および「腫瘍細胞」という用語ならびにそれらの文法的同等物は、腫瘍または前癌性病変に由来する細胞の総集団を表す。

【0042】

本明細書で使用される「生検」および「生検組織」という用語は、癌組織を含むか否かを決定する目的で対象者から採取される組織または体液の試料を表す。ある実施態様では、対象者が癌を有することが疑われるために生検組織または体液が採取され、その生検組織または体液は癌の有無について検査される。

30

【0043】

本明細書で使用される「対象者」という用語は、特定の処置を受けることになるあらゆる動物(例えば哺乳類)を表し、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類等を含むがこれらに限定されない。典型的には、ヒト対象者に関して、本明細書で「対象者」という用語と「患者」という用語は互換的に使用される。

【0044】

「有効量」、「治療的有效量」、または「治療効果」という用語は、対象者または哺乳類における疾患または障害を「治療」する上で有効な抗体、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、有機小分子その他の薬剤の量を表す。癌の場合、薬剤の治療的有效量とは、治療効果を有することにより癌細胞の数を減少させること、腫瘍形成能、腫瘍化頻度、もしくは腫瘍化能力を減少させること、癌細胞の数もしくは頻度を低下させること、腫瘍の大きさを低減させること、癌細胞の周辺器官への浸潤(例えば癌が軟組織および骨に拡散することを含む)を抑制もしくは阻止すること、腫瘍転移を抑制もしくは阻止すること、腫瘍成長を抑制もしくは阻止すること、癌に関連する1つ以上の症状をある程度まで軽減させること、罹患率および死亡率を低下させること、生活の質を改善させること、またはこれらの効果の組合せを可能とする量である。

40

【0045】

「治療すること」または「治療」または「治療する」または「緩和させること」または「緩和させる」といった用語は、(1)診断された病理学的状態もしくは障害を治癒する

50

、遅らせる、その症状を緩和させる、および/またはその進行を停止させる治療的措置、ならびに、(2)対象となる病理学的状態もしくは障害の発生を防止する、および/または遅らせる予防的もしくは防止的措置の両方を表す。従って、治療を必要とする対象者には、すでに障害を有する者、障害を患いやすい者、および障害を予防すべき者が含まれる。ある実施態様では、患者が次のうちの1つ以上を示した場合に、本発明の方法による対象者の「治療」が成功したこととなる：癌細胞の数の減少もしくは完全な不在；腫瘍の大きさの減少；癌細胞の周辺器官への浸潤（例えば癌が軟組織および骨に拡散することを含む）の抑制もしくは不在；腫瘍転移の抑制もしくは不在；腫瘍成長の抑制もしくは不在；特定の癌に関連する1つ以上の症状の軽減；罹患率もしくは死亡率の低下；生活の質の改善；腫瘍形成能の低下；癌細胞の数もしくは頻度の減少、または複数の効果のいずれかの組合せ。

10

**【0046】**

本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、多数のヌクレオチドユニット（リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドまたは関連する構造異型体）がリン酸ジエステル結合で連結されたものから構成される重合体を表し、DNAまたはRNAを含むがこれらに限定されない。この用語は、DNAおよびRNAの既知の塩基類似体を含む配列を包含する。ポリヌクレオチドの例としては、mRNA、miRNA、tRNA、rRNA、snRNA、siRNA、dsRNA、cDNA、およびDNA/RNAハイブリッドが含まれるが、これらに限定されない。

20

**【0047】**

「遺伝子」という用語は、ポリペプチド、前駆体、またはRNA（例えばrRNA、tRNA）の生成に必要なコード配列を含む核酸（例えばDNA）配列を表す。ポリペプチドは、全長コード配列によってコードされていてもよいし、あるいは、全長ポリペプチドもしくは断片の所望の活性もしくは機能的特性（例えば、酵素活性、リガンド結合、シグナル伝達、免疫原性等）が維持される限り、コード配列のいずれかの部分によってコードされていてもよい。この用語はまた、構造遺伝子のコード領域およびそのコード領域の5'末端側と3'末端側の両方に隣接して位置しそれぞれの末端側において約1 kbかそれ以上の長さ及び配列（これによってこの遺伝子は全長mRNAの長さに相当することとなる）を包含する。「遺伝子」という用語は、遺伝子のcDNA形態およびゲノム形態の両方を包含する。

30

**【0048】**

「ポリペプチド」、「ペプチド」、「タンパク質」、および「タンパク質断片」という用語は本明細書で互換的に使用され、アミノ酸残基の重合体を表す。この用語は、1つ以上のアミノ酸残基が、対応する天然アミノ酸の人工化学模倣物となっているアミノ酸重合体に適用され、天然アミノ酸の重合体および非天然アミノ酸の重合体にも適用される。

**【0049】**

「アミノ酸」という用語は、天然アミノ酸および合成アミノ酸、ならびに、天然アミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣物を表す。天然アミノ酸は、遺伝暗号でコードされたもの、および、事後的に修飾されたアミノ酸、例えばヒドロキシプロリン、ガンマ-カルボキシグルタミン酸、およびO-ホスホセリンである。「アミノ酸類似体」とは、例えばアルファ炭素が水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基と結合したもののよう、天然アミノ酸と同じ基本的な化学構造を有する化合物を表す（例えばホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウム）。そのような類似体は改変されたR基（例えばノルロイシンの場合）または改変されたペプチド骨格を有し得るが、天然アミノ酸と同じ基本的化学構造を維持する。「アミノ酸模倣物」は、アミノ酸の一般的化学構造とは異なる構造を有するが天然アミノ酸と同様に機能する化学化合物を表す。

40

**【0050】**

「保存的に改変された変異体」は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。「アミノ酸変異体」はアミノ酸配列を表す。特定の核酸配列との関係で、保存的に改変された変異体は、同一のもしくは実質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸を表し、あ

50

るいは、その核酸がアミノ酸配列をコードしない場合であっても、実質的に同一のもしくは関連する（例えば自然な連続性を示す）配列を表す。遺伝暗号の縮重のため、ほとんどのタンパク質は、機能的に同一な多数の核酸によってコードされる。例えば、GCA、GCC、GCG、およびGCUというコドンは全てアミノ酸アラニンをコードする。従って、あるコドンによってアラニンが規定されている全ての位置において、そのコドンは、コードされるポリペプチドを変えることなく上記対応コドンの内の別のものに変えることができる。そのような核酸の変異は「サイレントな変異」であり、保存的に改変された変異の一種である。ポリペプチドをコードする本明細書記載の全ての核酸配列は、その核酸のサイレントな変異も記述する。一定の文脈の中で、核酸中の各コドン（通常はメチオニンについての唯一のコドンであるAUG、および、通常はトリプトファンについての唯一のコドンであるTGGを除く）を改変しても機能的に同一の分子を産出することができることは、当業者に認識されるであろう。従って、あるポリペプチドをコードする核酸のサイレントな変異が、その発現産物との関係で記載されている配列に包含されている。

10

#### 【0051】

アミノ酸配列については、コードされる配列において単一のアミノ酸または小さな割合のアミノ酸を改変、追加、または削除する、核酸配列、ペプチド配列、ポリペプチド配列またはタンパク質配列における個々の置換、欠失、または付加は、「保存的に改変された変異体」であり、これは改変により一つのアミノ酸が化学的に類似するもう一つのアミノ酸に置換される場合が含まれることは、当業者に認識されるであろう。機能的に類似するアミノ酸を提示する保存的置換一覧表は当該技術分野でよく知られている（例えば表1を参照のこと）。どのアミノ酸変化が表現型上サイレントである可能性が高いかということに関する手引きは、Bowie et al., 1990, Science 247: 1306-1310にも見出される。多型変異体、種間ホモログ、およびアレルに加えてこのような保存的に改変された変異体があり、また、このような保存的に改変された変異体は多型変異体、種間ホモログ、およびアレルを除外するものではない。典型的な保存的置換としては、(1) アラニン(A)、グリシン(G)；(2) アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)；(3) アスパラギン(N)、グルタミン(Q)；(4) アルギニン(R)、リシン(K)；(5) イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V)；(6) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)；(7) セリン(S)、トレオニン(T)；および(8) システイン(C)、メチオニン(M)が含まれるが、これらに限定されない（例えばCreighton, Proteins (1984)を参照のこと）。アミノ酸は、側鎖に付随する特性に基づいて置換することができる。例えば、極性の側鎖を有するアミノ酸を置き換えることができ（例えばセリン(S)とトレオニン(T)）、側鎖の電荷に基づいてアミノ酸を置き換えることができ（例えばアルギニン(R)とヒスチジン(H)）、疎水性側鎖を有するアミノ酸を置き換えることができる（例えばバリン(V)とロイシン(L)）。示されているように、変化は通常は些細な性質のものであり、例えばタンパク質の折り畳みまたは活性に著しく影響しない保存的アミノ酸置換である。

20

30

#### 【0052】

「組換え」ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質とは、組換えDNA技術により産生されたペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質、すなわち、所望のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質をコードする外因性DNA構築物により形質転換された細胞から産生されたものを表す。

40

#### 【0053】

「融合ポリペプチド」とは、2つ以上の異種性タンパク質またはポリペプチドをつなげることにより作製されたポリペプチドを表す。異種性のタンパク質、ポリペプチド、核酸、または遺伝子とは、異なる種に由来するものであり、あるいは、同じ種由来である場合には、元の形態から実質的に改変されたものである。融合された2つのドメインまたは配列は、天然のタンパク質または核酸においてそれらが互いに隣接していないのであれば、互いに対して異種性である。

#### 【0054】

「予め定められた基準」という用語は、癌を有さない対象者からの同種類の組織または

50

細胞の試料における特定のタンパク質の発現の対照レベルを表す。例えば、予め定められた基準は、乳癌を有さない対象者から単離された乳房組織におけるFRY遺伝子の発現に基づいて決定された対照レベルであり得る。

【0055】

本明細書で使用される「表現型」という用語は、生命体（例えば幹細胞）の観察可能な特徴または形質、例えばその形態、発生、生化学的もしくは生理学的特性、または行動を表す。表現型は、その生命体の遺伝子の発現だけでなく、環境的因子の影響、およびこれら2つの間の相互作用によりもたらされる。幹細胞の表現型の例としては、サイズ、細胞表面マーカーのプロファイル、増殖能、免疫原性、無制御増殖（すなわち腫瘍細胞）、可塑性（すなわち分化能）、生着能、治療能、およびこれらの組合せが含まれるが、けっしてこれらに限定されるわけではない。

10

【0056】

本明細書で使用される「ホルモン受容体陰性癌」という用語は、癌の種類であって、癌細胞がある種のホルモンに対する受容体を発現せず、典型的には、成長するためにそのホルモンを必要としないものを表す。ホルモン受容体陰性癌の一例はエストロゲン受容体陰性であり、これは、ホルモンであるエストロゲンが結合する受容体を持たない細胞を表す。エストロゲン受容体陰性である癌細胞は、成長するためにエストロゲンを必要とせず、また、エストロゲンの結合を遮断するホルモンで処置しても通常は成長を止めない。もう1つの例は三重陰性乳癌であり、これは、エストロゲン受容体（ER）、プロゲステロン受容体（PR）、またはヒト上皮成長因子受容体2（Her2）の遺伝子を発現しない乳癌を表す。

20

【0057】

本明細書で使用される「プローブ」という用語は、オリゴヌクレオチドであって、1つ以上の種類の化学結合（通常は相補的塩基対形成を介し、これは通常は水素結合形成を介する）を介して相補的配列の標的核酸に結合することができるものを表す。プローブは、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに応じて、プローブ配列と完全なる相補性は有さない標的配列に結合し得る。本明細書に記載される一本鎖核酸と標的配列との間のハイブリダイゼーションに干渉する塩基対ミスマッチの数は何個であってもよい。しかしながら、突然変異数があまりに多くて、最もストリンジェンシーの低いハイブリダイゼーション条件でさえもハイブリダイゼーションが起り得ないのであれば、その配列は相補的標的配列ではない。プローブは一本鎖であるか、または、部分的に一本鎖であって部分的に二本鎖であり得る。プローブが何本鎖であるかは、標的配列の構造、組成、および特性により決められる。プローブは直接的に標識してもよいし、あるいは、後でストレプトアビジン複合体が結合できるようにビオチンを用いる場合のように、間接的に標識してもよい。

30

【0058】

本明細書で核酸を表すために使用される「相補鎖」または「相補的」は、核酸分子のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体の間のワトソン-クリック塩基対形成（例えばA-T/UおよびC-G）またはフーグスティーン塩基対形成を意味する。完全な相補鎖または完全に相補的とは、核酸分子のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体の間の100%相補的な塩基対形成を意味し得る。

40

【0059】

本明細書で使用される「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、例えば核酸の複雑な混合物中において第1の核酸配列（例えばプローブ）が第2の核酸配列（例えば標的）にハイブリダイズする条件を表す。ストリンジェントな条件は配列に依存し、異なる状況によって変動し得るものあり、当業者によって適宜選択され得る。ストリンジェントな条件は、規定されたイオン強度pHにおけるその特定の配列の熱的融点（ $T_m$ ）より約5~10 低くなるように選択し得る。 $T_m$ は、標的と相補的なプローブの50%が、（規定されたイオン強度、pH、および核酸濃度下で）平衡状態で標的配列とハイブリダイズする温度であり得る（標的配列は過剰に存在するので、 $T_m$ においては、プローブの50%が平衡状態

50

で結合に従事している)。ストリンジェントな条件は、pH 7.0~8.3において塩濃度が約1.0 M未満のナトリウムイオン、例えば約0.01~1.0 Mのナトリウムイオン濃度(またはその他の塩)であって、温度は、短いプローブ(例えば約10~50ヌクレオチド)の場合は少なくとも約30、長いプローブ(例えば約50ヌクレオチド超)の場合は少なくとも約60である条件であり得る。ストリンジェントな条件は、ホルムアミドのような不安定化剤の添加によっても達成することができる。選択的または特異的なハイブリダイゼーションにおいては、陽性シグナルがバックグラウンド・ハイブリダイゼーションの少なくとも2~10倍であり得る。典型的なストリンジェント・ハイブリダイゼーション条件は以下のものを含む: 50%ホルムアミド、5xSSC、および1% SDSで、42 においてインキュベートし、または、5xSSC、1% SDSで65 においてインキュベートし、0.2xSSCおよび0.1% SDSで65 において洗浄する。しかしながら、例えば塩濃度など、温度以外にもいくつかの要素がハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響し得、当業者は同様のストリンジェンシーを達成するためにこれらの要素を適宜選択することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0060】

本明細書で使用される「実質的に同一」とは、核酸またはアミノ酸の配列が、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50もしくはそれ以上の個数のヌクレオチドもしくはアミノ酸の領域に渡って、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一であることを表し、あるいは、核酸に関しては、第1の配列が第2の配列の相補鎖と実質的に相補的である場合を表す。好ましくは、そのような変異体核酸配列および変異体ポリペプチド配列は、本願に記載される配列と75%以上(すなわち80、85、90、95、97、98、99%またはそれ以上)の配列同一性を共有する。好ましくは、そのような配列同一性は参照配列(すなわち本願に記載される配列)の全長に関して計算される。

#### 【0061】

本明細書で使用される「実質的に相補的」とは、核酸配列が、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50もしくはそれ以上の個数のヌクレオチドの領域に渡って、第2の配列の相補鎖に対して少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一であること、または、2つの配列がストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズすることを表す。

#### 【0062】

本明細書で使用される「標的指向化物質」とは、標的細胞表面上の受容体その他の分子に結合する、リガンド、ポリマー、タンパク質、サイトカイン、ケモカイン、ペプチド、核酸、脂質、糖類、多糖類、小分子、またはこれらのあらゆる組合せ(例えば糖脂質、糖タンパク質等)を表す。典型的な小分子標的指向化化合物は葉酸であり、これは葉酸受容体を標的とする。標的指向化分子の選択を通じて、特異性の程度を調節することができる。例えば抗体は非常に特異的である。これら抗体はポリクローナル、モノクローナル、断片、組換え、または単一鎖であり得、その多くは市販されているか、または標準的な技術を使用して容易に得ることができる。抗体の例としては、アブシキシマブ、バシリキシマブ、セツキシマブ、インフリキシマブ、リツキシマブ、トラストズマブ等が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0063】

「トランスフェクション」という用語は、外来DNAが細胞により取り込まれることを表す。外因性(すなわち外来の)DNAが細胞膜の内側に導入された場合、その細胞は「トランスフェクトされた」ことになる。トランスフェクションは一過性(すなわち、導入されたDNAが染色体外に留まり、細胞分裂の際に希釈される)または安定性(すなわち、導入されたDNAが細胞ゲノムに挿入されるか、もしくは安定的なエピソーム性因子として維持される)であり得る。

#### 【0064】

「共トランスフェクション」とは、所与の細胞に2つ以上のベクターを同時にまたは連

続的にトランスフェクトすることを表す。

【0065】

「プロモーターエレメント」または「プロモーター」または「制御領域」という用語は、細胞中でRNAポリメラーゼに結合することができ（例えば直接的に、または他のプロモーター結合タンパク質もしくは物質を介して）、コード性または非コード性のRNA配列の転写が開始されることを可能とするDNA制御領域を表す。プロモーター配列は、一般的に、その3'末端に転写開始部位があり、何らかのレベルで転写を開始するために必要とされる最小数の塩基またはエレメントを含むよう上流側（5'方向）に延びる。プロモーター配列内に転写開始部位（例えばヌクレアーゼS1を用いたマッピングにより簡便に決定される）、およびRNAポリメラーゼの結合に寄与するタンパク質結合ドメイン（コンセンサス配列）が見出され得る。プロモーターには、他の発現制御配列（エンハンサーおよびリプレッサー配列を含む）が作用可能に付随し得る。

10

【0066】

「作用可能な組合せで」、「作用可能な順番で」、あるいは「作用可能に連結されて」という用語は、所与の遺伝子の転写および/または所望のタンパク質分子の合成を誘導することができる核酸分子が生じるような態様で核酸配列を連結することを表す。この用語はまた、機能的なタンパク質が生じるような態様でアミノ酸配列を連結することも表す。

【0067】

本明細書で使用される「検査試料」または「生物学的試料」とは、核酸および/またはポリペプチドを含有する生物学的組織または体液の試料を意味し得る。そのような試料としては動物から単離された組織が含まれるがこれに限定されない。生物学的試料にはまた、生検試料および剖検試料のような組織の切片、組織学的目的で採取された凍結切片、血液、血漿、血清、痰、糞便、涙、粘液、尿、浸出液、羊水、腹水、体毛、ならびに皮膚も含まれ得る。生物学的試料にはまた、患者組織に由来する外植片ならびに初代細胞および/または形質転換細胞の培養物も含まれる。生物学的試料は、動物から細胞の試料を採取することによって提供し得るが、過去に単離された細胞（例えば、別の者によって、別の時に、および/または別の目的のために単離された細胞）を使用すること、または本明細書に記載される方法をインビボで実施することによっても達成することができる。保存記録組織（例えば治療または治療成果の履歴を有するもの）も使用し得る。

20

【0068】

「ベクター」という用語は、遺伝子配列を標的細胞に移入することができる核酸アセンブリ（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、粒子性担体、およびリポソーム）を表す。「発現ベクター」という用語は、細胞中で対象配列または遺伝子の発現を誘導することができるプロモーターを含有する核酸アセンブリを表す。ベクターは、典型的には、そのベクターでトランスフェクトされた細胞を選択するための選択可能マーカをコードする核酸配列を含有する。一般的に、「ベクター構築物」、「発現ベクター」、および「遺伝子導入ベクター」とは、対象遺伝子の発現を誘導することができる、そして標的細胞に遺伝子配列を移入することができる、何らかの核酸構築物を表す。従ってこの用語は、クローニングおよび発現の媒体、ならびにウイルスベクターを含む。

30

【0069】

### 3. 薬学組成物および使用方法

本発明は、少なくとも1つのFRYポリペプチド、または、FRYポリペプチドをコードする少なくとも1つのFRYポリヌクレオチド、および薬学的に許容される担体を含有する、薬学組成物を提供する。対象者にこの薬学組成物を投与するためには、1つ以上の薬学的に許容される担体を含有する組成物中に上記分子を調製することが好ましい。「薬学的に許容される」という語句は、当該技術分野で周知の経路を使用して投与された場合にアレルギー反応その他の有害反応を生じない分子の実体および組成物を表す。「薬学的に許容される担体」としては、臨床的に有用な溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤等のあらゆる全てが含まれる。

40

【0070】

50

上記薬学組成物は、配列番号2と実質的に同一であるFRYポリペプチドを含み得る。このFRYポリペプチドは、配列番号2の保存的に改変された変異体であってもよい。当業者は、当該技術分野で知られるルーチン的方法を利用して、FRYポリペプチドの活性を維持するためのアミノ酸保存性置換を同定し、そのためのポリペプチドの長さを決定することができる。

