

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/033565

発行日 平成29年3月2日 (2017.3.2)

(43) 国際公開日 平成27年3月12日 (2015.3.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	2G045
C07K 14/705 (2006.01)	C07K 14/705	4B024
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4B063
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4B065
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 1/21	4C084

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁) 最終頁に続く

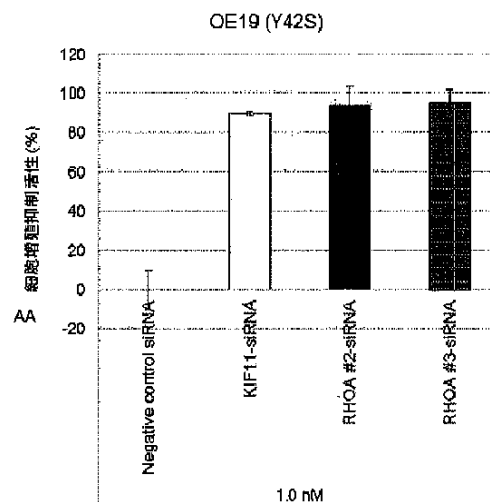
出願番号 特願2015-535317 (P2015-535317)	(71) 出願人 504137912 国立大学法人 東京大学 東京都文京区本郷七丁目3番1号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2014/004539	
(22) 国際出願日 平成26年9月4日 (2014.9.4)	
(31) 優先権主張番号 特願2013-185493 (P2013-185493)	(71) 出願人 000003311 中外製薬株式会社 東京都北区浮間5丁目5番1号
(32) 優先日 平成25年9月6日 (2013.9.6)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	
	(74) 代理人 230104019 弁護士 大野 聖二
	(74) 代理人 100105991 弁理士 田中 玲子
	(74) 代理人 100119183 弁理士 松任谷 優子
	(74) 代理人 100149076 弁理士 梅田 慎介

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の診断、阻害剤のスクリーニングにおける RHOA の使用

(57) 【要約】

新たな癌の検出方法、癌に関連する分子を標的とした阻害剤や抗癌剤のスクリーニング方法、ならびに癌治療剤として、変異を含むRHOAポリペプチド、当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、およびこれらを用いて癌を検出する方法が開示される。また、当該ポリヌクレオチドを含むベクターおよび宿主細胞、当該ポリペプチドおよび/または当該ポリヌクレオチドを含む癌の治療剤のスクリーニング方法、ならびにRHOA変異体のサイレンシング効果を有するsiRNAを含む癌治療剤も開示される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：1で表されるアミノ酸配列において以下のアミノ酸；

5位のArg、

17位のGly、

22位のLeu、

38位のVal、

42位のTyr、

54位のGlu、および/または

74位のTyr、

が変異しているポリペプチド。

10

【請求項 2】

5位のArgがTrpまたはGln、

17位のGlyがGlu、

22位のLeuがArg、

38位のValがGly、

42位のTyrがCys、

54位のGluがLys、および/または

74位のTyrがAsp、

に置換されている請求項 1 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 3】

請求項 1 または 2 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項 3 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 6】

被験物質が請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドの活性化を阻害する能力を測定し、ポリペプチドの活性化を阻害する能力を有する化合物を癌の治療剤の候補物質として選択することを含む癌の治療剤のスクリーニング方法。

30

【請求項 7】

請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドを含む細胞または請求項 5 に記載の細胞を被験物質と接触させ、当該細胞の形質をモニターすることを含む癌の治療剤のスクリーニング方法。

【請求項 8】

癌が請求項 1 または 2 に記載のポリペプチド、または請求項 3 に記載のポリヌクレオチドを含む癌細胞を含む癌である請求項 6 または 7 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 9】

癌が、胃癌、大腸癌、乳癌、または肺癌のいずれかである請求項 6 から 8 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

40

【請求項 10】

対象から分離された試料中で、配列番号：1で示されるアミノ酸配列において以下のアミノ酸；

5位のArg、

17位のGly、

22位のLeu、

38位のVal、

42位のTyr、

54位のGlu、および/または

74位のTyr、

50

の変異を有するポリペプチドまたはこれをコードするポリヌクレオチドを検出することを
含む、対象における癌の存在の検出方法。

【請求項 1 1】

アミノ酸の変異が、
5位のArgがTrpまたはGln、
17位のGlyがGlu、
22位のLeuがArg、
38位のValがGly、
42位のTyrがCys、
54位のGluがLys、および/または
74位のTyrがAsp、
への置換である、請求項 1 0 に記載の検出方法。

10

【請求項 1 2】

免疫学的手法による検出を含む請求項 1 0 または 1 1 に記載の検出方法。

【請求項 1 3】

遺伝子変異検出手法による検出を含む請求項 1 0 または 1 1 に記載の検出方法。

【請求項 1 4】

癌が、胃癌、大腸癌、乳癌、または肺癌のいずれかである請求項 1 0 から 1 3 のいずれか
に記載の方法。

【請求項 1 5】

配列番号：1 で表されるアミノ酸配列において以下のアミノ酸；

5位のArg、
17位のGly、
22位のLeu、
38位のVal、
42位のTyr、
54位のGlu、および/または
74位のTyr、

が変異しているポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を抑制することが可能
なsiRNAを含む癌の治療剤。

30

【請求項 1 6】

siRNAが配列番号：3 から 1 2 のいずれか、または配列番号：1 9 から 2 2 のいずれかの
配列を含む請求項 1 5 に記載の治療剤。

【請求項 1 7】

癌が、胃癌、大腸癌、乳癌、または肺癌のいずれかである請求項 1 5 または 1 6 に記載の
治療剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0 0 0 1】

本発明は、変異を含むRHOAポリペプチドおよび当該ポリペプチドをコードするポリヌク
レオチド、当該ポリヌクレオチドを含むベクターおよび宿主細胞に関する。また、本発明
は当該ポリペプチドおよび/または当該ポリヌクレオチドを含む癌の治療剤のスクリーニ
ング方法、当該癌の検出方法、ならびに当該癌を含む対象に投与される癌の治療剤に関す
る。

【背景技術】

【0 0 0 2】

胃癌は男性では肺癌、前立腺癌、大腸癌について世界で4番目に発症率の高い癌であり
、女性でも5番目に多い癌である（非特許文献 1）。2011年の胃癌における死亡者数は、

50

男性で推定464,000人、女性で273,000人と見積もられており（非特許文献2）、医療ニーズは極めて高い。地域的には、東アジア、中東ヨーロッパ、南アメリカに患者数が多く、日本では男性で最も罹患率の高い癌となっている（非特許文献3）。

【0003】

分子標的薬としては、HER2陽性の胃癌患者を対象とした臨床試験の結果から、2010年にTrastuzumabがFDAより承認されている（非特許文献4）。しかしながら、HER2の陽性率は腸管型胃癌で30%程度、びまん型胃癌で10%以下と報告されている（非特許文献5）。よって胃癌患者に対する医療ニーズは依然として高い。胃癌で高発現している分子として、VEGFやEGFRが知られており、抗VEGF抗体医薬であるBevacizumabや、抗EGFR抗体医薬であるCetuximabの臨床試験がフェーズ3まで進められたが、いずれも薬効不十分のため承認には至っておらず（非特許文献6、7）、新たな薬剤の開発が望まれている。

10

【0004】

RHOAはRAS small GTPase super familyに属する分子の一つであり、乳癌、大腸癌、肝癌、食道癌、胃癌、肺癌など、多岐に亘る癌種において、癌部での高発現がmRNA、およびタンパク質レベルで知られている（非特許文献8 - 10）。RHOAの高発現は発癌よりもむしろ浸潤や移動能といった癌転移に関わるという報告が多く、乳癌株をはじめとする種々の癌細胞株を用いた転移実験において、その寄与が認められている（非特許文献11）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】J. Surg. Oncol. (2013) 107 (3) 230-6

【非特許文献2】CA Cancer J. Clin. (2011) 61 (2) 69-90

【非特許文献3】Clinical Summary: Reimbursement & Formulary (https://subscriptions.nccn.org/gi_login.aspx?ReturnURL=http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/gastric.pdf)

【非特許文献4】Lancet (2010) 376 (9742) 687-97

【非特許文献5】2013 GASTROINTESTINAL CANCERS SYMPOSIUM, Result of HER2 status in Japanese metastatic gastric cancer: Prospective cohort study (JFMC44-1101)

【非特許文献6】J. Clin. Oncol. (2011) 29 (30) 3968-76

【非特許文献7】Lancet Oncol. (2013) 14 (6) 490-9

【非特許文献8】Nat. Rev. Cancer (2002) 2 (2) 133-42

【非特許文献9】Biochim. Biophys. Acta. (2009) 1796 (2) 91-8

【非特許文献10】Biochim. Biophys. Acta. (2009) 1795 (2) 137-51

【非特許文献11】Nat. Cell Biol. (2010) 12 (5) 457-67

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の課題は、新たな癌の検出方法を提供することである。また、本発明の課題には、癌に関連する分子を標的とした阻害剤や抗癌剤のスクリーニング方法を提供することも含まれる。さらに本発明の課題には癌治療剤を提供することも含まれる。

40

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上記課題を解決するべく癌の診断および治療のために有用な標的分子を探索したところ、癌組織検体中に、RAS small GTPase super familyに属する分子の一つであるRHOAに変異を含む検体があることを見出した。加えて、本発明者らは変異RHOAの発現抑制に伴ったRHOA変異を含む癌細胞の顕著な細胞増殖抑制効果を確認し、RHOAの変異が、癌細胞の増殖に大きく寄与していることを明らかにした。本発明はRHOA変異の検出を含む癌、特に胃癌および/または食道癌の検出方法を提供する。また、本発明はRHOA変異を含む癌の治療方法、ならびに癌の治療剤のスクリーニング方法を提供する。さらに、本発明はRHOA変異体のサイレンシング効果を有するsiRNAを含む癌治療剤を提供する。

50

【 0 0 0 8 】

すなわち、本発明は以下を提供するものである。

〔 1 〕 配列番号： 1 で表されるアミノ酸配列において以下のアミノ酸；

5位のArg、

17位のGly、

22位のLeu、

38位のVal、

42位のTyr、

54位のGlu、および/または

74位のTyr、

が変異しているポリペプチド；

〔 2 〕 5位のArgがTrpまたはGln、

17位のGlyがGlu、

22位のLeuがArg、

38位のValがGly、

42位のTyrがCys、

54位のGluがLys、および/または

74位のTyrがAsp、

に置換されている〔 1 〕に記載のポリペプチド；

〔 3 〕 〔 1 〕または〔 2 〕のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

〔 4 〕 〔 3 〕に記載のポリヌクレオチドを含むベクター；

〔 5 〕 〔 4 〕に記載のベクターを含む細胞；

〔 6 〕 被験物質が〔 1 〕または〔 2 〕に記載のポリペプチドの活性化を阻害する能力を測定し、阻害する能力を有する被検物質を癌の治療剤の候補物質として選択することを含む癌の治療剤のスクリーニング方法；

