

【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象におけるCRCまたはCRCを発症する素因を診断する方法であって、患者由来生体試料におけるC10orf3の発現レベルを決定する段階を含み、ここで該遺伝子の正常対照レベルと比較した場合の該レベルの増加により、該対象がCRCを患っているかまたは発症する危険性があることが示される方法。

【請求項2】

増加が正常対照レベルよりも少なくとも10%高い、請求項1記載の方法。

【請求項3】

以下からなる群より選択されるいずれか1つの方法によって発現レベルが決定される、請求項1記載の方法： 10

- (a) C10orf3のmRNAの検出、
- (b) C10orf3によってコードされるタンパク質の検出、および
- (c) C10orf3によってコードされるタンパク質の生物活性の検出。

【請求項4】

患者由来生体試料の遺伝子転写物に対するC10orf3プローブのハイブリダイゼーションを検出することで発現レベルが決定される、請求項1記載の方法。

【請求項5】

ハイブリダイゼーション段階がDNAアレイで行われる、請求項4記載の方法

。

20

【請求項6】

生体試料が上皮細胞を含む、請求項1記載の方法。

【請求項7】

生体試料がCRC細胞を含む、請求項1記載の方法。

【請求項8】

生体試料がCRCに由来する上皮細胞を含む、請求項4記載の方法。

【請求項9】

以下の段階を含む、CRCを治療または予防するための化合物をスクリーニングする方法：

- (a) 被験化合物をC10orf3の核酸によってコードされるポリペプチドと接触させる段階；
- (b) 前記ポリペプチドと被験化合物との間の結合活性を決定する段階；および 30
- (c) 前記ポリペプチドに結合する化合物を選択する段階。

【請求項10】

以下の段階を含む、CRCを治療または予防するための化合物をスクリーニングする方法：

- (a) 候補化合物をC10orf3を発現する細胞と接触させる段階；および
- (b) C10orf3の発現レベルを低減させる化合物を選択する段階。

【請求項11】

細胞が結腸直腸癌細胞を含む、請求項10記載の方法。

【請求項12】

以下の段階を含む、CRCを治療または予防するための化合物をスクリーニングする方法：

- (a) 被験化合物をC10orf3の核酸によってコードされるポリペプチドと接触させる段階； 40
- (b) 段階(a)のポリペプチドの生物活性を検出する段階；および
- (c) 被験化合物の非存在下で検出される生物活性と比較して、C10orf3の核酸によってコードされるポリペプチドの生物活性を抑制する化合物を選択する段階。

【請求項13】

ポリペプチドの生物活性が細胞増殖活性である、請求項12記載の方法。

【請求項14】

ポリペプチドの生物活性がATP-ase活性である、請求項12記載の方法。

【請求項15】

以下の段階を含む、CRCを治療または予防するための化合物をスクリーニングする方法：

- (a) 候補化合物を、C10orf3の転写制御領域およびその転写制御領域の制御下で発現され 50

るレポーター遺伝子を含むベクターを導入した細胞と接触させる段階;

(b) 該レポーター遺伝子の活性を測定する段階;ならびに

(c) 対照と比較して、該レポーター遺伝子の発現レベルを低減させる化合物を選択する段階。

【請求項16】

C10orf3の核酸配列またはポリペプチドに結合する検出試薬を含むキット。

【請求項17】

C10orf3のコード配列に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス組成物を対象に投与する段階を含む、対象におけるCRCを治療または予防する方法。

【請求項18】

対象におけるCRCを治療または予防する方法であって、siRNA組成物を対象に投与する段階を含み、ここで該組成物によりC10orf3の核酸配列の発現が減少する方法。

【請求項19】

siRNAが、標的配列として配列番号:21のヌクレオチド配列を含むセンス鎖を含む、請求項18記載の方法。

【請求項20】

siRNAが一般式5'-[A]-[B]-[A']-3'を有し、式中、
[A]は配列番号:21のヌクレオチド配列に相当するリボヌクレオチド配列であり、
[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、および
[A']は[A]の相補配列からなるリボヌクレオチド配列である、
請求項19記載の方法。

【請求項21】

組成物がトランスフェクション増強剤を含む、請求項18記載の方法。

【請求項22】

C10orf3の核酸によってコードされるタンパク質に結合する抗体またはその断片の薬学的有効量を対象に投与する段階を含む、対象におけるCRCを治療または予防する方法。

【請求項23】

C10orf3の核酸によってコードされるポリペプチドもしくは該ポリペプチドの免疫学的活性断片、またはこのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むワクチンを対象に投与する段階を含む、対象におけるCRCを治療または予防する方法。

【請求項24】

請求項9~15のいずれか一項記載の方法によって得られる化合物を投与する段階を含む、対象におけるCRCを治療または予防する方法。

【請求項25】

有効成分として、C10orf3のポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチドまたは低分子干渉RNAの薬学的有効量、および薬学的に許容される担体を含む、CRCを治療または予防するための組成物。

【請求項26】

siRNAが、標的配列として配列番号:21のヌクレオチド配列を含むセンス鎖を含む、請求項25記載の組成物。

【請求項27】

siRNAが一般式5'-[A]-[B]-[A']-3'を有し、式中、
[A]は配列番号:21のヌクレオチド配列に相当するリボヌクレオチド配列であり、
[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、および
[A']は[A]の相補配列からなるリボヌクレオチド配列である、
請求項26記載の組成物。

【請求項28】

有効成分として、C10orf3の核酸によってコードされるタンパク質に結合する抗体またはその断片の薬学的有効量、および薬学的に許容される担体を含む、CRCを治療または予防するための組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 29】

有効成分として、請求項9～15のいずれか一項記載の方法によって選択される化合物の薬学的有効量、および薬学的に許容される担体を含む、CRCを治療または予防するための組成物。

【請求項 30】

センス鎖が配列番号:21に相当するリボヌクレオチド配列を含み、ならびにアンチセンス鎖が該センス鎖に相補的であるリボヌクレオチド配列を含み、該センス鎖および該アンチセンス鎖が互いにハイブリダイズして二本鎖分子を形成し、C10orf3遺伝子を発現する細胞に導入された場合に該二本鎖分子が該遺伝子の発現を阻害する、センス鎖およびアンチセンス鎖を含む二本鎖分子。

10

【請求項 31】

センス鎖が配列番号:1由来の約19～約25の連続したヌクレオチドを含む、請求項30記載の二本鎖分子。

【請求項 32】

センス鎖が配列番号:21に相当するリボヌクレオチド配列からなる、請求項30記載の二本鎖分子。

【請求項 33】

単一のリボヌクレオチド転写物がセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、二本鎖が該センス鎖と該アンチセンス鎖を連結する一本鎖リボヌクレオチド配列をさらに含む、請求項30記載の二本鎖分子。

20

【請求項 34】

請求項30記載の二本鎖分子をコードするベクター。

【請求項 35】

二次構造を有する転写物をコードし、この転写物がセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む、請求項34記載のベクター。

【請求項 36】

転写物がセンス鎖とアンチセンス鎖を連結する一本鎖リボヌクレオチド配列をさらに含む、請求項34記載のベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

発明の分野

本発明は結腸直腸癌を診断する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

結腸直腸癌（CRC）は、世界的に最も多く見られる固形腫瘍の一つであり、2000年には、約940,000人の人が結腸癌であると診断された（1）。結腸直腸癌の診断および治療においては様々な進展が見られるが、進行期の患者の予後を見ると死亡率は高い。予後を改善するためには、早期の癌腫を検出するための感度が良くかつ特異的な診断バイオマーカーの開発、およびより効果的でありかつより害の少ない治療薬の開発が望まれる。この目的を実現するには、結腸直腸癌の発生の分子機構をさらに理解することが必要である。

40

【0003】

近年の分子的研究により、結腸直腸癌の発生には、APC、p53、 β -カテニン、およびK-rasを含む腫瘍抑制遺伝子および/または癌遺伝子の遺伝子変化を含めた遺伝子変化の蓄積が関与していることが明らかにされた（2～5）。さらに、メチル化の変化（6）および刷り込みの欠損（7）、ならびに/または遺伝子変化もしくはその他の未知の機構に起因する遺伝子発現の調節解除などのエピジェネティックな事象が結腸直腸腫瘍の発生の根底にある。これらの遺伝子変化およびエピジェネティックな変化はそれぞれ、種々の遺伝子の発現に及ぼす影響が非常に複雑であるため、それぞれの癌症例によって発現プロファイルは

50

大きく異なる。したがって、結腸直腸癌の発生を包括的に理解するには、結腸直腸腫瘍におけるゲノム全域にわたる発現プロファイルを調べる必要がある。

【0004】

cDNAマイクロアレイを用いた発現プロファイルの解析は、種々の生理的状态もしくは薬剤または病的状態に反応して発現が変化する遺伝子を同定するための有望な方法である(10、11)。この技術はまた、細胞集団のサブセットの生理的表現型または病的表現型を反映し得る系統的な発現プロファイルを提供し得る。このアプローチは、種々の新生物に関する遺伝子の解析、および特定の表現型の検出に有用であることが判明している(12~14)。cDNAマイクロアレイ技術により、正常細胞および悪性細胞における遺伝子発現の包括的プロファイルを得て、悪性細胞とそれに対応する正常細胞における遺伝子発現を比較することが可能になった(Okabe et al., *Cancer Res* 61:2129-37 (2001); Kitahara et al., *Cancer Res* 61: 3544-9 (2001); Lin et al., *Oncogene* 21:4120-8 (2002); Hasegawa et al., *Cancer Res* 62:7012-7 (2002))。このアプローチにより癌細胞の複雑な性質を明らかにすることが可能となり、かつこれは発癌現象の機構の理解に役立つ。腫瘍において調節が解除される遺伝子の同定は、個人の癌のより正確かつ厳密な診断、および新規治療標的の開発をもたらす可能性がある(Bienz and Clevers, *Cell* 103:311-20 (2000))。ゲノム全体にわたる観点から腫瘍の発生機構を明らかにし、診断および新規治療薬の開発のための標的分子を見出すため、本発明者らは遺伝子23040個のcDNAマイクロアレイを用いて腫瘍細胞の発現プロファイルを解析している(Okabe et al., *Cancer Res* 61: 2129-37 (2001); Kitahara et al., *Cancer Res* 61:3544-9 (2001); Lin et al., *Oncogene* 21:4120-8 (2002); Hasegawa et al., *Cancer Res* 62:7012-7 (2002))。これらの試みにより、対応する非癌細胞と比較して、癌組織において高い頻度で上方制御されていることが明らかである、ESTを含む多くの遺伝子が特定されている。

10

20

【0005】

発癌の機構を明らかにするように計画された研究により、抗腫瘍剤の分子標的の同定が既に促進されている。例えば、その活性化が翻訳後ファルネシル化に依存するRasに関連した増殖シグナル伝達経路を阻害するように本来開発されたファルネシルトランスフェラーゼ(FTI)の阻害剤は、動物モデルにおけるRas依存性腫瘍の治療に有効である(He et al., *Cell* 99:335-45 (1999))。乳癌の約30%で過剰発現する受容体であるHER2/neuは、特異的なリガンドの結合に反応して増殖シグナルを媒介する。癌原遺伝子受容体HER2/neuを拮抗するために、抗癌剤と抗HER2モノクローナル抗体、トラスツズマブとの組み合わせを用いたヒトの臨床試験が行われ、乳癌患者の臨床反応および全生存率の改善が達成されている(Molina et al., *Cancer Res* 16:4744-9 (2001); Lin et al., *Cancer Res* 61:6345-9(2001))。bcr-abl融合タンパク質を選択的に不活化するチロシンキナーゼ阻害剤、STI-571は、bcr-ablチロシンキナーゼの構成的活性化が白血球の形質転換において重要な役割を果たす慢性骨髄性白血病を治療するために開発された(O'Dwyer et al., *Curr Opin Oncol* 12:594-7 (2000))。これらの種類の薬剤は、特定の遺伝子産物の発癌活性を抑制するために設計されている(Fujita et al., *Cancer Res* 61:7722-6 (2001))。したがって、癌細胞において一般に上方制御される遺伝子産物は、新規抗癌剤を開発するための有力な標的となり得る。