#### 【0071】

FRYポリペプチドは、単離タンパク質または精製タンパク質であり得る。FRYポリペプチドは融合タンパク質でもあってよい。FRYポリペプチドは、例えば抗体、抗体断片、または特異的受容体に標的指向化されるペプチドリガンドのような、標的指向化物質に融合させることができる。その例には、RGDモチーフを有する直鎖状ペプチド、EGFモチーフを有するペプチド、TATのような細胞貫通性ペプチドが含まれるが、これらに限定されない。さらなる手引きを得るために当業者はAusubel et al. (上記)、Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)を参考にすることができる。あるいは、本発明のペプチド/ポリペプチド/タンパク質を化学合成することもできる(例えばCreighton, Proteins: Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman & Co., NY, 1983を参照のこと)。

#### 【0072】

「単離された」または「精製された」ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質とは、自然状態において付随している他のタンパク質、脂質、および核酸から分離されたペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を表す。ポリペプチド/タンパク質は、精製調製物の乾燥重量の少なくとも10%(すなわち、10%と100%の間のいずれかの割合、例として20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、および99%)を占めることができる。純度はあらゆる適切な標準的方法により測定することができ、例えばカラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはHPLC分析によって測定し得る。本発明で記述される単離ポリペプチド/タンパク質は、天然供給源から精製してもよいし、組換えDNA技術によって製造してもよいし、または化学的方法によって製造してもよい。

#### 【0073】

FRYポリペプチドは標的指向化物質に結合させることもできる。共有結合的付着は、相互に反応する官能基を治療用物質とFRYポリペプチドとに組み入れること、あるいは、ホモおよび/またはヘテロ多官能性クロスリンカーを使用することにより達成することができる。分解可能な共有結合の例としては、酵素感受性のペプチドリinkerおよび結合;自己分解可能なエステルおよびチオエステル結合;イミン、ヒドラゾン、カルボキシヒドラゾン、ケタール、アセタール、シス-アコニチル、およびトリチル結合のような酸感受性結合;低酸素感受性リンカー;ならびに自己犠牲(self-immolative)結合が含まれるが、これらに限定されない。BIOCONJUGATE TECHNIQUES (Academic Press; 1st edition, Greg T. Hermanson, 1996)は、生体分子の修飾または架橋のための技術を記述している。BIOCONJUGATE TECHNIQUES (Academic Press; 1st edition, Greg T. Hermanson, 1996)は、生体分子の修飾または架橋のための技術を記述している。

#### 【0074】

FRYポリペプチドは、半減期および安定性を向上させるためにPEG化することもできる。FRYポリペプチドはまた、安定性を向上させるために生分解性ポリマーに結合させることもでき、その例としてはポリ乳酸および/もしくはポリグリコール酸、ポリ酸無水物、ポリカプロラクトン、ポリエチレンオキシド、ポリブチレンテレフタレート、デンプン、セルロース、キトサン、ならびに/またはこれらのいずれかの組合せが含まれる。

#### 【0075】

薬学組成物は、FRYポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み得る。このFRYポリヌクレオチドは配列番号1と実質的に同一であり得る。このFRYポリヌクレオチドは配列番号1と実質的に相補的であり得る。このFRYポリヌクレオチドはまた、配列番号1の保存的に改変された変異体であり得る。当業者は、当該技術分野で知られるルーチン的方法を利用して、FRYポリペプチドの活性を維持するための核酸保存性置換を選択・同定し、そ

10

20

30

40

50

のためのポリヌクレオチドの長さを決定することができる。

【0076】

FRYポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、癌細胞に送達するために様々なベクターに組み入れてもよいし、あるいは裸の(ベクターをもたない)DNAとして送達してもよいことは、当業者により認識されるであろう。FRYポリヌクレオチドを含有する薬学組成物は、カテーテルのような送達器具を使用することにより送達し得る。他の送達器具も当業者に知られている。

【0077】

本発明のFRYポリヌクレオチドを収容するための適切なベクターとしては、プラスミドベクターおよびウイルスベクターが含まれるが、これらに限定されない。Daya, S et al., "Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors", *Clinical Microbiology Reviews* Oct. 2008, p. 583-593 Vol. 21, No. 4を参照のこと。本発明の方法は、分子生物学の分野におけるルーチンの技術を利用する。一般的な分子生物学的方法を開示している基礎的文献としては、Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3rd ed. 2001)およびAusubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1994)が挙げられる。

10

【0078】

一実施態様において、ベクターは、パルボウイルスファミリーに属するアデノ随伴ウイルス(AAV)を含む。当業者は、AAVの利点として、病原性でないという事実、および、AAVで処置されたほとんどの人はこのウイルスを除去するための免疫反応を起こさないという事実があることを認識するであろう。

20

【0079】

アデノウイルスベクターおよびAAVベクターは両方とも、導入遺伝子(所望の標的遺伝子に向けられた導入遺伝子を含む)を中枢神経系細胞に送達する上で有効であることが示されている。例えば、Bankiewicz et al., "Long-Term Clinical Improvement in MPTP-Lesioned Primates after Gene Therapy with AAV-hAADC", *Mol. Ther.*, E-publication Jul. 6, 2006 (MPTP病変サルにおいて、L-アミノ酸デカルボキシラーゼ抑制因子(AAV-hAADC)遺伝子治療剤をコードする核酸配列を含有する線条体内AAVと、ドーパミン前駆体であるL-ドーパの投与との組合せが、臨床的評点スコアの長期的改善、L-ドーパ要求性の有意な低下、およびL-ドーパ誘発性副作用の減少をもたらした。)、Machida et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 343(1): 190-7 (2006) (疾患発症後のHDモデルマウスの線条体にrAAVを介してRNAiを送達することにより、突然変異遺伝子の発現を直接的に抑制したことが報告されている。)、Mittoux et al., *J. Neurosci.* 22(11):4478-86 (2002) (アデノウイルスを介して繊毛様神経栄養因子を脳に送達することにより、神経毒素に対する線条体神経細胞の生存率上昇をもたらされた。)を参照のこと。

30

【0080】

癌細胞にFRYヌクレオチドを送達するための他のベクターの例としては、レンチウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アルファウイルスベクター、およびヘルペスウイルスベクターが含まれるが、これらに限定されない。ベクターはさらに、そのベクターのために選択される制御領域に応じて、一定の種類で発現されるように設計することもできる。その制御配列は器官および/または組織特異的プロモーターであり得る。例として、Mellonらは、GnRH制御領域の制御下にSV40 T抗原癌遺伝子を含むトランスジェニックマウスを作成することにより、ゴナドトロピン放出因子を分泌する視床下部ニューロンを含むクローン化され分化された神経分泌性細胞株を開発することに成功した(*Neuron*, 5(1): 1-10 (1990))。さらなる手引きを得るために当業者はAusubel et al. (上記)、Sambrook et al. (*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)を参考にすることができる。インビトロまたはインビボでレトロウイルスを生成し細胞を感染させるための他の方法は、*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F. M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Sections 9.10-9.14に記述されている。

40

50

## 【0081】

薬学組成物は、癌治療のための追加的な抗悪性腫瘍剤をさらに含んでいてもよいし、または、他の抗悪性腫瘍剤とともに同時投与されてもよい。その例としては、アバレリックス、アルデスロイキン、アレムツズマブ、アリトレチノイン、アロプリノール、アルトレタミン、アミフォスチン、アナストロゾール、三酸化ヒ素、アスバラギナーゼ、アザシチジン、ベバシズマブ、プレオマイシン、ボルテゾミブ、カペシタビン、カルボプラチン、カルムスチン、セレコキシブ、セツキシマブ、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリピン、クロファラビン、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ダウノルビシン、ダウノマイシン、デクスラゾキサソ、ドセタキセル、ドキシソルビシン、エピルビシン、エポエチンアルファ、エルロチニブ、エストラムスチン、リン酸エトポシド、エトポシド、VP-16、エキセメスタン、フィルグラスチム、フロクスウリジン、フルダラビン、フルオロウラシル、5-FU、フルベストラント、ゲフィチニブ、ゲムシタビン、ゲムツズマブ、酢酸ゴセレリン、酢酸ヒストレリン、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イホスファミド、メシル酸イマチニブ、インターフェロンアルファ2a、イリノテカン、レナリドマイド、レトロゾール、ロイコボリン、酢酸リュープロリド、レバミソール、ロムスチン、CCNU、メクロレタミン、ナイトロジェンマスタード、酢酸メゲストロール、メルファラン、L-PA M、メルカプトプリン、6-MP、メスナ、メトトレキサート、メトキサレン、マイトマイシンC、ミトタン、ミトキサントロン、ネララビン、ノフェツモマブ、オブレルベキン、オキサリプラチン、パクリタキセル、パリフェルミン、パミドロネート、ペガデマールゼ、ペメトレキセド二ナトリウム、ペントスタチン、ピボプロマン、プリカマイシン、ミトラマイシン、ポルフィマーナトリウム、プロカルバジン、キナクリン、ラスプリカーゼ、リツキシマブ、サルグラモスチム、ソラフェニブ、ストレプトゾシン、マレイン酸スニチニブ、タモキシフェン、テモゾロミド、テニポシド、VM-26、テストラクトン、チオグアニン、6-TG、チオテパ、トポテカン、トレミフェン、トシツモマブ、トラスツズマブ、ウラシルマスタード、バルルビシン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピノレルピン、ゾレドロネート、およびゾレドロン酸が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

## 【0082】

薬学的に許容される担体または添加物の例としては、水、薬学的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルデンプンナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアガム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン (HSA)、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、薬学的に許容される界面活性剤等が含まれる。使用される添加物は、本発明の投与形態に依存して、上記のものまたはそれらの組合せから適宜選択されるが、これらに限定されない。

30

## 【0083】

本発明の薬学組成物を医薬として使用する場合には、本発明の化合物を薬学的に許容される担体 (賦形剤、結合剤、崩壊剤、矯正剤、香料、乳化剤、希釈剤、可溶化剤等) と混合し、経口的または非経口的に投与できる薬学組成物を提供する。薬学組成物は一般的な方法によって調製できる。

40

## 【0084】

本発明は、癌を治療するための方法であって、FRYポリペプチドを含む、またはFRYポリペプチドをコードするFRYポリヌクレオチドを含む薬学組成物の有効量を、必要とする対象者に投与する方法を提供する。本発明はまた、必要とする対象者において癌の転移を抑制するための薬学組成物を提供する。

## 【0085】

癌の種類は、FRYの過少発現および/または機能的FRYポリペプチドの発現の欠如により特徴付けられる。一般的に、機能的FRYポリペプチドの発現の欠如は、同種類の非癌性細

50

胞におけるFRY機能が50%未満しか保持されていないこととして定義される。予め定められた基準を得るためには、正常細胞のFRYポリペプチドの存在レベル、発現レベル、および/または活性レベルを決定するための平易な試験が当該技術分野において知られている（例えばウェスタン・ブロッティング、免疫組織化学、および配列決定）。

【0086】

一般的に、上記癌は、上皮細胞から生じた癌として特徴付けられ得る。上記癌細胞はまた、幹細胞の表現型を有し得る。一実施態様では、癌は、乳癌、ホルモン受容体陰性乳癌、または、乳癌細胞がエストロゲン受容体（ER）、プロゲステロン受容体（PR）、およびヒト上皮成長因子受容体2（Her2）を欠く三重陰性乳癌である。

【0087】

これらの条件により特徴付けられる癌のその他の種類は、固形腫瘍または液状癌の中から選択され得る。固形腫瘍としては、前立腺癌、卵巣癌、肺癌、脳癌、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、肺の扁平上皮癌等が含まれるが、これらに限定されない。他の実施態様では、血液細胞の様々な癌が治療の適用対象となる。これらの血液癌としては、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、有毛細胞白血病、骨髄腫、およびリンパ腫が含まれるが、これらに限定されない。他の実施態様では、その他の種類の癌として、腺癌、扁平上皮癌、腺扁平上皮癌、メラノーマ、退形成性癌(anaplastic carcinoma)、退形成性(anaplastic)もしくは未分化(undifferentiated)の癌のような細胞腫が含まれる。

【0088】

癌の性質に応じて、本発明の薬学組成物は、経口投与、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、結腸内投与、頭蓋内投与、くも膜下腔内投与、脳室内投与、尿道内投与、腔内投与、皮下投与、眼内投与、鼻腔内投与、およびこれらのあらゆる組合せからなる群から孤立に選択される経路により、投与することができる。

【0089】

本明細書では、非経口投与として、皮下注射、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、点滴または局所投与（経皮投与、経眼投与、経肺もしくは気管支投与、経鼻投与、経直腸投与等）などが含まれる。

【0090】

本発明の薬学組成物の投与量は、年齢、体重、全般的健康状態、性別、食生活、投与時間、投与方法、クリアランス速度、および、患者が治療している疾患のその時点におけるレベルに応じて、あるいはさらに他の要素を考慮して、決定される。本発明の化合物の1日あたりの投与量は、患者の状態および体重、化合物の種類、投与経路等に依存して変動するが、例えば、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、経皮投与、経眼投与、経肺もしくは気管支投与、経鼻投与、経直腸投与により0.01~100 mg/患者/日にて非経口投与される。

【0091】

経口投与形態としては、カプセル、錠剤、乳濁液、ならびに水性の懸濁液、分散液、および溶液が含まれ得る。錠剤の場合は、一般的に使用される担体として、ラクトースおよびコーンスターチが含まれるが、これらに限定されない。潤滑剤（例えばステアリン酸マグネシウムがあるがこれに限定されない）もまた通常添加される。カプセル形態での経口投与のための有用な希釈剤としてはラクトースおよび乾燥コーンスターチが含まれるがこれらに限定されない。水性懸濁液または乳濁液を経口投与する場合には、乳化剤または懸濁剤と組み合わせられた油相に活性成分を懸濁または溶解することができる。所望であれば、一定の甘味剤、着香剤、または着色剤を添加することができる。

【0092】

特定の例において、経口投与量の範囲は、単一のまたは分割した投与にて体重1 kgあたり約1.0~約100 mgであり、これには体重1 kgあたり約1.0~約50 mg、体重1 kgあたり約1.0~約25 mg、体重1 kgあたり約1.0~約10 mgが含まれる（約70 kgの平均的体重を前提とする。平均より重い人あるいは軽い人についてはこれに応じて値が調節される）。経口投

10

20

30

40

50

与のためには、組成物は、例えば約50～約1000 mgの活性成分を含む（特に、治療されている対象者に対する投与量に対症的に調節するために、約75 mg、約100 mg、約200 mg、約400 mg、約500 mg、約600 mg、約750 mg、または約1000 mgの活性成分を含む）錠剤の形態で提供される。

【0093】

#### 5. 癌の診断、予後、および治療有効性についての方法

本発明はまた、診断方法、および、癌の予後を評価するための方法を提供する。癌を有する、または癌に罹りやすい対象者を、FRY遺伝子の発現のレベル、パターン、またはプロファイルに基づいて決定することができ、例えば対象者からの検査試料中の核酸（例えばmRNA、miRNA）またはポリペプチドを、予め定められた基準もしくは対応する非癌性試料中の基準レベルと比較する。換言すれば、癌が存在するか否かを示すマーカー、あるいは癌になるリスクを示すマーカーとして、さらには癌の予後を評価するためのマーカーとして、FRYのポリペプチドおよび核酸を使用することができる。本発明の診断アッセイおよび予後アッセイとしては、核酸またはポリペプチドの発現レベルを評価する方法が含まれる。この方法およびキットは、癌の種類および癌のステージを検出することを可能とする。例えば、FRYの遺伝子発現レベルの相対的増加は、腫瘍の大きさの減少を示し得る。

【0094】

ブルーム・リチャードソン・エルストンのグレード化システムは、乳癌をグレード化するための乳癌予後分類システムを提供する。より低いグレードの腫瘍は、予後の良さと関連しており、治療の積極性をより低くすることができ、対象者はより良好な生存率を有する。より高いグレードの腫瘍は、予後の悪さと関連しており、より積極的に治療がなされる。グレードまたはスコアは、例えばその癌の進行速度、拡散度等の多くの可変要素に基づいて癌に割り当てられ、他の要素も当業者によって検討される。当業者は、適切な癌グレード化システムおよび各グレードの腫瘍におけるFRYの発現に基づいて様々な腫瘍を比較することにより、FRYの発現レベルに基づく癌グレード化システムを開発することができる。例えば、FRYの発現レベルを、グレード1の乳癌細胞、グレード2の乳癌細胞、等において決定することができる。このようにして、対象者から乳腺腫瘍試料が得られた場合に、FRYの発現レベルがその乳癌のグレードを決めることができ、その癌についての予後を対象者に提供することができる。癌グレード化システムの例としては、悪性腫瘍のTNM分類、および前立腺癌のためのグリーソン・グレード化システムが含まれる。

【0095】

検査試料における核酸またはポリペプチドの存在、レベル、または不在は、検査対象者から検査試料を得て、ポリペプチドまたは核酸を検出することができる化合物または物質（例えばmRNA、miRNA、またはゲノムDNAのプロープ）にその検査試料を接触させることにより評価することができる。「検査試料」とは、対象者から単離された組織、細胞、および生物学的液体、ならびに、対象者内に存在する組織、細胞、および液体を含む。対象遺伝子（複数可）の発現のレベルは多くの方法で測定することができ、それら方法には、その遺伝子によりコードされるmRNAを測定すること、その遺伝子によりコードされるポリペプチドの量を測定すること、またはその遺伝子によりコードされるポリペプチドの活性を測定することが含まれる。

【0096】

発現されたRNAの試料は、よく知られた多くの手順のうちのいずれかを使用して、生物学的試料から単離することができる。例えば、グアニジウムに基づく溶解緩衝液（RNAを安定化させるための添加成分を任意で含む）中で生物学的試料を溶解することができる。ある実施態様では、上記溶解緩衝液は、細胞培養物からのRNAの回収率および安定性をモニターするための対照として、精製RNAを含有し得る。そのような精製RNA鑄型の例としては、プロメガ社（ウィスコンシン州マディソン）のカナマイシン陽性対照RNA、およびライフテクノロジー社（メリーランド州ロックビル）の7.5 kbポリ(A)テール付きRNAが含まれる。溶解物はすぐに使用してもよいし、例えば-80 °Cにおいて冷凍保存してもよい。

【0097】

10

20

30

40

50

任意で、例えばRNEASY精製プラットフォーム（キアゲン社、カリフォルニア州バレンシア）のような、自動化可能な96ウェル形式におけるシリカに基づく単離法を使用して、細胞溶解物（またはその他の種類の試料）から全RNAを精製し得る。あるいは、マイクロビーズまたはセルロースカラムに結合させたオリゴdTを用いた固相オリゴdT捕獲を使用してRNAを単離する。この方法は、ゲノムDNAおよび全RNAからmRNAを単離し、mRNA捕獲媒体を直接的に逆転写反応に移すことを可能にするという、追加の利点を有する。シリカでコーティングされたビーズまたはグアニジウムを用いた抽出など、他のRNA単離法も考慮される。RNAの単離および調製のためのさらなる方法は当業者が案出することができる。

#### 【0098】

本発明の方法は、粗製の細胞溶解物を使用して実施することもでき、その場合RNAを単離する必要性が省かれる。粗製試料にはRNAseインヒビターが任意で添加される。粗製の細胞溶解物を使用する場合には、試料によっては、ゲノムDNAが標的配列（例えば遺伝子）の1以上のコピーを提供し得ることに留意すべきである。標的配列が1以上の高レベル発現遺伝子に由来する状況では、ゲノムDNAに起因するシグナルは有意なものにはならないかもしれない。しかし、低いレベルで発現される遺伝子の場合には、試料をDNAseで処理するか、または、後でcDNAもしくは増幅産物をプライミングする際にスプライス部位を標的とするプライマーを使用することにより、バックグラウンドを除去することができる。例えば、2つの標的特異的プライマーの内の1つを、スプライス部位を跨ぐように設計し、鋳型からDNAを排除することができる。別の例として、スプライス部位に隣接するように2つの標的特異的プライマーを設計し、プロセスされたmRNA鋳型と比べてDNAまたは未スプライシングmRNAの鋳型はより大きなPCR産物を生じるようにすることができる。粗製抽出物を本発明の目的のための試料として使用することを容易にする、様々な特化されたプライミング法の応用を、当業者は設計することができる。

#### 【0099】

細胞内の遺伝子に対応するmRNAのレベルは、インサイチュ(in situ)およびインビトロのいずれでも決定することができる。検査試料から単離されたメッセンジャーRNAを、ハイブリダイゼーション・アッセイまたは増幅アッセイ（サザンもしくはノザン解析、PCR解析、およびプローブアレイを含む）において使用することができる。mRNAレベルの検出のための好ましい診断的方法は、遺伝子によりコードされたmRNAとハイブリダイズすることができる核酸プローブに、単離されたmRNAを接触させることを含む。上記プローブは、全長核酸、あるいはその一部分であってもよく、例えば少なくとも10ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドであってストリンジェントな条件下でmRNAに特異的にハイブリダイズする上で十分なものであり得る。