〔 7 〕 〔 1 〕または〔 2 〕に記載のポリペプチドを含む細胞または〔 5 〕に記載の細胞を被験物質と接触させ、当該細胞の形質をモニターすることを含む癌の治療剤のスクリーニング方法；

〔 8 〕 癌が〔 1 〕または〔 2 〕に記載のポリペプチド、または〔 3 〕に記載のポリヌクレオチドを含む癌細胞を含む癌である〔 6 〕または〔 7 〕に記載のスクリーニング方法；

〔 9 〕 癌が、胃癌、大腸癌、乳癌、または肺癌のいずれかである〔 6 〕から〔 8 〕のいずれかに記載のスクリーニング方法；

〔 1 0 〕 対象から分離された試料中で、配列番号： 1 で示されるアミノ酸配列において以下のアミノ酸；

5位のArg、

17位のGly、

22位のLeu、

38位のVal、

42位のTyr、

54位のGlu、および/または

74位のTyr、

の変異を有するポリペプチドまたはこれをコードするポリヌクレオチドを検出することを含む、対象における癌の存在の検出方法；

〔 1 1 〕 アミノ酸の変異が、

5位のArgがTrpまたはGln、

17位のGlyがGlu、

22位のLeuがArg、

38位のValがGly、

42位のTyrがCys、

54位のGluがLys、および/または

10

20

30

40

50

74位のTyrがAsp、

への置換である、〔10〕に記載の検出方法；

〔12〕免疫学的手法による検出を含む〔10〕または〔11〕に記載の検出方法；

〔13〕遺伝子変異検出手法による検出を含む〔10〕または〔11〕に記載の検出方法；

〔14〕癌が、胃癌、大腸癌、乳癌、または肺癌のいずれかである〔10〕から〔13〕のいずれかに記載の方法；

〔15〕配列番号：1で表されるアミノ酸配列において以下のアミノ酸；

5位のArg、

17位のGly、

22位のLeu、

38位のVal、

42位のTyr、

54位のGlu、および/または

74位のTyr、

が変異しているポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を抑制することが可能なsiRNAを含む癌の治療剤；

〔16〕siRNAが配列番号：3から12のいずれか、または配列番号：19から22のいずれかの配列を含む〔15〕に記載の治療剤。

〔17〕癌が、胃癌、大腸癌、乳癌、または肺癌のいずれかである〔15〕または〔16〕に記載の治療剤。

〔18〕〔1〕または〔2〕に記載のポリペプチドの機能を阻害する物質を含有する、変異RHOA陽性の癌治療剤。

〔19〕癌が、胃癌、大腸癌、乳癌、または肺癌のいずれかである〔18〕に記載の治療剤。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】RHOA変異を有する癌細胞株のRHOAのY42とG17の各部位に存在する変異を表す図である。

【図2】各細胞に対するRHOA-siRNAによるRHOA mRNAの発現抑制効率を示す図である。

【図3A】Y42Sの変異を有するOE19細胞に対するRHOA-siRNAの細胞増殖抑制活性を表す。

【図3B】G17Aの変異を有するHCC95細胞に対するRHOA-siRNAの細胞増殖抑制活性を表す。

。

【図3C】G17Eの変異を有するSW948細胞に対するRHOA-siRNAの細胞増殖抑制活性を表す。

。

【図3D】G17Eの変異を有するBT474細胞に対するRHOA-siRNAの細胞増殖抑制活性を表す。

。

【図3E】野生型のRHOAを有するHCC38細胞に対するRHOA-siRNAの細胞増殖抑制活性を表す。

【図3F】野生型のRHOAを有するAGS細胞に対するRHOA-siRNAの細胞増殖抑制活性を表す。

。

【図4】正常の大腸組織、肺組織、胃、および胸部、ならびにOE19、SW948、BT474、HCC95、HCC38およびAGSにおけるRHOAの発現量を表す図である。

【発明を実施するための形態】

【0010】

1. 定義

アミノ酸

本明細書においては、たとえば、Ala/A、Leu/L、Arg/R、Lys/K、Asn/N、Met/M、Asp/D、Phe/F、Cys/C、Pro/P、Gln/Q、Ser/S、Glu/E、Thr/T、Gly/G、Trp/W、His/H、Tyr/Y、Ile/I、Val/Vと表されるように、アミノ酸を1文字コードまたは3文字コード、またはその

10

20

30

40

50

両方で表記する。なお、本発明で記載されているアミノ酸配列に含まれるアミノ酸は翻訳後に修飾（例えば、Asn-Glyの連続するアミノ酸配列等におけるAsnの脱アミド化反応）を受ける場合もあるが、そのようにアミノ酸が翻訳後修飾された場合であっても当然のことながら本発明で記載されているアミノ酸配列に含まれる。

【0011】

および/または

本明細書において、アミノ酸の変異を表す際に用いられる「および/または」の用語の意義は、「および」と「または」が適宜組み合わせられたあらゆる組合せを含む。具体的には、例えば「22位、38位、および/または42位のアミノ酸の変異」とは以下のアミノ酸の変異のバリエーションが含まれる；

(a) 22位、(b) 38位、(c) 42位、(d) 22位および38位、(e) 22位および42位、(f) 38位および42位、(g) 22位および38位および42位。

【0012】

GTPase活性

GTPase活性は、自己を含む標的ポリペプチドに結合するGTPをGDPに加水分解する活性をいい、例えば、配列番号：1で表されるRHOAのGTPase活性はHommaら（EMBOJ. (1995) 14, 286）に記載の方法、すなわち、[^{-32}P]GTP/GST-RHOAの放射活性の減少の測定等の方法を用いて測定することが可能である。また、市販のGTPase測定キットを適宜利用することも可能である。

【0013】

Rhoファミリーポリペプチド

Rhoファミリーポリペプチドとは、GTPと結合し、GTPを加水分解することによって機能する小さい膜結合したRas関連のGTP結合性タンパク質をいう。RHOファミリーポリペプチドは、不活性なGDP結合型の立体配座と、活性なGTP結合型の立体配座との間を循環する分子スイッチとして機能し、これには、RHOA、RHOB、RHOC、CDC42、RAC1、RAC2、RAC3、TC10、RHOG、RHOD、CHP、WRCH1、TCLおよびRIF等が知られている。

【0014】

ポリヌクレオチド

ポリヌクレオチドとは、一本鎖又は二本鎖形態の、及びセンス又はアンチセンス方向のポリ核酸をいう。ポリヌクレオチドには、ポリリボ核酸、ポリデオキシリボ核酸及びその合成類似体が含まれる。また、ペプチド核酸（PNA）、ポリシロキサン及び2'-O-（2-メトキシ）エチルホスホロチオエート等の修飾された骨格を有する核酸も含まれる。ポリヌクレオチドは、約10～約5000塩基、特に約100～約4000塩基、特に約250～約2500塩基の範囲で長さにおいて変化する配列により記載される。一つのポリヌクレオチドの実施態様には、約10～約30塩基長を含む。ポリヌクレオチドの別の異なる非限定な一態様としては、約17～約22ヌクレオチドのポリリボヌクレオチドであり、より一般的には低分子干渉RNA（siRNA）としても表現される。別の非限定な一態様としては、ペプチド核酸（PNA）、ポリシロキサン及び2'-O-（2-メトキシ）エチルホスホロチオエートなどの修飾された骨格を有する核酸、または非天然存在型核酸残基、もしくはメチル-、チオ-、サルフェート-、ベンゾイル-、フェニル-、アミノ-、プロピル-、クロロ-及びメタノカルバヌクレオシド-などの一以上の核酸置換基、もしくはその検出を容易にするレポーター分子を含む核酸も含まれる。ポリヌクレオチドは、本明細書において、特定の標的DNA配列の異なる鎖と実質的に相補的に選択される。これは、当該ポリヌクレオチドが、それらのそれぞれの鎖でハイブリダイズするために十分に相補的でなければならないことを意味する。ポリヌクレオチドには、ストリンジェント条件下において特定のポリ核酸にハイブリダイズする相補的ポリ核酸、並びに、その塩基対のうち少なくとも約60パーセント、好ましくは約70パーセントが同一であり、特に好ましくは約80パーセント、さらに好ましくは約90パーセント、および特定の態様においてはその塩基対の100パーセントが同一の塩基対を含むポリヌクレオチドも含まれる。

【0015】

10

20

30

40

50

本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、好ましくは単離されたものである。本明細書において本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに関し「単離された」とは、それに天然に付随する他の成分から分離されていることをいう。非限定な一態様では、天然に付随しているポリペプチド、ペプチドおよび天然に存在する有機分子を含まずに、重量で少なくとも50%である場合、あるいはポリ核酸に関しては、生物体のゲノムにおけるポリ核酸の配列に天然に隣接する核酸配列を含んでいないときは「単離され」ている。好ましくは、これらのポリペプチドまたはポリヌクレオチドは重量%で、少なくとも75%、好ましくは80%、より好ましくは少なくとも90%又は95%、さらに好ましくは、少なくとも99%純粋である。実質的に純粋なこれらのポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、化学合成、天然源からのこれらのポリペプチドまたはポリヌクレオチドの分離、あるいは天然にはこれらのポリペプチドまたはポリヌクレオチドを産生しない組換え宿主細胞における因子の産生により得ることができる。

10

20

30

40

50

【0016】

化合物

本明細書において、化合物とは、本発明のスクリーニング方法に関連して記載されている「被験物質」又は「治療剤候補物質」の文脈で使用される。化合物には有機化合物および無機化合物が含まれ、化学合成によるものであっても天然資源に由来するものであってもよい。化合物は、ポリヌクレオチド、脂質またはホルモン類似体などの無機化合物または有機化合物を含む。他の生体高分子性の有機化合物は、約2~約40アミノ酸を含むペプチド、及び約40~約500アミノ酸を含むより大きなポリペプチドを含み、ポリペプチドリ

【0017】

接触

本明細書において、接触とは、対象を含む検体を異なる対象を含む検体に生体外系または生体内系のいずれかにおいて単に加えることをいう。例えば、被験物質と細胞を接触させるとは、細胞を含む検体に被験物質を含む検体を加えることをいう。接触させる時間は特定されず、十分な長さの時間この混合物をインキュベートして当該被験物質による当該細胞に対する作用を観察することが可能である。

【0018】

アッセイ

アッセイとは、化合物の特定の特性を測定するために使用するいかなるプロセスをいい、スクリーニング方法とは、化合物のコレクションからそれらの活性に基づく化合物を特徴づけるかまたは選択するために使用する方法をいう。

【0019】

阻害

阻害とは、プロセスの減少、下方制御、またはプロセスについての刺激の除去をいい、阻害の非限定の一態様として、ポリペプチドの発現または活性の不在あるいは最小化が例示される。

