

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-271524

(P2004-271524A)

(43) 公開日 平成16年9月30日(2004.9.30)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53</b>	GO 1 N 33/53 A	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 31/7088</b>	GO 1 N 33/53 Z N A B	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 K 31/7088	4 C O 8 4
<b>A 6 1 K 48/00</b>	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 6
<b>A 6 1 P 5/26</b>	A 6 1 P 5/26	4 H O 4 5
	審査請求 有 請求項の数 15 O L	(全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-52619 (P2004-52619)  
 (22) 出願日 平成16年2月27日 (2004. 2. 27)  
 (31) 優先権主張番号 10309280.3  
 (32) 優先日 平成15年3月4日 (2003. 3. 4)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)  
 (31) 優先権主張番号 60/465, 692  
 (32) 優先日 平成15年4月25日 (2003. 4. 25)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 502148901  
 イェナファルム ゲーエムベーハー ウン  
 ト コー. カーゲー  
 J E N A P H A R M G m b H & C o  
 . K G  
 ドイツ連邦共和国 D-07745 イェ  
 ナ オットー-スコット-シュトラッセ  
 15  
 (74) 代理人 100068755  
 弁理士 恩田 博宣  
 (74) 代理人 100105957  
 弁理士 恩田 誠

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 物質のホルモン作用を判定する方法

## (57) 【要約】

【課題】 被験物質のホルモン作用について信頼性と感度の高い判定を簡単、廉価、かつ迅速に下すことができる方法を提供する。

【解決手段】 ホルモン作用を判定する方法。EWS (ユーイング肉腫タンパク質) 又はそのEWS誘導体を、核受容体 (NR) 又はその誘導体及び被験物質と接触させ、被験物質がEWSタンパク質又はその誘導体及びNR又はその誘導体の結合に及ぼす影響を判定するか、又は被験物質がNRのリガンド誘発活性に及ぼす影響を判定する各工程からなる。アンドロゲン受容体とEWSとの間の共同調節機構における障害を判定する方法であり、アンドロゲン受容体とEWSの細胞濃度の測定を包含する方法、並びにNRの活性に影響を与える物質の識別及び特性把握のためにEWSタンパク質又はその誘導体を使用する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

物質のホルモン作用を判定する方法であって、

- a . EWSタンパク質又はその誘導体を、NR又はその誘導体及び被験物質と接触させる工程と、
  - b . 被験物質がEWSタンパク質又はその誘導体及びNR又はその誘導体の結合に及ぼす影響を判定する工程、又は
  - c . 被験物質が核受容体のリガンド誘発活性に及ぼす影響を判定する工程と
- からなる方法。

**【請求項 2】**

少なくとも1つの工程が細胞系において行われることを特徴とする請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

- a . EWSタンパク質又はその誘導体及びNR又はその誘導体を発現する細胞を被験物質に曝露する工程と、
  - b . 受容体又はその断片とEWSタンパク質又はその誘導体との間の相互作用に及ぼす物質の影響を、タンパク質・タンパク質相互作用又はタンパク質・タンパク質・DNA相互作用を測定することによって判定する工程と
- からなる請求項2に記載の方法。

**【請求項 4】**

- a . EWSタンパク質又はその誘導体及びNR又はその誘導体を発現し、レポーター遺伝子構築物でトランスフェクションされた細胞をNR及び被験物質のリガンドに曝露する工程と、
  - b . NRのレポーター遺伝子活性を測定することによってNRの転写活性を判定する工程と、
  - c . 被験物質の非存在下で工程a及びbを実施した際の転写活性と比較する工程と
- からなる請求項2に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記細胞が真核細胞、好ましくは前立腺細胞、神経細胞、グリア細胞、線維芽細胞、血球、骨芽細胞、破骨細胞、肝細胞、上皮細胞又は筋肉細胞であることを特徴とする請求項3又は4に記載の方法。

**【請求項 6】**

NRの活性に影響を与える物質を識別して特性を把握するために、少なくとも1種類のNRの活性を調節する機能を有するEWSタンパク質又はその誘導体を使用する方法。

**【請求項 7】**

EWS誘導体が、アミノ酸欠失、置換、挿入、逆位、付加又は交換によって生じる、配列ID番号1でコードされたポリペプチドの誘導体を包含していることを特徴とする請求項1乃至4のいずれか1項、又は請求項6に記載の方法。

**【請求項 8】**

NRの活性に影響を与える物質を識別して特性を把握するために、EWS又はEWS誘導体をコードする核酸を使用する方法。

**【請求項 9】**

前記核酸が、配列ID番号1に対して、又は配列ID番号1の配列範囲8~2032もしくは配列範囲1000~2011に対して少なくとも70%の相同性を有することを特徴とする請求項8に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記核酸が発現ベクターの発現カセットにクローン化されていることを特徴とする、請求項8又は9に記載の方法。

**【請求項 11】**

NRがアンドロゲン受容体、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、グルココルチコイド受容体、ミネラルコルチコイド受容体、甲状腺ホルモン受容体、ビタミンD受容体、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体、レチン酸受容体、レチノイドX受容体又はオル

10

20

30

40

50

ファン受容体、好ましくはアンドロゲン受容体であることを特徴とする請求項 1 乃至 4、又は請求項 6 乃至 10 のいずれか 1 項に記載の使用する方法。

【請求項 1 2】

配列 ID 番号 1 の配列範囲 8 ~ 2032 もしくは配列範囲 1000 ~ 2011 に対して少なくとも 70% の相同性を有する核酸が、又は当該核酸のいずれか 1 つによってコードされたタンパク質に対して設けられた抗体を、NR 活性、好ましくはアンドロゲン受容体活性の機能不全を伴う疾患の診断に使用する方法。