#### 【0100】

1つの形式においては、mRNA（またはそれから調製されたcDNA）を表面上に固定化してプローブと接触させるが、これは例えば、単離されたmRNAをアガロースゲル上で泳動して、ゲルから膜（例えばニトロセルロース）へとそのmRNAを移すことによって行われる。別の形式では、例えば遺伝子チップアレイのように、プローブを表面上に固定化してmRNA（またはcDNA）をそのプローブに接触させる。当業者であればmRNAのレベルを検出するための既知のmRNA検出法を適合させることができる。

#### 【0101】

調べられる対象となる遺伝子によりコードされた、試料中のmRNA（またはそれから調製されるcDNA）のレベルは、核酸増幅、例えば標準的なPCR（米国特許第4,683,202号）、RT-PCR（Bustin S. J Mol Endocrinol. 25: 169-93, 2000）、定量的PCR（Ong Y. et al., Hematology. 7:59-67, 2002）、リアルタイムPCR（Ginzinger D. Exp Hematol. 30:503-12, 2002）、およびインサイチュPCR（Thaker V. Methods Mol Biol. 115:379-402, 1999）、または任意のその他の核酸増幅法を行った後に、増幅された分子を当該技術分野で知られる技術を用いて検出することにより、評価することができる。

#### 【0102】

「プライマー」という用語は、その3'末端において相補的な核酸分子とハイブリダイ

10

20

30

40

50

ズすることができ、核酸ポリメラーゼにより伸長され得る遊離3'ヒドロキシ末端を提供する、あらゆる核酸を表す。本明細書で使用される場合、増幅プライマーとは、遺伝子の5'または3'領域(それぞれプラス鎖およびマイナス鎖、またはその逆)にアニールすることができ、それらの間に短い領域を包含する、核酸分子の対である。適切な条件下で適切な試薬を用いれば、そのようなプライマーは、それらプライマーに隣接するヌクレオチド配列を有する核酸分子を増幅することを可能とする。インサイチュの方法においては、細胞または組織試料を調製して支持体(例えばスライドガラス)上に固定化し、それからmRNAとハイブリダイズすることができるプローブに接触させる。発現RNA試料に相当する核酸を増幅するための代替法としては、米国特許第7,897,750号に記載されたものが含まれる。

10

#### 【0103】

別の実施態様では、本発明の方法は、遺伝子のmRNAを検出することができる化合物または物質を対照試料に接触させ、その対照試料中のmRNAの存在を検査試料中のRNAの存在と比較することをさらに含む。

#### 【0104】

上に記述した核酸に基づく診断的方法は、対象者が癌により特徴付けられる疾患もしくはその素因を有しているか否かということ、癌が転移する可能性、または癌が転移していることを決定するための定性的および定量的情報を提供することができる。

#### 【0105】

本明細書で開示される遺伝子によりコードされるポリペプチドのレベルを決定するためには、様々な方法を使用することができる。一般的に、これらの方法は、そのポリペプチドに選択的に結合する物質(例えば抗体)に接触させて、試料中のポリペプチドのレベルを評価することを含む。抗体はポリクローナルであってもよく、あるいはより好ましくはモノクローナルであり得る。完全な抗体、あるいはその断片(例えばFabまたはF(ab')<sub>2</sub>)も使用できる。好ましい一態様において、抗体は、検出可能な標識を有する。本明細書に記載される配列番号3に結合するFRY抗体は、1つのそのような例である。「標識」という用語は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、化学的、またはその他の物理的手段により検出可能な組成物を表す。例えば、有用な標識としては、<sup>32</sup>P、蛍光色素、高電子密度試薬、酵素(例えばELISAで通常使用されるもの)、ビオチン、ジゴキシゲニン、またはハプテン、および検出可能とすることができるその他のものが含まれる。標識は、核酸およびタンパク質の任意の位置に組み入れることができる。プローブまたは抗体に関して「標識された」という用語は、検出可能物質を物理的に連結させることによりプローブまたは抗体を直接標識することだけでなく、検出可能物質との反応性によりプローブまたは抗体を間接的に標識することも包含することが意図される。例えば、ウサギFc領域を有する抗体は、そのウサギFc領域に対する第2の抗体を使用して間接的に標識することができ、ここでは、その第2の抗体が検出可能物質と結合される。検出可能物質の例は本明細書で提示される。適切な検出可能物質または標識としては、放射性同位体(例えば<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>3</sup>H、もしくは<sup>32</sup>P)、酵素(例えばアルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、もしくはガラクトシダーゼ)、蛍光性の成分もしくはタンパク質(例えばフルオレセイン、ローダミン、フィコエリトリン、緑色蛍光タンパク質(GFP)、もしくは青色蛍光タンパク質(BFP)、または発光性の成分(例えばクオンタム・ドット社(カリフォルニア州パロアルト)のQdot(登録商標)ナノ粒子)が含まれる。

20

30

40

#### 【0106】

検出方法は、インビトロで生物学的試料中のポリペプチドを検出することのみならずインビボにおけるポリペプチドの検出にも使用され得る。ポリペプチドを検出するためのインビトロ技術としては、ELISA、免疫沈降法、免疫蛍光法、EIA、RIA、およびウェスタン・ブロッティング解析が含まれる。ポリペプチドを検出するためのインビボ技術としては、標的抗体を対象者中に導入することが含まれる。例えばその抗体を上記のように検出可能物質で標識することができる。対象者中の上記検出可能物質の存在および位置は、標

50

準的な画像解析技術により検出することができる。

【0107】

本明細書に記載される診断方法は、癌を有する対象者、または癌を発生する危険性を有する対象者を同定することができる。本明細書に記載される予後アッセイは、対象者が癌治療のための薬剤（例えば作動薬、拮抗薬、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子、またはその他の薬剤候補）を投与することに適しているか否かを決定するために使用され得る。例えば、そのようなアッセイは、癌治療のために上記薬学組成物またはその他の適切な薬剤を対象者に投与することができるか否かを決定するために使用することができる。

【0108】

癌を発生する危険性を有する対象者を同定するための方法の別の側面は、対象者のFRY遺伝子における易罹患性多型を検出することを含み、ここで、易罹患性多型の存在は、癌を発生する危険性が高いことを予測する。FRY遺伝子における易罹患性多型は、FRYポリペプチドの機能喪失またはFRYポリペプチドの不在を引き起こす多型である。機能喪失とは、腫瘍成長を抑制する能力および/または分化を誘導する能力の喪失として定義される。FRY機能の喪失を決定するためのアッセイは当該技術分野において知られており、下記に記述する。一実施態様において、上記多型は、FRYポリペプチドの保存された領域においてアミノ酸置換をもたらす一塩基多型である。易罹患性多型は、例えば配列決定またはハイブリダイゼーションによる遺伝子型決定のような、当該技術分野で知られる方法により検出することができる。多型がコード領域中にありアミノ酸の変化をもたらす場合には、ポリペプチド中のアミノ酸変化の解析を使用して上記多型を検出し得る。

【0109】

対象者において癌の治療を監視する、またはその治療の有効性を決定する方法も、本発明により提供される。この目的のためには、本明細書で開示される遺伝子の発現レベルを、治療を行う前、途中、または後の対象者からの検査試料について決定し得る。そして、ベースラインのレベルと比較した上記レベルの変化の大きさを評価する。一般的に、治療の前に癌の試料を採取し、治療後に試料を採取し、これら2つの試料の間のFRYのレベルを比較し、治療後試料においてFRYポリペプチドのレベルが上昇したか否かによって、その治療が有効であるか否かを当業者がさらに決定することができる。FRYポリペプチドのレベルの上昇は、その治療が有効であることを示し、医療従事者は何らかの追跡治療のための適切な療法、投与量、および投与計画をさらに決定することができる。

【0110】

4. FRY抗体、およびFRY抗体とポリヌクレオチドを含むキット

別の側面において本発明は、FRY抗体、ならびに、本明細書に記載される生物学的試料中のFRY遺伝子発現解析およびFRYポリペプチド検出を行うための方法、組成物、およびシステムを具現化する、キットを提供する。

【0111】

FRYポリペプチドに結合する単離抗体が本発明において提供される。本発明の抗体は、FRYに対する抗体であり、FRY、またはFRYのアミノ酸配列から選択された任意のポリペプチド、またはFRYポリペプチド内で選択されたエピトープを用いて、動物を免疫し、インビボで生成された抗体を、当業者に知られる通常の手順に従って回収して精製することにより、取得することができる。FRYポリペプチドはペプチド領域WGVERRRSLDSLKDC（配列番号3）を含有する。配列番号3を抗原上のエピトープとして産生するためのルーチン的方法は当該技術分野において知られている。ある実施態様では、配列番号3を抗原上のエピトープとして使用して、動物を配列番号3によって免疫し得る。抗原は、配列番号3と実質的に同一のエピトープを含み得る。エピトープはまた、配列番号3の保存的に改変された変異体であってもよい。モノクローナル抗体は、既知の方法（例えば、Kohler and Milstein, Nature, (1975) 256, pp. 495-497; Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, pp. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)）に従って、FRYに対する抗体を産生する抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを樹立することにより得ることができる。

## 【0112】

FRYに結合する抗体、またはFRYポリペプチド内で選択されるエピトープに結合する抗体は、ファージ・ディスプレイ技術を使用して取得することができる。さらなる実施態様では、FRYおよび配列番号3に結合する抗体もファージ・ディスプレイ技術を使用して取得し得る。本発明の抗体を作製するために使用できるファージ・ディスプレイ法の例としては、Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184: 177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994)により開示されているものが含まれる。本発明はまた、配列番号3をコードするポリヌクレオチドと、配列番号3をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターとを含む。

10

## 【0113】

FRYおよび配列番号3に結合する抗体は、検出可能なように標識することもできる。標識の非限定的な例としては、放射性同位体、酵素、酵素断片、酵素基質、酵素阻害剤、補酵素、触媒、フルオロフォア、色素、化学発光物質、発光物質、または感作物質、非磁性もしくは磁性粒子、放射線不透過性物質として使用されるヨード化糖類が含まれ、リンカーに付加させ抗体に結合させることができる。そのような方法は当業者に知られており、例えばBIOCONJUGATE TECHNIQUES (Academic Press; 1st edition, Greg T. Hermanson, 1996)は生体分子の修飾または架橋のための技術を記述している。

## 【0114】

さらなる側面において、本発明は、FRYポリペプチドに特異的に結合する1つ以上の検出試薬を含むキットを提供する。好ましくは、このキットは、配列番号3に結合する抗体を含む。検出試薬は、FRYポリペプチドに結合するFRY抗体の側面に位置することが知られるペプチド配列であり得る。上記試薬は固形マトリックスに結合しているか、または、それをマトリックスに結合させるための試薬と共に包装され得る。固形マトリックスまたは基質は、ビーズ、プレート、チューブ、ディップスティック、ストリップ、またはバイオチップの形態であり得る。位置を指定できる(with addressable locating)バイオチップまたはプレートおよび個別化されているマイクロタイタープレートは特に有用である。

20

## 【0115】

検出試薬は、洗浄試薬、および結合抗体(例えば標識化二次抗体)を検出することができる試薬、または標識抗体と反応することができる試薬を含む。キットはまた、対照試薬(陽性および/または陰性)、および/または抗体を検出するための手段を便宜よく含むであろう。使用説明書をキットに含ませることもできる。最も一般的には、上記キットは、当該技術分野で知られるもののように、公知のアッセイ(例えばELISAアッセイ)用に構成されるであろう。

30

## 【0116】

キットは、1つ以上の容器から構成されていてもよく、採取用備品を含んでいてもよく、これらの例としてはボトル、バッグ(例えば静脈内注入液バッグ)、バイアル、注射器、および試験管が挙げられる。他の構成要素としては、針、希釈剤、および緩衝液が含まれ得る。キットは、例えばリン酸緩衝食塩水、リンガー液、およびデキストロス溶液のような薬学的に許容される緩衝液を含有する少なくとも1つの容器を含むことが有用であり得る。

40

## 【0117】

上記アッセイおよびキットにおいて使用される抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得、任意の哺乳類で調製することができ、あるいは当該技術分野で知られる他の公知方法で調製してもよい。抗体結合の解析はいずれかの公知アッセイ方法(例えば競合的結合アッセイ、非競合的アッセイ、直接および間接的サンドイッチアッセイ、蛍光免疫アッセイ、免疫放射性定量アッセイ、発光アッセイ、化学発光アッセイ、酵素結合免疫蛍光アッセイ(ELIFA)、および免疫沈降アッセイ)を使用して行うことができる(Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987); Harlow and Lome (1998) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Har

50

bour Publications, New York.)。

【0118】

本発明は、生物学的試料中においてFRYポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを同定するためのポリヌクレオチドを提供する。そのようなポリヌクレオチド配列としては、配列番号1およびその断片、ならびに配列番号1の相補鎖およびその断片、ならびに前記配列と高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする配列、ならびに本明細書で開示されるプライマーが含まれる。一般的な組換え法を使用する当業者ならば、FRYポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを検出するために使用するポリヌクレオチドを決定することができる。

【0119】

本明細書で開示されるポリヌクレオチドは、生物学的試料中のFRY遺伝子の存在を決定するためのキットに含ませることができる。そのようなキットは、本明細書に記載される核酸と共に、以下のいずれかまたは全てを含み得る：アッセイ試薬、緩衝液、プローブおよび/またはプライマー、ならびに無菌食塩水もしくは別の薬学的に許容される乳液および懸濁液基剤。加えて、上記キットは、本明細書に記載される方法の実施のための手引き（例えばプロトコル）を含む説明資料を含み得る。例えば、上記キットは、標的FRY mRNA配列の増幅、検出、同定、または定量のためのキットであり得る。その目的のために、上記キットは、ポリ(T)プライマー、フォワード・プライマー、リバース・プライマー、およびプローブを含み得る。

【0120】

1つの例において、本発明のキットは、複数の異なる核酸（その各々が、FRY遺伝子の異なる領域または核酸変異体に相当する）が配置された1つ以上のマイクロアレイスライド（あるいは代替的なマイクロアレイ形態）を含む。キットはまた、複数の標識されたプローブを含み得る。あるいは、キットは、プローブとして適切な複数のポリヌクレオチド配列、および、前記付属ポリヌクレオチド配列または実施者の裁量による他のポリヌクレオチド配列をカスタマイズするのに適した一揃いの標識を含み得る。通常は、付属のポリヌクレオチド配列の少なくとも1つは、対照配列、例えば「ハウスキーピング」遺伝子、アクチン等に相当する。典型的な標識としては、核酸プライマーに結合された蛍光発色団、色素、放射性標識、酵素タグが含まれるが、これらに限定されない。

【0121】

一実施態様において、発現されたRNA試料に相当する核酸を増幅することに適したキットが提供される。そのようなキットは、上記の増幅方法のいずれかにおける使用に適した試薬およびプライマーを含む。それに替えて、またはそれに加えて、キットは、プローブと標的核酸試料（例えばマイクロアレイ上に配置されたもの）との間のハイブリダイゼーションに対応するシグナルを増幅することに適したものである。

【0122】

それに加えて、生物学的試料を遺伝子発現解析のために調製する上で必要な1つ以上の材料および/または試薬が、任意でキットに含まれる。さらに、核酸を増幅することに適した1つ以上の酵素（様々なポリメラーゼ（RT、Taq等）を含む）、1つ以上のデオキシヌクレオチド、および、増幅のために必要な反応混合物を提供するための緩衝液が、任意でキットに含まれる。

【0123】

典型的には、キットは、mRNAを出発鋳型として使用して遺伝子発現パターンを解析するために利用される。mRNA鋳型は、全細胞RNAとして、または単離mRNAとして提供され得る。どちらの種類も同等の結果を生じる。他の実施態様では、本発明で記述される方法およびキットは、遺伝子発現のその他の産物（tRNA、rRNA、またはその他の転写産物を含む）の定量化を可能とする。

【0124】

任意で、本発明のキットは、データの産出、解析、および/または貯蔵を促進し、データベースへのアクセスを容易にするためのソフトウェアをさらに含む。上記ソフトウェア

10

20

30

40

50

は、データの回収、貯蔵、および/または解析に使用することができる論理命令、命令セット、または適切なコンピュータ・プログラムを含む。提供されたソフトウェアを使用して、データの比較および相関的な解析が可能である。

【0125】

#### 5. FRYの発現を誘導する化合物をスクリーニングする方法

本発明は、癌の治療のための候補化合物をスクリーニングするためのインビトロおよびインビボの方法であって、FRYポリペプチドの発現もしくは活性、またはFRY遺伝子の発現もしくは少なくとも1つのそのプロモーターの活性を上昇させる化合物の能力を決定することを含み、上記変化は癌の治療におけるその化合物の有用性を示す方法を提供する。従って上記方法は、FRYの発現もしくは活性、またはその遺伝子の発現もしくは少なくとも1つのそのプロモーターの活性を増加させる能力を有する化合物を選び出すことを可能にする。

【0126】

より具体的には、本発明のこの側面は、癌の治療のための候補化合物をスクリーニングするインビトロの方法であって、以下の工程を含むものである。

【0127】

- a. 少なくとも2つの生物学的試料または反応混合物を調製すること；

【0128】

- b. 上記試料または反応混合物のうちの1つを、1つ以上の試験化合物に接触させること；

【0129】

- c. 上記生物学的試料または反応混合物におけるFRYポリペプチドの発現もしくは活性、その遺伝子の発現、または少なくとも1つのそのプロモーターの活性を測定すること；

【0130】

- d. 未処理の試料または未処理の混合物と比較して、上記bで処理された試料または混合物において、FRYポリペプチドの発現もしくは活性、その遺伝子の発現、または少なくとも1つのそのプロモーターの活性の上昇が測定された化合物を選択すること。

【0131】

「反応混合物」は、当業者に知られているところにより、FRYポリペプチドの活性または発現を再現する全ての必要な試薬および生物学的材料を含む。

【0132】

インビボのスクリーニング方法は、例えばげっ歯類など、あらゆる実験動物において実行することができる。好ましい実施態様によれば、上記スクリーニング方法は、試験化合物を動物に投与すること、その後任意で安楽死により動物を犠牲にすること、および、腫瘍の試料を採取し、本明細書に記載されるいずれかの方法によって上記腫瘍における遺伝子の発現を評価することを含む。

【0133】

試験される化合物はいかなる種類のものであってもよい。それらは天然由来のものであってもよいし、または化学合成により製造されたものであってもよい。これには、構造が明確に理解された化学的化合物のライブラリー、未解明の化合物もしくは物質、または化合物の混合物が関わり得る。化合物の例としては、小分子、ポリペプチド、核酸、炭水化物、またはこれらのいずれかの組合せが含まれるが、これらに限定されない。

【0134】

これらの化合物を試験し、FRYポリペプチドの発現または活性を増加させ治療的意義を有する化合物を同定するために、様々な技術を使用することができる。第1の実施態様によれば、上記生物学的試料は、FRYポリペプチドをコードする遺伝子のプロモーターの全部または一部に機能的に連結されたレポーター遺伝子によりトランスフェクトされた細胞であり、上記工程cは上記レポーター遺伝子の発現を測定することを含む。

【0135】

レポーター遺伝子は、特に、所与の基質の存在下で有色の産物の形成をもたらす酵素、

10

20

30

40

50

例えばCAT（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）、GAL（ベータ・ガラクトシダーゼ）またはGUS（ベータ・グルクロニダーゼ）をコードするものであり得る。ルシフェラーゼ遺伝子またはGFP（緑色蛍光タンパク質）遺伝子であってもよい。レポーター遺伝子によりコードされるタンパク質のアッセイ、またはその活性のアッセイは、従来法により、特に比色定量的、蛍光定量的、または化学発光的技術により、実行される。

【0136】

第2の実施態様によれば、上記生物学的試料は、FRYポリペプチドをコードする遺伝子を発現する細胞であり、上記工程cは上記遺伝子の発現を測定することを含む。

【0137】

ここで使用される細胞はいかなる種類のものであってもよい。それは、FRY遺伝子を内因的に発現する細胞であってもよく、例えば乳腺組織由来の正常分化細胞であり得る。FRYポリペプチドを発現しない、または低いレベルで発現する細胞、例えば三重陰性乳癌細胞を使用してもよい。他の種類の細胞としては、幹細胞表現型を有する細胞が含まれる。

10

【0138】

細胞はまた、好ましくはヒトの、あるいは哺乳類のFRYポリペプチドをコードする異種性核酸により形質転換されたものであってもよい。例えばCos-7、CHO、BHK、3T3、またはHEK293細胞等、多種多様な宿主細胞系を使用することができる。例えばリン酸カルシウム、DEAE-デキストラン、リポソーム、ウイルス、電気穿孔、微量注入等、当業者に知られるいずれかの方法によって、核酸を安定的または一過的にトランスフェクトすることができる。