【0020】

対象から分離された試料

本発明の検出方法において使用される対象にはヒト及び他の哺乳類を含む、一般に考えられる動物が含まれる。本明細書において対象から分離された試料とは、本発明のRHOA変異体またはそれをコードするポリヌクレオチドを含有すると推測され、対象から分離されたいずれかの液体または固体試料をいう。しばしば、前記試料は、臨床試料、すなわち、癌に関して検査されるべき患者から得られたかまたは単離された試料であり得る。前記試料には、細胞材料を含有し、細胞を含有することが可能である体液、例えば、血液、血漿、血清、尿、精液、唾液、眼球レンズ液、リンパ液等や、胃、食道、および直腸等の消化器から分離された組織の試料が含まれるが、それに限定されるわけではない。前記試料は、上記の組織の試料の切片でもあり得る。

【 0 0 2 1 】

2 . RHOA変異体

本発明に係るRHOA変異体は、ポリペプチドであって、当該ポリペプチドを構成するアミノ酸のうち少なくとも一つが天然に存在するRHOAのアミノ酸配列から変異しているポリペプチドを表す。RHOA変異体は好ましくはGTPase活性を有する。天然に存在するRHOAのアミノ酸配列の非限定の一態様として、配列番号：1 (NP_001655.1) で表されるアミノ酸配列が例示され得る。前記の変異の一態様として、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列のうち12位から19位、59位から63位、および/または117位から120位に相当するGTP結合に関連する機能ドメイン (<http://www.uniprot.org/uniprot/P61586>、Ridley (Int. J. Biochem. Cell. Biol. (1997) 29 (11) 1225-9)) に含まれるアミノ酸の変異が例示され得る。また、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列のうち34位から42位に相当するシグナル伝達にかかわるエフェクター (effector) 分子の結合に関連する機能ドメインに含まれるアミノ酸の変異も例示され得る (<http://www.uniprot.org/uniprot/P61586>、Vegaら (FEBS Lett. (2008) 582 (14) 2093-101))。配列番号：1 で表されるアミノ酸配列のうち34位から42位に相当するシグナル伝達にかかわるエフェクター分子の結合に関連する機能ドメインはswitch 1とも呼ばれ (<http://www.uniprot.org/uniprot/P61586>、Vegaら (FEBS Lett. (2008) 582 (14) 2093-101))、GDPが結合した不活性型RHOAとGTPが結合した活性型RHOAの構造は互いに大きく異なる。こうした構造変化がエフェクター分子の結合に重要な働きをすることが知られている (Vegaら (FEBS Lett. (2008) 582 (14) 2093-101))。

10

【 0 0 2 2 】

前記の変異の一態様として、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列のうち、5位のArg、17位のGly、22位のLeu、38位のVal、42位のTyr、54位のGlu、および/または74位のTyr、の変異が例示される。これらのアミノ酸の部位における欠失、置換、または付加が例示され得るが、好ましくは、当該変異はこれらのアミノ酸の置換であり得る。そのような置換の非限定の一態様として5位のArgのTrpまたはGlnへの置換、17位のGlyのGluへの置換、22位のLeuのArgへの置換、38位のValのGlyへの置換、42位のTyrのCysへの置換、54位のGluのLysへの置換、および/または74位のTyrのAspへの置換が例示され得る。なお、本発明においてアミノ酸の変異ないし置換とは、ポリペプチド中のアミノ酸残基の変異ないし置換を意味する。

20

【 0 0 2 3 】

また、本発明は、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列のうち、5位のArg、17位のGly、22位のLeu、38位のVal、42位のTyr、54位のGlu、および/または74位のTyr、が変異しているポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。前記の変異としては、これらのアミノ酸の部位における欠失、置換、または付加が例示され得るが、好ましくは、当該変異はこれらのアミノ酸の置換であり得る。そのような置換の非限定の一態様として5位のArgのTrpまたはGlnへの置換、17位のGlyのGluへの置換、22位のLeuのArgへの置換、38位のValのGlyへの置換、42位のTyrのCysへの置換、54位のGluのLysへの置換、および/または74位のTyrのAspへの置換が例示され得る。

30

【 0 0 2 4 】

本発明において、変異RHOA陽性とは、上述したアミノ酸の変異を有するRHOA変異体のポリペプチドまたはこれをコードするポリヌクレオチドの検出結果が陽性であることをいう。

40

【 0 0 2 5 】

3 . 癌の検出方法

本発明において、対象から分離された試料において本発明のRHOA変異体ポリペプチドまたはこれをコードするポリヌクレオチドを検出することを含む、対象における癌の存在の検出方法も提供される。本RHOA変異体は胃癌、食道癌、および/またはスキルス性胃癌の腫瘍部において見出されることが判明したため、対象から分離された試料中における本RHOA変異体の存在を検出することによって、対象における癌、好適には胃癌、食道癌、および/またはスキルス性胃癌の存在を検出することが可能である。これまで、いくつかの癌に

50

において配列番号：1で表されるRHOAの発現の亢進等RHOAポリペプチドの量的変化は知られていたが、本発明において見出された、いくつかの癌、好適には胃癌、食道癌、および/またはスキルス性胃癌で本発明に係る変異RHOAの発現、すなわちRHOAポリペプチドの質的变化を示すことは予想外の発見であった。よって、本発明はこのようなRHOAの質的变化を検出することによって対象における癌、好適には胃癌、食道癌、および/またはスキルス性胃癌の存在を検出する方法を提供する。

【0026】

免疫学的手法

本発明のRHOA変異体のポリペプチドを検出するための免疫学的手法として、当該ポリペプチドに結合することができる抗体、例えば、検出可能な標識を有する抗体が例示される。好ましくは、当該抗体は野生型のRHOAにはほとんどまたは全く結合しない。抗体は、ポリクローナルであってもモノクローナルであってもよい。完全な抗体、またはその断片（例えば、FabまたはF(ab')₂）もまた使用することが可能である。抗体の標識は、検出可能な標識物質を抗体に連結することによる抗体の直接標識化、または直接標識されている別の試薬との反応性による抗体の間接標識化が例示される。間接標識化の例としては、蛍光標識された二次抗体を使用した一次抗体の検出が例示される。

10

【0027】

別の非限定の一態様では、抗体は、例えば、放射性標識され、発色団標識され、フルオロフォア標識され、または酵素標識され得る。別の実施形態では、抗体誘導體（例えば、基質と、または例えば、ビオチン-ストレプトアビジン等のリガンド対のいずれか一方と連結された抗体やその抗体断片（例えば、単鎖抗体、単離された抗体の可変領域等）が使用され得る。

20

【0028】

免疫組織化学またはIHC（Immunohistochemistry）とは、生物学的組織中の抗原に特異的に結合する抗体の原理を利用した、組織切片に存在する抗原を検出する方法をいう。免疫組織化学染色は、癌組織または腫瘍において見出される特異的分子マーカー等の異常細胞の診断において広範に使用されている。当該マーカーは、癌化（トランスフォーメーション）または細胞死（アポトーシス）等の特定の細胞の現象の特徴を示す。IHCはまた、生物学的組織の異なる部分におけるマーカーならびに異なって発現したタンパク質の分布および局在性を理解するための研究において広範に使用される。抗体-抗原相互作用の可視化は、多くの方法で行うことができる。最も一般的な例では、抗体は、呈色反応を触媒することができるペルオキシダーゼなどの酵素と連結される。そのほかの非限定の一態様として、フルオロフォア（フルオレセイン、ローダミン、DyLight FluorまたはAlexa Fluor等）のタグが抗体に連結される。

30

【0029】

別の非限定の一態様において、生体の組織または細胞において発現している本発明のRHOA変異体を、抗体または抗体フラグメントを用いて、ウエスタンブロットまたは免疫蛍光技術などの方法により検出することも可能である。当該組織または細胞に由来する試料を、当業者に公知の技術を使用して単離することが可能である。例えば、検出に供されるポリペプチドを含むタンパク質画分の単離方法は、HarlowおよびLane（HarlowおよびLane、1988年、Antibodies：A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York）において記載された方法等が例示される。このような態様において、固体支持体上に抗体またはポリペプチドを固定化することが可能である。適切な固相支持体または担体には、ポリペプチドまたは抗体を結合することができる任意の支持体が含まれ得る。公知の支持体または担体には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、天然のまたは修飾されたセルロース、ポリアクリルアミド、およびマグネタイトが含まれる。

40

【0030】

抗体または抗原を結合するための多くの他の適切な担体が当業者にとって公知であり、本発明の検出方法のためにこのような支持体を使用され得る。例えば、細胞から単離した

50

タンパク質画分を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、固相支持体（ニトロセルロースなど）上に当該画分に含まれるポリペプチドを固定化することが可能である。次いで、適切な緩衝液で洗浄された当該支持体が、検出可能な程度に標識された抗体によって処理され得る。緩衝液で二度洗浄され、その支持体上から非結合抗体が除去された固相支持体上に結合した標識の量が、公知の手段によって検出され得る。電気泳動技術を使用したタンパク質を検出する手段は、当業者には公知である（前記HarlowおよびLane等）。

【0031】

別の非限定の一態様では、ウエスタンブロット（イムノブロット）分析を使用して、試料中のポリペプチドの存在が検出および定量化され得る。この技術は一般に、分子量に基づいてゲル電気泳動によって試料に含まれるポリペプチドを分離することと、分離されたポリペプチドを適切な固相支持体（ニトロセルロースフィルター、ナイロンフィルター、または誘導体化されたナイロンフィルター等）に転写することと、試料を、ポリペプチドを特異的に結合する抗体と共にインキュベートすることを含む。抗RHOA変異体ポリペプチド抗体は、固相支持体上でRHOA変異体ポリペプチドに特異的に結合することが可能である。これらの抗体は直接的に標識され得るし、抗RHOA変異体ポリペプチド抗体に特異的に結合する標識された抗体（例えば、標識されたヒツジ抗マウス抗体）を使用して検出され得る。

10

【0032】

RHOA変異体ポリペプチドに特異的に結合する抗体は公知の方法を用いて取得することが可能である。本発明に使用される抗体としてはポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体もしくはこれらの断片が好適に例示され得る。例えば、モノクローナル抗体は、Hammerlingら（1981年、Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas、Elsevier、N.Y.）によって教示されるようなハイブリドーマ技術を用いて調製され得る。この技術を用いて、マウス等の免疫応答性動物がRHOA変異体ポリペプチドまたはそれに由来するペプチドを用いて免疫される。次いで、免疫された動物から抽出された脾細胞と例えばSP2/0細胞等の適切な骨髓腫細胞が融合される。その細胞融合の結果得られた後にHAT培地に選択的に維持されたハイブリドーマ細胞が、限界希釈によってクローニングされる。次いで、そのような選択を通して得られた細胞は、本発明のRHOA変異体ポリペプチドに優先的に結合し、かつ野生型RHOAにはほとんどまたは全く結合しない抗体を分泌するクローンを同定するためにアッセイされ得る。