30

40

【0006】

CD8+細胞傷害性Tリンパ球(CTL)が、MHCクラスI分子上に提示された腫瘍関連抗原(TAA)に由来するエピトープペプチドを認識し、腫瘍細胞を溶解させることが実証された。TAAの最初の例としてMAGEファミリーが発見されて以来、免疫学的アプローチを用いて多くの他のTAAが発見されている(Boon, *Int J Cancer* 54: 177-80 (1993); Boon and van der Bruggen, *J Exp Med* 183: 725-9 (1996); van der Bruggen et al., *Science* 254: 1643-7 (1991); Brichard et al., *J Exp Med* 178: 489-95 (1993); Kawakami et al., *J Exp Med* 180:347-52 (1994))。発見されたTAAのいくつかは、現在、免疫療法の標的として臨床開発が行われている段階である。これまでに発見されたTAAには: MAGE(van der Bruggen et al., *Science* 254: 1643-7 (1991))、gp100(Kawakami et al., *J Exp Med* 18

50

0:347-52 (1994)) ; SART (Shichijo et al., J Exp Med 187: 277-88 (1998)) ; および NY-ESO-1 (Chen et al., Proc Natl Acad Sci USA 94: 1914-8 (1997)) が含まれる。他方では、腫瘍細胞において特異的に過剰発現されることが実証されている遺伝子産物が、細胞性免疫反応を誘導する標的として認識されることが示された。そのような遺伝子産物には、p53 (Umano et al., Brit J Cancer 84: 1052-7 (2001)) ; HER2/neu (Tanaka et al., Brit J Cancer 84: 94-9 (2001)) ; CEA (Nukaya et al., Int J Cancer 80: 92-7 (1999)) 等が含まれる。

【 0 0 0 7 】

TAAに関する基礎的および臨床的研究における著しい進展にもかかわらず (Rosenbeg et al., Nature Med 4: 321-7 (1988) ; Mukherji et al., Proc Natl Acad Sci USA 92: 80 10
78-82 (1995) ; Hu et al., Cancer Res 56: 2479-83 (1996))、結腸直腸癌を含む腺癌の治療に関して、限られた数の候補TAAしか得られていない。癌細胞において大量に発現され、同時にその発現が癌細胞に限られているTAAは、免疫療法標的としての有望な候補の代表例である。さらに、強力でありかつ特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導する新規TAAの同定により、様々な種類の癌においてペプチドワクチン戦略の臨床用途が促進されると考えられる。(Boon and van der Bruggen, J Exp Med 183: 725-9 (1996) ; van der Bruggen et al., Science 254: 1643-7 (1991) ; Brichard et al., J Exp Med 178: 489-95 (1993) ; Kawakami et al., J Exp Med 180: 347-52 (1994) ; Shichijo et al., J Exp Med 187: 277-88 (1998) ; Chen et al., Proc Natl Acad Sci USA 94: 1914-8 (1997) ; Harris, J Natl Cancer Inst 88: 1442-5 (1996) ; Butterfield et al., Cancer Res 59: 3134-42 20
(1999) ; Vissers et al., Cancer Res 59: 5554-9 (1999) ; van der Burg et al., J Immunol 156: 3308-14 (1996) ; Tanaka et al., Cancer Res 57: 4465-8 (1997) ; Fujie et al., Int J Cancer 80: 169-72 (1999) ; Kikuchi et al., Int J Cancer 81: 459-66 (1999) ; Oiso et al., Int J Cancer 81: 387-94 (1999))。

【 0 0 0 8 】

ある健常ドナー由来のペプチド刺激した末梢血単核細胞 (PBMC) は、ペプチドに反応して有意なレベルのIFN- γ を産生するが、⁵¹Cr放出アッセイ法においてHLA-A24またはHLA-A0201制限様式で腫瘍細胞に対する細胞傷害性をほとんど起こさないことが繰り返し報告されている (Kawano et al., Cancer Res 60: 3550-8 (2000) ; Nishizaka et al., Cancer Res 60: 4830-7 (2000) ; Tamura et al., Jpn J Cancer Res 92: 762-7 (2001))。しかし 30
ながら、HLA-A24およびHLA-A0201はいずれも日本人および白人において一般的なHLA対立遺伝子の1つである (Date et al., Tissue Antigens 47: 93-101 (1996) ; Kondo et al., J Immunol 155: 4307-12 (1995) ; Kubo et al., J Immunol 152: 3913-24 (1994) ; Imanishi et al., Proceeding of the eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference Oxford University Press, Oxford, 1065 (1992) ; Williams et al., Tissue Antigen 49: 129 (1997))。したがって、これらのHLAによって提示される癌腫の抗原ペプチドは、日本人および白人の癌腫の治療に特に有用である可能性がある。さらに、インビトロでの低親和性CTLの誘導は通常は高濃度でのペプチドの使用に起因することが知られており、これにより抗原提示細胞 (APC) 上で高レベルの特異的ペプチド/MHC複合体が生じ、これらのCTLが効果的に活性化されることになる (Alexander-Miller et al. 40
, Proc Natl Acad Sci USA 93: 4102-7 (1996))。

【 発明の開示 】

【 0 0 0 9 】

発明の概要

新規抗癌剤を開発するための有用な分子標的を探索するため、本発明者らはゲノム全域にわたるcDNAマイクロアレイを用いて、癌患者の臨床試料の発現プロファイルを解析している。結腸癌細胞を用いた実験において、C10orf3をコードする遺伝子が発現上昇を示したものの1つであった。本発明者らは、C10orf3 siRNAをトランスフェクションすることで、培養下の結腸癌細胞の増殖が抑制されることを示した。

【 0 0 1 0 】

本発明は、結腸直腸癌（CRC）と関連するC10orf3の遺伝子発現パターンの発見に基づく。本発明において、本発明者らは、結腸直腸癌においてC10orf3が上方制御されている頻度が高いこと、ならびにC10orf3が精巣において大量に発現され、小腸、結腸、胃、胎盤、および卵巣においてわずかに発現されることを明らかにする。癌細胞においてC10orf3の発現を減少させると細胞の増殖が抑制されるため、C10orf3は癌細胞の増殖に必須である可能性が高い。これらのデータは結腸直腸癌の発生のさらなる理解に役立ち、また結腸癌の新規治療戦略を開発するための手がかりを提供する可能性がある。

【0011】

したがって、本発明は、組織試料等の患者由来生体試料におけるC10orf3の発現レベルを決定することによって、対象におけるCRCの診断または素因を決定する方法を扱う。正常細胞は結腸直腸組織から得られる細胞である。正常対照レベルと比較した場合のC10orf3の発現レベルの増加により、対象がCRCを発症しているかまたは発症する危険性があることが示される。

10

【0012】

正常対照レベルとは、正常健常個体またはCRCを患っていないことが分かっている個体の集団において検出される遺伝子発現のレベルを意味する。対照レベルとは、単一の参照集団または複数の発現パターンに由来する単一の発現パターンである。例えば、対照レベルは、以前に試験した細胞による発現パターンのデータベースであってよい。正常個体とは、CRCの臨床症状がない個体である。

【0013】

正常対照レベルと比較した場合の被験試料中に検出されるC10orf3の発現レベルの増加により、（試料を採取した）対象がCRCを発症しているかまたは発症する危険性があることが示される。

20

【0014】

遺伝子発現は、対照レベルと比較して10%、25%、50%増加している。または、遺伝子発現は、対照レベルと比較して、0.1、0.2、1、2、5、10倍、またはそれ以上増加する。発現は、ハイブリダイゼーション、例えば患者由来組織試料の遺伝子転写産物に対するC10orf3遺伝子プローブを検出することにより決定される。

【0015】

患者由来組織試料は、被験対象、例えばCRCを有することが公知であるかまたはその疑いがある患者由来の任意の組織である。例えば、組織は結腸直腸癌細胞を含む。例えば、組織は結腸由来の細胞である。

30

【0016】

本発明はさらに、C10orf3を発現する被験細胞を被験物質と接触させ、C10orf3の発現レベルまたは活性を決定することにより、C10orf3の発現または活性を阻害する物質を同定する方法を提供する。被験細胞は結腸直腸癌由来の結腸細胞等の結腸細胞である。本遺伝子の正常対照レベルと比較したレベルの減少により、被験物質がC10orf3の阻害剤であり、CRCの症状を軽減することが示される。

【0017】

本発明はまた、C10orf3核酸配列に結合する、または本核酸配列によってコードされる遺伝子産物に結合する検出試薬を伴うキットを提供する。

40

【0018】

本治療法は、アンチセンス組成物を対象に投与することにより、対象におけるCRCを治療または予防する方法を含む。本アンチセンス組成物は特定の標的遺伝子の発現を減少させるものであり、例えば、C10orf3の核酸配列に相補的なヌクレオチドを含むアンチセンス組成物である。別の方法は、低分子干渉RNA（siRNA）組成物を対象に投与する段階を含む。siRNA組成物により、C10orf3の核酸の発現が減少する。さらに別の方法では、対象におけるCRCの治療または予防は、リボザイム組成物を対象に投与することによって行われる。核酸特異的リボザイム組成物により、C10orf3の核酸の発現が減少する。関心対象の遺伝子のインビボ発現に適した機構は、当技術分野において公知である。

50

【0019】

本発明はまた、ワクチンおよびワクチン接種法を含む。例えば、対象におけるCRCを治療または予防する方法は、C10orf3の核酸によってコードされるポリペプチド、またはそのようなポリペプチドの免疫学的活性断片を含むワクチンを対象に投与することによって行われる。免疫学的活性断片とは、天然タンパク質の全長よりも長さが短く、かつ免疫応答を誘導するポリペプチドである。例えば、免疫学的活性断片は、少なくとも8残基長であり、T細胞またはB細胞等の免疫細胞を刺激する。免疫細胞刺激は、細胞増殖、サイトカイン（例えばIL-2）の生成、または抗体の産生を決定することにより測定する。

【0020】

他に定義しない限り、本明細書で使用する専門用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者によって共通に理解される意味と同じ意味を有する。本発明の実施または試験においては、本明細書に記載するものと類似または同等の方法および材料を用いることができるが、適した方法および材料を以下に記載する。本明細書において言及する刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献はすべて、全体が参照により組み入れられる。抵触する場合には、本明細書が定義も含め調整することになる。さらに、材料、方法、および実施例は説明するためのみのものであり、制限する意図はない。

10

【0021】

本明細書に記載する方法の1つの利点は、明白な臨床症状が検出される前に疾患が同定される点である。本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明、および特許請求の範囲から明らかになると考えられる。

20

【0022】

詳細な説明

本発明は、一つには、CRCを有する患者の結腸細胞由来におけるC10orf3の発現上昇の発見に基づく。遺伝子発現の上昇は、包括的なcDNAマイクロアレイシステムを用いて同定された。

【0023】

遺伝子23,040個を含むcDNAマイクロアレイを用いて、20名の患者の包括的な遺伝子発現プロファイルを予め構築した。C10orf3は、CRC患者において高レベルで発現されることが見出された。その過程において、患者の血清において癌関連タンパク質を検出する可能性を有する候補分子マーカーが選択され、ヒト結腸直腸癌におけるシグナル抑制戦略を開発するためのいくつかの有力な標的が見出された。C10orf3は、cDNAマイクロアレイ上でUPA AA1として示される。

30

【0024】

本明細書で同定されたC10orf3は、CRCのマーカーとして、およびCRCの症状を治療または軽減するためにその発現が変更される遺伝子標的として、診断を目的として使用される。

【0025】

他に特に示さない限り、「CRC」は本明細書に開示される配列の任意のものを意味する。

【0026】

細胞試料中のC10orf3の発現を測定することにより、CRCが診断される。同様に、種々の物質に応答したC10orf3の発現を測定することにより、CRCを治療するための物質が同定され得る。