20

【0139】

これらの方法においては、FRY遺伝子もしくはレポーター遺伝子の発現は、その遺伝子の転写のレベル、または、その翻訳のレベルを評価することにより、決定することができる。

【0140】

「遺伝子の転写のレベル」という表現は、対応するmRNAが産生される量を意味することが意図される。「遺伝子の翻訳のレベル」という表現は、タンパク質が産生される量を意味することが意図される。当業者は、目的遺伝子のmRNAを定量的または半定量的に検出するための技術に精通している。mRNAが特異的ヌクレオチド・プローブにハイブリダイズすることに基づく技術が最も一般的である（ノザンプロットティング、RT-PCR（逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応）、定量的RT-PCR（qRT-PCR）、RNaseプロテクション）。例えば蛍光、放射性、もしくは酵素剤、またはその他のリガンド（例えばアビジン/ビオチン）のような検出標識を使用することが有利となり得る。

30

【0141】

特に、遺伝子の発現はリアルタイムPCRまたはRNaseプロテクションによって測定し得る。「RNaseプロテクション」という用語は、組織のポリ(A)-RNAの中から既知mRNAを検出することを意味することが意図され、この検出は標識プローブとの特異的ハイブリダイゼーションを使用して行うことができる。プローブは、検出しようとしているメッセンジャーと相補的な標識（放射性）RNAである。プローブは既知のmRNAから構築することができ、RT-PCR後のそのmRNAのcDNAがファージにおいてクローン化される。当該配列を検出しようとしている組織からのポリ(A)-RNAを、液状媒体中で、遅いハイブリダイゼーション条件下でこのプローブとインキュベートする。検出しようとしているmRNAと上記アンチセンスプローブとの間でRNA:RNAハイブリッドが形成する。ハイブリダイズした媒体を、一本鎖RNAに特異的なリボヌクレアーゼの混合物とインキュベートし、プローブと共に形成されたハイブリッドのみがこの消化に耐えられることとなる。続いて消化産物を脱タンパク質化して再精製し、その後電気泳動により解析する。標識されたハイブリッドRNAはオートラジオグラフィーにより検出される。

40

【0142】

遺伝子の翻訳のレベルは、例えば、その遺伝子の産物の免疫学的アッセイによって評価される。この目的で使用されるFRY抗体はポリクローナル型またはモノクローナル方であ

50

り得る。免疫学的アッセイは、固相または均一相において、1工程または2工程において、サンドイッチ法または競合法において、行うことができる（これらは非限定的な例である）。1つの好ましい実施態様によれば、捕獲抗体が固相に固定化される。固相の非限定的な例として、マイクロプレート、特にポリスチレン・マイクロプレート、または固形粒子もしくはビーズ、または常磁性ビーズを使用し得る。

#### 【0143】

ELISAアッセイ、放射免疫アッセイ、またはその他のあらゆる検出技術を使用して、形成された抗原/抗体複合体の存在を明らかにすることができる。

#### 【0144】

本明細書で規定されるスクリーニング方法により選出された化合物は、その後、他のインビトロ・モデルおよび/またはインビボ・モデル（動物またはヒトにおけるもの）で癌に対する効果について試験することができる。

10

#### 【0145】

本明細書ではまた、低いレベルのFRYポリペプチドを発現する細胞に、FRYポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはFRYポリペプチドを導入することにより、前記細胞を分化させる方法も開示される。ベクター、トランスフェクション、もしくは電気穿孔、または当該技術分野で知られる他の方法によりFRYポリヌクレオチドを導入することができる。

#### 【実施例】

#### 【0146】

本発明を一般的に記述してきたが、以下の実施例を参照することにより本発明をより容易に理解することができるであろう。これら実施例は本発明の一定の側面および実施態様を説明する目的のためだけに提供されるのであって、本発明を限定する意図はない。

20

#### 【0147】

[実施例1：材料および方法]

#### 動物

コペンハーゲン (Co)、フィッシャー344 (F344)、およびブラウン・ノルウェー (BN) ラットはハーラン・スプレイグ・ダーレイ社 (ウイスコンシン州マディソン) から購入した。F1子孫を産生するために、F344メスをCopオスと交配させた。メス (F344 X Cop) F1子孫をF344オスと交配させてN2戻し交配子孫を産生した。育種、処置、腫瘍部位、発生率、潜伏期、表現型、および遺伝子型は関係データベースにより追跡した。

30

#### 【0148】

#### 発癌物質処置および表現型決定

日齢50~55日のメスのN2ラットおよびF344ラットに、N'-メチル-N'-ニトロソウレア (NMU) (アッシュ・スティーブン社、ミシガン州デトロイト) の腹腔内注射 (体重1 kgあたり50 mg) を1回行い、乳癌の発生率および潜伏期間をスコア化した。NMU (アッシュ・スティーブン社、ミシガン州デトロイト) は、酢酸でpH 5.0まで酸性化した0.9% NaCl溶液中の10 mg/mlのストック溶液として調製した。30分ごとに新鮮なNMU溶液を調製した。発癌物質への曝露の後、N2子孫を高脂肪食 (適宜30%脂肪を補足したラット餌) で飼育して、腫瘍の成長を促進させた。ラットは1週間単位で腫瘍について触診を行い、瀕死となった時、または腫瘍が直径1 cmに達する前に、安楽死させた。腫瘍を有するラットから乳腺腫瘍と正常乳腺組織とを採取し、液体窒素中で凍結し、-80 で保存した。加えて、各腫瘍の切片をホルマリン中で固定し、パラフィンに包埋し、組織病理学的解析のために切片をヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。各動物について乳癌の数および潜伏期間をスコア化した。

40

#### 【0149】

#### 遺伝子型決定

キアゲンDNeasy 96組織キット (キアゲン社、カリフォルニア州バレンシア) を使用して組織からゲノムDNAを単離した。ラットゲノムデータベース (<http://rgd.mcw.edu/>) から有用な単純直列型反復配列 (STR) マーカーを選び出した。ホールデン・マッピング関

50

数を用いて計算したスウェプト・ラディウス(Swept radii)を使用して、95%信頼限界においてゲノムをカバーするのに必要なマーカーおよびN2戻し交配子孫の数を推定した。低分解能マッピングにおいては、77個の多型マーカーを使用して99匹のメスN2戻し交配子孫(NMU誘発乳癌発生に対する易罹患性について表現型決定した)の遺伝子型決定を行った。高分解能マッピング(1~2 cM)においては、低分解能マッピングで有意なまたは示唆的な連鎖スコアを生じた区間内にある有用なマーカーを選んだ。

#### 【0150】

##### 連鎖統計解析

腫瘍の数を量的形質として用いた連鎖解析は、マップマネージャー-QTX(K. F. Manly et al. AL, Mamm Genome 12, 930, Dec, 2001)を使用して行った。交互作用および関連は、SAS v.8.0統計ソフトウェア・パッケージ(SASインスティテュート社)を用いた二元配置ANOVA、 $\chi^2$ 検定、およびロジスティック分析モデルにより検定した。

#### 【0151】

##### 蛍光インサイチュ・ハイブリダイゼーション(FISH)

Cop X F344 F1ラットおよびBN/SsNHsdMcv系統からの胚線維芽細胞を培養し、コルセミドを用いて有糸分裂を遮断し、中期染色体のスプレッド標本を調製するために使用した。特定のSTRマーカーを含むラットBACクローンはチルドレンズ・ホスピタル・オークランド研究所から購入し(CHORI-230 BACライブラリー)、そのSTR配列を含むことをPCR増幅により確認した。BAC DNAはオートジェン740システム上で単離し、ニック・トランスレーションでピオチン化し、過剰量の無標識ラットCot1 DNAの存在下で中期染色体スプレッド標本にハイブリダイズさせ、アビジンFITCを用いて検出した(Trask 1999)。染色体はDAPI染色によりQFHバンド化した。DAPIとFITCの画像は別々に、しかし同時に、採取した。ハイブリダイゼーション・シグナルは、プローブあたり少なくとも5個、より典型的には10個の分裂中期細胞において解析した。

#### 【0152】

##### ゲノムDNAの単離および遺伝子型決定

STRマーカーのためのPCRプライマーは、リサーチ・ジェネティックス社(ウィスコンシン州マディソン)から購入した。PCRに基づく遺伝子型決定アッセイは2つの方法の内のいずれかを使用して行った。F344アリルとCopアリルとの間でSTRの長さが8塩基対以上違う場合は、リサーチ・ジェネティックス社から購入した無標識プライマーでPCR反応を行い、ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動(PAGE)解析を使用して増幅産物の長さによって遺伝子型を決定した。差異が6塩基対以下であるSTRについては、蛍光標識プライマーでPCR反応を行い、ABIプリズム(登録商標)3100ジェネティック・アナライザー・システムおよびジーンスキャン・ソフトウェア上で遺伝子型を決定した。遺伝子型の判定はジェノタイプ・ソフトウェア(ABI社)を用いて行った。通常のPAGE解析からのものを含め、全てのアリル判定結果は、さらなる解析のためのデータベースに入力する前に、少なくとももう一人の研究者によって独立に確認された。

#### 【0153】

##### 候補Mcs遺伝子のPCR増幅および配列決定

選択された候補遺伝子を増幅するためのPCRプライマーは、2つ以上のオーバーラップする増幅産物を生じるように設計した。キアゲンRNeasy maxiキット(キアゲン社、カリフォルニア州バレンシア)を使用して正常乳腺からRNAを抽出した。スーパースク립ト(登録商標)II逆転写酵素の説明書(インビトロジェン社、カリフォルニア州カールスバッド)に従って逆転写反応を用いてcDNAを生成した。増幅されたPCR産物をアガロースゲル電気泳動(0.8~1.5%)により分離し、ゲルから切り出し、キアゲン・ゲル抽出キット(キアゲン社、カリフォルニア州バレンシア)を用いて精製した。

#### 【0154】

DNA配列決定は、ビッグダイ・サイクル・シーケンシング・プロトコール(パーキンエルマー・バイオシステムズ社、マサチューセッツ州ボストン)を使用して行った。PCR増幅反応に使用したのと同じプライマーを使用して、それぞれのPCR産物を両方の鎖につ

10

20

30

40

50

いて配列決定した。標識された配列決定反応産物を、自動蛍光式配列決定装置（アプライドバイオシステムズ社（カリフォルニア州フォスターシティ）のモデル377）上で分離した。自動塩基判定結果は目視により確認した。Sequencer 4.2ソフトウェア（ジーン・コーズ社、ミシガン州アナーバー）を使用して配列を組み合わせた。

#### 【 0 1 5 5 】

##### GFP標識ラットFRYタンパク質発現ベクターの構築

3'および5'のRACEを使用して、ラットFRY遺伝子の全長転写物を決定した。増幅は、マラソンcDNA増幅キット（BDクロンテック社、カリフォルニア州パロアルト）で2つの遺伝子特異的プライマーを使用して行った。マラソンcDNA増幅キットを使用して二本鎖cDNAを調製し、増幅し、TOPO TAキットを使用してクローン化し、DNA配列決定に付した。10,791塩基対のFRY cDNAは4つの断片としてクローン化し、それから発現ベクター中で再構築した。手短に述べると、プライマーセット1、5' - CAGGCATTGCTGCTTATG - 3'および5' - TCCAAGAACAACGCTCCA - 3'；プライマーセット2、5' - CTGGAGAGCATCGAAATC - 3'および5' - CAAGGCCATCAGGTATTC - 3'；プライマーセット3、5' - AGCACTGTGACAACCCAC - 3'および5' - CAGAGCAGGAGGTAAGCA - 3'、ならびにプライマーセット4、5' - TTGGGAGACGGTATGATG - 3'および5' - TATAGGATCCGGAGCCTCCTGTCCGAGAC - 3'を用いてCOPラットFRY cDNA（ジェンバンク登録番号EU563851.1）をPCR増幅し、ここで、C末端プライマーは、終止コドン（グリニン）に変え、プライマーの最後にBamHIクローニング部位を追加する変更を施した。オーバーラップする4つのPCR産物を、製造会社（インビトロジェン社、カリフォルニア州カールスバッド）のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクター中にクローン化し、そのベクターがCOPラットFRY遺伝子の正しい配列を含んでいることを確認するために配列決定を行った。得られたプラスミドはそれぞれpCR2.1-1、pCR2.1-2、pCR2.1-3、およびpCR2.1-4と名付けた。pCR2.1-1および空のpEGFP-N1発現ベクターをXho I / BamHI制限酵素（クロンテック社、カリフォルニア州マウンテンビュー）（NEB社、マサチューセッツ州イプスウィッチ）で切開し、その産物をQIAquickゲル抽出キット（キアゲン社、カリフォルニア州バレンシア）を使用してゲル精製し、T4 DNAリガーゼ（インビトロジェン社、カリフォルニア州カールスバッド）を使用してライゲートして繋ぎ合わせた。得られたプラスミドを配列決定してpEGFP-N1-1と名付けたが、これは第1のセットのプライマーにより増幅されたPCR産物を含むものである。同じ手順に従って、Xba I / BamHI制限酵素で消化したpCR2.1-2およびpEGFP-N1-1ベクターを使用してpEGFP-N 1-2を生成した。pEGFP-N 1-3プラスミドは、Not I / BamHI制限酵素により切開されたpEGFP-N 1-2およびpCR2.1-3を使用して生成した。最後に、COPラットFRY遺伝子の完全なコード配列を含むpEGFPN1-COPプラスミドを、EcoR V / BamHI制限酵素により切開されたpEGFP-N1-3およびpCR2.1-4ベクターから生成した。

#### 【 0 1 5 6 】

##### 細胞培養

細胞培養物は、5% CO<sub>2</sub>、95%空気の加湿環境中で37℃にて維持した。MCF-10Aおよび10-shFRY細胞は、MEGM SingleQuots（ロンザ社）（硫酸ゲンタマイシン、アンホテリシンB、20 ng/mlヒト上皮成長因子、10 μg/mlインスリン、5 μg/mlヒドロコルチゾン、およびウシ下垂体抽出物）で補足された乳腺上皮基本培地（MEBM）中で培養した。MDA-MB-231および231wCFRY細胞は、10%熱不活性化FBSおよび100 μg/mlペニシリン・ストレプトマイシン溶液を伴うアドバンストDMEM中で培養した。MCF 10A細胞は、MEGM SingleQuots（ロンザ社）で補足されたMEBM中で培養した。

#### 【 0 1 5 7 】

##### ノザンプロット解析

キアゲンRNeasy maxiキット（キアゲン社、カリフォルニア州バレンシア）を使用して全RNAを抽出した。RNA試料（30 μg）を0.8%（w/v）ホルムアルデヒドノアガロースゲルを通した電気泳動により分離し、ハイボンドNナイロン膜（アマシャム・ファルマシア・バイオテク社）に移し取り、[α-<sup>32</sup>P]-dCTP標識プローブを用いて検出した。ハイブリダイゼーションおよび洗浄を経た後、X線フィルムに曝露することによりオートラジオグラフィ

ーを実施した。

【0158】

半定量的(RT)-PCR

キアゲンRNEasy Miniキット(キアゲン社、カリフォルニア州バレンシア)を使用して組織および細胞株から全RNAを単離した。逆転写はスーパースク립ト(登録商標)II逆転写酵素キット(インビトロジェン社、カリフォルニア州カールスバッド)を用いて実施した。直線的増幅範囲におけるDNA増幅のためのPCR条件はGeneAmp PCRシステム7600(パーキンエルマー社、マサチューセッツ州ウェルズリー)上で確立した。プラチナム(登録商標)Taq DNAポリメラーゼ(インビトロジェン社、カリフォルニア州カールスバッド)およびプライマーをDNA増幅のために使用した。RT-PCR産物は0.9%アガロースゲル上で解析し、発現は  $\alpha$ -アクチンに対して標準化した。

10

【0159】

SNAP解析

SNAP(許容不可能多型のスクリーニング)コンピュータツールは、単一アミノ酸置換の機能的帰結を、二元的形式(野生型機能に対して中立的/非中立的)およびスコア形式(-100から+100まで。負の予測は中立的であり、正の予測は非中立的であり、スコアの絶対値がより高ければ二元的予測の信頼性がより高いことを示す。)の両方において予測する。フィッシャー-344ラット系統における非同義SNPが機能的作用を示すものであるか否かを示すために、SNAPを使用した。問題となるコドンにおけるアミノ酸置換の各々について、SNAP出力スコアを評価した。SNAPはまた、SNAP-BLOSUM62スコア(野生型残基の各々について、カットオフを 0としたBLOSUM62マトリックスにより許容される置換の平均SNAPスコア)を計算することにより、タンパク質配列における各アミノ酸に見込まれる(構造上ではなく)機能上の重要性を提示する。通常SNAPスコアと同様に、SNAP-BLOSUM62スコアが 0であることは特定の配列位置が機能上重要である見込みが少ないことを示し、スコアが >0であることはその位置がおそらく機能上重要であることを示す。

20

【0160】

ヌードマウス腫瘍形成能アッセイ

胸腺欠損ヌードマウス(NCR-NU)はタコニック社から購入した。被験動物は3匹ずつの群で収容し、12時間の明/暗サイクルのもと餌と水を随意摂取できるようにして飼育した。細胞株のインビボ腫瘍形成能は、 $2.5 \times 10^6$ 個の生きた細胞を、最大体積100  $\mu$ lにて、26ゲージ針を有するツベルクリン注射器を使用して、オスのヌードマウスの肩甲骨内領域に皮下注射することにより評価した。細胞は、トリプシン消化により調製し、計数し、トリパンブルー生体染色により生存性について試験し、ハンクス平衡塩類溶液中に懸濁した。計画される実験あたりの動物数が所与の仮説を試験するのに十分であることを保証するために、細胞種あたり6匹のマウスを使用し、これにより5%のアルファ誤差レベル(あるいは95%信頼区間)および0.55の検出力(45%のベータ誤差レベル;統計学的検出力 = 1 - ベータ)が得られた。

30

【0161】

腫瘍は、デジタル式カリパスを使用して1週間に2回測定した。腫瘍成長速度および最終体積を細胞株間で比較した。実験を終結させる際には、CO<sub>2</sub>によって窒息させて動かなくなった動物の頸椎を脱臼させることによりマウスを犠牲にし、腫瘍組織を採取し、一部を10%ホルマリン中で固定して液体窒素中で凍結した。各腫瘍の一部を切片にして、1)ヘマトキシリンとエオシン、および2)マッソン・トリクローム染色を使用した組織病理学的解析のために染色した。腫瘍体積は、以下の式を用いて推定した。

40

【0162】

球状腫瘍:  $(4/3)\pi r^3$

【0163】

楕円状腫瘍:  $(4/3)\pi(r_1)(r_2)(r_3)$

【0164】

マイクロアレイ解析

50

各試料からの40ナノグラムの全RNAを使用して、アレイ・ハイブリダイゼーションのための高精度cDNAを生成した。cDNAを増幅し、断片化し、NuGENオベーション増幅・標識キットV2 (NuGEN社、カリフォルニア州サンディエゴ) を使用してビオチン標識した。マイクロアレイ・ハイブリダイゼーションに先立って、SPIA産物および断片化cDNAをアジレント・バイオアナライザー2100を使用した電気泳動により分析し、適切なサイズ分布を評価する。増幅され標識された3.75  $\mu$ gのcDNAを、GeneChip解析のためのハイブリダイゼーション・カクテルに使用した。NuGENオベーション増幅・標識キットを使用した試料調製のための詳細なプロトコールは、<http://www.nugeninc.com>において参照できる。

#### 【0165】

全ての試料は、アフィメトリクス・ヒトゲノムU 13 3プラス2.0高密度オリゴヌクレオチド・アレイ (現時点で47,000個を超える転写産物を調べることができる) を介した遺伝子発現解析に付した。全てのアレイのハイブリダイゼーション、染色、および洗浄は、製造会社のプロトコールに従って、アフィメトリクス流体工学モジュールにおいて実施した。ストレプトアビジン・フィコエリトリン染色 (SAPE、モレキュラープローブス社) は、ハイブリダイズした標的配列を検出するために使用された蛍光コンジュゲートである。標的ハイブリダイゼーションの検出および定量化は、GeneArrayスキャナー3000 (アフィメトリクス社) を用いて実施した。本研究で言及される全てのアレイは、データ解析の前に「アレイ性能」について評価した。

10

#### 【0166】

GeneMaths (アプライドマス社) を使用して生のマイクロアレイ・データを解析した。それからLIMMA (マイクロアレイ解析のための線形モデル) を利用して各遺伝子の発現データ (対数比) に線形モデルをあてはめた (Smyth 2005)。偽発見率はベンジャミンとホックバーグの手順 (Benjamini 1995) を使用してコントロールした。