20

30

【0033】

RHOA変異体ポリペプチドまたはそれに由来するペプチドとして、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列において以下のアミノ酸；5位のArg、17位のGly、22位のLeu、38位のVal、42位のTyr、54位のGlu、および/または74位のTyr、が変異しているポリペプチドのうち、42位のTyrの変異を含むRHOA変異体ポリペプチドに特異的に結合する抗体を取得するために当該42位のTyrの変異を含むペプチドが動物に免疫される。免疫に供されるペプチドの長さは適宜デザインされ得るが、好ましくは5から20のアミノ酸からなる前記42位のTyrの変異を含むペプチドが使用される。前記42位のTyrの変異がCysである場合、免疫に供されるペプチドおよび/または前記クローンを同定するためのアッセイに使用されるペプチドの非限定の一態様では、TVFENC、VFENCV、FENCVA、ENCVAD、NCVADI、またはCVADIE等のペプチドが使用され得る。また、当該ペプチドとして10アミノ酸からなるペプチドが使用される場合には、VYVPTVFENC、YVPTVFENCV、VPTVFENCVA、PTVFENCVAD、またはTVFENCVADI等のペプチドも使用され得る。

40

【0034】

遺伝子変異検出手法

本発明は、配列番号：1で表されるアミノ酸配列のうち、配列番号：1で表されるアミノ酸配列のうち12位から19位、59位から63位、および/または117位から120位に相当するGTP結合に関連する機能ドメインに含まれるアミノ酸変異を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。また、配列番号：1で表されるアミノ酸配列のうち34位から42位に相当するシグナル伝達にかかわるエフェクター分子の結合に関連する機能ドメイ

50

ンに含まれるアミノ酸変異を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。配列番号：1で表されるアミノ酸配列のうち34位から42位に相当するシグナル伝達にかかわるエフェクター分子の結合に関連する機能ドメインはswitch 1とも呼ばれ、GDPが結合した不活性型RHOAとGTPが結合した活性型RHOAの構造は互いに大きく異なる。こうした構造変化がエフェクター分子の結合に重要な働きをすることが知られている。

【0035】

また、本発明は、配列番号：1で表されるアミノ酸配列のうち、5位のArg、17位のGly、22位のLeu、38位のVal、42位のTyr、54位のGlu、および/または74位のTyr、が変異しているポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。前記の変異としては、これらのアミノ酸の部位における欠失、置換、または付加が例示され得るが、好ましくは、当該変異はこれらのアミノ酸の置換であり得る。そのような置換の非限定の一態様として5位のArgのTrpまたはGlnへの置換、17位のGlyのGluへの置換、22位のLeuのArgへの置換、38位のValのGlyへの置換、42位のTyrのCysへの置換、54位のGluのLysへの置換、および/または74位のTyrのAspへの置換が例示され得る。

10

【0036】

また本発明は、配列番号：1で表されるアミノ酸配列のうち、5位のArg、17位のGly、22位のLeu、38位のVal、42位のTyr、54位のGlu、および/または74位のTyr、が変異している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のプライマーおよびプローブを提供する。このようなプライマーおよびプローブは、配列番号：2 (NM_001664.2) における前記の変異をもたらす遺伝子変異の有無を検出することができる。より具体的には、本発明は、配列番号：2で表されるポリヌクレオチド配列であって上記のアミノ酸変異に対応するヌクレオチド変異を有する配列のうち、連続した少なくとも10塩基(ベース)、12塩基、15塩基、20塩基、30塩基、40塩基または50塩基のヌクレオチドの配列(たとえば10~30塩基のヌクレオチドまたは10~25塩基のヌクレオチド)を有する、たとえば10~30塩基のヌクレオチドの単離されたポリ核酸およびその使用方法を提供する。

20

【0037】

これらのヌクレオチドを使用して、例えば、W02003/023063に記載された種々の方法、例えば、RFLP法、PCR-SSCP法、ASOハイブリダイゼーション、ダイレクトシークエンス法、ARMS法、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法、RNaseA切断法、化学切断法、DOL法、TaqMan PCR法、インベダー法、MALDI-TOF/MS法、TDI法、モレキュラー・ビーコン法、ダイナミック・アレルスペシフィック・ハイブリダイゼーション法、パドロック・プローブ法、UCAN法、DNAチップまたはDNAマイクロアレイを用いた核酸ハイブリダイゼーション法、およびECA法等によって前記の変異を検出することが可能である。

30

【0038】

本発明の検出方法の非限定の一態様として、TaqMan PCR法について以下に説明する。TaqMan PCR法は、蛍光標識した変異特異的オリゴヌクレオチド(TaqManプライマー)とTaq DNAポリメラーゼによるPCRとを利用した方法である。TaqManプライマーとしては、配列番号：2で表されるポリヌクレオチド配列の部分配列であって、上記したいずれかの変異に相当する塩基を含む約15~約30塩基の連続した塩基配列からなるオリゴヌクレオチドがプライマーとして用いられる。当該プライマーの5'末端がFAMやVIC等の蛍光色素で、3'末端がTAMRAなどのクエンチャー(消光物質)でそれぞれ標識されており、そのままの状態ではクエンチャーが蛍光エネルギーを吸収するため蛍光は検出されない。また、TaqManプライマーからのPCR伸長反応が起こらないように当該プライマーの3'末端はリン酸化されている。TaqManプライマーとハイブリダイズする変異RHOAポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むmRNAまたはゲノムDNAの部分配列を増幅するように設計されたPCRプライマーおよびTaq DNAポリメラーゼを用いてPCRを行うと、TaqManプライマーが鋳型DNAとハイブリダイズし、同時にPCRプライマーからの伸長反応が起こるが、伸長反応が進むとTaq DNAポリメラーゼの5'ヌクレアゼ活性によりハイブリダイズしたTaqManプライマーが切断され、蛍光色素が遊離してクエンチャーの影響を受けなくなり蛍光が検出される。鋳型の増幅により指数関数的に増大した蛍光強度を検出することによって、TaqManプライ

40

50

マーが特異的にハイブリダイズする本発明のRHOA変異体を検出することが可能である。

【0039】

4. 化合物の同定方法

本発明の非限定の一態様では、本発明に係るRHOA変異体の機能を阻害または促進する化合物、あるいは本発明に係るRHOA変異体をコードするポリヌクレオチドの発現を阻害または促進する化合物の同定方法に関する。本RHOA変異体は胃癌、食道癌、および/またはスキルス性胃癌の腫瘍部において見出されることが判明したので、本発明において、本RHOA変異体の機能を阻害および/または本RHOA変異体をコードするポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物を同定することにより、当該化合物を含む、これらの胃癌、食道癌、および/またはスキルス性胃癌の腫瘍の進展を防止および/または治療する治療剤が提供される。これまで、いくつかの癌において配列番号：1で表されるRHOAの発現の亢進等RHOAポリペプチドの量的変化は知られていたが、本発明において見出された、いくつかの癌、好適には胃癌、食道癌、および/またはスキルス性胃癌で本発明に係る変異RHOAの発現、すなわちRHOAポリペプチドの質的变化を示すことは予想外の発見であった。よって、本発明はこのような質的变化を有するRHOAを標的とする化合物を投与することによって、対象における癌、好適には胃癌、食道癌、および/またはスキルス性胃癌の進展を防止および/または治療する治療剤を提供する。好ましくは本発明の治療剤は配列番号：1で表される野生型RHOAの機能を阻害しない。したがって、そのような治療剤に含まれる化合物の同定方法として、本発明において好ましくは、本RHOA変異体の機能を阻害する化合物および/または本RHOA変異体をコードするポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物をスクリーニングする方法が挙げられる。

10

20

【0040】

本発明に係る同定方法は、本RHOA変異体、当該変異体をコードするポリヌクレオチド、当該ポリヌクレオチドを含む組換えベクター、当該ベクターによる形質転換細胞もしくは本RHOA変異体を内在性に含む細胞、または本RHOA変異体に特異的に結合することが可能な抗体のうち少なくともいずれか一種類またはこれらの組合せを用いて、それ自体公知な医薬品スクリーニング方法を利用して実現することが可能である。本同定方法は、試験管内（*in vitro*（インビトロ））または生体内（*in vivo*（インビボ））で実施されるいずれの方法も包含する。本同定方法により、本RHOA変異体の立体構造に基づくドラッグデザインによる拮抗剤のスクリーニング方法、ポリペプチド合成系を利用した遺伝子レベルでの発現の阻害剤のスクリーニング方法、または抗体を利用した抗体結合物質のスクリーニング方法等が実施できる。

30

【0041】

本発明に係るRHOA変異体の機能を阻害または促進する化合物の同定方法の非限定の一態様では、本RHOA変異体の機能を測定し得る実験系において、本発明に係るベクターによる形質転換細胞もしくは本RHOA変異体を内在性に含む細胞と調べようとする化合物（被験物質）の相互作用を可能にする条件下で、これらの細胞と被験物質とを共存させてその細胞の機能を測定し、次いで、被験物質の存在下における細胞の機能と、被験物質の非存在下における細胞の機能と本発明に係るベクターを含まない細胞もしくは本RHOA変異体を内在性に含まない細胞の機能を比較し、本RHOA変異体の機能の存在、不存在または変化、例えば低減、増加、消失、出現を検出することにより実施することが可能である。被験物質の非存在下における本RHOA変異体の機能と比較して、被験物質の存在下における本RHOA変異体の機能が低減または消失する場合、当該被験物質は本RHOA変異体の機能を阻害すると判定することが可能である。逆に、被験物質の存在下における本RHOA変異体の機能が増加する場合、当該被験物質は本RHOA変異体の機能を促進すると判定することが可能である。機能の測定は、当該機能の直接的な検出により、または当該機能の指標となるシグナルを実験系に導入して当該シグナルを検出することにより実施することが可能である。シグナルとして、GST等の酵素類、His-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tagまたはXpress-tag等のタグペプチド類、または蛍光タンパク質等が例示できるが、化合物の同定方法に一般的に用いられている標識物質であればいずれも利用することが可能である。

40

50

【0042】

上記の直接的な検出に使用され得る細胞の機能の非限定の一態様としてフォーカス形成能を利用するフォーカス形成アッセイが例示され得る。フォーカス形成アッセイは、例えば6ウェルプレートに播種された 5×10^4 細胞を10%FBS中で15~21日間維持された適切な細胞（例えば本発明に係るRHOA変異体が安定的に形質導入されたNIH3T3細胞株や内在的に本発明に係るRHOA変異体を発現するOE19株等の細胞）を用いて行われる。培地は2~3日毎に新しいものに置換される。クリスタルバイオレット（1%）を用いて染色後、プレートを写真撮影し、MetamMorph（登録商標）ソフトウェアを用いてフォーカスが計測される。

【0043】

また、上記の直接的な検出に使用され得る細胞の機能の別の非限定の一態様として足場非依存性成長アッセイが例示され得る。種々の適切な細胞（例えば本発明に係るRHOA変異体が安定的に形質導入されたNIH3T3細胞株や内在的に本発明に係るRHOA変異体を発現するOE19株等の細胞）を6ウェルプレートに1ウェル当たり 1.25×10^3 細胞で播種し、0.3%アガロース中で成長したコロニー数が3~5週後に計測される。各ウェルには、播種後毎週1回の頻度で1mlの上層アガロースが添加される。