【請求項 1 3】

NR 活性の機能不全に起因する疾患の治療に、請求項 1 2 に記載の核酸、又は当該核酸によってコードされるタンパク質、又は当該核酸に対して設けられたアンチセンス核酸を使用する方法。

10

【請求項 1 4】

アンドロゲン受容体と EWS との間の共同調節機構における障害を判定する方法であって、アンドロゲン受容体と EWS の細胞濃度及び / 又は組織濃度を測定する方法。

【請求項 1 5】

前記濃度測定をラジオイムノアッセイ、ELISA、免疫染色法、RT-PCR、ウェスタンブロット、又はノーザンブロットにより行う請求項 1 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、物質のホルモン作用を判定する方法、及び核受容体 (NR) の共同調節機構における障害を判定する方法に関する。さらに本発明は、ユーイング肉腫タンパク質 (EWS) 又は EWS 誘導体ならびにこれらをコードする核酸を使用する方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

物質の可能な薬剤利用について判定する際は、当該物質のホルモン作用の有無、特にアンドロゲン活性又は抗アンドロゲン活性の有無について試験することが通常行われている。薬剤効果のある物質を投与する際は、副作用の可能性について判定するために、当該物質のホルモン作用、特にアンドロゲン作用又は抗アンドロゲン作用に関する知識が重要である。物質のホルモン作用を試験するために、たとえばホルモン受容体を結合して、それらの転写活性を活性化する物質の能力を測定する方法を用いる。

30

【0003】

しかし物質のホルモン作用に関する知識は、潜在的薬剤だけでなく、非薬剤物質についても関心事である。なぜならば環境中に存在する多くの物質は、住民の一部においてアンドロゲン活性もしくは抗アンドロゲン活性又はエストロゲン活性もしくは抗エストロゲン活性を有し得ると考えられているからである。それにより好ましくない有害な作用が引き起こされる虞がある。

【0004】

ステロイドホルモンによって媒介される効果に対する作用の識別及び特性把握は特に難しい。なぜならば、最終的にホルモンに媒介される転写調節を制御するシグナルカスケード及びシグナルネットワークが、ここでは特に複雑な構成となっているからである。その理由は、リガンド活性化後に種々のステロイド受容体が結合する DNA 目標配列が非常に類似して構成されていることにある。それが原因となって、核受容体の的確な応答を引き起こすために、とりわけ受容体に媒介される転写活性の特異性を強化する特殊な補因子との相互作用が必要とされている。

40

【0005】

それゆえ、特定のホルモン誘発シグナル経路に作用する物質を識別するために、ステロイド作用を媒介するための細胞シグナルネットワークを構成する個々の要素の機能を的確に把握できる試験構成及び試験方法が必要である。

【0006】

50

したがって、物質のホルモン作用について信頼性と感度の高い判定を簡単、廉価、かつ迅速に下すことができる方法に対する需要がある。しかし従来ある方法はこの需要を満たすものではない。

【非特許文献 1】ビートら (Beato et al.), 2000, Human Reproduct.Update, 6, 225-236

【非特許文献 2】マンゲルドルフおよびエバンス (Mangelsdorf & Evans), 1995, Cell, 83, 841-850

【非特許文献 3】ロバイアら (Robyr et al.) 2000, Mol. Endocrinol, 14, 329-347

【非特許文献 4】リンクマンら (Brinkmann et al.), 1999, J.Steroid Biochem. and Mol.Biol., 69, 307-313

10

【非特許文献 5】デラットレら (Delattre et al.), 1992, Nature 359;162-165

【非特許文献 6】ザックマンら (Zucman et al.), 1993, Nature Genet. 4; 341-345

【非特許文献 7】ジェラルドら (Gerald et al.), 1995, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 92: 1028-1032

【非特許文献 8】ラバレら (Laballe et al.), 1995, Hum.Mol.Genet.4; 2219-2226

【非特許文献 9】オオノら (Ohno et al.), 1994, Oncogene 9: 3087-3097

【非特許文献 10】メローら (Melot et al.), 2001, Eur. J.Biochem.268, 3483-3489

【非特許文献 11】マッケンナら (McKenna et al.), 1999, Endocr.Rev., 20, 321-347

【非特許文献 12】ディンら (Ding et al.), 1998, Mol.Endocrinol., 12, 302-313

【非特許文献 13】ロダーら (Roder et al.), 1996, Analytical Biochemistry 241, 260-62

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、被験物質のホルモン作用について信頼性と感度の高い判定を簡単、廉価、かつ迅速に下すことができる方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

この課題を解決するために本発明による物質のホルモン作用を判定する方法は、ユーイング肉腫タンパク質 (EWS) 又はその誘導体を、核受容体 (NR) 又はその誘導体及び被験物質と接触させて、

30

a. 被験物質がEWS又はその誘導体及びNR又はその誘導体の結合に及ぼす影響を判定するか、又は

b. 被験物質がNRのリガンド誘発活性に及ぼす影響を判定する、という各工程からなるようにした。

【0009】

本発明の枠内においてタンパク質もしくはポリペプチドの誘導体とは、たとえばアミノ酸欠失、置換、挿入、逆位、付加又は交換によって得られるタンパク質もしくはポリペプチドの誘導体を意味する。この場合、タンパク質/ポリペプチドの能力、たとえば他のタンパク質の活性に影響を与えるか、又は少なくとも他のタンパク質を結合する能力は変化せず維持されることが望ましい (機能的誘導体)。