20

#### 【0167】

野生型コペンハーゲンFRYアリルを用いたMDA-MB-231のトランスフェクション

FRY遺伝子の野生型Copアリルを含むpAcGFP1-N1 (クロンテック社カタログ番号632469) プラスミドベクター (pAcGFP1-N1-COP) を細菌培養物から単離した。DoTapトランスフェクション試薬 (ロシュ社) を使用して、pAcGFP1-N1を集密状態前のMDA-MB-231細胞に6時間トランスフェクトした。その後細胞を血清含有培地で培養して48時間かけて回復させた。G418 (シグマ社) を800  $\mu$ g/mlの濃度で加え、ゲノムにpAcGFP-N1を取り込んだ細胞を選択した。個々のG418耐性コロニーをクローニング・シリンドラーで単離した。個々のクローン株を拡張し、ラットとヒトの両方のFRY発現について調べた後に、インビトロおよびインビボの細胞形質転換アッセイにおいて評価した。

30

#### 【0168】

FRYに対するshRNAによるMCF10Aのトランスフェクション

配列確認済みの5つのshRNAレンチウイルス・プラスミド (元のベクターpLKO.1を含んでいる) の組は、それぞれ異なるFRY標的化shRNA配列 (シグマ社 MISSION shRNA SHCLND-NM\_023037) を含有する。非標的化shRNAベクターを対照として使用した (シグマ社 MISSION 非標的化shRNA対照ベクター-SHC002)。これらを含むプラスミドベクターを単離し、DoTapトランスフェクション試薬 (ロシュ社) を使用して集密状態前のMCF 10A細胞に6時間トランスフェクトした。その後血清含有培地を再導入して、トランスフェクト済み細胞を48時間かけて回復させた。ピューロマイシンを1  $\mu$ g/mlの濃度で加えて、ゲノムに対照またはshRNAプラスミドを取り込んだ細胞を選択した。個々のピューロマイシン耐性コロニーをクローニング・シリンドラーで単離した。クローン株を拡張し、FRY発現の低下の持続性について調べた後に、インビトロおよびインビボの細胞形質転換アッセイにおいて使用した。

40

#### 【0169】

ウェスタンブロット

全細胞抽出物 (タンパク質30  $\mu$ g) をプレキャスト7.5% Tris-HClゲル (バイオ・ラッド社) における電気泳動により分離し、イモビロンFL (ミリポア社、カタログ番号IPFL00010) PVDF膜に転写した。この膜を4 にて一晚FRY抗体 (1:10,000) とインキュベートした

50

。それからこのプロットを、TTBSで3回（10分、7分、5分）洗浄し、TBSで短時間洗浄した後に、4 にて穏やかに揺らしながら45分間、LI-COR抗ウサギ680 nm二次抗体とインキュベートした。LI-CORオデッセイ（登録商標）赤外画像処理システムを使用してプロットを現像した。

【0170】

マトリゲル三次元増殖アッセイ

Lee et al. (S0)により記述された方法を使用して、細胞を三次元培養において増殖させた。6ウェルプレートのウェルをマトリゲルの基底層で被覆し、MEBM培地に再懸濁した細胞を基底層上に $2.5 \times 10^4$ 細胞/cm<sup>2</sup>の密度で蒔き、37 °Cで30分間定着させた。その後、上記細胞培養物の上に、適切な細胞培養培地中の10%のマトリゲル溶液を適用した。細胞は目視で評価する前に5日間増殖させた。

10

【0171】

ヒト臨床的癌コホートにおけるFRY mRNA発現の統計学的解析

オンコマイン3.0癌プロファイリング・データベース (<http://www.oncomine.org>) で入手できるマイクロアレイ・データは、ダゴスティノとピアソンのオムニバス正規性検定を使用して正規性について確認した。データセットが正規性検定に合格した場合、続いてパラメトリック検定を解析に利用した（スチューデントのt検定（対応なし）または一元配置ANOVA）。それに加えて、解析されているデータセットのいずれかまたは両方が正規分布でなかった場合は、ノンパラメトリック検定を解析に利用した（マン・ホイットニーまたはクラスカル・ウォリス）。遺伝子発現相関は、95%信頼区間および両側p値を用いたピアソン相関係数を使用して計算した。GraphPadプリズム5.0ソフトウェアを使用して関連する全ての統計学的操作を実施した。

20

【0172】

インジェニュイティ（登録商標）経路解析

インジェニュイティ経路解析（IPA）（インジェニュイティ（登録商標）システムズ、[www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)）を使用してマイクロアレイ・データの解釈を行った。オーバーラップする遺伝子を決定してベン図を作成するために、 $p < 0.05$ というカットオフを使用して、10A-shFRY / 10A-CV解析（2,188遺伝子）および231wCFRY / MDA-MB-231解析（4,896遺伝子）において有意に変化した遺伝子を全て包含させた。

30

【0173】

免疫組織化学

ベントナ・メディカル・システムズ・ディスクバリーXT自動免疫染色機を使用して、抗FRY（ウサギ・ポリクローナル）を正常ヒト乳腺組織スライド上で最適化した。ヒト乳腺腫瘍組織アレイ（TMA）スライド（U.S. バイオマックス社）は、脱パラフィン化して、CC 1（細胞コンディショニング溶液、ベントナ・メディカル・システムズ社、カタログ番号950-124）を72分の延長時間で用いて抗原回復を行った。TMAスライドを三重実験にてFRYについて染色し、追加の2つの対照スライドを免疫前ウサギ血清（前血清）または二次抗体のみを使用して染色した。抗FRY抗体および前血清を1:2500の希釈率で適用し、スライドを37 °Cで1時間インキュベートした。ベントナ社のユニバーサル二次抗体（カタログ番号760-4205）を1時間インキュベートした後、発色検出キットDABMap（ベントナ・メディカル・システムズ社、カタログ番号760-124）を使用した。スライドはヘマトキシリンで対比染色した。

40

【0174】

免疫組織化学染色のコンピュータ定量的画像解析を行った。ツァイス/トレスルMedMicro全スライド画像処理システムを40xボリュームスキャン構成で用いて標本をデジタル化した。各々の全スライド画像に画像レジストレーション・アルゴリズムを適用してTMA構造を再生し、各コア画像を20x等解像度にて抽出した。コア画像を色分解してヘマトキシリン対比染色からDABシグナルを単離し、統合染色強度（ISI）、有効染色面積（ESA）、および有効染色強度（ESI）を得るために解析した。上記乳腺腫瘍組織アレイBR208（U.S. バイオマックス社）は、60事例の乳癌および9事例の正常乳腺組織からなる。この乳腺T

50

MA BR208 (U.S. バイオマックス社) 上にコアは3つ組で存在しており、各コアについてFRY染色値から前血清染色値を差し引き、各コアについてのこの結果からlog2をとった。数値は、各スライド上の患者間で、および各事例についてスライド間で (n=9) 平均化した。これらの結果値を統計学的にグラフ化して解析した。

【 0 1 7 5 】

コアは、番号付けシステム (0 : 染色なし、1 : 0 ~ 10%の細胞が染色されている、2 : 10 ~ 40%の細胞が染色されている、3 : 40 ~ 70%の細胞が染色されている、4 : 70 ~ 100%の細胞が染色されている) を使用して病理学者による評点もなされた。それから患者ごとにスコアを平均化し (n=3)、スチューデントのt検定を使用して結果値を統計学的に解析して、対象となる群の間で平均値に有意差があるか否かを決定した。

10

【 0 1 7 6 】

[ 実施例2 : QTLマッピングおよび比較配列解析はFRYがMCS候補遺伝子であると同定する ]  
N'-メチル-N'-ニトロソウレア (NMU) 誘発性乳腺発癌 (曝露後200日以内) によって誘発された乳腺腫瘍の数を量的形質として使用した、324匹のメス [(F344 X Cop) F1 X F344)N2] 子孫における遺伝連鎖により、ラット12番染色体 (RNO12) 上に新規Mcs遺伝子座が同定された。この遺伝子座候補McsはD12Rat59単純縦列反復配列マーカーときわめて有意な連鎖を示し (LOD=8.6)、この領域との連鎖は区間マッピングによりさらに確認された (Z. Zeng, *Genetica* 123, 25, Feb. 2005) (表1および2)。区間マッピングにおける相加効果の方向性から、Cop FRYアレルの存在は易罹患性と負に相関することが確認され、それが劣性形質であることが示された。上記推定Mcs遺伝子座はRNO12のセントロメア付近の5.6センチモルガン領域内に位置し、この領域のシンテニーはヒト染色体13q12 ~ 13q13で保存されていてラットBrca2を含むので、DNA配列決定ならびにこれらの系統間のmRNAおよびタンパク質の発現レベルの比較により、Brca2の可能性を排除した。この領域内のBrca2および数個の候補腫瘍抑制遺伝子を除外した後、R12Rat59マーカーの30 kbp遠位であってBrca2の2.5 kbp以内に位置する一つの遺伝子が検討された。その後この遺伝子はラットFRYと同定されたが、この遺伝子はヒトFRY遺伝子 (NM\_023037) と非常に類似しており、ショウジョウバエfurry遺伝子のオーソログである。cDNA末端迅速解析法 (D. J. Park et. AL, *Biotechniques* 34, 750, Apr. 2003) により、ラットFRY転写物は10,791ヌクレオチドを含み、3011アミノ酸のタンパク質をコードすることが示された。GHMPファミリーのキナーゼに共通である推定ATP結合ドメインが、FRYポリペプチドにおいて異なる種間で高度に保存されており (表3)、FRYはタンパク質キナーゼをコードすることが示唆される。

20

30

【 0 1 7 7 】

3つのラット系統間 (F344、Cop、ブラウン・ノルウェー (BN))、および複数の種間のFRYの比較配列解析により、易罹患性F344系統のFRY遺伝子に特有の2つの非同義SNPが同定された。どちらのSNPも進化の過程で高度に保存されている残基においてアミノ酸置換を引き起こすものであり (図1)、これらの残基は正常なFRY機能にとって重要であり得ることが示唆される。

【 0 1 7 8 】

2170番目のアミノ酸におけるアラニンからセリンへの置換は、いくつかの癌関連タンパク質キナーゼにあるリン酸化コンセンサス配列を新たに創出するものであり (表4)、このF344特異的突然変異は異常な翻訳後修飾によってFRY機能を改変し得る。2171番目のコドン (F344ラットがアラニンからセリンへの突然変異を有していた場所 ; スコア +15) におけるアミノ酸置換のSNAPスコア (Bromberg, B. Rost, *Nucleic Acids Res* 35, 3823, 2007) は、この位置におけるアミノ酸変化は機能的な影響を有する可能性が高いことを示していた。SNAP-BLOSUM62スコアは、この部位が機能的に重要であることを示していた (スコア +8)。

40

【表 1】

**Table 1.**

高密度および低密度連鎖解析に使用したラットSTRマーカの完全なリスト

D1RAT15	D1RAT115	D5RAT17	D9RAT133	D15RAT12
D1RAT257	D1RAT76	D5RAT82	D9RAT30	D15RAT71
D1RAT266	D1RAT81	D5RAT13	D9RAT18	D16RAT8
D1RAT29	D1RAT132	D5RAT149	D9RAT7	D16RAT61
D1RAT32	D2RAT10	D5RAT95	D9RAT100	D16RAT34
D1RAT183	D2RAT21	D5RAT108	D10RAT182	D17RAT61
D1RAT38	D2RAT161	D5RAT35	D10RAT73	D17RAT15
D1RAT41	D2RAT38	D5RAT205	D10RAT18	D17RAT32
D1RAT272	D2RAT54	D6RAT68	D10RAT8	D18RAT53
D1RAT173	D2RAT66	D6RAT135	D11RAT11	D18RAT13
D1RAT236	D3RAT17	D6RAT21	D11RAT34	D19RAT15
D1RAT49	D3RAT103	D6RAT12	D12RAT3	D19RAT71
D1RAT277	D3RAT167	D7RAT31	D12RAT35	D20RAT4
D1RAT164	D3RAT220	D7RAT103	D12RAT36	D20RAT5
D1RAT282	D3RAT15	D7RAT86	D13RAT70	D20RAT10
D1RAT437	D3RAT4	D7RAT100	D13RAT24	D21RAT24
D1RAT198	D4RAT115	D7RAT11	D13RAT32	D21RAT111
D1RAT65	D4RAT27	D7RAT4	D14RAT5	D21RAT115
D1RAT290	D4RAT40	D8RAT51	D14RAT11	
D1RAT22	D4RAT6	D8RAT46	D14RAT39	
D1RAT181	D4RAT200	D8RAT104	D14RAT94	
D1RAT293	D4RAT68	D8RAT65	D15RAT5	

10

20

【表 2】

**Table 2.**

ラット12番染色体上のマーカについて計算されたLODスコア

マーカ名	遺伝子型決定したラットの数	LOD
<b>D12Rat57</b>	<b>324</b>	<b>3.3</b>
<b>D12Rat1</b>	<b>324</b>	<b>6.0</b>
<b>D12Rat59</b>	<b>324</b>	<b>8.6</b>
<b>D12Arb2</b>	<b>324</b>	<b>2.1</b>
D12Rat3	99	2.7
D12Rat35	99	0.8
D12Rat36	99	0.5

30

40

【表 3】

**Table 3.**  
ラットFRYポリペプチドに見出されるパターン、プロファイル、およびモチーフ

プロスキャンサイト登録番号	パターン、プロファイル、およびモチーフの名称	ヒット数
PS00627	GHMPキナーゼ推定ATP結合ドメイン	1
PS50324	セリン・リッチ領域プロファイル	1
PS00006	カゼインキナーゼIIリン酸化部位	63
PS00005	タンパク質キナーゼCリン酸化部位	33
PS00001	N-グリコシル化部位	7
PS00007	チロシンキナーゼリン酸化部位	3
PS00004	cAMPおよびcGMP依存性タンパク質キナーゼリン酸化部位	5
PS00008	N-ミリストイル化部位	13
PS00009	アミド化部位	1
PS00029	ロイシン・ジッパーのパターン	1

10

【表 4】

**Table 4.**

NetPhos2.0予測ソフトウェアによる、F344 Fryアレルにおける新規リン酸化部位の予測

20

NetPhos2.0予測ソフトウェア				
名称	位置	コンテキスト	スコア	予測
配列	2170	AERISQVCL	0.986	*S*
部位	キナーゼ			スコア
S-2170	タンパク質キナーゼ、DNA活性化型、触媒性ポリペプチド [ <i>Rattus norvegicus</i> ]			0.51
S-2170	血管拡張性失調症突然変異ホモログ(ヒト)(マッピングされたもの) [ <i>Rattus norvegicus</i> ]			0.55
S-2170	タンパク質キナーゼ、cAMP依存型、触媒性 [ <i>Rattus norvegicus</i> ]			0.60

30

## 【 0 1 7 9 】

[ 実施例3：インビトロでFRY発現の変化は上皮細胞の形態を改変する ]

非腫瘍原性MCF 10Aヒト乳腺上皮細胞株、FRY mRNA発現レベルは試験されたすべての乳癌細胞株において少なくとも40%減少しており、FRYポリペプチド発現は、評価した4つの乳癌株のうち3つにおいて減少していた(図2a、b)。FRY活性の減少が乳腺発癌に寄与するという仮説を試験するために、2つのインビトロモデルを使用した機能解析を行った。浸潤性が高い進行期乳腺上皮細胞腫瘍に由来し転移性乳癌のモデルとして一般的に使用される、三重陰性MDA-MB-231乳癌細胞株(ER-/PR-/HER2-)において、野生型Cop FRYアレルを発現させた。非腫瘍原性MCF 10A細胞株と同様のレベルでFRYを発現するいくつかのクローンを表現型解析のために単離したが、これにより、表現型の何らかの変化があった場合にそれがCop FRYアレルの過剰発現の結果であるという可能性を排除できる(図2c、d)。第2に、非腫瘍原性MCF 10A乳腺上皮細胞株において内因性FRYの発現をロックダウンするために、FRY mRNAに対してshRNAを適用した。非標的指向化shRNAで安定的にトランスフェ

40

50

クトしたMCF-10A細胞（10A-CV）におけるレベルと比較してFRYのmRNAおよびタンパク質が約60減少しているMCF10Aクローンを選択した（図2e）。

【0180】

FRY発現の改変は、単層培養で増殖した細胞と3次元培養で増殖した細胞との両方の形態および組織性に劇的に影響を与えた。単層において、もともなったMDA-MB-231細胞は未分化の紡錘様の増殖パターンを示したのに対し、FRYでトランスフェクトしたものは、より組織化され上皮様である敷石的パターンを示した。単層で培養したときに、10A-CV細胞は組織化され上皮様である敷石的パターンを示したのに対し、10A-shFRY細胞は改変された形態を示した。それに加えて、マトリゲル（登録商標）の上張りを用いて培養した場合、異所性FRYを発現する細胞は、非腫瘍原性MCF 10A細胞株により形成されるものと類似した極性化マンモスフィア（Debnath, S. K. et. al., Methods 30, 256, Jul. 2003）を形成した。対照的に、もともなったMDA-MB-231細胞、および10A-shFRY細胞は、無秩序な形態および細胞接着の低下を示すより無秩序な塊として成長した。これらの発見は、インビトロにおいてFRY発現の増加が細胞形態、細胞極性化、および分化の変化と関連することを示すものであった。

10

【0181】

[実施例4：インビボでFRY遺伝子は腫瘍形成能を抑制する]

インビボで、異所性FRY発現は腫瘍形成能を劇的に低下させた。MDA-MB-231細胞により形成される急速な成長と比較して（図3）、Cop FRY のwtアレルを異所的に発現するMDA-MB-231細胞（231wCFRY）のヌードマウス皮下異種移植片は、腫瘍成長において約8倍の低下を示した。さらに、MDA-MB-231細胞により形成される急速に成長し浸潤性の高い腫瘍とはきわめて対照的に、231wCFRY細胞により形成される小さな皮下結節は、被包されており、下にある骨格筋および/または脂肪組織に浸潤しなかった。

20

【0182】

[実施例5：ヒト乳腺腫瘍においてFRYは減少している]

ヒト乳癌の臨床的進行における改変されたFRY遺伝子発現の関連性を評価するために、オンコマイン3.0癌プロファイリング・データベース（<http://www.oncomine.org>）で入手可能なデータを利用した。本研究の解析は、正常乳腺組織と比較してヒト乳癌ではFRY発現が有意に減少していることが示された（ $p<0.0001$ ）（図4a）。この観察は、配列番号3に対する抗FRY抗体、すなわちヒトおよびラットのタンパク質で保存されているペプチド配列に対する抗体を設計し実証することにより、タンパク質レベルで確認された。この抗体は次に、市販されている乳腺腫瘍と正常組織のマイクロアレイ（U.S. バイオマックス社）の免疫組織化学的染色および半定量的画像解析に使用した。FRY発現のレベルは病理学者により独立に評価された。どちらの解析においても、正常乳腺細胞と比較して腫瘍ではFRYポリペプチド発現が有意に減少していることが確認され、mRNAについての観察が独立のコホートにおいて検証された。

30

【0183】

免疫組織化学もまた、腫瘍と正常組織型との間で核FRYポリペプチド発現に有意な差があることを明らかにした（ $p<0.02$ ）（図4b、c）重要なことに、>70%の正常乳腺細胞の核がFRY染色について陽性であるのに対し、その度合いの核染色を示すのは解析された腫瘍のわずか5%にすぎないことをこの解析は示していた（図4d）。これらの発見は、核FRYポリペプチド発現の喪失がヒト乳癌の臨床的表現型と高度に相関することを示すものであった。

40

【0184】

[実施例6：悪性度の高いホルモン受容体陰性乳癌においてFRYは減少している]

10個の乳癌コホートにおけるFRY発現の解析により、高分化型乳腺腫瘍と比較して低分化型乳腺腫瘍ではFRY発現がさらに減少していることが明らかになった（ $n=1,860$ ； $p<0.001$ ）（図4e；表5aおよびb）。これらの観察は、免疫組織化学的に染色されたTMAの定量的画像解析を使用して、独立のコホートにおいてタンパク質レベルで確認された（ $N=69$ ； $p<0.02$ ）（図4f、g）。