10

【0044】

本発明に係るRHOA変異体の機能を阻害または促進する化合物の同定方法は、本RHOA変異体の機能を測定し得る実験系において、本RHOA変異体と調べようとする化合物（被験物質）の相互作用を可能にする条件下で、本RHOA変異体と被験物質とを共存させてその機能を測定し、次いで、被験物質の存在下における本RHOA変異体の機能と、被験物質の非存在下における本RHOA変異体の機能とを比較し、本RHOA変異体の機能の存在、不存在または変化、例えば低減、増加、消失、出現を検出することにより実施することが可能である。被験物質の非存在下における本RHOA変異体の機能と比較して、被験物質の存在下における本RHOA変異体の機能が低減または消失する場合、当該被験物質は本RHOA変異体の機能を阻害すると判定することが可能である。逆に、被験物質の存在下における本RHOA変異体の機能が增加する場合、当該被験物質は本RHOA変異体の機能を促進すると判定することが可能である。機能の測定は、当該機能の直接的な検出により、または当該機能の指標となるシグナルを実験系に導入して当該シグナルを検出することにより実施することが可能である。シグナルとして、GST等の酵素類、His-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tagまたはXpress-tag等のタグペプチド類、または蛍光タンパク質等が例示できるが、化合物の同定方法に一般的に用いられている標識物質であればいずれも利用することが可能である。

20

30

【0045】

本発明に係るRHOA変異体の機能を阻害または促進する化合物の同定方法の非限定の一態様として、本発明に係るRHOA変異体をコードするポリヌクレオチドの発現を指標にした同定方法が例示され得る。本発明に係るRHOA変異体をコードするポリヌクレオチドの発現を指標にした態様においては、本ポリヌクレオチドの発現を測定し得る実験系において、本ポリヌクレオチドと被験物質の相互作用を可能にする条件下で、本ポリヌクレオチドと被験物質とを共存させてその発現を測定し、次いで、被験物質の存在下における本ポリヌクレオチドの発現と、被験物質の非存在下における本ポリヌクレオチドの発現とを比較し、本ポリヌクレオチドの発現の存在、不存在または変化、例えば低減、増加、消失、出現を検出することにより、所望の性質を示す化合物が同定され得る。被験物質の非存在下における本ポリヌクレオチドの発現と比較して、被験物質の存在下における本ポリヌクレオチドの発現が減少または消失する場合、当該被験物質は本ポリヌクレオチドの発現を阻害すると判定することが可能である。逆に、被験物質の存在下における本ポリヌクレオチドの発現が増加する場合、当該被験物質は本ポリヌクレオチドの発現を促進すると判定することが可能である。

40

【0046】

具体的には、本発明に係るポリヌクレオチドの発現を指標にした態様においては、例えば、本発明に係る形質転換体を用いて本ポリヌクレオチドを発現させる実験系において、当該形質転換体と被験物質とを接触させた後に、本ポリヌクレオチドの発現を測定するこ

50

とにより、所望の性質を示す化合物が同定され得る。発現は、発現される本発明に係るRHOA変異体ポリペプチドまたはこれをコードするmRNAの量、あるいは当該RHOAの機能を指標にして測定することが可能である。また、例えば発現の指標となるシグナルを実験系に導入して当該シグナルを検出することにより、その発現が測定され得る。シグナルとして、GST等の酵素類、His-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tagまたはXpress-tag等のタグペプチド類、または蛍光物質等が使用できる。これらシグナルの検出方法は当業者には周知である。

【0047】

5. RHOA変異体の機能を阻害または促進する化合物

本発明に係る同定方法により選択された化合物は、本発明に係るポリヌクレオチドの発現阻害剤、本発明に係るRHOA変異体の機能の阻害剤や拮抗剤等の候補化合物として利用され得る。RHOA本同定方法により得られた化合物は、本発明に係るポリヌクレオチドの発現促進剤、または本発明に係るRHOA変異体の機能の促進剤の候補化合物として利用できる。本発明に係るRHOA変異体は胃癌、食道癌、および/またはスキルス性胃癌の腫瘍部において見出されることが判明したので、本発明者らは、本発明に係るRHOA変異体の機能を阻害および/または本ポリヌクレオチドの発現を阻害することにより、これらの疾患を防止および/または治療できると考えられる。したがって、本発明に係る同定方法により得られる化合物として、好ましくは、本発明に係るRHOA変異体の機能を阻害する化合物および/または本ポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物が挙げられる。これら候補化合物は、その有用性と毒性のバランスを考慮して選別することにより医薬として調製され得る。このような医薬は、本発明に係るRHOA変異体の機能の異常および/または本ポリヌクレオチドの発現の異常に起因する各種病的症状の防止および/または治療に有効である。本発明に係る化合物には、本同定方法以外の方法により得られた化合物であって、本発明に係るRHOA変異体の機能を阻害するおよび/または本ポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物、あるいは本発明に係るRHOA変異体の機能を促進するおよび/または本ポリヌクレオチドの発現を促進する化合物も含まれる。

【0048】

RHOA変異体の機能を阻害する物質を含む癌治療剤

本発明には、RHOA変異体の機能を阻害する物質（例えば、本発明のスクリーニングする方法によって得られた物質〔例えば、二重鎖核酸（siRNAを含む）、蛋白質（抗体又は抗体断片を含む）、ペプチド、又はそれ以外の化合物〕）を有効成分とする変異RHOA陽性の癌治療剤が包含される。

【0049】

本発明の癌治療剤における有効成分は、本発明のスクリーニング方法により選択することができる（上記「化合物の同定方法」参照。）。好ましくは本発明の治療剤は配列番号：1で表される野生型RHOAの機能を阻害しない。

【0050】

本発明のRHOA変異体の機能を阻害する物質（例えば、本発明のスクリーニング方法により得られた物質〔例えば、二重鎖核酸、蛋白質（抗体又は抗体断片を含む）、ペプチド、又はそれ以外の化合物〕）を有効成分とする製剤は、前記有効成分のタイプに応じて、これらの製剤化に通常用いられる薬理学上許容される担体、賦形剤、及び/又はその他の添加剤を用いて、医薬組成物として調製することができる。

【0051】

本発明の癌治療剤による治療対象は、本発明のポリヌクレオチド及び/又は本発明のポリペプチドの存在が検出された被験者（即ち、本発明の変異RHOA陽性の癌患者）である。本発明に係るRHOA変異体は胃癌、食道癌、および/またはスキルス性胃癌の腫瘍部において見出されることが判明したので、本発明者らは、本発明に係るRHOA変異体の機能を阻害することにより、これらの疾患を防止および/または治療できると考えられる。そのため、本発明のRHOA変異体の機能を阻害する物質が本発明の変異RHOA陽性の癌（特には胃癌、食道癌、および/またはスキルス性胃癌）の有効な治療剤になる。

【0052】

siRNAを利用したRNAを含む治療剤

非哺乳動物細胞において、二本鎖RNA (dsRNA) は、遺伝子発現に対して強力かつ特異的なサイレンシング効果を発揮することが示されており、これはRNA干渉 (RNAi) と呼ばれている (Sharp (Genes Dev. (1999) 13 (2) 139))。dsRNAは、RNaseIIIモチーフを含む酵素によって、低分子干渉RNA (siRNA) と呼ばれる20~23ヌクレオチドのdsRNAに処理される。siRNAは、多成分ヌクレアーゼ複合体によって相補的mRNAを特異的に標的とする (Hammondら (Nature (2000) 404 (6775) 293))。哺乳動物細胞において、相補的ヌクレオチド19個を有する20または21量体dsRNAおよびチミジンまたはウリジンの3'末端非相補的二量体からなるsiRNAは、遺伝子発現の全体的な変化を誘導することなく、遺伝子特異的

10

ノックダウン効果を有することが示されている (Elbashirら (Nature (2001) 411 (6836) 494))。さらに、低分子核RNA (snRNA) U6またはポリメラーゼIII H1-RNAプロモーターを含むプラスミドは、RNAポリメラーゼIIIを動員するような低分子RNAを効率よく産生し、したがって、その標的mRNAを構成的に抑制することが可能である (Miyagishiら (Nat. Biotechnol. (2002) 20 (5) 497))。

【0053】

細胞の増殖は、本発明のRHOA変異体のサイレンシング効果を有するsiRNAを含む組成物に細胞を接触させることによって阻害される。細胞にさらに、トランスフェクション剤を接触させる。適したトランスフェクション剤は、当技術分野で公知である。「細胞増殖の阻害」という用語は、組成物に曝されていない細胞と比較して、細胞がより低い速度で増殖するか、または生存率が低下していることを意味する。細胞増殖は、MTT細胞増殖アッセイのような当技術分野で公知の方法によって測定され得る。

20

【0054】

標的mRNAとハイブリダイズする本発明のRHOA変異体のsiRNAは、通常は一本鎖のmRNA転写産物と結合し、それにより翻訳を阻害し、したがってタンパク質の発現を阻害することにより、RHOA変異体の遺伝子によってコードされる本発明のRHOA変異体ポリペプチド産物の産生を減少させ、または阻害する。したがって、本発明のsiRNA分子は、本発明のRHOA変異体の遺伝子由来のmRNAまたはcDNAに対する特異的ハイブリダイズ能によって定義することができる。本発明の目的に関して、「ハイブリダイズする」または「特異的にハイブリダイズする」という用語は、「ストリンジентなハイブリダイゼーション条件」で二つの核酸分子がハイブリダイズできることを指すために用いられる。「ストリンジентなハイブリダイゼーション条件」という用語は、典型的には、核酸の複雑な混合物において、核酸分子がその標的配列にハイブリダイズするが、他の配列とのハイブリダイズは検出することが困難な条件を指す。ストリンジентな条件は、配列依存的であり、異なる環境においては異なるであろう。より長い配列は、より高温で特異的にハイブリダイズする。一般的に、ストリンジентな条件は、既定のイオン強度pHでの特異的配列に対する熱融解点 (T_m) より約5~10 低いように選択される。T_mは標的に対して相補的なプローブの50%が平衡時に標的配列とハイブリダイズする (既定のイオン強度、pH、および核酸濃度下での) 温度である (標的配列が過剰量存在する場合、T_mではプローブの50%が平衡時に占有される)。ストリンジент条件はまた、ホルムアミドのような脱安定化剤を加えることによって達成され得る。選択的または特異的ハイブリダイゼーションに関して、陽性シグナルは、バックグラウンドの少なくとも2倍、好ましくはバックグラウンドのハイブリダイゼーションの10倍である。例示的なストリンジентなハイブリダイゼーション条件は、以下となり得る：50%ホルムアミド、5×SSC、および1%SDS、42 でのインキュベーション、または、5×SSC、1%SDS、65 でのインキュベーション、その後0.2×SSCおよび0.1%SDSにおける50 での洗浄。

30

40

【0055】

本発明のsiRNAは、長さが約500、約200、約100、約50、または約25ヌクレオチド未満である。好ましくは、siRNAは長さが約19~約25ヌクレオチドである。本発明の変異RHOAに特異的なsiRNAを産生するための例示的な核酸配列には、標的配列として、配列番号：2