40

【0010】

本発明は、ユーイング肉腫タンパク質及びこれから派生した誘導体 (以下EWSと呼ぶ) は、核受容体 (もしくはその誘導体) と相互作用をして、その活性を調節する能力を有するという驚くべき認識に基づいている。

【0011】

50種類以上のタンパク質が属している核受容体 (NR) のスーパーファミリーは、特異的リガンド、たとえばホルモンに対する反応である、それぞれの目標遺伝子の転写を制御する類似の転写因子のグループである。ファミリーは、特定の特徴、たとえば二量化ステータス、リガンドの種類又はDNA反応エレメントの構造などにより幾つかのサブファミリー

50

に分類される(非特許文献1)。NR特有の特徴は、機能的ドメイン(名称A~Fを有する)の構造が、自律性の構成的活性化機能(AF-1)を有していて、可変性が高く保存性の低いN末端領域、2つの垂鉛フィンガー型モチーフからなり、特殊なDNA反応エレメントの識別を可能にする保存性の高いDNA結合ドメイン(DBD)、可変ヒンジ部、及び二量化とリガンドに依存するトランス活性化機能(AF-2)を有する保存された多機能型C末端リガンド結合ドメイン(LBD)と一致していることである。その後最も離れたC末端部が続くが、その機能は知られておらず、PR(プロゲステロン受容体)、PPAR(ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体)及びRXR(レチノイドX受容体)などの受容体には欠如している(非特許文献2、3)。若干のNR(たとえばアンドロゲン受容体(AR))については、N末端領域はC末端領域と相互作用できることが証明された(非特許文献4)。ステロイドホルモン受容体、たとえばエストロゲン受容体(ER)、プロゲステロン受容体(PR)、グルココルチコイド受容体(GR)、ミネラルコルチコイド受容体(MR)、及びアンドロゲン受容体(AR)は、プレグネノロンから導かれるステロイドリガンド、たとえばプロゲステン、エストロゲン、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイド及びアンドロゲンを結合する。リガンド結合は受容体を活性化し、相応の目標遺伝子の発現を制御する。

10

20

30

40

50

#### 【0012】

EWSはユーイング肉腫及びその他の新生物、たとえば腱及び腱膜の明細胞肉腫、小細胞及び円形細胞の線維形成性腹腔内腫瘍、ならびに骨格外軟骨肉腫の前癌原遺伝子として知られている(非特許文献5~8)。これらすべての腫瘍において、EWS遺伝子座は置き換えられるので、タンパク質のアミノ酸末端(N末端)はFLI1、ERG1、ATF1又はWT1のDNA結合ドメインと融合する。この融合タンパク質のN末端は、EWSエクソン1-7又は1-8又は1-9を含む。欠損部位がエクソン7とエクソン8との間にある場合、融合によって生じたタンパク質のEWS部分は、ここで定義されたアンドロゲン受容体結合ドメインとは一致していない。これに対して欠損部位がエクソン8と9又はエクソン9と10の間にある場合は、2つの癌原遺伝子EWS融合タンパク質の5個もしくは20個のアミノ酸のみが、アンドロゲン受容体結合ドメインを含むEWS部分と一致する。このことから、置き換えられたEWS融合タンパク質はアンドロゲン受容体に結合する能力を失ったことが推定される。

#### 【0013】

RT-PCRを用いて胸腺RNAを分析する際に、17個のアミノ酸が欠如したEWS異型(EWS1-c)が発見された(図3)。これは明らかにスプライス異型である。なぜならば、イントロンとエクソンとの間の接合部にすべての必要なコンセンサス配列が存在したからである。その結果がエクソン15(エクソン15b)の短縮化であった。このほかに、従来技術では別のスプライス異型も知られている。200bp短縮されたEWS転写物(EWS1-b)が静止リンパ球及び植物凝集素(PHA)により刺激されたリンパ球で発見された(非特許文献9)。EWS1-bにはエクソン8及び9が欠如している。その他の異型(非特許文献10)はエクソン4と5の間に追加のエクソン4を含み、脳特異的アイソフォームと呼ばれている。

#### 【0014】

EWSは、従来技術ではRNA合成もしくはRNAプロセッシングのプロセスに含まれるRNA結合タンパク質のグループに属しているが、体細胞野生型EWSの生理学的機能についてはこれまでわずかしら知られていなかった。特に従来技術では、EWSが核受容体を結合してその活性を調節する能力を有しており、そのためNRコモジュレーターのクラスに帰属すべきであることは知られていなかった。

#### 【0015】

2003年1月24日、Escherichia Coli EWS-10CMXと呼ばれる大腸菌株がドイツ微生物・培養細胞バンク(DSMZ)に番号DSM15417で登録された。Escherichia Coli EWS-10CMXは、本発明による方法で使用できる完全長EWS-cDNAを含んでいる。

#### 【0016】

いわゆるコモジュレーターは、遺伝子転写の活性化(コアクチベータ)もしくは抑制(コリプレッサ)において、転写開始複合体とNRとの間の架橋分子として働くクラスのタンパク質である(非特許文献11)。コアクチベータは、受容体機能を強化し、アゴニスト

の存在下でNRの活性ドメインと直接相互作用する能力がなければならない。コアクチベータは、基本転写装置とも相互作用しなければならない、最終的にそれ自身で基本転写活性を強化してはならない。ほとんどのコモジュレーターは1つ以上のLXXLLモチーフ（NRボックス）を用いてNRのAF-2ドメインと相互作用するが、他のNRドメインと相互作用する若干のコモジュレーターについても記述された（非特許文献12）。さらに、数種類のNRと類似の仕方で相互作用する多数のコモジュレーターが識別された。