50

【表 5 a】

**Table 5a.**  
腫瘍グレード臨床的乳癌コホート — FRY mRNA

著者	年	オンコマインID	N: 試料 <sub>1</sub> 分布	N <sub>2</sub>	統計学的解析 (KWまたはOA) p値 <sub>3</sub>
Vantveer et al.	2002	Vantveer_Breast	グレード1:12、グレード 2:27、グレード3:78	117	<0.0001 (OA)
Sotiriou et al.	2003	Sotiriou2_Breast	グレード1:16、グレード 2:37、グレード3:45	98	0.0001 (KW)
Miller et al.	2005	Miller_Breast	グレード1:67、グレード 2:128、グレード3:53	248	<0.0001 (KW)
Bittner et al.	2005	Bittner_Breast	グレード1:30、グレード 2:107、グレード3:141	278	<0.0001 (OA)
Ivshina et al.	2006	Ivshina_Breast	グレード1:68、グレード 2:166、グレード3:55	289	<0.0001 (KW)
Sotiriou et al.	2006	Sotiriou3_Breast	グレード1:67、グレード 2:46、グレード3:59	172	<0.0001 (KW)
Hess et al.	2006	Hess_Breast	グレード1:2、グレード 2:54、グレード3:77	133	<0.0001 (KW)
Desmedt et al.	2007	Desmedt_Breast	グレード1:30、グレード 2:83、グレード3:83	196	<0.0001 (KW)
Schmidt et al.	2008	Schmidt_Breast	グレード1:29、グレード 2:136、グレード3:35	200	<0.0001 (KW)
Finak et al.	2008	Finak_Breast	グレード1:3、グレード 2:23、グレード3:27	53	0.0081 (KW)
Lu et al. <sup>4</sup>	2008	Lu_Breast	グレード1:27、グレード 2:32、グレード3:70	129	<0.0001 (KW)

10

20

【表 5 b】

**Table 5b.**  
腫瘍グレード臨床的乳癌コホート — FRYポリペプチド

バイオマックス・ アレイ ID	N: 試料分布 <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	統計学的解析 (KWまたはOA) p値 <sub>3</sub>
BR208	グレード1:22、グレード 2:27、グレード3:20	69	<0.02 (OA)

30

【 0 1 8 5 】

乳腺腫瘍におけるFRY発現の解析に利用したコホート。

40

【 0 1 8 6 】

<sup>1</sup>特に記載がない限り、これらの試料はエルストンのグレード化システムを使用してグレード分けした。

【 0 1 8 7 】

<sup>2</sup>グレード1、2、および3の試料の合計。

【 0 1 8 8 】

<sup>3</sup>比較されるデータセットは、ダゴスティーノとピアソンのオムニバス正規性検定を使用して正規性について検定した。OA：データセットが正規性検定に合格した場合、一元配置ANOVA（パラメトリック）を利用して、患者試料の間で腫瘍グレードの上昇に伴ってFRY

50

発現が減少する傾向があるか否かを決定した。KW：データセットが正規性検定に合格しなかった場合、クラスカル・ウォリス検定（ノンパラメトリック）を利用して、患者試料の間で腫瘍グレードの上昇に伴ってFRY発現が減少する傾向があるか否かを決定した。

【0189】

<sup>4</sup>これらの試料はリチャードソン・ブルームのグレード化システムを使用してグレード分けした。

【0190】

オンコマイン・データベース内で、エストロゲン受容体の状態に関するアノテーションを含むコホートを同定した。これらの研究における解析により、エストロゲン受容体陽性（ER+）乳癌と比較して、エストロゲン受容体陰性（ER-）乳癌ではFRYが有意に減少していることが示された（ $n=2,555$ ； $p<0.01$ ）（図4h；表6aおよびb）。FRYはまた、三重陰性（ERBB2/ER/PR-）乳癌において、他の受容体状態の癌と比較して有意に減少していた（ $n=475$ ； $p<0.01$ ）（図4i；表7）。このデータは独立のコホートでタンパク質レベルにおいて確認され、FRYポリペプチド発現は、50%超のER+細胞を有するER+癌（ $N=12$ ）と比較して、ER-乳癌（ $N=16$ ）および三重陰性癌（ $N=4$ ）において減少していることが実証された（ $p<0.04$ ）（図4j、k）。限られた組におけるER-（ $N=16$ ）およびER+（ $N=18$ ）乳癌におけるFRYポリペプチドの発現低下も統計学的有意性に近かった（ $p=0.057$ ）。乳癌コホートの上記解析により、最も進行性・悪性である乳腺腫瘍の種類であって臨床的結果が芳しくない傾向にある低分化型ホルモン受容体陰性乳癌表現型と、FRYの減少とが、高い関連性を有していることが示された。

【表6a】

**Table 6a.**

ホルモン受容体状態臨床的乳癌コホート — FRY mRNA

著者	年	オンコマインID	N: 試料分布	N <sub>i</sub>	統計学的解析 (STまたはMW) p値 <sub>2</sub>
Hedenfalk et al.	2001	Hedenfalk Breast	ER- 11, ER+ 10	21	0.007 (ST)
Gruvberger et al.	2001	Gruvberger Breast	ER- 30, ER+ 28	58	0.0242 (ST)
VandeVijver et al.	2002	Vandevijver Breast	ER- 69, ER+ 226	295	<0.0001 (ST)
Sotiriou et al.	2003	Sotiriou2 Breast	ER- 33, ER+ 65	98	0.0001 (ST)
Huang et al.	2003	Huang Breast	ER- 15, ER+ 73	88	0.0409 (ST)
Hedenfalk et al.	2003	Hedenfalk2 Breast	ER- 6, ER+ 10	16	0.003 (MW)
Wang et al.	2005	Wang Breast	ER- 77, ER+ 209	286	<0.0001 (ST)
Bittner et al.	2005	Bittner Breast	ER- 76, ER+ 149	225	<0.0001 (ST)
Miller et al.	2005	Miller Breast	ER- 34, ER+ 213	247	0.007 (MW)
Minn et al.	2005	Minn2 Breast	ER- 42, ER+ 57	99	<0.0001 (MW)
Bild et al.	2006	Bild Breast	ER- 48, ER+ 110	158	0.0016 (ST)
Ginestier et al.	2006	Ginestier Breast	ER- 28, ER+ 27	55	0.0003 (ST)
Chin et al.	2006	Chin Breast	ER- 43, ER+ 75	118	<0.0001 (MW)
Ivshina et al.	2006	Ivshina Breast	ER- 33, ER+ 212	245	<0.0001 (MW)
Richardson et al.	2006	Richardson2 Breast	ER- 24, ER+ 15	39	0.0005 (ST)
Hess et al.	2006	Hess Breast	ER- 51, ER+ 82	133	<0.0001 (MW)
Desmedt et al.	2007	Desmedt Breast	ER- 64, ER+ 134	198	<0.0001 (MW)
Lu et al.	2008	Lu Breast	ER- 53, ER+ 76	129	<0.0001 (MW)
Boersma et al.	2008	Boersma Breast	ER- 26, ER+ 21	47	0.0021 (ST)

## 【表 6 b】

Table 6b.

## ホルモン受容体状態臨床的乳癌コホート — FRYポリペプチド

バイオマックス社 アレイID	N: 試料分布	N <sub>i</sub>	統計学的解析 (STまたはMW) p値 <sup>2</sup>
BR962	ER- 16, ER+ 12	28	<0.03 (MW)
BR962	三重陰性: 4, ER+ 12	16	<0.04 (MW)

10

## 【 0 1 9 1 】

乳腺腫瘍におけるFRY発現の解析に利用したコホート。

## 【 0 1 9 2 】

<sup>1</sup>エストロゲン受容体陽性試料およびエストロゲン受容体陰性試料の合計。

20

## 【 0 1 9 3 】

<sup>2</sup>比較されるデータセットは、ダゴスティーノとピアソンのオムニバス正規性検定を使用して正規性について検定した。ST: データセットが正規性検定に合格した場合、スチューデントのt検定(パラメトリック)を利用して、エストロゲン受容体陰性試料における平均FRY発現が、エストロゲン受容体陽性試料のものと有意に異なっており且つより低いかなかを決定した。MW: データセットが正規性検定に合格しなかった場合、マン・ホイットニー検定(ノンパラメトリック)を利用して、ER陰性試料における平均FRY発現がER陽性試料のものより有意に低いかなかを決定した。

## 【表 7】

30

Table 7.

## 三重陰性臨床的乳癌コホート — FRY mRNA

著者	年	オンコマインID	N: 試料分布	N <sub>i</sub>	統計学的解析 (STまたはMW) p値 <sup>2</sup>
Bittner et al.	2005	Bittner_Breast	三重陰性: 39、他の 受容体状態: 121	160	0.0019 (ST)
Minn et al.	2005	Minn2_Breast	三重陰性: 25、他の 受容体状態: 63	88	0.0004 (MW)
Chin et al.	2006	Chin_Breast	三重陰性: 19、他の 受容体状態: 59	78	<0.0001 (ST)
Richardson et al.	2006	Richardson2 Breast	三重陰性: 18、他の 受容体状態: 19	37	0.0003 (ST)
Bonnefoi et al.	2007	Bonnefoi Breast	三重陰性: 80、他の 受容体状態: 32	112	0.0026 (ST)

40

## 【 0 1 9 4 】

乳腺腫瘍におけるFRY解析に利用されたオンコマイン・コホート。

## 【 0 1 9 5 】

<sup>1</sup>三重陰性試料と他の受容体状態の試料との合計。

## 【 0 1 9 6 】

50

<sup>2</sup>比較されるデータセットは、ダゴスティーノとピアソンのオムニバス正規性検定を使用して正規性について検定した。ST：データセットが正規性検定に合格した場合、スチューデントのt検定（パラメトリック）を利用して、三重陰性試料における平均FRY発現が、他の受容体状態の試料のものと有意に異なり且つより低いかなかを決定した。MW：データセットが正規性検定に合格しなかった場合、マン・ホイットニー検定（ノンパラメトリック）を利用して、三重陰性試料における平均FRY発現が他の受容体状態の試料のものより有意に低いかなかを、これらの群間で有意に異なるかなかを決定した。

【0197】

[実施例7：FRYは上皮細胞の分化および発生において役割を果たす]

アイソジェニックな細胞株の対（MDA-MB-231と231wCFRY；MCF10Aと10A-shFRY）のインビトロおよびインビボの解析は、FRYを上皮細胞の分化、接着、および移動性と関連付けた。IPA（インジェニユイティ（登録商標）システムズ、www.ingenuity.com）を使用した遺伝子発現プロファイリング・インシリコ解析では、上皮細胞の構築、分化、運動性、細胞対細胞シグナル伝達、および細胞接着の維持に関係する遺伝子ネットワークにおけるFRYの同様の役割が確認された（表8）。FRYレベルの改変は、上皮細胞分化に関係する遺伝子の42%（104/245）、組織発生に関与する遺伝子の48%（49/103）、および細胞極性に関与する遺伝子の45%（22/49）において発現レベルを有意に変化させた（図5）。インジェニユイティ（登録商標）経路解析ソフトウェアを利用して、アイソジェニックな細胞株の両方の対（MDA-MB-231 / 231wCFry、および10A-CV / 10A-shFRY）で共通して有意に（ $p < 0.05$ ；765遺伝子、表5（a）および（b））変化していた遺伝子の機能解析を行った。（a、b、c）上皮細胞分化、組織発生、および細胞極性において解明されたFRY応答性遺伝子。各ベン図の右側に挙げられている遺伝子は、アイソジェニック細胞株の両方の対において共通して変化していたものである（図5）。腫瘍細胞における異所性FRY発現または正常乳腺上皮細胞におけるFRY発現減少により最も影響された古典的（canonical）経路は、上皮細胞極性の維持において重要な役割を果たすWnt /  $\beta$ -カテニン・シグナル伝達経路であった（表9）。10A-shFRYにおけるFRY発現の減少は  $\beta$ -カテニン発現を低下させ、231wCFRY細胞株におけるFRYの異所性発現は  $\beta$ -カテニン発現を回復させた（図6a）。

10

20

【表 8】

Table 8.

## FRY応答性遺伝子

ABCC3	ATP5G3	CAPRIN2	COL17A1	DUSP16	FAM27E3
ABHD15	ATP9A	CARD8	COL4A1	DYNC1H1	FAM63B
ACAD8	AXL	CARS	COMM4	ECHDC3	FAM69A
ACAT2	B3GNT5	CASP6	CPD	EDEM2	FAM83A
ACTR1A	B9D1	CBVWD1	CPED1	EDEM3	FARP1
ADAM8	BAMBI	CCDC123	CRNDE	EDIL3	FBLIM1
ADAM17	BBS7	CCDC90A	CSNK1E	EFNA5	FBXL5
ADAMTS15	BRI3BP	CCL20	CSNK2A1	EFTUD1	FBXO11
ADD3	BTG1	CCNA1	CTSB	EGFR	FERMT1
AFAPIL1	BTG3	CCNA2	CTSC	EHF	FGD6
AFF4	C10orf47	CD24	CUL1	EID2	FGF2
AGR2	C11orf1	CD44	CXCL1	EID2B	FGF11
AIG1	C11orf75	CD2BP2	CXCL2	EIF2S3	FGF13
AKR1C3	C12orf39	CDC14B	CXCL3	EIF4E2	FGFR1
AKR1C1/AKR1C2	C13orf18	CDC42EP1	CXXC5	EIF4EBP1	FKBP15
ALAS2	C15orf48	CDCP1	CYLD	EIF4EBP2	FLJ10120
ALCAM	C16orf52	CDH4	CYP1B1	ELK3	FLRT2
ALDH1L2	C16orf53	CDH18	CYP24A1	ELL2	FLRT3
ALS2CL	C16orf74	CDIPT	CYP27B1	EMB	FMNL2
AMOTL1	C17orf97	CDK2	DAZAP2	EMPI	FN1
ANGPTL4	C18orf25	CDK12	DCIN1	ENPP1	FOSL2
ANK3	C19orf28	CDV3	DDAH1	ENY2	FRG1
ANKRD28	C1orf21	CFB	DDX5	EP300	FRMD6
ANKRD50	C1orf53	CFLAR	DDX17	EPAS1	FSIP1
ANXA8L2	C1S	CHD2	DDX60	EPHA2	FST
AOX1	C21orf7	CHD9	DEM1	EPHA4	FSTL1
API3	C2orf74	CHIC1	DERL3	EPHB2	FSTL5
APAF1	C3orf21	CHST11	DFNA5	EPM2AIP1	FXC1
APBB2	C4orf21	CIAO1	DHFRL1	ERCC8	FXYD3
AQP3	C5orf46	CITED2	DIDO1	EREG	FZD3
AREG/AREGB	C6orf52	CLDN4	DIEXF	ERMP1	FZD7
ARF3	C6orf132	CLEC2B	DIP2C	ESYT2	GALNT6
ARHGAP32	C6orf168	CLGN	DIS3	ETFB	GATA6
ARHGEP9	C7orf10	CLK4	DIS3L2	EVI5	GBP1
ARID4A	C8orf55	CLMN	DMRT1	F3	GCNT1
ARL4D	C9orf3	CLNS1A	DNAJC21	FAIM3	GCOM1
ARNIL2	C9orf150	CLSPN	DSC2	FAM107B	GDAP1
ARRB2	C9orf123	CLTA	DSE	FAM133B	GEMIN6
ARSD	CA12	CMIM6	DST	FAM162A	GIT2
ARV1	CABYR	CNIH4	DUSP1	FAM167A	GJB3
ASAP1	CALHM2	CNST	DUSP4	FAM175A	GK
ASNS	CALM1	COBLL1	DUSP5	FAM201A	GLS
ATF3	CAMTA1	COG3	DUSP6	FAM20C	GLUD2
ATP2A2	CAMTA2	COL12A1	DUSP10	FAM24B	GNA15

10

20

30

40

**Table 8.**  
FRY応答性遺伝子(続き)

GNAI1	IL1RL1	KRCC1	MAPK8	NOG	PIGC
GNPAT	IL31RA	KRT14	MARCKS	NOTCH2	PIM1
GOLGB1	IL6ST	KRT17	MAST4	NPEPL1	PIR
GOPC	ING5	KRT8L2	MBD1	NPY1R	PLA2G4A
GOSR2	INHBA	KYNU	MBP	NR1D2	PLAC2
GPCPD1	INHBE	LAMA3	MCPH1	NR2F2	PLAU
GPNMB	INSIG1	LAMB3	MCTP1	NR3C1	PLAUR
GPR87	INTS6	LAMC1	MDM4	NRIP1	PLSCR1
GPR110	IPO9	LAMC2	MED13L	NRP2	PLXNA1
GPR137C	IQCB1	LARP6	MFAP3L	NUDT4	POLE4
GPRC5B	IRS1	LCN2	MIA	NUDT21	POLR2C
GPX7	IRX5	LETM2	MICAL2	NUPR1	POMT1
GRIK2	ISL2	LMAN1	MICAL3	OAZ3	PON2
GSK3B	ITGA3	LMBR1	MIPOL1	OCLN	POSTN
GTF2H5	ITGB3	LMO7	MLLT4	OGFRL1	POU2F2
GYG1	ITGB4	LOC25845	MMP14	OPA3	PPAP2B
H2AFV	ITGB8	LOC81691	MON1B	OSBPL6	PPM1A
HBEGF	ITPR2	LOC221710	MPP5	OTUD4	PPP1R3C
HDAC9	JAG1	LOC283788	MPZL3	P2RY2	PPP2CA
HERPUD1	JHDM1D	LOC284561	MRPS21	PAICS	PPP2R5D
HFE	JMJD1C	LOC339290	MSI2	PAPOLA	PPP3CC
HIST1H2BD	JRK	LOC389834	MTHFD2	PAPSS2	PRICKLE1
HK2	JUB	LOC651250	MTHFD1L	PAQR5	PRICKLE2
HOXA7	KANK1	LOC728855	MTL5	PAWR	PRKAG2
HOXC9	KCNJ15	LOC100129637	MTSS1	PAX8	PRKAR2B
HOXC11	KCNK1	LOC100292680	MXD1	PBXIP1	PRNP
HOXC13	KCNMA1	LOC100499467	MYC	PCDH7	PROCR
HP1BP3	KHDRBS3	LOC100505761	MYO10	PCGF2	PROM2
HPGD	KIAA0391	LOC100131199	MYO1E	PCGF6	PRRC2C
HRCT1	KIAA0564	LOX	MYPN	PCK2	PSAT1
HRH1	KIAA1217	LRRC16A	NAMPT	PCM1	PSCA
HS3ST3B1	KIAA1279	LUM	NASP	PDE4D	PSTPIP2
HSPA2	KIAA1310	LYRM2	NCOR1	PDE4DIP	PTER
HSPA13	KIAA1430	M6PR	NCRNA00292	PDGFC	PTGS2
HTATIP2	KIAA1644	MAFB	NDUFB2	PDK4	PTPN12
HTRA1	KIAA1797	MAFF	NEDD4L	PDLIM4	PTPN14
ICAM1	KIAA0664L3	MALL	NEGR1	PDLIM5	PTPN18
IERSL	KIAA1324L	MAN1A1	NEK9	PDXK	PTPRE
IIFT27	KIF7	MAN2C1	NETO2	PDZD2	PTPRJ
IGFBP3	KLF5	MANSC1	NF2	PDZK1IP1	PTPRM
IL6	KLF7	MAOA	NFX1	PEG10	PVRL2
IL32	KLHL29	MAP7	NHEDC2	PGBD1	PWWP2B
IL13RA1	KLK6	MAP3K3	NLN	PHF14	QKI
IL13RA2	KMO	MAP4K4	NMD3	PHLDB2	QPCT

10

20

30

40

Table 8.

## FRY応答性遺伝子(続き)

QRSL1	SEMA3C	SLFN5	TATDN3	TSPAN13	ZKSCAN1
RAB31	SEMA3D	SLITRK5	TBL1XR1	TTC9	ZNF22
RAB27A	SEMA3F	SLITRK6	TBX3	TTC14	ZNF117
RAB4A	SEMA5A	SLK	TCN1	TTC22	ZNF131
RAGE	SEMA6A	SMAD2	TCP11L1	TUBE1	ZNF174
RANBP17	SEMA7A	SMARCB1	TET2	TUSC3	ZNF232
RAP2B	SERPINA1	SMEK2	TFCP2L1	TWIST1	ZNF236
RASSF9	SERPINA3	SMOX	TFPI	TWSG1	ZNF302
RB1CC1	SERPINE1	SMTN	TFPT	TXNIP	ZNF346
RBBP6	SESN2	SMURF2	TGIF1	TXNL4B	ZNF365
RBM8A	SETD5	SNAPC3	THADA	TYSND1	ZNF451
RBMS3	SETD7	SNHG5	THRA	UBAP2L	ZNF551
RBPMS	SFN	SNRK	TIGD2	UBE2H	ZNF558
RCAN2	SGCB	SNRPE	TLK2	ULK3	ZNF785
RCOR1	SGMS2	SOD2	TLR2	UNC5C	ZNF789
RFC1	SH3RF3	SORBS1	TLR4	UQCRB	ZNF264/ZNF805
RGMB	SHISA2	SOX5	TMCC3	USP25	ZNRF1
RGNEF	SIK3	SP140/SP140L	TMCO6	USP46	
RHOB	SIM2	SPA17	TMEFF1	USP53	
RHOBTB1	SIPA1L1	SPIN3	TMEM2	VAMP4	
RHOF	SIPA1L2	SPOCK1	TMEM19	VANGL1	
RHOQ	SIRPA	SPILC3	TMEM139	VEGFA	
RIMS2	SIRT3	SQRDL	TMEM154	VEZT	
RIPK2	SKA2	SREK1	TMEM63C	VNN1	
RIT1	SKIV2L2	SSH1	TNFAIP3	VRK3	
RLIM	SLAIN1	SSU72	TNFAIP6	VSIG10L	
RNF13	SLC16A6	STC1	TNFAIP8	VWA5A	
RNF146	SLC16A14	STEAP1	TNFRSF10D	WISP3	
RNF144B	SLC1A1	STK38	TNFRSF11A	WNT5A	
RNFT2	SLC22A3	STX6	TNIP1	WWC3	
ROR1	SLC25A17	STX16	TNIP3	XBP1	
RSL24D1	SLC25A29	SUGT1	TPM1	XDH	
RSPRY1	SLC25A37	SULT1A1	TPM2	ZADH2	
RTTN	SLC29A1	SULT1A2	TRAF3IP2	ZBED6	
SAA1	SLC35B4	SULT1A3/SULT1A4	TRAK1	ZBTB10	
SAMD5	SLC39A8	SUN2	TRAM1L1	ZBTB44	
SBF2	SLC44A2	SYBU	TRIB1	ZCCHC2	
SBNO1	SLC44A3	SYNGR1	TRIB3	ZCCHC7	
SCD	SLC45A4	SYNM	TRIM2	ZDHHC2	
SDC2	SLC4A11	TAB2	TRIM8	ZDHHC3	
SDR16C5	SLC6A8	TAB3	TRIM23	ZDHHC17	
SEC62	SLC6A14	TAF11	TRIM29	ZEB2	
SEC24A	SLC6A15	TANC2	TRIOBP	ZFP36L1	
SELENBP1	SLC7A2	TAP2	TRPS1	ZFYVE21	

10

20

30

40

【表9】

Table 9.