50

のヌクレオチドの配列であって本発明の変異体におけるアミノ酸変異に対応するヌクレオチド変異を有する配列が含まれる。さらに、siRNAの阻害活性を増強するために、ヌクレオチド「U」を標的配列のアンチセンス鎖の3'末端に加えることができる。加える「U」の数は少なくとも約2個、一般的に約2~約10個、好ましくは約2~約5個である。添加された「U」は、siRNAのアンチセンス鎖の3'末端で一本鎖を形成する。

【0056】

細胞は、本発明のRHOA変異体を発現するする任意の癌細胞である。当該癌細胞は、食道癌、胃癌組織に含まれ得る。当該癌細胞は、スキルス性胃癌の組織に含まれ得る。

【0057】

本発明の変異RHOAに特異的なsiRNAは、mRNA転写産物に結合することができる形で細胞に直接導入される。または、本発明の変異RHOAに特異的なsiRNAをコードするDNAが下記のようなベクターに組み込まれ得る。

【0058】

ベクターは、例えば、本発明の変異RHOAに含まれる標的配列を、双方の鎖を発現（DNA分子の転写によって）することができるように、調節配列が機能的に結合するよう、RHOA配列に隣接する発現ベクターにクローニングすることによって作製される（Leeら（*Nat. Biotechnol.* (2002) 20, 500））。本発明の変異RHOAのmRNAに対してアンチセンスであるRNA分子は、第一のプロモーター（例えば、クローニングしたDNAの3'のプロモーター配列）によって転写され、かつ、本発明の変異RHOAのmRNAのセンス鎖であるRNA分子は第二のプロモーター（例えば、クローニングしたDNAの5'のプロモーター配列）によって転写される。センス鎖およびアンチセンス鎖は、インピボでハイブリダイズし、本発明の変異RHOAの遺伝子のサイレンシングのためのsiRNA構築物が生成される。または、siRNA構築物のセンス鎖およびアンチセンス鎖を作製するために、2つの構築物が利用される。クローニングされた本発明の変異RHOAは、二次構造、例えば単一の転写産物が標的遺伝子由来のセンス配列および相補的アンチセンス配列の双方を伴うヘアピンを有する構築物にコードされ得る。ヘアピンループ構造を形成するために、任意のヌクレオチド配列からなるループ配列がセンス配列とアンチセンス配列との間に位置され得る。このように、本発明はまた、一般式5'-[A]-[B]-[A']-3'を有するsiRNAであって、[A]が本発明の変異RHOAの遺伝子由来のmRNAまたはcDNAと特異的にハイブリダイズする配列に対応するリボヌクレオチド配列である、siRNAを提供する。好ましい態様において、[A]は、配列番号：2のヌクレオチド配列であって本発明の変異体におけるアミノ酸変異に対応するヌクレオチド変異を有する配列からなる群より選択される配列に対応するリボヌクレオチド配列である。[B]は3~23ヌクレオチドからなるリボヌクレオチド配列であり、かつ、[A']は[A]の相補的配列からなるリボヌクレオチド配列である。領域[A]は[A']にハイブリダイズして、次に領域[B]からなるループが形成される。ループ配列は好ましくは長さが約3~約23ヌクレオチドであり得る。例えばループ配列は、以下の配列からなる群より選択することが可能である。例えば、本発明のヘアピンループ構造を有する好ましいsiRNAを以下に示す。非限定の例示としてループ配列は、CCC、CCACC、CCACACC（Jacqueら（*Nature* (2002) 418, 435））、UUCG（Leeら（*Nat. Biotechnol.* (2002) 20 500）、およびFruscoloniら（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2003) 100, 1639））、およびUUCAAGAGA（Dykxhoornら（*Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2003) 4, 457））からなる群より選択され得る。さらに、23ヌクレオチドからなるループ配列も同様に、活性なsiRNAを提供する（Jacqueら（*Nature* (2002) 418, 435））。

【0059】

センス鎖、およびアンチセンス鎖は公知のソフトウェアやプログラムを使用して適宜設計することが可能である。こうしたプログラムは例えば下記のsiRNA分子のメーカー等のサイトにおいて提供されている。

<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/rnai.html>

10

20

30

40

50

<http://www.thermoscientificbio.com/design-center/>
<http://sidirect2.rnai.jp/>
<http://optirna.unl.edu/>
<http://biotools.idtdna.com/Scitools/Applications/RNAi/RNAi.aspx?source=menu>
<http://sfold.wadsworth.org/cgi-bin/sirna.pl>
<http://sysbio.kribb.re.kr:8080/AsiDesigner/menuDesigner.jsf>
<http://sirna.wi.mit.edu/>

【 0 0 6 0 】

非限定の一態様として以下の配列が上記の領域[A]の配列として好適に使用され得る。

si1 : GAAAGACAUGCUUGCUCUAUAGUCUU (配列番号 : 3)
 si2 : CAGAGGUGUAUGUGCCCACAGUGUU (配列番号 : 4)
 si3 : UGUUUGAGAACUAUGUGGCAGAUAU (配列番号 : 5)
 si4 : UGGCAGAUAUUCGAGGUGGAUGGAAA (配列番号 : 6)
 si5 : UCGAGGUGGAUGGAAAGCAGGUAGA (配列番号 : 7)
 si6 : AGGUGGAUGGAAAGCAGGUAGAGUU (配列番号 : 8)
 si7 : CAGGUAGAGUUGGCUUUGUGGGACA (配列番号 : 9)
 si8 : ACCCAGAUACCGAUGUUAUACUGAU (配列番号 : 1 0)
 si9 : CCAGAUACCGAUGUUAUACUGAUGU (配列番号 : 1 1)
 si10 : GAUACCGAUGUUAUACUGAUGUGUU (配列番号 : 1 2)

10

【 0 0 6 1 】

20

ジンクフィンガーヌクレアーゼを利用したDNAを含む治療剤

ジンクフィンガーヌクレアーゼ技術は、様々なDNA配列の認識および切断に、ジンクフィンガーDNA認識ドメインおよびDNA切断ドメインを含むキメラヌクレアーゼである制限酵素を使用する技術をいう。ジンクフィンガーヌクレアーゼは、細胞内に導入された際、ゲノムDNAから標的化された二重鎖切断 (double strand break) を誘導できるため、対象とするポリヌクレオチドを含む細胞で効率的な遺伝子変異を生じさせるために使用され得る。細胞内で二重鎖切断が生じると、細胞はそれ自身有する修復システムを用いて切断された部位を直す。この際、切断された部分と類似するDNA配列を有する供与DNAを細胞内に導入すると、切断されたDNAと供与DNAとの間に相同組換えが生じる。遺伝子上の特定部位に供与DNAの配列を含む所望の変異を生じさせることが可能である。一方、供与DNAがない場合でも、前記のようにそのDNAが切断された細胞は、非相同末端連結 (non-homologous end joining) によって切断された部位が修理され得る。同非相同末端連結では、二つの切断末端などをともに接合して切断されたDNAを修復し、一般的に変異等は形成しないが、一部の場合、切断されたDNA末端で塩基対等の挿入または欠失が生じるエラーが発生しやすい方向に修復される場合もある。よって、ジンクフィンガーヌクレアーゼを用いて特定塩基配列の部分に二重鎖切断を生じて非相同末端連結を誘導した場合でも、DNAに突然変異が生じ、ロックアウト細胞株を作ることが可能である (Urnovら (Nature (2005) 435 (7042) 646)、Lombardoら (Nat. Biotechnol. (2007) 25 (11) 1298)、Doら (Mutat. Res. (2012) 740 (1-2) 34))。

30

【 0 0 6 2 】

40

6 . 癌の治療剤

本発明の非限定の一態様では、本発明に係るポリヌクレオチド、組換えベクター、または本発明のスクリーニング方法により選択された化合物を有効成分として含み、本RHOA変異体ポリペプチドの機能および/または本RHOA変異体ポリペプチドの発現を阻害するまたは拮抗することに基づく癌の治療剤に関する。本発明に係る治療剤は、本発明に係るポリヌクレオチド、組換えベクター、または化合物のうち少なくとも一つを有効成分としてその有効量含む医薬とすることが可能である。通常は、一種類または二種類以上の医薬用に許容される担体 (医薬用担体) を用いて治療剤を製造することが好ましい。

【 0 0 6 3 】

本発明の治療剤が投与される対象としては、本発明のRHOA変異体ポリペプチドが含まれ

50

る癌が含まれる癌患者が選択され得る。すなわち本発明のRHOA変異体ポリペプチドが含まれる癌であればいずれの癌もその治療対象として選択され得る。そのような本発明のRHOA変異体ポリペプチドが含まれる癌の非限定の一態様として、胃癌、大腸癌、乳癌、肺癌等が好適に例示され得る。

【0064】

本発明に係る癌の治療剤中に含まれる有効成分の量は、広範囲から適宜選択される。任意の患者の用量は、患者の体格、体表面積、年齢、投与される特定の治療剤、性別、投与時間および投与経路、全身の健康状態、ならびに同時投与される他の薬剤を含む、多くの要因に依存する。通常約0.00001乃至70重量%、好ましくは0.0001乃至5重量%程度の範囲とするのが適切であるがこれに限定されない。有効成分としてsiRNA等のポリヌクレオチドが使用される場合には、その用量の単位として上記重量%のほか当該ポリヌクレオチド分子のコピー数でも決定され得る。ポリヌクレオチド分子の静脈内投与のための用量は、核酸分子約 $10^6 \sim 10^{22}$ コピーの間から選択され得る。

10

【0065】

医薬用担体は、治療剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、滑沢剤等の希釈剤や賦形剤等が例示され得る。これらは得られる治療剤の使用形態に応じて適宜選択して使用され得る。例えば水、医薬的に許容される有機溶剤、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、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、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、マンニトール、ソルビトール、ラクトース等が挙げられる。これらは、本発明に係る治療剤の使用形態に応じて適宜一種類または二種類以上が組み合わせて使用され得る。

20

【0066】

所望により、通常の製剤に使用され得る各種の成分、例えば安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、pH調整剤、界面活性剤等を適宜使用して本発明の治療剤が調製され得る。

【0067】

安定化剤としては、ヒト血清アルブミンや通常のL-アミノ酸、糖類、セルロース誘導体等が例示され得るが、これらは単独でまたは界面活性剤等と組み合わせて使用され得る。特にこの組合せによれば、有効成分の安定性をより向上させ得る場合がある。上記L-アミノ酸は、特に限定はなく、例えばグリシン、システイン、グルタミン酸等のいずれでもよい。糖類も特に限定はなく、例えばグルコース、マンノース、ガラクトース、果糖等の単糖類、マンニトール、イノシトール、キシリトール等の糖アルコール、ショ糖、マルトース、乳糖等の二糖類、デキストラン、ヒドロキシプロピルスターチ、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸等の多糖類等およびそれらの誘導体等のいずれでもよい。セルロース誘導体も特に限定はなく、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等のいずれでもよい。