40

【0027】

本発明は、C10orf3の発現を決定する（例えば測定する）段階を含む。GeneBank（商標）データベースエントリーによりC10orf3配列に関して提供される配列情報を用いて、当業者に周知の技法によりC10orf3が検出および測定される。例えば、配列データベースエントリー内のC10orf3に相当する配列を用いて、例えばノーザンブロットハイブリダイゼーション解析においてC10orf3 RNA配列を検出するためのプローブを構築することができる。別の例として、この配列を用いて、例えば逆転写に基づくポリメラーゼ連鎖反応法等

50

の増幅に基づく検出法においてC10orf3を特異的に増幅するためのプライマーを構築することができる。

【0028】

次いで、被験細胞集団、例えば患者由来組織試料におけるC10orf3の発現レベルを、参照集団におけるC10orf3の発現レベルと比較する。参照細胞集団は、比較するパラメータが公知である1つまたは複数の細胞、すなわちCRC細胞または非CRC細胞を含む。

【0029】

参照細胞集団と比較した被験細胞集団における遺伝子発現のパターンがCRCまたはその素因を示すか否かは、参照細胞集団の組成に依存する。例えば、参照細胞集団が非CRC細胞から構成される場合、被験細胞集団と参照細胞集団の類似した遺伝子発現パターンにより、被験細胞集団が非CRCであることが示される。逆に、参照細胞集団がCRC細胞から構成される場合、被験細胞集団と参照細胞集団の類似した遺伝子発現プロファイルにより、被験細胞集団がCRC細胞を含むことが示される。

10

【0030】

被験細胞集団におけるCRCマーカー遺伝子の発現レベルは、その発現レベルが対応するC10orf3の発現レベルと1.0、1.5、2.0、5.0、10.0倍、またはそれ以上の倍率を超えて参照細胞集団と異なる場合に、参照細胞集団の発現レベルとは変化したと見なされる。

【0031】

被験細胞集団と参照細胞集団との差次的な遺伝子発現は、対照核酸、例えばハウスキーピング遺伝子に対して標準化される。例えば、対照核酸は、細胞のCRC状態または非CRC状態に依存して異なることが公知である核酸である。被験核酸および参照核酸における対照核酸の発現レベルを用いて、比較する集団のシグナルレベルを標準化することができる。対照遺伝子には、 α -アクチン、グリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素、またはリボソームタンパク質P1が含まれる。

20

【0032】

被験細胞集団を、複数の参照細胞集団と比較する。複数の参照集団はそれぞれ、公知のパラメータにおいて異なってよい。したがって、被験細胞集団を、例えばCRC細胞を含むことが分かっている第二の参照細胞集団と、また同様に例えば非CRC細胞（正常細胞）を含むことが分かっている第二の参照集団と比較してもよい。被験細胞は、CRC細胞を含むことが分かっているかまたは含むと疑われる対象由来の組織型または細胞試料中に含まれる。

30

【0033】

被験細胞は、身体組織または例えば生体液（血液または尿等）といった体液から得られる。例えば、被験細胞は組織から精製される。被験細胞集団は、好ましくは上皮細胞を含む。本上皮細胞は、CRCであることが分かっているかまたはその疑いのある組織に由来する。

【0034】

参照細胞集団の細胞は、被験細胞に類似した組織型に由来する。任意で、参照細胞集団は細胞株、例えばCRC細胞株（陽性対照）または正常非CRC細胞株（陰性対照）である。または、対照細胞集団は、アッセイされるパラメータまたは条件が公知である細胞由来の分子情報のデータベースに由来する。

40

【0035】

対象は好ましくは哺乳動物である。哺乳動物は、例えばヒト、非ヒト霊長動物、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシであってよい。

【0036】

本明細書において開示するC10orf3の発現は、当技術分野において公知の方法を用いて、タンパク質または核酸レベルで決定される。例えば、本配列を特異的に認識するプローブを用いたノーザンハイブリダイゼーション解析を用いて、遺伝子発現を決定することができる。または、例えばC10orf3に特異的なプライマーを用い、逆転写に基づいたPCRアッセイ法を用いて、発現を測定する。発現はまた、タンパク質レベルで、すなわち本明細書

50

に記載の遺伝子産物によってコードされるポリペプチドまたはその生物活性のレベルを測定することにより決定される。そのような方法は当技術分野において周知であり、これには例えば、C10orf3によってコードされるタンパク質に対する抗体に基づいた免疫測定法が含まれる。この遺伝子によってコードされるタンパク質の生物活性もまた周知である。

【0037】

CRCの診断

CRCは、細胞の被験集団（すなわち、患者由来生体試料）に由来するC10orf3の発現レベルを測定することにより診断される。好ましくは、被験細胞集団は上皮細胞、例えば結腸組織から得られる細胞を含む。遺伝子発現はまた、血液または尿等の他の生体液から測定される。タンパク質レベルを測定するために、他の生体試料を使用することもできる。例えば、診断する対象に由来する血液または血清中のタンパク質レベルを、免疫測定法または生物学的アッセイ法により測定することができる。

10

【0038】

C10orf3の発現を被験細胞または生体試料において決定し、次いで正常対照発現レベルと比較する。正常対照レベルとは、CRCを患っていないことが公知の集団において典型的に見出されるC10orf3の発現プロファイルである。C10orf3の患者由来組織試料における発現レベルの増加により、対象がCRCを発症しているかまたは発症する危険性があることが示される。

【0039】

正常対照レベルと比較して、被験集団におけるC10orf3が変化した場合、対象がCRCを発症しているかまたは発症する危険性があることが示される。

20

【0040】

C10orf3発現または活性を阻害する物質の同定

C10orf3の発現または活性を阻害する物質は、C10orf3を発現する被験細胞集団を被験物質と接触させ、C10orf3の発現レベルまたは活性を決定することによって同定される。正常対照レベルと比較した場合の（または被験物質の非存在下でのレベルと比較した場合の）物質の存在下での発現または活性の減少により、その物質がC10orf3の阻害剤であり、CRCの阻害に有用であることが示される。

【0041】

被験細胞集団は、C10orf3を発現する任意の細胞である。例えば、被験細胞集団は、細胞が結腸であるかまたは結腸に由来するような上皮細胞を含む。例えば、被験細胞は、結腸直腸癌に由来する不死化細胞株である。または、被験細胞は、C10orf3をトランスフェクションした細胞、またはレポーター遺伝子に機能的に連結したC10orf3由来の制御配列（例えば、プロモーター配列）をトランスフェクションした細胞である。

30

【0042】

対象におけるCRCの治療効果の評価

本明細書において同定されたC10orf3の差次的発現により、CRCの治療過程をモニターすることも可能になる。本方法では、CRCの治療を受けている対象から被験細胞集団が提供される。必要に応じて、被験細胞集団は、治療前、治療中、または治療後の様々な時点で対象から採取される。次いで、その細胞集団においてC10orf3の発現を決定し、CRC状態が公知である細胞を含む参照細胞集団と比較する。参照細胞は治療に暴露されていない。

40

【0043】

参照細胞集団がCRC細胞を含まない場合、被験細胞集団と参照細胞集団におけるC10orf3の発現の類似性により、治療が有効であることが示される。一方、被験集団と正常対照参照細胞集団におけるC10orf3の発現の相違により、臨床結果または予後が良好でないことが示される。

【0044】

「有効である」とは、その治療により、病的に上方制御された遺伝子の発現の減少、病的に下方制御された遺伝子の発現の上昇、または対象の結腸直腸腫瘍の大きさ、蔓延度、もしくは転移能の減少がもたらされることを意味する。予防的に処置を施す場合には

50

、「有効である」とは、その処置によりCRCの形成が遅延されるかもしくは妨げられる、または臨床的CRCの症状が遅延される、妨げられる、もしくは軽減されることを意味する。結腸直腸腫瘍の評価は、標準的な臨床手順により行われる。

【0045】

有効性は、CRCの診断または治療に関して公知である任意の方法と関連して決定される。CRCは、例えば症状の異常を同定することによって診断される。

【0046】

特定の個体に適したCRCを治療するための治療薬剤の選択

個体の遺伝子構成の相違により、種々の薬剤を代謝する相対的能力に差が生じ得る。対象において代謝されて抗CRC薬剤として作用する物質は、CRC状態に特有の遺伝子発現パターンから非CRC状態に特有の遺伝子発現パターンへと、対象の細胞における遺伝子発現パターンの変化を誘導することにより顕在化し得る。したがって、本明細書において開示するC10orf3の差次的発現により、選択された対象において物質がCRCの適した阻害剤であるかどうかを決定するために、CRCの推定上の治療的または予防的阻害剤をその対象由来の被験細胞集団で試験することが可能になる。

10

【0047】

特定の対象に適したCRCの阻害剤を同定するため、対象由来の被験細胞集団を治療薬剤に曝露し、C10orf3の発現を決定する。

【0048】

被験細胞集団は、C10orf3を発現するCRC細胞を含む。好ましくは、被験細胞は上皮細胞である。例えば、被験細胞集団を候補物質の存在下でインキュベートし、被験試料の遺伝子発現のパターンを測定し、それを1つまたは複数の参照プロファイル、例えばCRC参照発現プロファイルまたは非CRC参照発現プロファイルと比較する。

20

【0049】

CRCを含む参照細胞集団と比較した場合の被験細胞集団におけるC10orf3の発現の減少により、その物質に治療効果があることが示される。

【0050】

被験物質は任意の化合物または組成物であり得る。例えば、被験物質は免疫調節薬剤である。

【0051】

治療薬剤を同定するためのスクリーニングアッセイ法

本明細書において開示するC10orf3を用いて、CRCを治療するための候補治療薬剤を同定することもできる。本方法は、候補治療薬剤がCRC状態に特徴的なC10orf3の発現プロファイルを非CRC状態を示すパターンに変化させるかどうかを決定する、候補治療薬剤のスクリーニングに基づく。

30

【0052】

本方法においては、細胞を被験物質または被験物質の組み合わせ（連続的にまたは結果として）に曝露し、細胞におけるC10orf3の発現を測定する。被験集団におけるC10orf3の発現レベルを、被験物質に曝露していない参照細胞集団におけるC10orf3の発現レベルと比較する。

40

【0053】

過剰発現された遺伝子の発現の抑制に効果的な物質は、臨床上有用であると見なされる。そのような化合物を、CRCの増殖を妨げる能力に関してさらに試験する。

【0054】

さらなる態様において、本発明は、CRCの治療における有力な標的である候補物質をスクリーニングする方法を提供する。上記で詳述したように、マーカー遺伝子の発現レベルまたは活性を調節することにより、CRCの発症および進行を調節することができる。したがって、指標としてマーカー遺伝子の発現レベルおよび活性を用いるスクリーニングにより、CRCの治療における有力な標的である候補物質を同定することができる。本発明の文脈において、そのようなスクリーニングは例えば以下の段階を含み得る：

50

- (a) 被験化合物をC10orf3の核酸によってコードされるポリペプチドと接触させる段階 ;
- (b) ポリペプチドと被験化合物との結合活性を決定する段階 ; および
- (c) ポリペプチドに結合する化合物を選択する段階。

【0055】

または、本発明のスクリーニング法は以下の段階を含み得る :

- (a) 候補化合物をC10orf3を発現する細胞と接触させる段階 ; および
- (b) C10orf3の発現レベルを低減させる化合物を選択する段階。

【0056】

マーカー遺伝子を発現する細胞には、例えばCRCから樹立された細胞株が含まれる ; そのような細胞を、本発明の上記のスクリーニングに用いることができる。 10

【0057】

または、本発明のスクリーニング法は以下の段階を含み得る :

- (a) 被験化合物をC10orf3の核酸によってコードされるポリペプチドと接触させる段階 ;
- (b) 段階(a)のポリペプチドの生物活性を検出する段階 ; および
- (c) 被験化合物の非存在下で検出される生物活性と比較して、C10orf3の核酸によってコードされるポリペプチドの生物活性を抑制する化合物を選択する段階。

【0058】

スクリーニングに必要なタンパク質は、マーカー遺伝子のヌクレオチド配列を用いて組み換えタンパク質として得ることができる。当業者は、マーカー遺伝子の情報に基づき、スクリーニングの指標としてのタンパク質の任意の生物活性、および選択された生物活性に基づいた測定法を選択し得る。好ましくは、C10orf3の細胞増殖活性は、生物活性として選択してもよい。細胞増殖活性は、COS7またはNIH3T3等の細胞株の増殖により検出する。 20