FRY応答性遺伝子により表されるIPA古典的シグナル伝達経路

上位古典的経路	
ILKシグナル伝達	ニコチン酸およびニコチンアミドの代謝
T細胞シグナル伝達におけるTOBの抗増殖的役割	TGF- $\beta$ シグナル伝達
大腸癌転移シグナル伝達	アリアル炭化水素受容体シグナル伝達
軸索誘導シグナル伝達	膀胱癌シグナル伝達
肝線維症/肝星細胞活性化	ソニックヘッジホッグ・シグナル伝達
クラスリン媒介エンドサイトーシス・シグナル伝達	ドパミン受容体シグナル伝達
グルココルチコイド受容体シグナル伝達	ハンチントン病シグナル伝達
凝固系	癌における組織因子の役割
RAR活性化	エストロゲン受容体シグナル伝達
NF- $\kappa$ Bシグナル伝達	p53シグナル伝達
VDR/RXR活性化	ERK/MAPKシグナル伝達
PXR/RXR活性化	急性期応答シグナル伝達
多形性神経膠芽腫シグナル伝達	PPARシグナル伝達
神経膠腫浸潤性シグナル伝達	リボフラビン代謝
硫黄代謝	Wnt/ $\beta$ -カテニン・シグナル伝達
D-グルタミンおよびD-グルタミン酸の代謝	スフィンゴ脂質代謝
IL-8シグナル伝達	MIF媒介性グルココルチコイド制御
気道細胞におけるIL-17Aシグナル伝達	エフリン受容体シグナル伝達
サイクリンおよび細胞周期の制御	マクロファージにおける一酸化窒素および活性酸素種の産生
窒素代謝	コンドロイチン硫酸の生合成
乾癬におけるIL-17Aの役割	Toll様受容体シグナル伝達
肝ナチュラルキラー細胞の殺腫瘍性機能	システイン代謝
癌の分子機構	コレシストキニン/ガストリン媒介性シグナル伝達
卵巣癌シグナル伝達	BTGファミリー・タンパク質による細胞周期制御
胃細胞におけるIL-17Aシグナル伝達	線維芽細胞におけるIL-17Aシグナル伝達

10

20

30

## 【0198】

アイソジェニック細胞株の使用により、細胞対細胞接着および移動性においてもFRYが役割を果たすことが示された。4-インテグリン (ITGA4) の発現は、細胞移動に關与する重要な細胞接着分子 (CAM) であるが、細胞の接着、増殖、移動、および分化において主要な役割を果たす分子であるフィブロネクチンの受容体でもある。ウェスタンブロット解析により、10A-shFRYにおけるFRY発現の減少がITGA4発現を低下させ、231wCFRY細胞株におけるFRYの異所性発現がITGA4発現を回復させたことが示された (図6b)。図6bは、FRY発現を減少させたときには (10A-shFRY) 4-インテグリンが減少し、異所性FRYを発現させたときには (231wCFry) 4-インテグリンが増加することを示している。-アクチンのタンパク質発現 (N=3) に対する標準化による定量化; タンパク質発現レベルは -アクチンに対する%として表している。

40

## 【0199】

[ 実施例8: 前立腺癌、卵巣癌、肺癌、脳癌、および血液癌においてFRYは減少している ]  
 オンコマイン3.0癌プロファイリング・データベースで入手可能なデータを使用して、臨床的なアノテーションがされた前立腺癌、卵巣癌、肺癌、脳癌、および血液癌のコホートを同定した。前立腺癌コホート (p<0.003) (正常32; 癌114)、卵巣癌コホート (p<0.008) (正常19; 癌182)、および肺癌コホート (p<0.008) (正常136; 癌452) の解析はすべて、正常組織と比較して癌ではFRYが有意に減少していることを示していた (図7a、b

50

、c)。正常脳組織と比較して神経膠芽腫ではFRY発現が減少しており ( $p < 0.0001$ ) (正常23; 癌81)、正常骨髄と比較して白血病事例ではFRYが減少していた ( $p < 0.0002$ ) (正常6; 癌121) (図7d、e)。

#### 【0200】

FRYの発現は、転移しない前立腺癌と比較して、転移する前立腺癌において最も低く (原発性癌65; 転移が存在するもの24) ( $p < 0.0001$ ; 図7)、また、ヒト乳癌における発明者らの観察と一致して、FRYの発現は、高分化型肺癌におけるその発現と比較して、悪性度の高い低分化型肺癌において有意に低かった ( $p < 0.03$ ; 図7f、g)。

#### 【0201】

##### [実施例9: SNAP解析]

SNAP (許容不可能多型のスクリーニング) は、単一アミノ酸置換の機能的帰結を、二元的形式 (野生型機能に対して中立的 / 非中立的) およびスコア形式 (-100から+100まで。負の予測は中立的であり、正の予測は非中立的であり、スコアの絶対値がより高ければ二元的予測の信頼性がより高いことを示す。) の両方において予測する (Bromberg and Rost 2007)。SNAPはまた、SNAP-BLOSUM62スコア (野生型残基の各々について、カットオフを0としたBLOSUM62マトリックスにより許容される置換の平均SNAPスコア) を計算することにより、タンパク質配列における各アミノ酸に見込まれる (構造上ではなく) 機能上の重要性を提示する。通常のSNAPスコアと同様に、SNAP-BLOSUM62スコアが0であることは特定の配列位置が機能上重要である見込みが少ないことを示し、スコアが $>0$ であることはその位置がおそらく機能上重要であることを示す。ヒトFRYポリペプチド配列はUSCSゲノムブラウザー (Q5TBA9; FRY\_HUMAN) から入手した。第661コドン (F344ラットがアスパラギン酸からグルタミン酸への突然変異を有する位置) におけるアミノ酸変化のSNAPスコア (-48) は、この突然変異は機能的な帰結を引き起こす可能性が低いことを示した。位置661のBLOSUM62スコア (-19) もさらに、その位置が機能的に重要ではないことを示唆した。フィッシャー-F344ラット系統で観察された第2170コドンの突然変異と一致するヒト第2171コドンにおける可能なすべての置換のSNAPスコアを解析した。第2171コドン (F344ラットがアラニンからセリンへの突然変異を有していた位置; スコア+15) におけるアミノ酸置換のSNAPスコアは、この位置におけるアミノ酸変化は機能的帰結を有する可能性が高いことを示した。SNAP-BLOSUM62スコアは、この位置が機能的に重要であることを示した (スコア+8)。

#### 【0202】

##### [実施例10: FRYタンパク質発現は良性病変よりも悪性乳腺病変において低い]

病理学者スコアによれば、ノンパラメトリックなマン・ホイットニー検定 ( $p < 0.025$ ) による解析に基づいて、悪性病変 (浸潤性乳管癌、浸潤性小葉癌、葉状肉腫、粘液性癌、および扁平上皮癌) と比較して良性乳腺病変 (線維腺腫、肉芽腫、および良性の線維嚢胞変化を伴う乳腺組織) における核FRYタンパク質発現は有意に高かった。図8は、悪性病変と比較して良性乳腺病変では核FRYタンパク質発現が有意に高いことを示している。(a) および (b) は浮動棒グラフであり、各群における最小値から最大値までを示し、中央値を線で示す。病理学者スコアは0~3である (0: 上皮細胞核の $<10\%$ がFRYについて陽性であった。1: 上皮細胞核の $10 \sim 40\%$ がFRY染色について陽性であった。2: 上皮細胞核の $40 \sim 70\%$ がFRY染色について陽性であった。3: 上皮細胞核の $70 \sim 100\%$ がFRY染色について陽性であった)。

#### 【0203】

本明細書は、明細書中で引用する参考文献の教示を参照すれば最も完全に理解される。明細書中の実施態様は本発明の実施態様の説明を提供するものであり、本発明の範囲を限定するものと解釈すべきではない。当業者は他の多くの実施態様が本発明に包含されることを容易に理解する。本開示で引用するすべての刊行物、米国特許、およびジェンバンク配列は、参照によりその全体が組み入れられる。本明細書におけるいかなる参考文献の引用も、そのような参考文献が本発明の先行技術であることを認めるものではない。

#### 【0204】

当業者は、本明細書に記載される本発明の具体的な実施態様の多くの等価物を認識し、または、ルーチンの実験法を使用するだけでそれらの等価物を確認することができる。そのような等価物は以下の実施態様に包含されることが意図される。

【 図 1 A 】

FIGURE 1A

Copラットにおける仮態タンパク質 [Rattus norvegicus] DELRHLAQNSLQGLLVDFSDMRD /LFGFTNLLREYNDVHHTL-  
 F344ラットにおける仮態タンパク質 [Rattus norvegicus] DELRHLAQNSLQGLLVDFSDMR(E)ALFGFTNLLREYNDVHHTL-  
 qi | 182900104 | [Mus musculus] DELRHLAQNSLQGLLVDFSDMRD /LFGFTNLLREYNDMHTL-  
 qi | 12957488 | [Homo sapiens] DELRHLAQNSLQGLLVDFSDMRD /LFGFTNLLREYNDMHTL-  
 qi | 76631515 | [Bos taurus] DELRHLAQNSLQGLLVDFSDMRD /LFGFTNLLREYNDMHTL-  
 qi | 168367717 | [Danio rerio] DELRHLAQNSLQGLLVDFSDMRD /LFGFTNLLREYNDTQGL-  
 qi | 11907986 | [Drosophila melanogaster] EELRILTHQSLITIVIDEPMRQD /VHGVTQFLYDVTYDTPQI-  
 qi | 71081935 | [Saccharomyces cerevisiae] VISSSSQALRALASKKPYTI I TWEAKYSDDFDEKTSYNNMS  
 qi | 73993432 | [Canis familiaris] DELRHLAQNSLQGLLVDFSDMRD /LFGFTNLLREYNDMHTL-  
 qi | 50747011 | [Gallus gallus] EELRALAFWTLQALMLDFDWRD /LSGFVYFVREVTDIHPTL-  
 qi | 55639689 | [Pan troglodytes] DELRHLAQNSLQGLLVDFSDMRD /LFGFTNLLREYNDMHTL-  
 qi | 47227844 | [Tetraodon nigro viridis] DELRHLAQNSLQGLLVDFSDMRD /LFGFTNLLREYQDTHQGL-

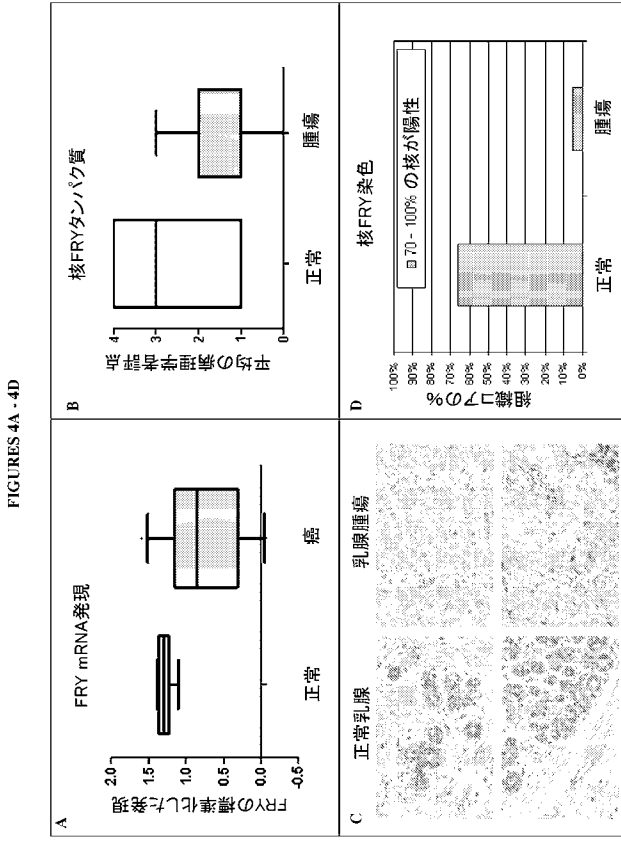
【 図 1 B 】

FIGURE 1B

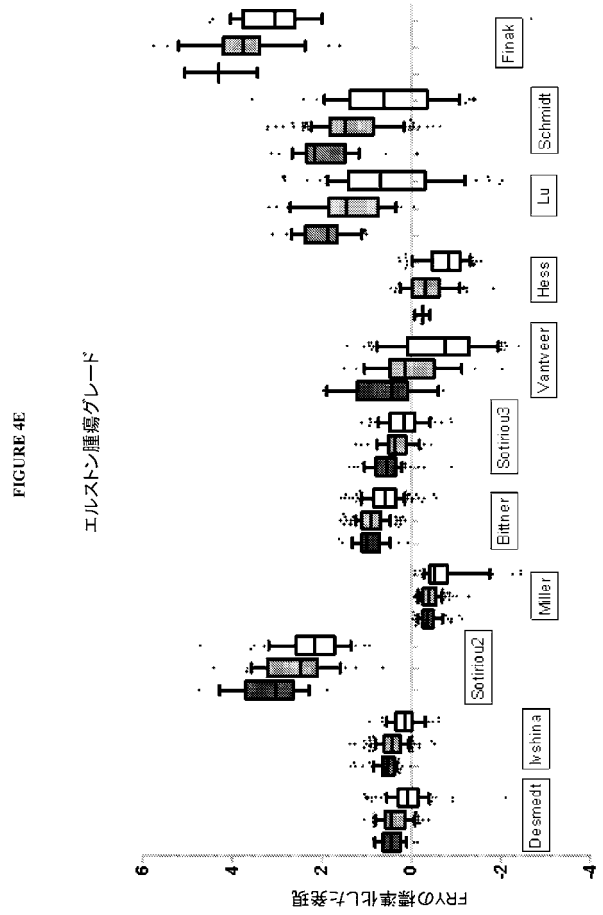
Copラットにおける仮態タンパク質 [Rattus norvegicus] QLIQHFNPHQFCXGI -ARR-ACVCEE --KPKLSNLAHWTLY  
 F344ラットにおける仮態タンパク質 [Rattus norvegicus] QLIQHFNPHQFCXGI -ARR-SV-CLEE --KPKLSNLAHWTLY  
 qi | 182900104 | [Mus musculus] QLIQHFNPHQFCXDI -ARR-ACVCEE --KPKLSNLAHWTLY  
 qi | 12957488 | [Homo sapiens] QLIQHFNPHQFCXDI -ARR-ACVCEE --KPKLSNLAHWTLY  
 qi | 76631515 | [Bos taurus] QLIQHFNPHQFCXDV -ARR-AC-----  
 qi | 168367717 | [Danio rerio] HLVQHFSGPTQFCKES -ARR-ACVCEEKQKAKLSNLAHWTLY  
 qi | 11907986 | [Drosophila melanogaster] YMLNLYEDANEIIRS -ARN-ACVSTE ---LGAKENLGTWVTLY  
 qi | 71081935 | [Saccharomyces cerevisiae] RFLNAMDKDFTEIQVANDSLELANAY ---KQPSLSRIDSIAKN  
 qi | 73993432 | [Canis familiaris] QLIQHFNPHQFCXDI -ARR-ACVCEE --KPKLSNLAHWTLY  
 qi | 50747011 | [Gallus gallus] HLIQHFNPTQFCKET -ADR-AYVCEE ---KSPFLANLAHWSLKY  
 qi | 55639689 | [Pan troglodytes] QLIQHFNPHQFCXDI -ARR-AC-----  
 qi | 47227844 | [Tetraodon nigro viridis] -----