30

40

【0068】

界面活性剤も特に限定はなく、イオン性および非イオン性界面活性剤のいずれも使用可能である。これには、例えばポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル系、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ソルビタンモノアシルエステル系、脂肪酸グリセリド系等が包含される。

【0069】

緩衝剤としては、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、 α -アミノカプロン酸、グルタミン酸および/またはそれらに対応する塩（例えばそれらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩）等が例示され得る。

50

【0070】

等張化剤としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリン等を例示され得る。

【0071】

キレート剤としては、エデト酸ナトリウム、クエン酸等が例示され得る。

【0072】

本発明に係る治療剤は、溶液製剤として使用され得る。その他、これを凍結乾燥化し保存し得る状態にした後、用時、水や生理的食塩水等を含む緩衝液等で溶解して適当な濃度に調製した後に使用することも可能である。

【0073】

siRNA療法は、本発明のsiRNAを含むポリヌクレオチドが挿入された標準的なベクターにより、および/または合成siRNAを含むポリヌクレオチドの送達によるような遺伝子送達システムにより、当該ポリヌクレオチドを患者に投与することによって行われる。典型的には、本発明のsiRNAは生体内におけるヌクレアーゼ分解を防止するように化学的に安定化される。化学的に安定なRNA分子を調製する方法は当技術分野で公知である。例えば、当該分子は、リボヌクレアーゼの作用を防止するために修飾された骨格およびヌクレオチドを含み得る。他の修飾も同様に可能である（Songら（Nature Med. (2003) 9, 347））。適切なポリヌクレオチド送達システムには、リポソーム、受容体媒介送達システム、または、中でもヘルペスウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ関連ウイルスのようなウイルスベクターが含まれ得る。当該ベクターには、プロモーターのような、標的細胞による発現のために必要な遺伝子情報が含まれ得る。本発明の治療剤にはまた、上記のような遺伝子送達システムが含まれ得る。

【0074】

投与経路としては、経口投与、または、静脈内、皮下、筋肉内、および腹腔内送達経路のような非経口投与を用いて、本発明の治療剤が投与され得る。

【0075】

なお、本明細書において引用されたすべての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

【0076】

以下、本発明を実施例により具体的に説明されるが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【実施例】

【0077】

〔実施例1〕RHOA変異の検出

OCT包埋された組織学的スキルス型低分化腺癌30症例の凍結組織を用い、癌部と非癌部の切片がそれぞれ作製された。切片はクライオスタット（Leica、CM1850）を用いて作製された。QIAamp DNA Mini Kit（QIAGEN）を用いて、当該切片から抽出された1μgのDNAに含まれるエクソンがAgilent社SureSelect Human All Exon Kit（Agilent）を用いて捕捉された。HiSeq 2000（Illumina）にてその全エキソームが解析された（100b paired end）。平均深度（average depth）は癌部で99回、非癌部で102回であった。体細胞性（Somatic）変異のうち、非同義置換性（non synonymous）変異を頻度順にリスト化したところ、RHOA遺伝子に7/30（21%）の反復性変異（recurrent mutation）が存在した。7症例の変異体の内訳はR5Wが1症例、L22Rが1症例、Y42Cが4症例、Y74Dが1症例であった。

【0078】

同様の凍結組織検体にて症例数を新たに57症例追加し、計87症例に関してRHOA遺伝子の標的化シーケンス（targeted sequencing）を行った。Illumina社の提供するアプリケーション Design StudioにてRHOA遺伝子のエクソン領域をターゲットとしたアンプリコンシーケンスを行うためのプライマーが設計された（ampliconサイズは175b）。設計されたTruSeq Custom Amplicon Kitを用いて250ng DNA からライブラリを作成し、Illumina社HiSeq2500 rapid run mode（150b paired end）にてシーケンスを行った。平均深度（

10

20

30

40

50

average depth) は癌部でx4152、非癌部でx3924であった。RHOA遺伝子に体細胞性変異を持つ症例が22/87 (25%) 症例認められた。22症例の変異体の内訳はR5Wが4症例、R5Qが1症例、R5W/R68Pの変異体が1症例、G17Eが3症例、L22Rが1症例、V38Gが1症例、Y42Cが6症例、E54Kが1症例、W58Sが1症例、L69Rが2症例、Y74Dが1症例であった。

【0079】

〔実施例2〕RHOA変異を有する細胞株の探索

胃癌、大腸癌、乳癌および肺扁平上皮癌の癌細胞株におけるRHOAの変異が解析された。癌細胞からDNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて抽出されたDNAを用いて、臨床検体において検出されたアミノ酸の変異領域を含むexon2とexon3部分がPCRで増幅された。BigDye (登録商標) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) と3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) を用いて増幅されたPCR断片における変異の有無が解析された。PCRに用いられたプライマーの配列を表1に示した。

【0080】

exon2およびexon3の増幅に使用されたプライマーの配列

【表1】

Exon 2 forward	GTTTTGTGTTTCAGCAATGG (配列番号: 13)
Exon 2 reverse	GTATACTCACCTGCTTCCATCC (配列番号: 14)
Exon 3 forward	TTCCCATACAGGTAGAGTTG (配列番号: 15)
Exon 3 reverse	AGGGCCACTCACCTAAACTATC (配列番号: 16)

【0081】

解析の結果、胃の噴門部癌株のOE19にY42S、大腸癌株のSW948と乳癌株のBT474にG17E、肺扁平上皮癌株のHCC95にG17Aの変異が存在していた(図1)。一方、胃癌株のAGSや乳癌株のHCC38には、RHOAの変異は認められなかった。

【0082】

〔実施例3〕RHOAを標的とするsiRNAによるRHOAのG17位とY42位に変異を有する癌細胞株と、野生型RHOAを有する癌細胞株の細胞増殖抑制

RHOAにY42Sの変異を有するOE19、G17Eの変異を有するSW948とBT474、G17Aの変異を有するHCC95、及び、野生型のRHOAを有するAGSとHCC38における、RHOAを標的とするsiRNAによるRHOAの発現欠失と、当該欠失に伴う細胞増殖抑制が検討された。RHOAを標的とするsiRNAとして、2種類のsiRNAコンストラクトが用いられた(Life Technologies)。陰性対照としてSilencer (登録商標) Select Negative Control #1 siRNA (Life Technologies)、陽性対照としてKIF11-siRNA (Life Technologies) コンストラクトが用いられた。RHOA、およびKIF11の各コンストラクトに使用されたsiRNAの配列を表2に示した。

【0083】

RHOA、KIF11のsiRNAの配列

【表2】

KIF11 siRNA sense	CCAUCAACACUGGUAAGAAUU (配列番号: 17)
KIF11 siRNA antisense	UUCUUACCAGUGUUGAUGGGU (配列番号: 18)
RHOA siRNA #2 sense	CUAUGAUUAUUAACGAUGUUU (配列番号: 19)
RHOA siRNA #2 antisense	ACAUCGUUAAUUAUCAUAGUU (配列番号: 20)
RHOA siRNA #3 sense	GVCUUUACUCCGUAACAGAUU (配列番号: 21)
RHOA siRNA #3 antisense	UCUGUUACGGAGUAAAGCCCU (配列番号: 22)

【0084】

それぞれの細胞がUltra-Low Attachment Surface plate (Corning) に播種された。1E5 cells/mLの濃度で、96ウェルのプレートに100 µLずつ播種された細胞はその増殖抑制の活

性評価に使用された。同濃度で6ウェルのプレートに2.5 mLずつ播種された細胞はsiRNAによるmRNA発現に対する抑制効率の評価に用いられた。37 °Cのインキュベータで2日間の培養後、6ウェルプレートに播種された細胞からRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出されたRNA、Power SYBR (登録商標) Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) とStep OnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) を用いてリアルタイムPCRを行い、mRNAが定量された。内部標準として測定されたRPS18の定量値で補正された値を用いて、陰性対照のsiRNAで処理された細胞を0%としたRHOA mRNA発現抑制効率が算出された。播種後、37 °Cのインキュベータで7日間の培養後、96ウェルプレートに播種された細胞のうちCellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (プロメガ) を用いて測定された生細胞数から、陰性対照のsiRNAで処理された細胞を0%とした細胞増殖抑制活性が算出された。リアルタイムPCRに使用されたPCRプライマーの配列を表3に示した。

10

【0085】

RHOAリアルタイムPCRプライマーの配列

【表3】

Forward	GGGAGCTAGCCAAGATGAAG (配列番号: 23)
Reverse	GTACCCAAAAGCGCCAATC (配列番号: 24)

【0086】

評価した細胞株において、RHOA siRNA #2および#3によっていずれも、85~99%のRHOA mRNAの発現抑制効率が示された(図2)。

20

【0087】

また、RHOA siRNA #2および#3によって、Y42Sの変異を有するOE19、ならびにG17Eの変異を有するSW948、およびBT474の細胞増殖は、陽性対照と同等以上に非常に強く抑制された。また、G17Aの変異を有するHCC95の細胞増殖も抑制された。一方、野生型のRHOAを有するHCC38とAGSの細胞増殖は、RHOA siRNA #2および#3によってあまり抑制されなかった(図3)。

【0088】

〔実施例4〕各種癌細胞株と、正常組織におけるRHOA mRNA量の比較

RHOAは癌で高発現していると論文で報告されている(非特許文献6-8)。そこで、RHOAの発現量が癌細胞株と正常組織との間で比較された。正常大腸組織、及び肺組織由来のRNAはAmbionから、正常胃由来のRNAはStratageneから、正常胸部由来のRNAはClontechから、それぞれ購入されたものが使用された。これらのRNAを鋳型としてPower SYBR (登録商標) Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) とStepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) を用いたリアルタイムPCRによって、RHOAのmRNAが定量された。内部標準として測定されたRPS18の定量値で補正された値を用いてRHOAのmRNAが算出された。

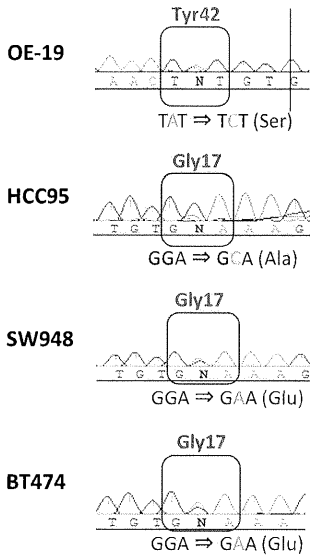
30

【0089】

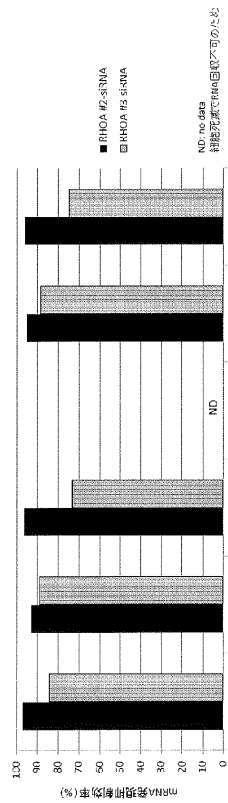
評価した癌細胞株においては、正常組織に比べて同等以下のRHOAの発現量が示された(図4参照)。また、RHOA siRNAによってその細胞増殖が抑制されたOE19、SW948、BT474、およびHCC95におけるRHOAの発現量と、RHOA siRNAによってその細胞増殖が抑制されないHCC38、およびAGSにおけるRHOAの発現量を比較しても、その細胞増殖抑制活性と発現量との間に相関関係は確認されなかった。