【0059】

または、本発明のスクリーニング法は以下の段階を含み得る :

- (a) 候補化合物を、C10orf3の転写制御領域およびその転写制御領域の調節下で発現されるレポーター遺伝子を含むベクターを導入した細胞と接触させる段階 ;
- (b) レポーター遺伝子の活性を測定する段階 ; および 30
- (c) 対照と比較して、レポーター遺伝子の発現レベルを低減させる化合物を選択する段階。

【0060】

適したレポーター遺伝子および宿主細胞は、当技術分野において周知である。スクリーニングに必要なレポーター構築物は、マーカー遺伝子の転写制御領域を用いて調製し得る。マーカー遺伝子の転写制御領域が当業者に公知である場合には、以前の配列情報を用いてレポーター構築物を調製することができる。マーカー遺伝子の転写制御領域が未知である場合には、マーカー遺伝子のヌクレオチド配列情報に基づいて、転写制御領域を含むヌクレオチド部分をゲノムライブラリーから単離することができる。 40

【0061】

スクリーニングによって単離される化合物は、マーカー遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を阻害する薬剤の候補であり、CRCの治療または予防に適用することができる。

【0062】

さらに、マーカー遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を阻害する化合物の構造の一部が、付加、欠失、および/または置換により改変された化合物もまた、本発明のスクリーニング法によって得られ得る化合物に含まれる。

【0063】

本発明の方法によって単離された化合物を、ヒトおよび他の哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、ヒヒ、およびチ 50

ンパンジー等に対する薬剤として投与する場合には、単離された化合物を直接投与することもでき、公知の製剤法により剤形へと製剤化することもできる。例えば、必要に応じて、薬剤を糖衣錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、およびマイクロカプセルとして経口服用することもでき、または水もしくは任意の他の薬学的に許容される液体を伴う無菌液もしくは懸濁液の注射剤形態として非経口的に服用することもできる。例えば、化合物を、一般的に認められる薬剤の実現のために必要な単位用量剤形として、薬学的に許容される担体または媒体、具体的には滅菌水、生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、溶剤、保存剤、結合剤等と混合することができる。これらの製剤中の活性成分の量により、指示範囲内にある適した投与量が得られる。

【0064】

錠剤およびカプセル剤に混合し得る添加物の例には、ゼラチン、コーンスターチ、トラガカントゴム、およびアラビアゴム等の結合剤；結晶セルロース等の賦形剤；コーンスターチ、ゼラチン、およびアルギン酸等の膨張剤；ステアリン酸マグネシウム等の潤滑剤；スクロース、ラクトース、またはサッカリン等の甘味料；ならびにペパーミント、アカモノ (*Gaultheria adenostrix*) 油、およびチェリー等の香味剤がある。単位用量剤形がカプセル剤である場合には、油等の液体担体も上記の成分にさらに含めることができる。注射用の滅菌組成物は、通常の薬剤の実現に従って、注射用蒸留水等の溶剤を用いて製剤化することができる。

10

【0065】

生理食塩水、グルコース、ならびにD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、および塩化ナトリウム等のアジュバントを含むその他の等張液を、注射用の水溶液として用いることができる。これらは、アルコール、特にエタノール、プロピレングリコールおよびポリエチレングリコール等の多価アルコール、ポリソルベート80(商標)およびHCO-50等の非イオン性界面活性剤のような適した可溶化剤と組み合わせて用いることができる。

20

【0066】

ゴマ油またはダイズ油を油性液体として用いることができ、これらを可溶化剤としての安息香酸ベンジルまたはベンジルアルコールと組み合わせて用いてもよい。これらを、リン酸緩衝液および酢酸ナトリウム緩衝液等の緩衝液；塩酸プロカイン等の鎮痛薬；ベンジルアルコールおよびフェノール等の安定剤；ならびに抗酸化剤と共に製剤化してもよい。調製された注射剤は適したアンプルに充填することができる。

30

【0067】

本発明の薬学的組成物を、例えば動脈内注射、静脈内注射、もしくは皮下注射として、および鼻腔内投与、経気管支投与、筋肉内投与、もしくは経口投与として患者に投与するために、当業者に周知の方法を用いてもよい。投与量および投与方法は、患者の体重および年齢ならびに投与方法に応じて異なる；しかしながら、当業者は慣行的に適した投与方法を選択することができる。前記化合物がDNAによってコードされ得る場合には、DNAを遺伝子治療用のベクターに挿入し、そのベクターを患者に投与し治療を行うことができる。投与量および投与方法は患者の体重、年齢、および症状に応じて異なるが、当業者はそれらを適切に選択することができる。

40

【0068】

例えば、本発明のタンパク質と結合してその活性を調節する化合物の用量は症状に依存するが、その用量は、標準的な成人(体重60 kg)に経口投与する場合、約0.1 mg~約100 mg/日、好ましくは約1.0 mg~約50 mg/日、およびより好ましくは約1.0 mg~約20 mg/日である。

【0069】

標準的な成人(体重60 kg)に注射剤の形態として非経口投与する場合には、患者、標的臓器、症状、および投与方法に応じて若干の違いはあるが、約0.01 mg~約30 mg/日、好ましくは約0.1~約20 mg/日、およびより好ましくは約0.1~約10 mg/日の用量を静脈内注射することが簡便である。同様に、他の動物の場合においても、体重60 kgに換算した

50

量を投与することが可能である。

【0070】

CRCを有する対象の予後評価

一連の病期にわたり、被験細胞集団におけるC10orf3の発現を、患者由来の参照細胞集団におけるその遺伝子の発現と比較することにより、CRCを有する対象の予後を評価する方法もまた提供される。被験細胞集団と参照細胞集団におけるC10orf3の遺伝子発現を比較することにより、または対象由来の被験細胞集団において長期にわたり遺伝子発現のパターンを比較することにより、対象の予後を評価することができる。

【0071】

正常対照と比較した場合のC10orf3発現の増加により、予後が良好でないことが示される。C10orf3の発現の減少により、対象の予後がより良好であることが示される。 10

【0072】

キット

本発明はまた、CRC検出試薬、例えば、C10orf3核酸の一部に相補的なオリゴヌクレオチド配列のような、C10orf3核酸に特異的に結合するかもしくはこれを同定する核酸、またはC10orf3核酸によってコードされるタンパク質に結合する抗体を含む。試薬はキットの形態で共に包装される。試薬は、例えば核酸もしくは抗体（固体マトリックスに結合されているか、またはそれらをマトリックスに結合させるための試薬と共に個別に包装されている）、対照試薬（陽性および/または陰性）、および/または検出可能な標識といった個別の容器内に包装される。アッセイを行うための説明書（例えば、書面、テープ、VCR、CD-ROM等）がキットに含まれる。キットのアッセイ形式は、当技術分野において公知であるノーザンハイブリダイゼーションまたはサンドイッチELISAである。 20

【0073】

例えば、CRC検出試薬を多孔性条片等の固体マトリックス上に固定化して、少なくとも1つのCRC検出部位を形成する。多孔性条片の測定または検出領域は、核酸を含む複数の部位を含み得る。試験条片はまた、陰性対照および/または陽性対照のための部位も含み得る。または、対照部位は試験条片とは別の条片上に位置する。任意で、異なる検出部位は異なる量の固定化核酸を含んでもよく、すなわち、第一検出部位はより多い量、次の部位ではより少ない量を含んでもよい。被験試料を添加した場合に、検出可能なシグナルを示す部位の数により、試料中に存在するCRCの量が定量的に示される。検出部位は任意の適した検出可能な形状で構成され得り、典型的には試験条片の幅に及ぶバーまたはドットの形状である。 30

【0074】

CRCを抑制する方法

本発明は、C10orf3の発現または活性を減少させることにより、対象におけるCRCの症状を治療または軽減する方法を提供する。CRCを発症している（または発症しやすい）対象に、治療化合物を予防的または治療的に投与する。投与は全身投与または局所投与であり得る。そのような対象は、標準的な臨床的方法を用いて、またはC10orf3の発現もしくは活性の異常なレベルを検出することによって同定される。治療薬剤には細胞増殖の阻害剤が含まれる。 40

【0075】

本方法は、C10orf3の遺伝子産物の発現もしくは機能またはその両方を減少させる段階を含む。発現は、当技術分野において周知であるいくつかの方法のいずれかによって抑制される。例えば、発現は、過剰発現される遺伝子の発現を抑制または拮抗する核酸、例えば過剰発現される遺伝子の発現を阻止するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは低分子干渉RNAを対象に投与することによって阻害される。

【0076】

上記のように、C10orf3のヌクレオチド配列に相当するアンチセンス核酸を用いて、C10orf3の発現レベルを減少させることができる。CRCにおいて上方制御されるC10orf3のヌクレオチド配列に相当するアンチセンス核酸は、CRCの治療に有用である。具体的には、本 50

発明のアンチセンス核酸は、C10orf3のヌクレオチド配列またはそれに相当するmRNAに結合し、それによって遺伝子の転写もしくは翻訳を抑制し、mRNAの分解を促進し、および/またはC10orf3の核酸によってコードされるタンパク質の発現を抑制し、最終的にタンパク質の機能を阻害することによって作用し得る。本明細書で使用する「アンチセンス核酸」という用語は、標的配列に完全に相補的なヌクレオチド、およびアンチセンス核酸が標的配列に特異的に結合し得る限り、ヌクレオチドのミスマッチを有するヌクレオチドの両方を含む。例えば、本発明のアンチセンス核酸には、少なくとも15個の連続したヌクレオチドにわたって、少なくとも70%またはそれ以上、好ましくは80%またはそれ以上、より好ましくは90%またはそれ以上、さらにより好ましくは95%またはそれ以上の相同性を有するポリヌクレオチドが含まれる。当技術分野において公知であるアルゴリズムを用いて、相同性を決定することができる。

10

【0077】

本発明のアンチセンス核酸誘導体は、タンパク質をコードするDNAまたはmRNAに結合し、それらの転写または翻訳を抑制し、mRNAの分解を促進し、かつタンパク質の発現を抑制し、その結果としてタンパク質機能の阻害を生じることにより、マーカー遺伝子によってコードされるタンパク質を産生する細胞に作用する。

【0078】

本発明のアンチセンス核酸誘導体は、誘導体に対して不活性である適した基剤と混合することにより、塗布剤または湿布等の外用剤にすることができる。

【0079】

同様に、賦形剤、等張剤、可溶化剤、安定剤、保存剤、鎮痛剤等を加えることにより、誘導体を必要に応じて錠剤、散剤、粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル、注射剤、液剤、点鼻剤、および凍結乾燥剤に製剤化することができる。これらは以下の公知の方法に従って調製し得る。

20

【0080】

アンチセンス核酸誘導体は、患部に直接適用することにより、または患部に到達できるように血管に注入することによって患者に供される。アンチセンス封入剤を用いて、耐久性および膜透過性を増すことも可能である。例としては、リポソーム、ポリ-L-リジン、脂質、コレステロール、リポフェクチン、またはそれらの誘導体が挙げられる。

【0081】

本発明のアンチセンス核酸誘導体の投与量は患者の状態に応じて適切に調節し、所望の量で使用することができる。例えば、0.1~100 mg/kg、好ましくは0.1~50 mg/kgの用量範囲で投与し得る。

30

【0082】

本発明のアンチセンス核酸は本発明のタンパク質の発現を阻害し、そのため本発明のタンパク質の生物活性を抑制するのに有用である。同様に、本発明のアンチセンス核酸を含む発現阻害剤は、本発明のタンパク質の生物活性を阻害し得るために有用である。

【0083】

本発明のアンチセンス核酸には、修飾オリゴヌクレオチドが含まれる。例えば、チオエート化(thioated)ヌクレオチドを用いて、オリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ耐性を付与することができる。