**【0017】**

本発明による方法は、インヴィトロでも（たとえば溶液又は適当な固相マトリクスにおける純粋に生物化学的又は生物物理学的アッセイなど）、一部又は全部細胞系でも進行できる。このような種々の試験法は当業者に十分知られている。

10

**【0018】**

少なくとも1つの方法工程は細胞系で進行することが好ましい。なぜならば、ステロイド媒介転写活性化の効果は細胞の生理学的関連において特に良好に確認し得るからである。したがって本発明には特に真核細胞が適しており、一次細胞と樹立細胞系のいずれも使用できる。樹立細胞系を使用すると、特に良好な再現性及び低コストが達成される。これに対して一次細胞を使用すると、突然変異とクローン選択に起因する細胞培養の欠陥をほぼ回避できる。特に適しているのは前立腺細胞、神経細胞、グリア細胞、線維芽細胞、血球、骨芽細胞、破骨細胞、肝細胞、上皮細胞又は筋肉細胞である。

**【0019】**

ここで特定される（すなわち識別、定量化又は特性把握された）ホルモン作用は、活性物質又は阻害物質のいずれの性格も持つことができ、受容体 コモジュレーター結合に対する作用のほかに、NRアクションの別の工程、たとえばリガンド誘発トランス活性化やNRの核局在化にも作用を及ぼすことができる。

20

**【0020】**

本発明による方法の好適な実施形態は、次の工程を包含している。

- a. 最初にEWS又はその誘導体及びNR又はその誘導体を発現する細胞を被験物質に暴露する。
- b. 受容体又はその誘導体とEWS又はその誘導体との間の相互作用に及ぼす物質の影響を、タンパク質・タンパク質相互作用又はタンパク質・タンパク質・DNA相互作用を測定することによって判定する。

30

**【0021】**

互いに相互作用する要素（一方はEWS/誘導体、他方はNR/誘導体）の一方又は両方の発現は細胞内で自然に、あるいは一過性の、もしくは安定したトランスフェクションの結果として行われ得る。適当な細胞タイプ及び場合によってベクター系を選択することは専門の当業者にとって通例の方策である。真核生物系において発現させるには、たとえばpCMX又はpSG5がベクターとして適している。

**【0022】**

受容体もしくは誘導体とEWSもしくは受容体との間のタンパク質・タンパク質相互作用、あるいはDNA目標配列を有する上記要素のタンパク質・タンパク質・DNA相互作用の測定は、当業者により公知の方策によって行われる。このために、たとえばtwo-hybrid法、共免疫沈降法、GSTプルダウン・アッセイ、FRET分析、ABCDアッセイもしくはゲル遅延アッセイなどの技術がタンパク質・タンパク質・DNA相互作用の分析に適している。

40

**【0023】**

本発明による方法の好適な実施形態は、次の工程を包含している。

- a. EWSタンパク質又はその誘導体及びNR又はその誘導体を発現し、レポーター遺伝子構築物でトランスフェクションされた細胞を核受容体及び被験物質のリガンドに曝露し、
- b. NRのレポーター遺伝子活性を測定することによってNRの転写活性を判定し、
- c. 被験物質の非存在下で工程 a 及び b を実施した際の転写活性と比較する。

**【0024】**

レポーター遺伝子とは、色反応による測光的方法など、できるだけ簡単に検出できる遺

50

伝子生成物をコードする遺伝子又は遺伝子断片である。頻繁に用いられるレポーター遺伝子は、  
- ガラクトシダーゼに対する遺伝子、アルカリホスファターゼに対する遺伝子、  
クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼに対する遺伝子、カテコルジオキシ  
ゲナーゼに対する遺伝子、緑色蛍光タンパク質又は青色蛍光タンパク質に対する遺伝子、  
ならびに細胞を発光させることができる種々のルシフェラーゼ遺伝子である。特定の転写  
因子又は特定のシグナルトランスダクション・カスケードの制御下にあるプロモーター・  
エンハンサー配列など、適当な制御因子を接続することによって、たとえば発現した遺伝  
子生成物の量に基づいて転写因子もしくはカスケードの活性を判定できる。

**【0025】**

慣用的にはそのようなレポーター遺伝子は適当なベクターにより、適当なプロモーター  
・エンハンサー配列を接続したうえ細胞内に挿入される。物質のステロイド活性の分析に  
は、分析すべきNRに応じて、すべての公知のNR目標配列が適している。このようなベクタ  
ーの例は、物質のアンドロゲン作用の測定に使用されるMMTVルシフェラーゼである。

10

**【0026】**

この場合、ホルモン作用、好ましくはアンドロゲン/抗アンドロゲン作用を有する物資  
は、被験物質を添加しない比較調製と比べてレポーター遺伝子の発現が多いか、又は少な  
いかによって識別できる。

**【0027】**

本発明の枠内における使用に適しているのは、野生型EWS、EWS誘導体と並んで、少なく  
とも1つの核受容体の活性、特にアンドロゲン受容体の活性を調節し、これを少なくとも  
結合する能力を維持した、特に機能的なEWS誘導体である(この場合、適当な方法により  
証明可能で無視できない仕方、たとえばEMSAなどのタンパク質・タンパク質相互作用アッ  
セイで行う。これは専門の当業者であれば判断できる)。同様のことはNR誘導体にも当て  
はまる。ここでも、EWS又はその機能的誘導体によって調節されるか、又は少なくとも結  
合される能力を維持した誘導体が優先される。

20

**【0028】**

EWS及びEWSをコードする核酸は従来技術において知られている(上記参照)。本発明の  
枠内で使用するためには、好ましくは配列ID番号1に従う核酸によってコードされたEWS  
もしくはそこから派生した誘導体が適している(特に機能的誘導体)。特に好ましいのは  
、配列ID番号1に記述された配列のアミノ酸319~656を有するEWS誘導体、特にそのアミ  
ノ酸からなる断片である。