40

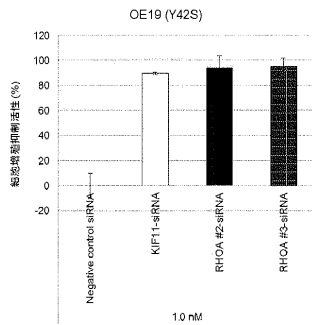
【 図 1 】



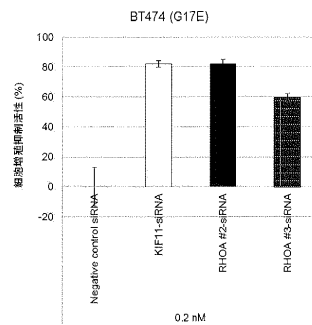
【 図 2 】



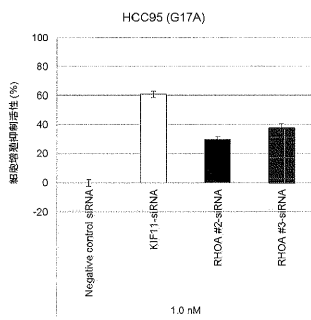
【 図 3 A 】



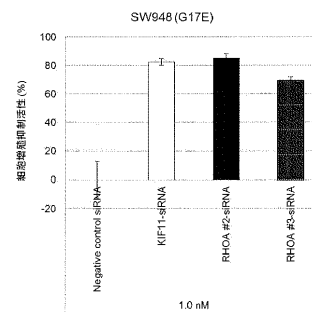
【 図 3 C 】



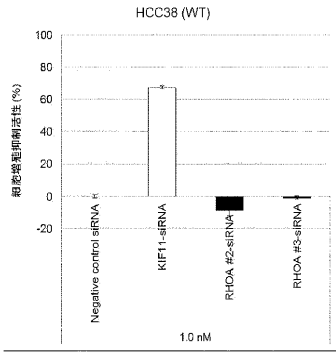
【 図 3 B 】



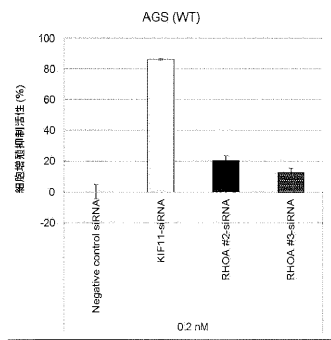
【 図 3 D 】



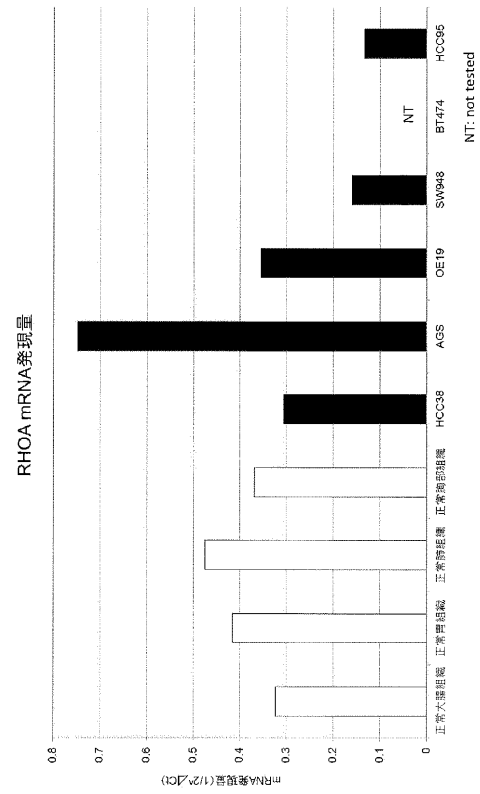
【 図 3 E 】



【 図 3 F 】



【 図 4 】



【 配 列 表 】

201503356500001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2014/004539
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K14/705(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, A61K31/7088, A61K48/00, A61P35/00, C07K14/705, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WAHEED, F., et al., Affinity precipitation of active Rho-GEFs using a GST-tagged mutant Rho protein (GST-RhoA(G17A)) from epithelial cell lysates., 2012, Journal of Visualized Experiments, Vol.61, e3932, p.1-5, abstract	1, 3-5/1-9, 15-17
Y	WO 2011/163436 A1 (QUARK PHARMACEUTICALS, INC.), 29 December 2011 (29.12.2011), examples; claim 83 & JP 2013-537404 A & US 2013/0137750 A1 & EP 2585594 A	1-9, 15-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier 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 02 December, 2014 (02.12.14)		Date of mailing of the international search report 09 December, 2014 (09.12.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer Telephone No.
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/004539

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2012-511031 A (Whitehead Institute for Biomedical Research), 17 May 2012 (17.05.2012), example 6 & US 2012/0041048 A1 & EP 2370091 A & WO 2010/065961 A2	1-9, 15-17
Y	WO 2003/030836 A2 (CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY), 17 April 2003 (17.04.2003), claims 19, 20, 35 & US 2004/0208862 A1	1-9, 15-17
Y	LONGENECKER, K., et al., Structure of a constitutively activated RhoA mutant (Q63L) at 1.55 Å resolution., 2003, Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, Vol.59, p.876-880	1-9, 15-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/004539

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))*C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i*

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/004539

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.: 10-14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 10-14 pertain to methods for diagnosis of the human body and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out a search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
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.:
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:

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.:

- 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.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 0 4 5 3 9									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))											
Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K14/705(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i											
B. 調査を行った分野											
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))											
Int.Cl. C12N15/09, A61K31/7088, A61K48/00, A61P35/00, C07K14/705, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの											
<table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2014年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2014年	日本国実用新案登録公報	1996-2014年	日本国登録実用新案公報	1994-2014年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2014年										
日本国実用新案登録公報	1996-2014年										
日本国登録実用新案公報	1994-2014年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)											
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, PubMed											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X/ Y	WAHEED, F., et al., Affinity precipitation of active Rho-GEFs using a GST-tagged mutant Rho protein (GST-RhoA(G17A)) from epithelial cell lysates., 2012, Journal of Visualized Experiments, Vol.61, e3932, p.1-5 要約	1, 3-5/ 1-9, 15-17									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 02.12.2014		国際調査報告の発送日 09.12.2014									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 福澤 洋光	4B 3963								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 0 4 5 3 9

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2011/163436 A1 (QUARK PHARMACEUTICALS, INC.) 2011.12.29, 実施例、請求項 8 3 & JP 2013-537404 A & US 2013/0137750 A1 & EP 2585594 A	1-9, 15-17
Y	JP 2012-511031A (ホワイトヘッド・インスティテュート・フォー・バイオメ ディカル・リサーチ) 2012.05.17, 実施例 6 & US 2012/0041048 A1 & EP 2370091 A & WO 2010/065961 A2	1-9, 15-17
Y	WO 2003/030836 A2 (CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY) 2003.04.17, 請求項 1 9、請求項 2 0、請求項 3 5 & US 2004/0208862 A1	1-9, 15-17
Y	LONGENECKER, K., et al., Structure of a constitutively activated RhoA mutant (Q63L) at 1.55 Å resolution., 2003, Acta Crystallographica Section D : Biological Crystallography, Vol.59, p.876-880	1-9, 15-17

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 0 4 5 3 9

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 10-14 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項10-14は、人体の診断方法に関するものであり、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	4 C 0 8 6
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A 4 H 0 4 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K	31/713	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N	33/574	A
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100173185

弁理士 森田 裕

(72)発明者 油谷 浩幸

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 石川 俊平

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 垣内 美和子

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 西沢 隆

東京都目黒区駒場4-2-16 株式会社未来創薬研究所内

Fターム(参考) 2G045 AA13 AA16 AA24 BA13 BB24 CA25 CA26 CB01 CB02 CB03
 CB07 CB14 CB26 DA13 DA14 DA36 FA11 FB01 FB02 FB03
 FB12 GC15 JA01
 4B024 AA01 AA12 BA63 CA04 CA11 CA12 DA03 EA04 GA11 HA14
 HA15 HA17
 4B063 QA13 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ43 QQ53 QQ79 QR32 QR36
 QR48 QR62 QR72 QR77 QS02 QS07 QS25 QS33 QS34 QS38
 QX01
 4B065 AA93X AA93Y AB01 AC20 BA01 CA24 CA44
 4C084 AA13 MA17 MA44 MA52 MA55 MA56 MA66 NA14 ZB26
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 MA17 MA44 MA52 MA55
 MA56 MA66 NA14 ZB26
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA41 DA50 EA28 FA71

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	诊断癌症，使用RHOA筛选抑制剂		
公开(公告)号	JPWO2015033565A1	公开(公告)日	2017-03-02
申请号	JP2015535317	申请日	2014-09-04
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人 东京大学		
申请(专利权)人(译)	东京大学 中外制药有限公司		
[标]发明人	油谷浩幸 石川俊平 垣内美和子 西沢隆		
发明人	油谷 浩幸 石川 俊平 垣内 美和子 西沢 隆		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/705 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68 A61K48/00 A61P35/00 A61K31/713 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/574 C12N5/10		
CPC分类号	A61K31/713 C07K14/705 C12N9/14 C12Y306/05002 G01N33/5011 G01N33/574 G01N33/57415 G01N33/57419 G01N33/57423 G01N33/57446 C12N15/1137 C12N2310/14 C12N2320/30 C12Q1/6886 C12Q2600/136 C12Q2600/156 C12Q2600/158 C12Q2600/178		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/705 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.A A61K48/00 A61P35/00 A61K31/713 G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53.D G01N33/574.A C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA16 2G045/AA24 2G045/BA13 2G045/BB24 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/CB14 2G045/CB26 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC15 2G045/JA01 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA14 4B024/HA15 4B024/HA17 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS02 4B063/QS07 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS38 4B063/QX01 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC20 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084/AA13 4C084/MA17 4C084/MA44 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB26 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA17 4C086/MA44 4C086/MA52 4C086/MA55 4C086/MA56 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA50 4H045/EA28 4H045/FA71		
代理人(译)	田中玲子 松任谷裕子 森田 裕		
优先权	2013185493 2013-09-06 JP		
其他公开文献	JP6519927B2		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

用于检测癌症的新方法，针对与癌症相关的抑制剂或抗癌剂靶向分子的筛选方法以及包含突变的RHOA多肽，编码该多肽的多核苷酸以及这些作为癌症的治疗剂 公开了一种检测癌症的方法。还公开了包含多核苷酸的载体和宿主细胞，用于筛选包含所述多肽和/或所述多核苷酸的癌症治疗剂的方法，以及用于具有具有RHOA突变体的沉默作用的siRNA的癌症治疗剂。它