40

【0084】

同様に、マーカー遺伝子に対するsiRNAを用いて、マーカー遺伝子の発現レベルを減少させることができる。「siRNA」という用語は、標的mRNAの翻訳を妨げる二本鎖RNA分子を意味する。細胞にsiRNAを導入する標準的な技法が用いられるが、これにはDNAがRNA転写の鋳型となる技法が含まれる。本発明との関連において、siRNAは、C10orf3などの上方制御されるマーカー遺伝子に対するセンス核酸配列およびアンチセンス核酸配列を含む。siRNAは、例えばヘアピンのように、単一の転写物が標的遺伝子のセンス配列および相補的なアンチセンス配列の両方を有するように構築される。

【0085】

50

標的細胞においてC10orf3に相当する転写物にsiRNAが結合することにより、細胞によるそのタンパク質の産生が減少する。オリゴヌクレオチドの長さは少なくとも10ヌクレオチドであり、天然の転写物と同程度の長さであってもよい。好ましくは、オリゴヌクレオチドは19~25ヌクレオチド長である。最も好ましくは、オリゴヌクレオチドは75、50、25ヌクレオチド長未満である。哺乳動物細胞において発現を阻害するC10orf3 siRNAオリゴヌクレオチドの例には、配列番号:21を含む標的配列が含まれる。さらに、siRNAの阻害活性を増強するために、標的配列のアンチセンス鎖の3'末端にヌクレオチド「u」を付加することができる。付加すべき「u」の数は少なくとも2個、通常は2~10個、好ましくは2~5個である。付加した「u」は、siRNAのアンチセンス鎖の3'末端において一本鎖を形成する。

10

【0086】

C10orf3 siRNAは、mRNA転写物に結合し得る形態で細胞に直接導入される。または、C10orf3 siRNAをコードするDNAがベクター内に存在する。

【0087】

ベクターは、例えば、(DNA分子の転写により)両鎖の発現を可能にする様式で、C10orf3配列に隣接する制御配列に機能的に連結された発現ベクターにC10orf3標的配列をクローニングすることによって作製される(Lee, N.S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M.-J., Ehsani, A., Salvaterra, P., and Rossi, J. (2002) Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nature Biotechnology* 20 : 500-505)。C10orf3 mRNAに対してアンチセンスであるRNA分子は第1プロモーター(例えば、クローニングしたDNAの3'側のプロモーター配列)の部分で転写され、C10orf3 mRNAのセンス鎖であるRNA分子は第2プロモーター(例えば、クローニングしたDNAの5'側のプロモーター配列)の部分で転写される。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、C10orf3遺伝子をサイレンシングするためのsiRNA構築物を生じる。または、2つの構築物を利用して、siRNA構築物のセンス鎖およびアンチセンス鎖を作製する。クローニングするC10orf3は、例えば、単一の転写物が標的遺伝子のセンス配列および相補的アンチセンス配列の両方を有するヘアピンのような、二次構造を有する構築物をコードすることも可能である。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をセンス配列とアンチセンス配列との間に配置することができる。したがって、本発明はまた、一般式5'-[A]-[B]-[A']-3'を有するsiRNAを

20

30

[A]は配列番号:1の1533~1551位のヌクレオチド配列(配列番号:21)に相当するリボヌクレオチド配列であり、

[B]は3~23位のヌクレオチドからなるリボヌクレオチド配列であり、

[A']は[A]の相補配列からなるリボヌクレオチド配列である。

ループ配列は、好ましくは3~23ヌクレオチド長であってもよい。ループ配列は、例えば以下の配列からなる群より選択され得る(http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_506.html)。本発明のsiRNAでは、siRNAの阻害活性を増強するために、[A']の3'末端にヌクレオチド「u」を付加することができる。付加すべき「u」の数は少なくとも2個、通常は2~10個、好ましくは2~5個である。さらに、23ヌクレオチドからなるループ配列もまた活性のあるsiRNAを提供する(Jacque, J.-M., Triques, K., and Stevenson, M. (2002) Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 418 : 435-438.)。

40

AUG:Sui, G., Soohoo, C., Affar, E.B., Gay, F., Shi, Y., Forrester, W.C., and Shi, Y. (2002) A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(8): 5515-5520.

CCC、CCACC、またはCCACACC:Paul, C.P., Good, P.D., Winer, I., and Engelke, D.R. (2002) Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nature Biotechnology* 20 : 505-508.

UUCG:Lee, N.S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M.-J., Ehsani, A., Salvaterra, P., and Rossi, J. (2002) Expression of small interfering RNAs targeted agai

50

nst HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nature Biotechnology* 20 : 500-505.

CTCGAGまたはAAGCUU:Editors of *Nature Cell Biology* (2003) Whither RNAi? *Nat Cell Biol.* 5:489-490.

UUCAAGAGA:Yu, J.-Y., DeRuiter, S.L., and Turner, D.L. (2002) RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(9) : 6047-6052.

【0088】

例えば、本発明のヘアピン構造を有する好ましいsiRNAを以下に示す。以下の構造では、ループ配列はAUG、CCC、UUCG、CCACC、CTCGAG、AAGCUU、CCACACC、およびUUCAAGAGAからなる群より選択され得る。好ましいループ構造はUUCAAGAGA (DNAでは「ttcaagaga」) である。ggagagacugaaaacagag-[B]-cucuguuuucagucucucc (配列番号:21の標的配列用)。

10

【0089】

C10orf3配列に隣接する制御配列は、それらの発現が独立して調節され得るか、または時間的もしくは位置的に調節され得るように、同一であるかまたは異なる。siRNAは、例えばRNA pol III転写単位を含むベクターにC10orf3遺伝子鋳型をクローニングすることによって、細胞内で低分子核内RNA (snRNA) U6またはヒトH1 RNAプロモーターから転写される。細胞にベクターを導入するために、トランスフェクション増強剤を用いることができる。FuGENE (Rochediagnostices)、Lipofectamine 2000 (Invitrogen)、Oligofectamine (Invitrogen)、およびNucleofactor (Wako pure Chemical) がトランスフェクション増強剤として有用である。

20

【0090】

siRNAのヌクレオチド配列は、Ambionウェブサイト (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) から利用できるsiRNA設計コンピュータプログラムを用いて設計した。このコンピュータプログラムは、以下の手順に基づいてsiRNA合成のためのヌクレオチド配列を選択する。

【0091】

siRNA標定部位の選択:

1. 目的の転写産物のAUG開始コドンから始めて、AAジヌクレオチド配列について下流方向にスキャンする。潜在的siRNA標的部位として、各AAおよび3'隣接19ヌクレオチドの存在を記録する。Tuschlらは、5'および3'非翻訳領域 (UTR) ならびに開始コドン近傍の領域 (75塩基内) には制御タンパク質結合部位がより豊富である可能性があるため、これらに対してsiRNAを設計しないことを推奨している。UTR結合タンパク質および/または翻訳開始複合体は、siRNAエンドヌクレアーゼ複合体の結合を妨げる可能性がある。

30

2. 有力な標的部位をヒトゲノムデータベースと比較し、他のコード配列に対して有意な相同性を有するいかなる標的配列も検討から除外する。相同性検索はBLASTを用いて行うことができ、これはwww.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/のNCBIサーバー上で見ることができる。

3. 合成のための適格な標的配列を選択する。Ambionでは、評価するために、好ましくは遺伝子の長さに沿っていくつかの標的配列を選択することができる。

【0092】

C10orf3 mRNAのオリゴヌクレオチドおよびC10orf3 mRNAの種々の部分に相補的なオリゴヌクレオチドを、標準的な方法に従って、(例えば、COS7細胞株、NIH3T3細胞株、ならびにHCT116およびSW948結腸直腸癌細胞株を用いて) 腫瘍細胞におけるC10orf3の産生を減少させるそれらの能力についてインビトロで試験した。候補siRNA組成物の非存在下で培養した細胞と比較した、候補siRNA組成物と接触させた細胞におけるC10orf3遺伝子産物の減少を、C10orf3特異的抗体または他の検出方法を用いて検出する。次いで、インビトロでの細胞に基づくアッセイ法または無細胞アッセイ法においてC10orf3の産生を減少させる配列を、細胞増殖の阻害効果について試験する。インビトロでの細胞に基づくアッセイ法において細胞増殖を阻害する配列を、ラットまたはマウスにおいてインビボで試験して、悪性新生物を有する動物におけるC10orf3産生の減少および腫瘍細胞増殖の減少を確認す

40

50

る。

【0093】

本発明には、標的配列、例えば配列番号:1のヌクレオチド1533~1551位(配列番号:21)の核酸配列、または配列番号:1のヌクレオチド1533~1551位(配列番号:21)の核酸配列に相補的な核酸分子を含む、単離された核酸分子も含まれる。本明細書で使用する「単離された核酸」とは、その元の環境(例えば、天然である場合には天然環境)から分離されて、その天然状態から人工的に変更された核酸のことである。本発明において、単離された核酸には、DNA、RNA、およびそれらの誘導体が含まれる。単離された核酸がRNAまたはその誘導体である場合には、ヌクレオチド配列において塩基「t」は「u」で置き換えられるべきである。本明細書で使用する「相補的な」という用語は、核酸分子のヌクレオチド単位間のワトソン-クリック型またはフーグスティーン型の塩基対形成を指し、「結合」という用語は、2つのポリペプチドもしくは化合物、または関連するポリペプチドもしくは化合物、またはそれらの組み合わせ間の物理的または化学的相互作用を意味する。

10

【0094】

相補的な核酸配列は適切な条件下でハイブリダイズして、ミスマッチをほとんどまたは全く含まない安定な二本鎖を形成する。さらに、本発明の単離されたヌクレオチドのセンス鎖およびアンチセンス鎖は、ハイブリダイゼーションによって二本鎖ヌクレオチドまたはヘアピンループ構造を形成し得る。好ましい態様において、そのような二本鎖は、10個の対応ごとに1個以下のミスマッチしか含まない。特に好ましい態様では、二本鎖が完全に相補的である場合、そのような二本鎖はミスマッチを含まない。核酸分子は、2624ヌクレオチド長未満である。例えば、核酸分子は500、200、または75ヌクレオチド長未満である。本発明にはまた、本明細書に記載の核酸の1つまたは複数を含むベクター、およびそのベクターを含む細胞が含まれる。本発明の単離された核酸は、C10orf3に対するsiRNAまたはそのsiRNAをコードするDNAに有用である。核酸をsiRNAまたはそのコードDNAに使用する場合、センス鎖は好ましくは19ヌクレオチドよりも長く、より好ましくは21ヌクレオチドよりも長い。

20

【0095】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAは、本発明のポリペプチドの発現を阻害し、そのため本発明のポリペプチドの生物活性を抑制するのに有用である。同様に、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAを含む発現阻害剤は、本発明のポリペプチドの生物活性を阻害し得るという点で有用である。したがって、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAを含む組成物は、CRCの治療に有用である。

30

【0096】

または、過剰発現される遺伝子の遺伝子産物の機能は、遺伝子産物に結合するかまたはさもなければその機能を阻害する化合物を投与することによって阻害される。例えば、化合物は過剰発現される遺伝子産物に結合する抗体である。

【0097】

本発明は、抗体、特に上方制御されるマーカー遺伝子によってコードされるタンパク質に対する抗体、またはその抗体の断片の使用を意味する。本明細書で用いる「抗体」という用語は、抗体を合成するために用いられた抗原(すなわち、上方制御されるマーカー遺伝子産物)またはそれと極めて近縁の抗原とのみ相互作用する(すなわち結合する)特定の構造を有する免疫グロブリン分子を指す。さらに、抗体は、マーカー遺伝子によってコードされるタンパク質に結合する限り、抗体の断片または改変抗体であってもよい。例えば、抗体断片は、Fab、F(ab')₂、Fv、またはH鎖およびL鎖によるFv断片が適切なリンカーにより連結された一本鎖Fv(scFv)であってよい(Huston J. S. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883 (1988))。より具体的には、抗体断片は、抗体をパパインまたはペプシン等の酵素で処理することによって作製し得る。または、抗体断片をコードする遺伝子を構築し、発現ベクターに挿入し、適切な宿主細胞において発現させてもよい(例えば、Co M. S. et al. J. Immunol. 152:2968-2976 (1994); Better M. and Horwitz A. H. Methods Enzymol. 178:476-496 (1989); Pluckthun A. and Skerra A. Method