30

**【0029】**

したがって本発明は、NRの活性に影響する物質の識別及び特性把握のために、EWSもし  
くはその誘導体を使用することにも関する。

さらに本発明は、核受容体の活性に影響する物質の識別及び特性把握のために、配列ID  
番号1に対して、又は配列ID番号1の配列範囲8~2032もしくは配列範囲1000~2011に対  
して少なくとも70%の相同性を有する核酸を使用することにも関する。このような核酸は  
、適当な発現ベクター、特に真核生物の発現ベクターの発現カセットにクローン化されて  
いることが好ましい。

**【0030】**

本発明の枠内では、「配列ID番号1に対して少なくとも70%の相同性を有する核酸」と  
いう概念は、70%と100%(したがって配列ID番号1と完全に一致)の間の相同性全範囲を  
対象とするものとして理解される。相同性の全範囲においてそれぞれの目的に適した核酸  
を選択することは、従来の特許家の能力の範囲に含まれる。核酸の相同性の判定は、専門  
の当業者においては慣行的に行われている。この目的のために、当業者に公知の種々のコ  
ンピューター・プログラムを使用することができる(例:BLAST; BLAST-2,ALIGN又はMeg  
align(DNASTAR))。

40

**【0031】**

本発明による方法もしくは本発明による上記タンパク質もしくは核酸の使用は、特にア  
ンドロゲン受容体、エストロゲン受容体(及び)、プロゲステロン受容体(A及びB

50

)、グルココルチコイド受容体、ミネラルコルチコイド受容体、甲状腺ホルモン受容体、ビタミンD受容体、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体、レチン酸受容体、レチノイドX受容体又はオルファン受容体に与える物質のホルモン作用に適している。とりわけアンドロゲン受容体に対するEWSもしくはEWS誘導体の作用特性は良好であるため、アンドロゲン受容体は本発明の特に有利な実施形態において使用される。

【0032】

さらにEWSはアンドロゲンに起因する疾患、たとえば前立腺癌、禿頭症、アクネ又は精巣機能低下症及びアンドロゲン抵抗性症候群、たとえば睾丸性女性化症の臨床的指示薬として使用される。これらの疾患はアンドロゲン受容体(AR)とEWSとの間の共同調節機構の欠陥に基づくものと推測される。したがってそのような疾患のある患者において納得のいく診断の可能性は、ARとEWSの相対量を測定することであろう。これはそれぞれの患者で目標細胞内の分子の相対量を測定する定量的方法によって可能である。

10

【0033】

それゆえ、本発明の別の観点は、配列ID番号1の配列範囲8~2032もしくは配列範囲1000~2011に対して少なくとも70%の相同性を有する核酸か、又は当該核酸のいずれか1つによってコードされたタンパク質に対して設けられた抗体を、NR活性、好ましくはアンドロゲン受容体活性の機能不全を伴う疾患の診断に使用することである。

【0034】

このような使用は、好ましくはアンドロゲン受容体とEWSとの間の共同調節機構における障害を判定するために、アンドロゲン受容体とEWSの細胞濃度又は組織濃度を測定するようにした方法の枠内において使用される。これについて当業者が適当と認めている種々の技術のうち、特にラジオイムノアッセイ、ELISA、免疫染色法、RT-PCR又はウェスタンブロットが適している。

20

【0035】

このようにARとEWSの相対量の測定の基礎をなすのは、アンドロゲン抵抗性症候群が目標細胞内におけるAR優勢とEWS優勢との間の平衡の障害に基づいているという理論である。EWSが過剰になるとAR系が過敏になって、必ずしもアンドロゲン作用を持たない分子に反応する。EWSの欠如又は誤機能により感度不足になると、あらゆるレベルでアンドロゲン抵抗性を招く。

【0036】

そのうえ、適当なEWS-cDNAプライマーを用いて、PCRアッセイを構成して、特定の患者において正常なDNA配列の突然変異を検出し、又はノーザンブロットアッセイ用の転写物もしくはin-situ-ハイブリダイゼーション用のDNAを生成することが可能である。

30

【0037】

患者で過度なEWSが検出された場合は、EWSレベルを下げる薬剤又は方策、たとえばEWS又はEWS誘導体に対するアンチセンス核酸や類似の技術を適用して、臨床条件下で当該患者のEWS力価を下げるのが妥当である。同様のことは、ARとEWSとの相互作用を阻止する分子によっても達成できよう。

【0038】

反対に患者のEWSレベルが低すぎる場合は、種々の機構を通してEWS-cDNA、EWSタンパク質又はEWS-DNAを供給して、活性EWSの力価を高めることができよう。したがって本発明の別の観点は、EWS又はEWS誘導体をコードする前記核酸か、又はそのような核酸によってコードされたEWSタンパク質及びEWS誘導体を、NR活性の機能不全が原因の疾患の治療に使用することに関する。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0039】

以下に、本発明を図を参考にして例に基づいて詳細に説明する。

例1

(使用したオリゴヌクレオチド)

ライブラリーインサートのPCR増幅に対するプライマー

50

Act2c5050Eco:gattacgctagcttgggtgg(SEQ ID No.3)

Act2-4939Xho:gttgaagtgaacttggcgggg(SEQ ID No.4)

完全長EWS-cDNAの増幅に対するプライマー

EWS-8-Sal:ggtcgacggacgcttgagagaacgagg(SEQ ID No.5)