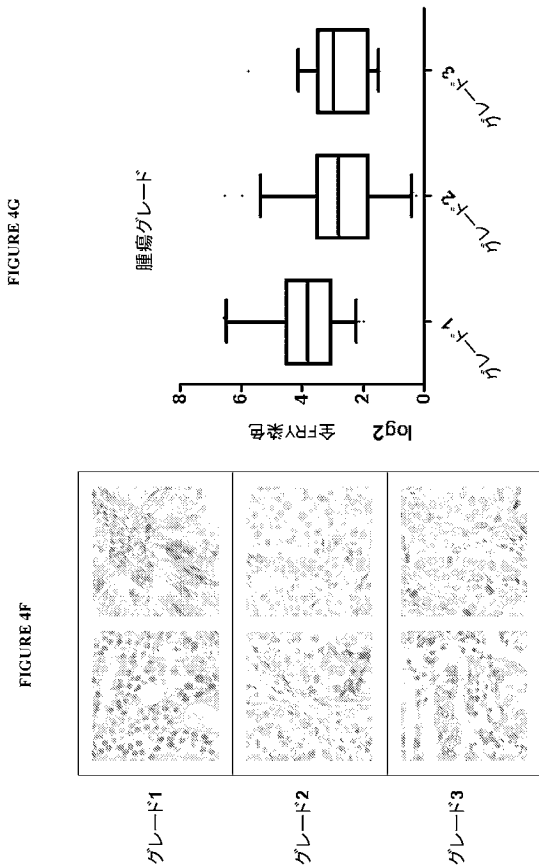
【 図 4 A - D 】



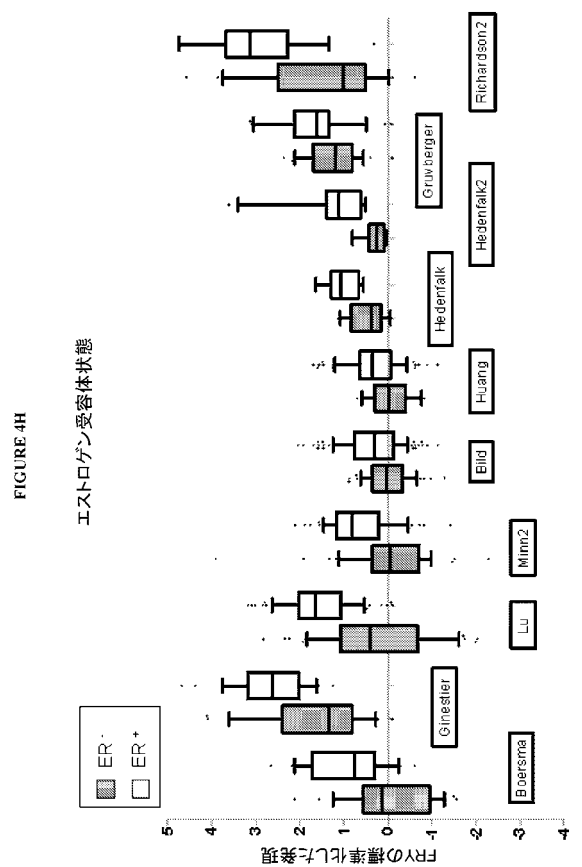
【 図 4 E 】



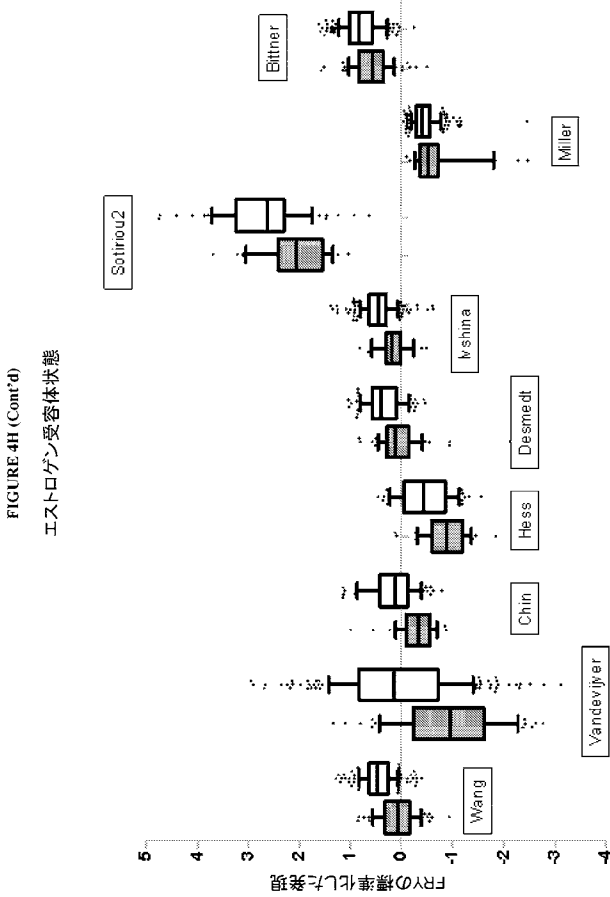
【 図 4 F - G 】



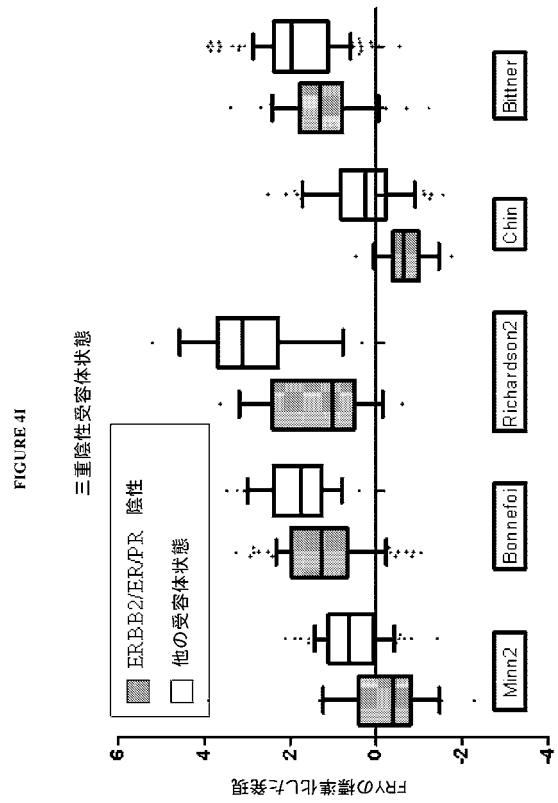
【 図 4 H - 1 】



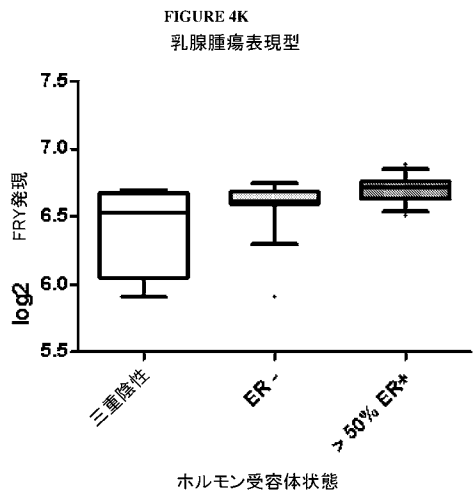
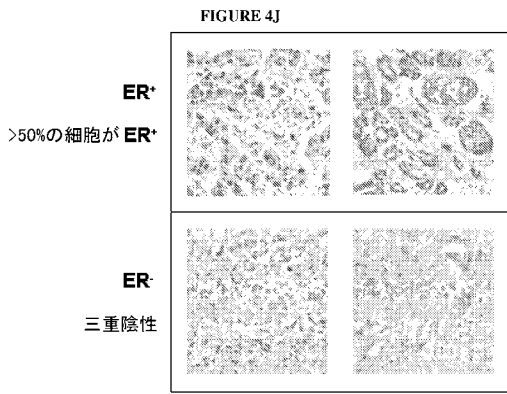
【 図 4 H - 2 】



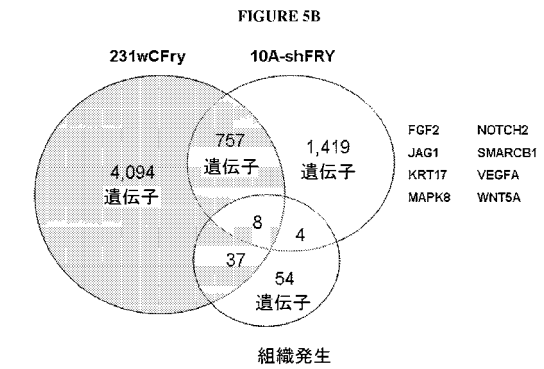
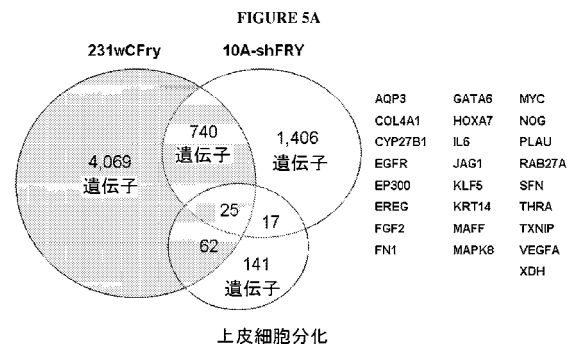
【 図 4 I 】



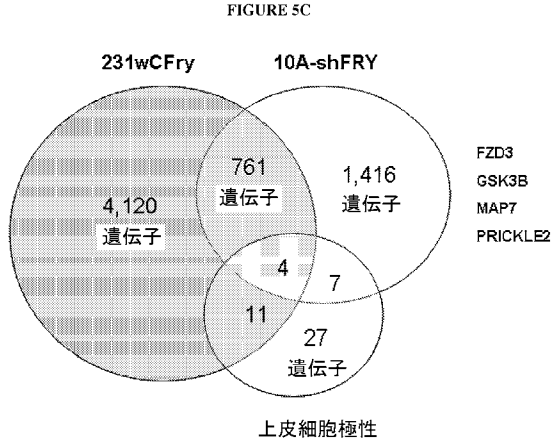
【 図 4 J - K 】



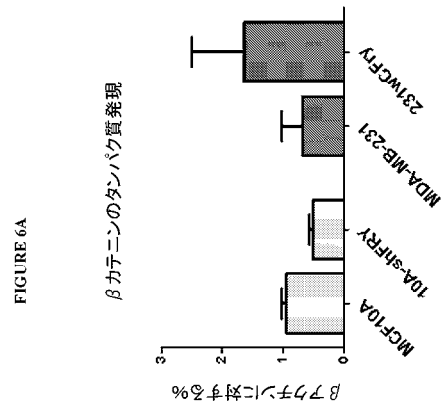
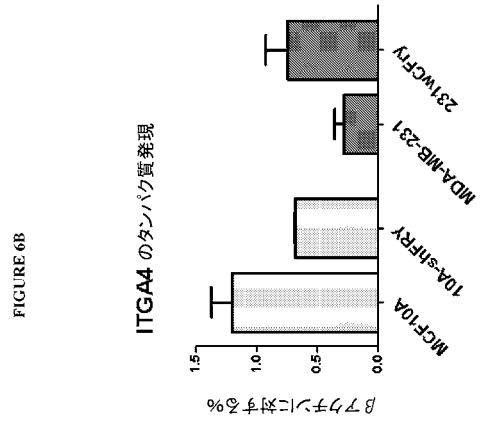
【 図 5 A - B 】



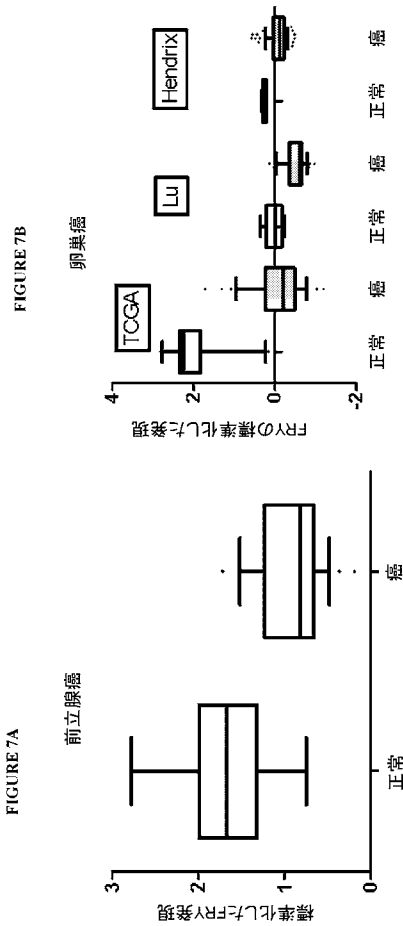
【 図 5 C 】



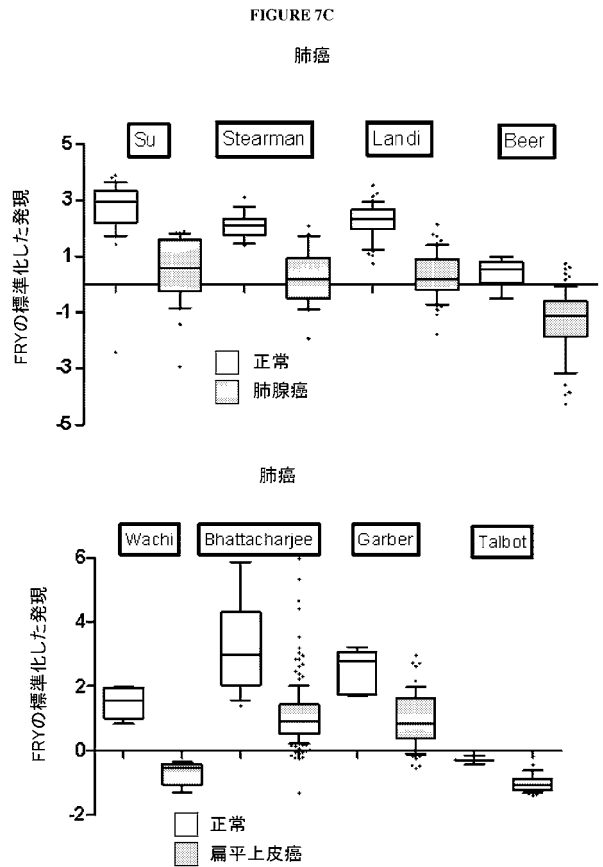
【 図 6 】



【 図 7 A - B 】

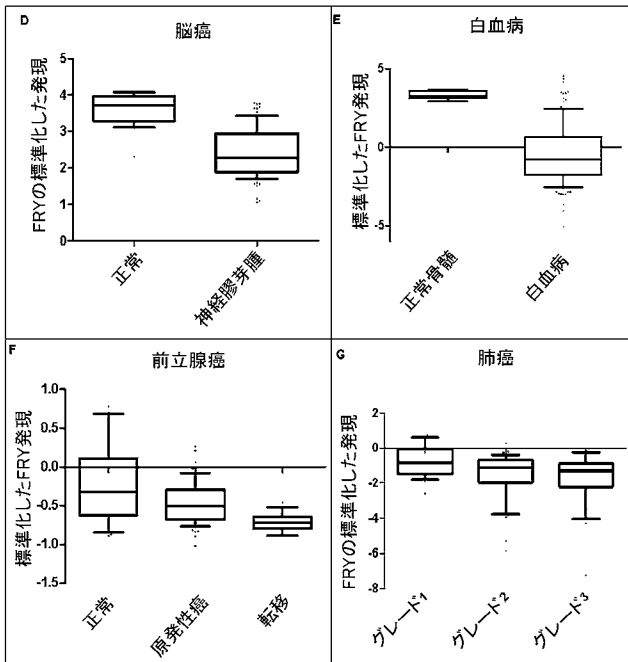


【 図 7 C 】



【 図 7 D - G 】

FIGURES 7D - 7G



【 図 8 】

FIGURE 8B

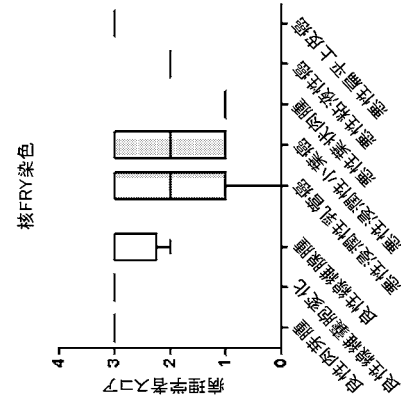
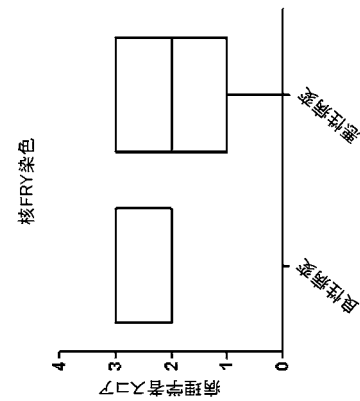


FIGURE 8A



【 配列表 】

201450762900001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 11/63553
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12Q 1/68, C12N 5/00, G01N 33/574 (2012.01) USPC - 435/6.14; 435/7.23, 435/6.13 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 435/6.14; 435/7.23, 435/6.13 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched 435/6.13, 6.14, 7.23, 377 (text search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic data bases: PubWEST (USPT, EPAB, JPAB, PGPB); Google Scholar; GenCore sequence search (NT, AA) Search terms: FRY (synonyms: furry homolog, C13orf14 ), cancer, melanoma, breast, lung, prostate detection, diagnosis, prognosis, monitoring, treatment, antibody, ELISA, immunohistochemistry, PCR, microarray, SEQ ID NOs: 1,3		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	US 2008/0113380 A1 (RIKER et al.) 15 May 2008 (15.05.2008). Especially para [0009], [0023], [0042], [0050], [0064], [0076], [0078], [0080-0082], [0104],[0105], pg 10 Table A.	1, 2, 4-6, 36, 37, 39-42 7-11 3
Y A	WO 2008/077165 A1 (LAUSS et al.) 3 July 2008 (03.07.2008). Especially abstract, pg 5 para 4, pg 6 para 1, pg 9 para 8, sheet 3 fig 2.	7, 9, 10, 11 3
Y	WO 2009/045201 A1 (CHU et al.) 9 April 2009 (09.04.2009). Especially pg 4 para 3, pg 47 Table 8.	8
Y	US 2010/0298160 A1 (SOTIRIOU et al.) 25 November 2010 (25.11.2010). Especially para [0088], [0132], pg 22 Supplementary table 1.	11
A	GenBank NM_023037.2 " Homo sapiens furry homolog (Drosophila) (FRY), mRNA" [online] 5 March 2010 [retrieved 6 June 2012]. Available on the internet: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/117606354?sat=13&satkey=12646443>. Especially pg 1,3 and 9.	3,6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 6 June 2012 (06.06.2012)		Date of mailing of the international search report <b>06 JUL 2012</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/63553

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: 38  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

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

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-11, 36, 37, 39-42, drawn to methods for diagnosing cancer, determining the effectiveness of cancer treatment, and kits for the diagnosis, prognosis or monitoring the treatment of a cancer.

Group II: Claims 12-17, drawn to methods for screening for compounds that induce differentiation of cells, and for differentiating a cell.

Group III: Claim 18-31, drawn to a pharmaceutical composition.

Group IV: Claim 32-35, drawn to an isolated antibody that binds to FRY polypeptide.

---please see extra sheet---

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-11, 36, 37, 39-42

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/63553

Continuation of Box No. III Observations where unity of invention is lacking

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The shared technical feature of the inventions listed as Groups I-IV is a FRY polypeptide or a polynucleotide encoding a FRY polypeptide. This shared technical feature fails to provide a contribution over the prior art, as evidenced by US 20080113360 A1 to Riker et al. (published 15 May 2008; hereinafter "Riker"). Riker discloses a FRY polypeptide (Table A - "furry homolog (Drosophila) FRY"), the expression level of which is analyzed for evaluating a cutaneous tissue sample for metastatic melanoma (para [0042]). Riker further teaches a. detecting a level of a FRY polypeptide or a polynucleotide encoding a FRY polypeptide in a biological sample from the subject (para [0078], [0042], Table A); and b. comparing the level detected in the subject's sample to a standard level in a corresponding non-cancerous sample (para [0078], [0042], Table A); c. diagnosing cancer when the level in the sample from the subject is less than the standard level (para [0042] - "Tables A and C list genes whose expression is decreased in metastatic melanoma samples, relative to non-metastatic samples."). In the absence of a contribution over the prior art, the shared technical feature is not a shared special technical feature.

Further, the special technical feature of the inventions listed as Group I is the treatment or diagnosis of cancer. This special technical feature is not shared by the inventions of Groups II-IV. The special technical feature of the inventions listed as Group II is the differentiation of cells. This special technical feature is not shared by the inventions of Groups I, III-IV. The special technical feature of the inventions listed as Group III is a pharmaceutical composition. This special technical feature is not shared by the inventions of Groups I-II and IV. The special technical feature of the inventions listed as Group IV is an antibody that binds to FRY polypeptide. This special technical feature is not shared by the inventions of Groups I-III.

Unity of invention exists only when the same or corresponding technical feature is shared by the claimed inventions. Without a shared special technical feature, the inventions of Groups I-IV lack unity with one another.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/63553

**Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

- on paper  
 in electronic form

b. (time)

- in the international application as filed  
 together with the international application in electronic form  
 subsequently to this Authority for the purposes of search

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

GenCore ver 6.3 SEQ ID NOs: 1,3

## 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 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	4 C 0 8 7
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 Y	4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/574 D	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 K 35/76	
	C 1 2 P 21/08	

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

(72)発明者 ザーブル、 ヘルムート  
 アメリカ合衆国 0 8 5 4 0 ニュージャージー州 プリンストン ツリートップス サークル  
 5 7

(72)発明者 グラハム、 ジェシカ  
 アメリカ合衆国 0 8 5 3 6 ニュージャージー州 プレインズボロ レイヴンズ クレスト ド  
 ライブ イースト 5 0 2

F ターム(参考) 2G045 AA13 AA16 AA24 AA26 AA29 AA40 BA13 BB20 BB22 BB24  
 CA25 CA26 CB01 CB02 CB03 CB04 CB08 CB09 CB17 DA13  
 DA14 DA20 DA36 FA16 FA19 FB01 FB02 FB03 FB05 FB08  
 FB12 FB13 FB15 GB01 GC10 GC15  
 4B024 AA01 AA11 BA41 BA61 BA80 CA01 CA09 CA11 CA20 DA02  
 EA04 GA11 HA01 HA09 HA11  
 4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79 QR32  
 QR35 QR48 QR55 QS25 QS32 QX02  
 4B064 AG01 AG26 AG27 CA02 CA19 CC24 DA01 DA13  
 4C084 AA02 AA13 BA01 BA08 BA18 CA53 CA59 NA14 ZB262  
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZB26  
 4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	一种新的癌症诊断和预后方法及治疗反应预测		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014507629A</a>	公开(公告)日	2014-03-27
申请号	JP2013543278	申请日	2011-12-06
[标]申请(专利权)人(译)	新泽西内科与牙科大学		
申请(专利权)人(译)	新泽西医学与牙科大学		
[标]发明人	ザーブルヘルムート グラハムジェシカ		
发明人	ザーブル、ヘルムート グラハム、ジェシカ		
IPC分类号	G01N33/574 C12Q1/68 C12N15/09 C12Q1/02 C07K16/18 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 A61K38/00 A61K48/00 A61P35/00 A61K35/76 C12P21/08		
CPC分类号	A61K38/1709 A61P35/00 G01N33/57484 G01N2800/50 G01N2800/52 C07K14/47 C12Q1/6886 G01N33/57496		
FI分类号	G01N33/574.A C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A C12Q1/02 C07K16/18 G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N33/574.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z A61K37/02 A61K48/00 A61P35/00 A61K35/76 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA16 2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/BB22 2G045/BB24 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/CB08 2G045/CB09 2G045/CB17 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FA19 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/FB15 2G045/GB01 2G045/GC10 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/BA61 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA09 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/CA53 4C084/CA59 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	三好秀 伊藤雅一 原 裕子		
优先权	61/419975 2010-12-06 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及包含FRY的多肽和核苷酸的药物组合物，治疗癌症的方法，诊断癌症的方法，确定癌症治疗功效的方法和分化干细胞的方法。

マーカー名	遺伝子型決定したラットの数	LOD
D12Rat57	324	3.3
D12Rat1	324	6.0
D12Rat59	324	8.6
D12Arb2	324	2.1
D12Rat3	99	2.7
D12Rat35	99	0.8
D12Rat36	99	0.5