40

50

s Enzymol. 178:497-515 (1989); Lamoyi E. Methods Enzymol. 121:652-663 (1986); Rousseaux J. et al. Methods Enzymol. 121:663-669 (1986); Bird R. E. and Walker B. W. Trends Biotechnol. 9:132-137 (1991)を参照されたい。

【0098】

抗体は、ポリエチレングリコール (PEG) 等の種々の分子との結合により修飾してもよい。本発明はそのような修飾抗体を提供する。修飾抗体は抗体を化学的に修飾することによって得ることができる。これらの修飾法は本分野において慣習的である。

【0099】

または、抗体は、非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域とのキメラ抗体として、または非ヒト抗体由来の相補性決定領域 (CDR)、ヒト抗体由来のフレームワーク (FR) 領域、および定常領域を含むヒト化抗体として得ることも可能である。そのような抗体は公知の技術を用いて調製することができる。

10

【0100】

癌細胞において起こる特定の分子変化を対象にした癌治療は、進行性乳癌治療用のトラスツズマブ (Herceptin)、慢性骨髄性白血病用のメシル酸イマチニブ (Gleevec)、非小細胞肺癌 (NSCLC) 用のゲフィチニブ (Iressa)、B細胞リンパ腫およびマントル細胞リンパ腫用のリツキシマブ (抗CD20 mAb) 等の抗癌剤の臨床開発ならびに規制認可により有効となっている (Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. Clin Cancer Res. 2001 Oct;7(10):2958-70. Review.; Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. N Engl J Med. 2001 Mar 15;344(11):783-92.; Rehwald U, Schulz H, Reiser M, Sieber M, Staak JO, Morschhauser F, Driessen C, Rudiger T, Muller-Hermelink K, Diehl V, Engert A. Treatment of relapsed CD20+ Hodgkin lymphoma with the monoclonal antibody rituximab is effective and well tolerated: results of a phase 2 trial of the German Hodgkin Lymphoma Study Group. Blood. 2003 Jan 15;101(2):420-424.; Fang G, Kim CN, Perkins CL, Ramadevi N, Winton E, Wittmann S and Bhalla KN. (2000). Blood, 96, 2246-2253)。これらの薬剤は形質転換細胞のみを標的とするため、これまでの抗癌剤よりも臨床的に有効でありかつ許容性がよい。したがって、そのような薬剤は癌患者の生存期間および生活の質を改善するばかりでなく、分子標的癌治療の概念を確証する。さらに、標的薬剤は、標準的な化学療法と併用した場合にその有効性を亢進し得る (Gianni L. (2002). Oncology, 63 Suppl 1, 47-56.; Klejman A, Rushen L, Morrione A, Slupianek A and Skorski T. (2002). Oncogene, 21, 5868-5876.)。したがって、今後の癌治療はおそらく、従来薬剤と、血管新生および侵襲性等の腫瘍細胞の差次的特徴を目標とした標的特異的な薬剤との併用を含むことになるであろう。

20

30

【0101】

これらの調節法は、エクスピボもしくはインピトロで (例えば、細胞を薬剤と培養することにより)、またはインピボで (例えば、対象に薬剤を投与することにより) 行われる。本方法は、差次的に発現される遺伝子の異常な発現または活性を妨げる治療として、タンパク質もしくはタンパク質の組み合わせまたは核酸分子もしくは核酸分子の組み合わせを投与する段階を含む。

40

【0102】

遺伝子のレベルまたは生物活性の増加 (疾患または障害に罹患していない対象と比較して) を特徴とする疾患および障害は、過剰発現される1つまたは複数の遺伝子の活性を拮抗する (すなわち、低減または阻害する) 治療薬剤で処置することができる。活性を拮抗する治療薬剤は治療的または予防的に投与される。

【0103】

利用し得る治療薬剤には、(i) 過剰発現される配列に対する抗体 ; (ii) アンチセンス

50

核酸または「非機能的」である核酸（すなわち、過剰発現される配列のコード配列内への異種挿入による）；(iii) 低分子干渉RNA (siRNA)；あるいは(iv) 調節因子（例えば、過剰発現されるポリペプチドとその結合パートナーとの相互作用を変化させる阻害剤およびアンタゴニスト）が含まれ得る。非機能的なアンチセンス分子は、相同的組換えによりポリペプチドの内因的機能を「ロックアウトする」ために利用される（例えば、Capecchi, Science 244: 1288-1292 1989を参照されたい）。

【0104】

レベルの増加は、患者の組織試料を（例えば生検組織から）得て、その試料を、発現したペプチド（または発現が変化する遺伝子のmRNA）のRNAもしくはペプチドレベル、構造、および/または活性についてインビトロでアッセイし、ペプチドおよび/またはRNAを定量することによって容易に検出することができる。当技術分野において周知である方法には、免疫測定法（例えば、ウェスタンブロット解析、免疫沈降法およびその後のドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル電気泳動、免疫細胞化学法等による）および/またはmRNAの発現を検出するためのハイブリダイゼーションアッセイ法（例えば、ノーザンアッセイ法、ドットプロット、インサイチュハイブリダイゼーション）が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0105】

疾患の明白な臨床症状が現れる前に、疾患または障害を予防するかまたはその進行を遅らせるように予防的投与を行う。

【0106】

本治療法は、差次的に発現される1つまたは複数の遺伝子の遺伝子産物の活性を調節する物質と細胞を接触させる段階を含む。タンパク質活性を調節する物質には、核酸またはタンパク質、これらのタンパク質の天然に存在する同族リガンド、ペプチド、ペプチド模倣体、または他の低分子が含まれる。

20

【0107】

本発明はまた、C10orf3の核酸によってコードされるポリペプチド、または本ポリペプチドの免疫学的活性断片、またはポリペプチドもしくはその断片をコードするポリヌクレオチドを含むワクチンを対象に投与する段階を含む、対象においてCRCを治療または予防する方法に関する。ポリペプチドの投与により、対象において抗腫瘍免疫が誘導される。抗腫瘍免疫を誘導するため、C10orf3の核酸によってコードされるポリペプチド、または本ポリペプチドの免疫学的活性断片、またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを投与する。ポリペプチドまたはその免疫学的活性断片は、CRCに対するワクチンとして有用である、場合によっては、タンパク質またはその断片を、T細胞受容体（TCR）に結合した形態、またはマクロファージ、樹状細胞（DC）、もしくはB細胞等の抗原提示細胞（APC）によって提示された形態で投与してもよい。DCは抗原提示能が強いため、APCの中でもDCを用いることが最も好ましい。

30

【0108】

本発明において、CRCに対するワクチンとは、動物に接種した場合に抗腫瘍免疫を誘導する機能を有する物質を指す。本発明により、C10orf3の核酸によってコードされるポリペプチドまたはその断片は、C10orf3を発現しているCRC細胞に対して強力かつ特異的な免疫応答を誘導し得るHLA-A24またはHLA-A*0201拘束性エピトープペプチドであることが示唆された。したがって本発明はまた、このポリペプチドを用いて抗腫瘍免疫を誘導する方法も含む。一般に、抗腫瘍免疫には以下のような免疫応答が含まれる：

40

- 腫瘍に対する細胞傷害性リンパ球の誘導、
- 腫瘍を認識する抗体の誘導、および
- 抗腫瘍サイトカイン産生の誘導。

【0109】

したがって、特定のタンパク質が動物への接種に際してこれらの免疫応答のいずれか1つを誘導する場合、そのタンパク質は抗腫瘍免疫誘導作用を有すると判定される。タンパク質による抗腫瘍免疫の誘導は、インビボまたはインビトロでタンパク質に対する宿主の

50

免疫系の反応を観察することによって検出することができる。

【0110】

例えば、細胞傷害性Tリンパ球の誘導を検出する方法は周知である。生体に侵入する外来物質は、抗原提示細胞（APC）の作用によりT細胞およびB細胞に対して提示される。APCによって提示された抗原に対して抗原特異的に反応するT細胞は、抗原による刺激により細胞傷害性T細胞（または細胞傷害性Tリンパ球；CTL）に分化し、次いで増殖する（これはT細胞の活性化と称される）。したがって、特定のペプチドによるCTLの誘導は、APCによりT細胞に対してペプチドを提示し、CTLの誘導を検出することによって評価することができる。さらに、APCは、CD4+ T細胞、CD8+ T細胞、マクロファージ、好酸球、およびNK細胞を活性化する作用を有する。CD4+ T細胞およびCD8+ T細胞は抗腫瘍免疫においても重要であることから、ペプチドの抗腫瘍免疫誘導作用は、これらの細胞の活性化作用を指標として用いて評価することができる。

10

【0111】

APCとして樹状細胞（DC）を用いるCTLの誘導作用を評価する方法は、当技術分野において周知である。DCは、APCの中で最も強いCTL誘導作用を有する代表的なAPCである。この方法において、被験ポリペプチドをまずDCと接触させ、次いでこのDCをT細胞と接触させる。DCとの接触後に関心対象の細胞に対して細胞傷害作用を有するT細胞が検出されることで、被験ポリペプチドが細胞傷害性T細胞の誘導活性を有することが示される。腫瘍に対するCTLの活性は、例えば指標として⁵¹Cr標識腫瘍細胞の溶解を用いて検出することができる。または、³H-チミジン取り込み活性またはLDH（乳酸脱水素酵素）放出を指標として用いて、腫瘍細胞の損傷の程度を評価する方法もまた周知である。

20

【0112】

DCとは別に、末梢血単核細胞（PBMC）をAPCとして用いてもよい。CTLの誘導は、GM-CSFおよびIL-4の存在下でPBMCを培養することによって増強されることが報告されている。同様に、CTLは、PBMCをキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）およびIL-7の存在下で培養することによって誘導されることも示されている。

【0113】

これらの方法によりCTL誘導活性を有することが確認された被験ポリペプチドは、DC活性化作用およびその後のCTL誘導活性を有するポリペプチドである。したがって、腫瘍細胞に対するCTLを誘導するポリペプチドは、腫瘍に対するワクチンとして有用である。さらに、ポリペプチドとの接触によって腫瘍に対するCTL誘導能を獲得したAPCは、腫瘍に対するワクチンとして有用である。さらに、APCによるポリペプチド抗原の提示により細胞傷害性を獲得したCTLも、腫瘍に対するワクチンとして用いることができる。APCおよびCTLによる抗腫瘍免疫を用いたそのような腫瘍の治療法は、細胞免疫療法と称される。

30

【0114】

一般に、細胞免疫療法にポリペプチドを用いる場合、異なる構造を有する複数のポリペプチドを組み合わせ、それらをDCと接触させることにより、CTL誘導の効率が增加することが知られている。したがって、タンパク質断片でDCを刺激する場合、多くの種類の断片の混合物を用いることが有利である。

【0115】

または、ポリペプチドによる抗腫瘍免疫の誘導は、腫瘍に対する抗体産生の誘導を観察することによって確認することができる。例えば、ポリペプチドを免疫した実験動物においてポリペプチドに対する抗体を誘導し、腫瘍細胞の増殖がそれらの抗体によって抑制される場合、そのポリペプチドは抗腫瘍免疫を誘導する能力を有すると判定され得る。

40

【0116】

抗腫瘍免疫は、本発明のワクチンを投与することによって誘導され、抗腫瘍免疫の誘導によりCRCの治療および予防が可能になる。癌に対する治療および癌の発症の予防は、癌細胞の増殖の抑制、癌の退縮、および癌の発症の抑制等の段階のいずれかを含む。癌を有する個体の死亡率の減少、血液中の腫瘍マーカーの減少、癌に伴う検出可能な症状の軽減等もまた、癌の治療または予防に含まれる。そのような治療および予防効果は好ましくは

50

統計的に有意である。例えば、細胞増殖性疾患に対するワクチンの治療または予防効果をワクチンを投与していない対照と比較した場合に、有意水準5%またはそれ以下で観察される。例えば、スチューデントのt検定、マン・ホイットニーのU検定、ANOVAを統計解析に用いることができる。