C3ESW-c2032-Eco:gggaattctgcggggtctctgcatctagtaggg(SEQ ID No.6)

シーケンスプライマー

XII-139a1:gcttgggtggtcatatgg(SEQ ID No.7)

(使用したベクター)

ライブラリー用のpACT2 (Genbankアクセス番号U29899);

プローブに対するpGBT9誘導体: pGBT9rev及びpGBT(+1)rev (非特許文献13);

PCR断片のクローニング用の.pCR2.1Topoベクター (Invitrogen社);

哺乳類細胞内の発現用のCMXベクター;

レポーター遺伝子アッセイ用のpAHLuc(MMTVプロモーターとルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を含む; A.Cato社);

pSG5AR(アンドロゲン受容体に対するヒト遺伝子を有するpSG5; Genbankアクセス番号AA A51775)

(使用した生体)

酵母株: Y187及びPJ69-2A

E.-coli株: DH5

哺乳類細胞: SH-SY5Y(ドイツ微生物・培養細胞バンク(DSMZ) DSM ACC209);

PC3(アメリカ培養細胞バンク(ATCC):CRL-1435);

PC3AR: pSG5ARで安定にトランスフェクションしたPC3(A.Cato社、カールスルーエ、ドイツ)

アンドロゲン受容体の新しいコモジュレーターを識別するために、酵母 Two-Hybrid法を用いて胎児の脳由来のcDNAライブラリー・ヒト・cDNAライブラリー(Clontech社の「Matchmaker(登録商標)」No.:HY4028AH)をアンドロゲン受容体(AR)の3種類の断片をプローブとしてスクリーニングした。

#### 【0040】

このために、ヒトARに対するcDNAを含んでいるベクターpSG5AR(遺伝子バンクAAA51775)をエンドヌクレアーゼPstIで分解して、3種類のAR-DNA断片を発生させた。これらの断片で最も短いもの(AR4)は受容体のN末端(AS 1-56)をコードし、中位のもの(AR3)は活性化ドメインを有する中央部(AS57-324)をコードし、最も長いもの(AR2)はDNA結合ドメインとリガンド結合ドメイン(DBDとLBD; 図1の概略図参照)とを有するC末端(AS 325-918)をコードする。AR2は、pGBT(+1)revベクターをあらかじめPstIによって直線化してから、このベクターにクローン化した。

#### 【0041】

次いで、AR断片を含むpGBTベクターで酵母株PJ69-2Aを形質転換した。製造者(Clontech)の指示に従い陽性の形質転換体(Trp+)を、胎児の脳から抽出したcDNAライブラリーとともにインキュベートした(Humane Multiple-Tissue-cDNA(MTC), Clontech社のPanel II、カタログ番号K1421-1)。また、製造者(Clontech)の指示に従い、 $3 \times 10^8$  クロオンをスクリーニングした。さらに陽性クロオンを選別して、製造者(Clontech)の指示に従いその - ガラクトシダーゼ活性を試験した。ライブラリーに由来する青色コロニーのインサートを、PCRを用いてプライマーAct2c5050Eco及びAct2-4939Xhoを使用して直接酵母細胞から増幅した。

#### 【0042】

PCR生成物を電気泳動ゲル画像解析によって長さによって分割し、MspIによる分解によって分析した。各々の制限酵素断片パターンの少なくとも1つのサンプルを、シーケンスプライマーXII-139a1を用いて配列決定した。これらの配列はGenbank又はデータバンクIn cyteと比較した。

#### 【0043】

10

20

30

40

50

多重に識別されたインサートの1つは、長さ1500bpであり、配列決定及びデータバンクNCBJとの並列比較により、ヒトEWSのN末端部分(AS319-656)をコードするものとして識別できた(図2の概略図;図3A-Dのアミノ酸配列)。

【0044】

図3A-DはヒトEWSのcDNA配列とそこから派生したアミノ酸配列を示している。図にはエクソン1~17が示されている。ボールド体の文字は、酵母Two-Hybrid法で検出され、AR部分AS325-919に結合する酵母断片を示している。下線部はスプライス異型ESW1-b(実線による下線)もしくはESW1-c(点線による下線)では欠如している配列範囲である。

【0045】

PCRを用い、プライマーEWS-8-SalI及びcESW-c2032-Eco、ならびにClontech社の胸腺cDNA又は脾臓cDNAを用いて、完全長のEWSを増幅し、脾臓からは転写物の完全コード領域が単離され、胸腺からはエクソン15の代わりにエクソン15Bを有する異型が単離された。次いで、増幅されたcDNAはEcoRIとSalIで哺乳類発現ベクターCMXの発現カセットにクローニングされた。

【0046】

図4に示した棒グラフから明らかなように、EWSはSH-SY5Y細胞に一時的にトランスフェクションした後、特に低いアンドロゲン濃度 $10^{-12}$ ~ $10^{-10}$  MolでARシグナル活動の強い共同活性化を誘発する能力がある。このためにそれぞれ6個の反応溝を有する反応プレート上でSH-SY5Y細胞を、ヒトアンドロゲン受容体に対するcDNAを含むベクター(pSG5AR)0.75 $\mu$ g、ルシフェラーゼ遺伝子の前にMMTVプロモーターを含む受容体遺伝子構築物pA Hluc 1.5 $\mu$ g、及びEWS-CMXベクター1 $\mu$ gとコトランスフェクションさせた。トランスフェクションはGibco BRC社のリポフェクチンを使用して、製造者の指示に従って行った。トランスフェクション後、細胞を種々のアンドロゲン量で24時間培養した。細胞は慣用的な溶菌緩衝剤を用いて溶菌し、BMG Lab Technologiesのルミスター・ルミノメーターでルシフェラーゼ活性を測定した。EWS-CMXルシフェラーゼ活性を対照活性と比較した(ブランクCMXベクター)。各々の反応溝内の混合物は微量滴定プレートの4つの溝内で測定した。DHTのない物質の対照値を差し引いた。図4に標準偏差を棒で示した。

【0047】

図5(a)には、正常なヒト組織におけるヒトEWSの組織分布がオートラジオグラフィーに基づいて示されている。このためにEWSの244-656をコードするEWS-cDNA断片を、Megaprime(登録商標)DNAマーキング法(Amersham Life Science)に従い、 $^{32}$ P-dATP及びクレノウフラグメントで標識した。標識されたフラグメントをニックカラム(Pharmacia)上で製造者の指示に従い純化し、Clontech社のヒューマン・ノーザン・プロット(MTN)No.7760-1及び7759-1を用いてハイブリダイゼーションした。図5(a)から明らかなように、EWS-RNAは主として睪丸で発現する。さらに、調査したほとんどの器官で種々のEWS量が検出可能である。

【0048】

図5(b)は、正常なヒト組織におけるヒトARの組織分布を示す。

図5の(a)及び(b)から、組織内の上記2種類のタンパク質の基準発現を読み取ることができる。

【0049】

図4は、SH-SY5Y細胞におけるARシグナルの共同活性化を示している。それぞれ6個の反応溝を有する反応プレートで、溝当り1 $\mu$ gコアクチベーター、1.5 $\mu$ g MMTV-ルシフェラーゼ及び0.75 $\mu$ g pSG5ARプラスミドを添加した。これら6個の混合物をそれぞれ微量滴定プレートの4つの溝に移して測定した。DHTのない物質の対照値を差し引いた。標準偏差をSDで示した。すべてのシグナルにおいてDHTのない対照する対照値を差し引いた。

【0050】

図5(a)は、EWS転写物の組織分布を示す(Clontech社のノーザン・プロットMTN)。製造者(Amersham)の指示に従い、アミノ酸244-656をコードするEWS-cDNA断片にランダムプライマー法を適用し、 $^{32}$ P-dATP及びクレノウフラグメントで標識した。プロット

10

20

30

40

50

をプローブでハイブリダイゼーションし、洗浄してフィルムに移し、現像した。

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1】アンドロゲン受容体（AR）及びAR2断片に対する遺伝子の概略図。

【図2】ユーイング肉腫タンパク質（EWS）に対する遺伝子の概略図。

【図3A】EWSエクソン（exon）及びEWSタンパク質の配列を示す図。

【図3B】EWSエクソン（exon）及びEWSタンパク質の配列を示す図。

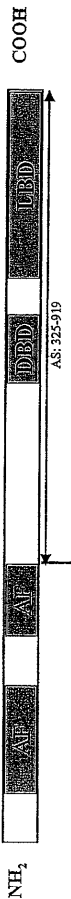
【図3C】EWSエクソン（exon）及びEWSタンパク質の配列を示す図。

【図3D】EWSエクソン（exon）及びEWSタンパク質の配列を示す図。

【図4】SH-SY5Y細胞内のARシグナルの共同活性化（Co-Aktivierung）を示すグラフ。

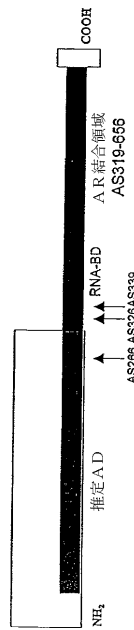
【図5】（a）はEWS転写物の組織分布を示す図、（b）はAR転写物の組織分布を示す図

【図1】



AS 325-919: アンドロゲン受容体断片2  
 AS: アミノ酸  
 AF: 活性化ドメイン  
 DBD: DNA結合ドメイン  
 LBD: リガント結合ドメイン