【0117】

免疫学的活性を有する上記のタンパク質またはタンパク質をコードするベクターをアジュバントと組み合わせてもよい。アジュバントとは、免疫学的活性を有するタンパク質と共に（または連続して）投与した場合に、そのタンパク質に対する免疫応答を増強する化合物を指す。アジュバントの例には、コレラ毒素、サルモネラ毒素、ミョウバン等が含まれるが、これらに限定されない。さらに、本発明のワクチンを薬学的に許容される担体と適切に組み合わせてもよい。そのような担体の例は、滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液等である。さらに、ワクチンは必要に応じて、安定剤、懸濁剤、保存剤、界面活性剤等を含み得る。ワクチンは全身投与または局所投与される。ワクチン投与は単回投与で行っても、または複数回の投与により強化してもよい。

10

【0118】

本発明のワクチンとしてAPCまたはCTLを用いる場合、腫瘍は例えばエキスピボ法によって治療または予防することができる。より具体的には、治療または予防を受ける対象のPBMCを採取し、細胞をエキスピボでポリペプチドと接触させ、APCまたはCTLを誘導した後に細胞を対象に投与することができる。APCはまた、ポリペプチドをコードするベクターをエキスピボでPBMCに導入することによって誘導することもできる。インビトロで誘導されたAPCまたはCTLは、投与前にクローニングすることができる。標的細胞を損傷する高い活性を有する細胞をクローニングし増殖させることにより、細胞免疫療法をより効率的に行うことができる。さらに、このようにして単離されたAPCおよびCTLは、細胞が由来する個体に対してのみならず、他の個体に由来する類似した種類の腫瘍に対する細胞免疫療法にも用いることができる。

20

【0119】

さらに、本発明のポリペプチドの薬学的有効量を含む、癌等の細胞増殖性疾患を治療または予防するための薬学的組成物を提供する。抗腫瘍免疫をもたらすために薬学的組成物を用いることができる。

【0120】

CRCを抑制するための薬学的組成物

薬学的製剤には、経口、直腸、経鼻、局所（口腔および舌下を含む）、腔、もしくは非経口（筋肉内、皮下、および静脈内を含む）投与に適した製剤、または吸入もしくは通気による投与に適した製剤が含まれる。投与は静脈内投与であることが好ましい。製剤は任意で投与単位で個別に包装される。

30

【0121】

経口投与に適した薬学的製剤には、それぞれが所定量の有効成分を含むカプセル剤、カシエ剤、または錠剤が含まれる。製剤にはまた、散剤、粒剤、または液剤、懸濁剤、もしくは乳剤が含まれる。有効成分は、任意で巨丸剤、舐剤、またはペースト剤として投与される。経口投与用の錠剤およびカプセル剤には、結合剤、増量剤、潤滑剤、崩壊剤、または湿潤剤等の従来賦形剤を含めてもよい。錠剤は、任意で1つまたは複数の製剤成分と共に、圧縮または成形により作製され得る。圧縮錠剤は、粉末または顆粒のような自由流動形態の有効成分を任意で結合剤、潤滑剤（lubricant）、不活性希釈剤、潤滑剤（lubricating）、界面活性剤、または分散剤と混合して、適した機械において圧縮することにより調製され得る。成形錠剤は、不活性液体希釈剤で湿潤した粉末化合物の混合物を適した機械において成形することによって作製され得る。錠剤は、当技術分野において公知の方法に従ってコーティングしてもよい。経口液体製剤は、例えば、水性もしくは油性懸濁剤、液剤、乳剤、シロップ剤、またはエリキシル剤の形態であってもよく、または使用前に水もしくはその他の適した溶剤を用いて構成するための乾燥製品として提供してもよい。そのような液体製剤には、懸濁剤、乳化剤、非水性溶剤（食用油を含み得る）、または保

40

50

存剤等の従来の添加剤を含めてもよい。錠剤は、任意で、中に含まれる有効成分の持続放出または制御放出を提供するように製剤化され得る。錠剤のパッケージは、その各月に服用すべき錠剤1個を含み得る。

【0122】

非経口投与用の製剤には、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、および製剤を目的のレシピエントの血液と等張にする溶質を含み得る水性および非水性無菌注射液；ならびに懸濁剤および増粘剤を含み得る水性および非水性無菌懸濁剤が含まれる。製剤は、例えば密封したアンプルおよびバイアルといった単位用量または多用量容器で提供され得り、使用する直前に例えば生理食塩水、注射用蒸留水といった無菌液体担体の添加のみを必要とする凍結乾燥（freeze-dried）（凍結乾燥（lyophilized））状態で保存され得る。または、製剤は持続注入用に提供してもよい。先に記載した種類の無菌散剤、粒剤、および錠剤から、即時注射溶液および懸濁液を調製することも可能である。

10

【0123】

直腸投与用の製剤には、カカオ脂またはポリエチレングリコール等の標準的な担体を伴う坐剤が含まれる。例えば口腔または舌下への口内局所投与用の製剤には、スクロースおよびアラビアゴムまたはトラガカントゴム等の香味基剤中に有効成分を含む口内錠、ならびにゼラチンおよびグリセリンまたはスクロースおよびアラビアゴム等の基剤中に有効成分を含む香剤が含まれる。鼻腔内投与には、本発明の化合物を液体スプレーもしくは分散粉末として、または滴剤の形態で用いてもよい。滴剤は、1つもしくは複数の分散剤、可溶化剤、または懸濁剤もまた含む水性または非水性基剤と共に製剤化され得る。

20

【0124】

吸入による投与のために、化合物は注入器、噴霧器、加圧パック、またはエアロゾルスプレーを他の簡便な送達手段を用いて送達される。加圧パックは、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、炭酸ガス、または他の適したガス等の適した噴霧剤を含み得る。加圧エアロゾルの場合には、バルブを備えることにより投与単位を決定して定量を送達してもよい。

【0125】

または、吸入もしくは通気による投与には、化合物は乾燥粉末組成物、例えば、化合物とラクトースまたはデンプン等の適した粉末基剤との粉末混合物の形態をとってもよい。粉末組成物は、例えば、カプセル、薬包、ゼラチン、またはブリスター包装での単位用量形態として提供することができ、そこから吸入器または注入器を用いて粉末が投与され得る。

30

【0126】

他の製剤には、治療薬剤を放出する埋め込み型装置および粘着パッチが含まれる。

【0127】

所望する場合には、有効成分の持続放出をもたらすように適合化した上記の製剤を用いてもよい。薬学的組成物は、抗菌剤、免疫抑制剤、または保存剤等の他の活性成分もまた含まれ得る。

【0128】

本発明の製剤は、先に詳述した成分に加えて、当該の製剤の種類を考慮して当技術分野において従来の他の物質を含み得ることが理解されるべきであり、例えば経口投与に適した製剤は香味剤を含み得る。

40

【0129】

好ましい単位用量製剤は、以下に挙げるような有効成分の有効用量を含む製剤、または有効成分のそれらの適切な一部を含む製剤である。

【0130】

前述の状態のそれぞれに関して、組成物、例えばポリペプチドおよび有機化合物は、約0.1~約250 mg/kg/日の用量で経口的にまたは注射により投与される。成人の用量範囲は一般に、約5 mg~約17.5 g/日、好ましくは約5 mg~約10 g/日、および最も好ましくは約100 mg~約3 g/日である。個別の単位で提供される提示の錠剤または他の単位用量形態は

50

、簡便に、そのような用量で効果的な量を含むか、または例えば約5 mg～約500 mg、通常は約100 mg～約500 mgを含む単位でそれを複数として含み得る。

【0131】

用いる用量は、対象の年齢および性別、処置する障害の詳細、ならびにその重症度を含む多くの要因に依存することになる。同様に、投与経路も状態およびその重症度に依存して変動し得る。

【0132】

本発明を以下の実施例においてさらに説明するが、これらの実施例は特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定するものではない。

【0133】

実施例1

材料および方法

ゲノム全域にわたるcDNAマイクロアレイ

本発明において、本発明者らは、23040個の遺伝子を含む本発明者ら独自のゲノム全域にわたるcDNAマイクロアレイを使用した。簡潔に説明すると、顕微解剖した組織から抽出したDNase I処理済みの全RNAを、Ampliscribe T7 Transcription Kit (Epicentre Technologies、米国、ウィスコンシン州、マディソン)を用いて増幅し、逆転写の過程においてCy色素 (Amersham Biosciences Corp.、米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ)で標識し;非癌組織由来のRNAはCy5で標識し、腫瘍由来のRNAはCy3で標識した。Automated Slide Processor (Amersham Biosciences Corp.、米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ)を用いて、標識RNAをcDNAマイクロアレイスライドとハイブリダイズさせた。ハイブリダイズしたスライドをアレイスキャナー (Amersham Biosciences Corp.、米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ)によりスキャンし、各標的スポットのCy5およびCy3の蛍光強度をArray Visionソフトウェア (Amersham Biosciences Corp.、米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ)により作製した。バックグラウンドシグナルを差し引いた後、各スポットについて二つ組の値を平均化した。次いで、各スライドの52個のハウスキーピング遺伝子の平均Cy5およびCy3強度を調整するために、スライド上の全蛍光強度を標準化した。

10

20

【0134】

細胞株

COS7細胞ならびにヒト結腸癌細胞株HCT116およびSW480はアメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) から入手し、ヒト結腸癌細胞株HT29、SNUC4、およびSNUC5は韓国細胞株バンクから入手した。細胞は全て以下の適切な培地中で単層として培養した: COS7細胞にはダルベッコ変法イーグル培地、HT29、SNUC4、およびSNUC5にはRPMI1640; HCT116にはマッコイ5A培地; SW480にはLeibovitz L-15培地を使用した。いずれの培地にも、10%ウシ胎児血清および1%抗菌/抗真菌溶液 (Sigma-Aldrich Corp.、米国、ミズーリ州、セントルイス) を添加した。

30

【0135】

RNA調製およびRT-PCR

Qiagen RNeasyキット (Qiagen Inc.、米国、カリフォルニア州、バレンシア) またはTrizol試薬 (Life Technologies, Inc.) を用いて製造業者の手順に従い、全RNAを抽出した。全RNAの10 μ g分割量を、ポリdT₁₂₋₁₈プライマー (Amersham Biosciences Corp.、米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ) をSuperscript II逆転写酵素 (Life Technologies, Inc.) と共に用いて一本鎖cDNAに逆転写した。各一本鎖cDNA調製物を、続いて行われる、20- μ l量のPCR緩衝液 (TAKARA) 中での標準的なRT-PCR実験によるPCR増幅のために希釈した。増幅は、GeneAmp PCRシステム9700 (Perkin-Elmer、カリフォルニア州、フォスターシティ) で、94 $^{\circ}$ Cで4分間の変性を行い、続いて94 $^{\circ}$ Cで30秒、60 $^{\circ}$ Cで30秒、および72 $^{\circ}$ Cで45秒の20サイクル (GAPDHの場合) または35サイクル (C10orf3の場合) を行った。プライマー配列は以下の通りであった。

40

GAPDH用:

50

フォワード、5'-ACAACAGCCTCAAGATCATCAG-3' (配列番号:3) および
リバーズ、5'-GGTCCACCACTGACACGTTG-3' (配列番号:4)

C10orf3用:

フォワード、5'-AGAGATCCGAAGAGCTCTTATCT-3' (配列番号:5) および
リバーズ、5'-GATGCTCAGTGGCTGGATACT-3' (配列番号:6)

【0136】

ノーザンブロット解析

ヒト多組織ブロット (Clontech、米国、カリフォルニア州、パロアルト) を、C10orf3の³²P標識PCR産物とハイブリダイズさせた。プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、および洗浄は、供給業者の推奨に従って実施した。ブロットは、増感スクリーンを用いて -80 で5日間かけてオートラジオグラフ検出した。 10

【0137】

C10orf3を発現するプラスミドの構築

C10orf3の全コード領域を、以下の遺伝子特異的プライマーセットを用いてRT-PCRにより増幅した。

5'-CGAAAGCTTCAGAGATGTCTTCCA-3' (配列番号:7) (フォワード) および

5'-AATGGATCCCTTTGAACAGTATTCCAC-3' (配列番号:8) (リバーズ)