【図2】

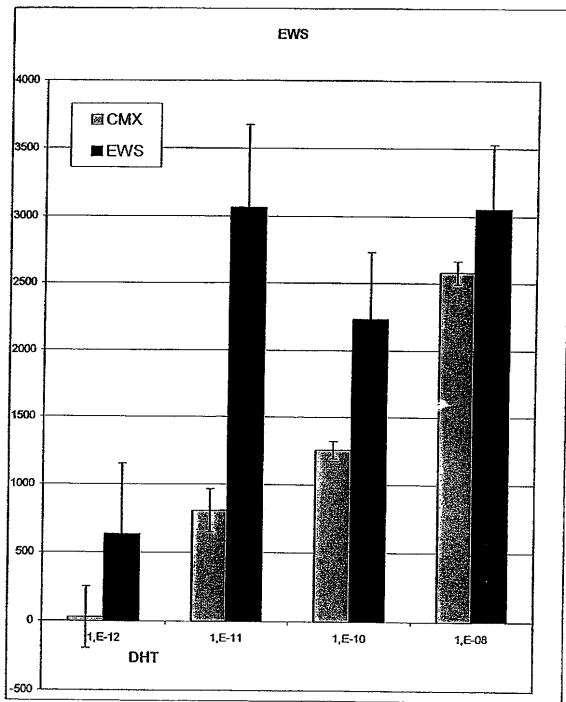


FLI-1又はユーイング肉腫タンパク質に  
 おいてEWSのC末端に置き換わるその他の  
 タンパク質との接合部

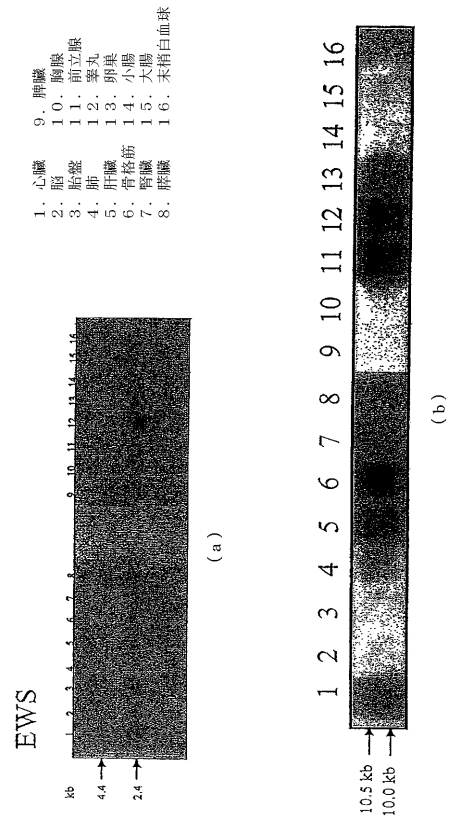
青: RNA結合ドメイン  
 暗褐色: アンドロゲン受容体結合領域 (AS 319-656)  
 AD: 活性化ドメイン  
 BD: 結合ドメイン



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

200427152400001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 N 15/00	A
// C 0 7 K 14/47	A 6 1 K 37/02	
	C 0 7 K 14/47	

(72)発明者 マイク オーベンドルフ

ドイツ連邦共和国 D - 9 9 4 2 3 バイマル ポール - シュナイダー - シュトラーセ 1 4

(72)発明者 ジークムント ボルフ

ドイツ連邦共和国 D - 0 7 6 3 9 バド クロースターローシュニッツ ブーテルバウム 1 5

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA05 CA06 CA09 DA02 DA06 DA12  
 EA04 FA02 FA07 FA10 GA11 GA18 GA19 HA03 HA08 HA14  
 4B063 QA01 QA18 QQ20 QQ22 QR33 QR58 QR59 QR66 QR69 QR77  
 QS12 QS24 QS28 QS36 QX02  
 4C084 AA02 AA13 BA44 NA14 ZB21 ZC10  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB21 ZC10  
 4H045 AA30 BA10 CA40 EA20 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	确定物质的激素作用的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004271524A</a>	公开(公告)日	2004-09-30
申请号	JP2004052619	申请日	2004-02-27
申请(专利权)人(译)	lenafarumu GMBH UND代码. 卡格		
[标]发明人	マイクオーベンドルフ ジークムントボルフ		
发明人	マイク オーベンドルフ ジークムント ボルフ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K38/00 A61K48/00 A61P5/26 A61P43/00 C07K14/47 C12N15/09 C12Q1/02 G01N33/68 G01N33/74		
CPC分类号	A61P5/26 A61P43/00 G01N33/6875 G01N33/74 G01N33/743 G01N2500/02 G01N2500/10		
FI分类号	G01N33/53.A G01N33/53.ZNA.B A61K31/7088 A61K48/00 A61P5/26 A61P43/00.111 C12Q1/02 C12N15/00.A A61K37/02 C07K14/47 A61K38/00 G01N33/53.BZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA07 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ20 4B063/QQ22 4B063/QR33 4B063/QR58 4B063/QR59 4B063/QR66 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QS12 4B063/QS24 4B063/QS28 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA44 4C084/NA14 4C084/ZB21 4C084/ZC10 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB21 4C086/ZC10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	昂达诚		
优先权	10309280 2003-03-04 DE 60/465692 2003-04-25 US		
其他公开文献	JP3862703B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

**摘要(译)**  
 解决的问题：提供一种能够容易，廉价且快速地对被测物质的激素作用进行高度可靠且灵敏的测定的方法。一种确定荷尔蒙作用的方法。EWS（尤文氏肉瘤蛋白）或使大肠杆菌的EWS衍生物与核受体（NR）或其衍生物和受试物质接触，并确定受试物质对EWS蛋白或其衍生物与NR或其衍生物结合的影响，或包括确定测试物质对配体诱导的NR活性影响的步骤。一种确定雄激素受体与EWS之间协同调节机制异常的方法。涉及测量受体和EWS的细胞浓度以及鉴定影响NR活性的物质的方法EWS蛋白或其衍生物用于区分和表征。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 公開特許公報(A)	(11) 特許出願公開特開2004- (P2004- 平成16年9月30日(20
(5) Int. Cl. <sup>7</sup>	FI	テーマコード(参)
G01N 33/53	GO1N 33/53 A	4B024
A61K 31/7088	GO1N 33/53 ZNAB	4B063
A61K 38/00	A61K 31/7088	4C084
A61K 48/00	A61K 48/00	4C086
A61P 5/26	A61P 5/26	4H045
	審査請求 有 請求項の数 15 O L (全 14 頁) 最終	
(21) 出願番号 特願2004-52619 (P2004-52619)	(71) 出願人 502148901	
(22) 出願日 平成16年2月27日(2004.2.27)	イェナファルム ゲーエム・ベアハ ト コー. カーゲー	
(31) 優先権主張番号 10309280.3	JENAPHARM GmbH & . KG	
(32) 優先日 平成15年3月4日(2003.3.4)	ドイツ連邦共和国 D-07744 ナ オットー・スコット・シュト 15	
(33) 優先権主張国 ドイツ(DE)	(74) 代理人 100068755	
(31) 優先権主張番号 60/465,692	弁理士 恩田 博宣	
(32) 優先日 平成15年4月25日(2003.4.25)	(74) 代理人 100105957	
(33) 優先権主張国 米国(US)	弁理士 恩田 誠	