【0138】

PCR産物を、pcDNA3.1 (Invitrogen Corp.、米国、カリフォルニア州、カールズバッド)、pFLAG-CMV-5a (Sigma-Aldrich Corp.、米国、ミズーリ州、セントルイス)、pcDNA3.1myc/His (Invitrogen Corp.、米国、カリフォルニア州、カールズバッド) の適切なクローニング部位にクローニングした。同様に、以下のプライマーセットを用いたRT-PCR産物を、pET28a (Novagen、米国、ウィスコンシン州、マディソン) ベクターにクローニングした。 20

5'-ATAGAATTCATGTCTTCCAGAAGTAC-3' (配列番号:9) (フォワード) および

5'-TATCTCGAGCTTTGAACAGTAT-3' (配列番号:10) (リバーズ)

【0139】

C10orf3に対するポリクローナル抗体の調製

組換えHisタグ付C10orf3タンパク質を大腸菌で産生させ、製造業者の推奨に従って (BD Biosciences Clontech、米国、カリフォルニア州、パロアルト) TALON(商標)Superflow Metal Affinity Resinを用いて細胞から精製した。ウサギを免疫化するために、この組換えタンパク質をウサギに接種した。C10orf3に対するポリクローナル抗体を本血清から精製した。タンパク質を10% SDS-PAGEで分離し、この抗体で免疫ブロットした。HRP結合ヤギ抗ウサギIgG (Santa Cruz Biotechnology、カリフォルニア州、サンタクルーズ) を、ECL Detection System (Amersham Pharmacia Biotech、ニュージャージー州、ピスカタウェイ) の二次抗体として使用した。抗C10orf3抗体による免疫プロットングによりflagタグ付C10orf3の54 kDバンドが示され、これは抗flag抗体を用いて検出されたパターンと同一のパターンであった。 30

【0140】

免疫組織化学的染色法

pFLAG-CMV-5a-C10orf3をトランスフェクションしたCOS7細胞、ならびに結腸癌細胞株、SW480、HCT116、およびSNUC5を、4%パラホルムアルデヒドを含むPBSで15分間固定し、次いで0.1% トリトン X-100を含むPBSで室温にて2.5分間透過処理した。続いて、PBSに溶解した3% BSAで室温にて10分間細胞を覆い、非特異的ハイブリダイゼーションをブロックした。pFLAG-CMV-5a-C10orf3をトランスフェクションしたCOS7細胞を、1:1000希釈したマウス抗flagモノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich Corp.、米国、ミズーリ州、セントルイス) および1:1000希釈したウサギ抗C10orf3ポリクローナル抗体で二重染色した。続いて、細胞をFITC結合抗マウス二次抗体 (WAKO、大阪) およびローダミン結合抗ウサギ二次抗体 (Wako、大阪) と共にインキュベートした後に可視化した。SW480、HCT116、およびSNUC5細胞は、1:2000希釈したウサギ抗C10orf3抗体で染色し、ローダミン結合抗ウサギ二 40

次抗体 (Wako、大阪) で可視化した。4',6'-ジアミジン-2'-フェニルインドール二塩酸塩 (DAPI) で核を対比染色した。スペクトル共焦点走査システム (Leica) 下で、蛍光画像を取得した。

【0141】

C10orf3-siRNAを発現するプラスミドの構築およびその遺伝子サイレンシング効果

低分子干渉RNA (siRNA) を発現するプラスミドベクターを調製するため、本発明者らは以下のプライマーセットおよび鋳型としてのヒト胎盤DNAを使用し、PCRによってそのプロモーター領域を含むH1RNA遺伝子のゲノム断片を増幅した。

5'-TGGTAGCCAAGTGCAGGTTATA-3' (配列番号:11) および

5'-CCAAAGGGTTTCTGCAGTTTCA-3' (配列番号:12)

産物を精製し、供給業者の手順 (Invitrogen) に従ってTAクローニングキットを使用し、pCR2.0プラスミドベクターにクローニングした。H1RNAを含むBamHIおよびXhoI断片をpcDNA3.1(+)のヌクレオチド56位と1257位の間に挿入し、以下を用いたPCRによりその断片を増幅した。

5'-TGCGGATCCAGAGCAGATTGTA CTGAGAGT-3' (配列番号:13) および

5'-CTCTATCTCGAGTGAGGCGAAAGAACCA-3' (配列番号:14)

【0142】

連結したDNAを、以下のプライマーを用いてPCR増幅するための鋳型とした。

5'-TTTAAGCTTGAAGACCATTTTTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAC-3' (配列番号:15) および

5'-TTTAAGCTTGAAGACATGGGAAAGAGTGGTCTCA-3' (配列番号:16)

【0143】

産物をHindIIIで消化し、次いで自己連結して、配列番号:23に示すヌクレオチド配列を有するpsiH1BX3.0ベクタープラスミドを作製した。

【0144】

siRNAをコードするDNA断片を、以下のプラスミド配列 (配列番号:23) 中の(-)と表示したヌクレオチド489~492位のギャップに挿入した。

10

20

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGC ACTCTCAGTACAATCTGCTCTGGATCC
ACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTGGTAGCCAAGTGCAGGTTATAGGGA
GCTGAAGGGAAGGGGGTACAGTAGGTGGCATCGTTCC TTTCTGACTGCCCGCCCCCGCAT
GCCGTCCCGCGATATTGAGCTCCGAACCTCTCGCCCTGCCGCGCCGGTGCTCCGTCGCCCGC
CGCGCCGCCATGGAATTCGAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGGCCA
GTGTCACTAGGCGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGA
CAGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGCATGTGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAAC
GTGAAATGTCTTTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTCTTTCCC----TTTT 10
TGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACGAAACCGGGCCGGGCGCGGTGGTTCACGCCTAT
AATCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCGGGCGGATCACAAGGTCAGGAGGTCGAGACCATC
CAGGCTAACACGGTGAAACCCCCCCCCATCTCTACTAAAAAAAAAAAAATACAAAAAATTAG
CCATTAGCCGGGCGTGGTGGCGGGCGCCTATAATCCAGCTACTTGGGAGGCTGAAGCAGA
ATGGCGTGAACCCGGGAGGCGGACGTTGCAGTGAGCCGAGATCGCGCCGACTGCATTCCAG
CCTGGGCGACAGAGCGAGTCTCAAAAAAAAAAACCGAGTGAATGTGAAAAGCTCCGTGAAA
CTGCAGAAACCCAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGTGAGG 20
CGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAG
CGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCCG
CTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCGGCTTCCCCGTCAAGCTCTAAA
TCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTG
ATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGT
TGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCT
CGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGC
TGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAA 30
AGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAAC
CAGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAAT
TAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCC
GCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCT
GCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAA
GCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTC
GCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTC
GGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGC 40
GCAGGGGCGCCCGTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGG
ACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCTTGCAGAGCTGTGCTCGAC
GTTGTCACTGAAGCGGGAAGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCC
TGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTG

CATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGC
ACGTA CT CGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGG
CTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGT
CGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGAT
TCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGT
GATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGC
CGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACT
CTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTCGATTCCAC 10
CGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCC
TCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATA
ATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCAT
TCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATAACCGTCGACCTCT
AGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACA
ATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGA
GCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCC 20
AGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGCTATTGGGCGCTCTTCC
GCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCA
CTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGA
GCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATA
GGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCC
GACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTT
CGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTC
ATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTG 30
CACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAA
CCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCG
AGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAG
AACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCT
CTTGATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACG
CGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTG
GAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGA
TCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTG 40
ACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCA
TAGTTGCCTGACTCCCCGTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCC
AGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCA
GCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTA
TTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTT

GCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGT
 TCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTT
 CGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAG
 CACTGCATAATTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACT
 CAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGCGTCAATA
 CGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTC
 GGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTG
 CACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGA
 AGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCT
 TCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTG
 AATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCT
 GACGTC

10

【0145】

ヘアピンループ構造のヌクレオチド配列およびsiRNAの標的配列を、それぞれ配列番号：22および配列番号：21に示す（各ヘアピンループ構造配列からエンドヌクレアーゼ認識部位は排除してある）。以下の二本鎖オリゴヌクレオチドをpsiH1BX3.0ベクターのBbsI部位

20

にクローニングして、対照プラスミド、psiH1BX-EGFPを調製した。

5'-CACCGAAGCAGCAGCACTTCTTCTTCAAGAGAGAAGAAGTCGTGCTGCTTC-3'（配列番号：17）および

5'-AAAAGAAGCAGCAGCACTTCTTCTTCTTGAAGAAGAAGTCGTGCTGCTTC-3'（配列番号：18）

psiH1BX3.0ベクターに二本鎖オリゴヌクレオチドをクローニングして、C10orf3-siRNAを発現するプラスミドを調製した。C10orf3-siRNAに使用したオリゴヌクレオチドは以下の通りであった。

5'-TCCCGGAGAGACTGAAAACAGAGTTCAAGAGACTCTGTTTTTCAGTCTCTCC-3'（配列番号：19）および

5'-AAAAGGAGAGACTGAAAACAGAGTCTTGAAGTCTGTTTTTCAGTCTCTCC-3'（配列番号：20）（psiH

1BX-C10orf3-G）

【0146】

30

細胞生存度アッセイ

SW480細胞およびHCT116細胞にpsiH1BX-C10orf3E、psiH1BX-C10orf3G、または対照プラスミド（psiH1BX-EGFP）をトランスフェクションし、454 μg/mlジェネティシンの存在下において培養液中で維持した。トランスフェクションしてから10日後、生存細胞数をMTTアッセイにより測定した。次いで、細胞溶解液の吸光度を、450 nmの試験波長（参照、600 nm）において分光光度プレートリーダー（spectrophotometer）で測定した。細胞生存度を対照細胞の吸光度に対する吸光度によって表した。

【0147】

実施例2

結腸直腸癌において上方制御されている遺伝子、C10orf3の同定

40

本発明者らはまた、23040個の遺伝子を含むcDNAマイクロアレイを用いて、結腸直腸癌11例および結腸腺腫9例の発現プロファイルを、対応する非癌性結腸組織の発現プロファイルと比較した。結腸癌において共通して上方制御された遺伝子のうち、UniGeneクラスター（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>）のEST Hs.14559に相当する研究所内アクセッション番号B5904を有する遺伝子が、5例のCRC全ておよび4例の腺腫のうち3例において、対応する非癌性結腸組織と比較して有効なシグナル強度を有して過剰発現されていた（図1a）。B5904ヌクレオチド配列を公的データベースでホモロジー検索したところ、B5904は、予測分子量54 kDの推定464アミノ酸タンパク質をコードする2624ヌクレオチドを含むC10orf3（GenBankアクセッション番号AB091343）と同一であることが明らかになった。構築されたcDNA配列をゲノム配列と比較することで、この遺伝子が9つのエキソンからなり

50

、染色体バンド10q23の約33 kbのゲノム領域をカバーすることが判明した(図1b)。Simple Modular Architecture Research Tool (SMART、<http://smart.embl-heidelberg.de>)を用いてタンパク質モチーフを検索した結果、予測タンパク質がAAA(種々の細胞活性と関連するATPase)ドメインを含むことが明らかになった(図1b)。本発明者らは、さらなる20のCRC症例を用いて半定量的RT-PCRを行うことでC10orf3の発現をさらに解析し、非癌性結腸組織と比較して、20例の癌のうち17例においてその発現が上昇していることを観察した(図1c)。

【0148】

実施例3

正常成体組織におけるC10orf3の発現

10

プローブとしてC10orf3のPCR産物を用いた多組織ノーザンブロット解析により、精巣において大量に発現され、また小腸、結腸、胃、胎盤、および卵巣においてわずかに発現される2.7 kbの転写物が検出された(図2)。

【0149】

実施例4

結腸癌におけるC10orf3タンパク質の発現

C10orf3の発現を調べ、C10orf3の機能を探索するため、本発明者らはC10orf3に対するポリクローナル抗体を調製した。COS7細胞、ならびにSW480、HCT116、HT29、SNUC4、およびSNUC5を含む結腸癌細胞の全抽出物を用いてウェスタンブロット解析したところ、C10orf3に相当する54 kDaバンドが示された(図3a)。内因性C10orf3タンパク質の大きさは、抗C10orf3抗体で検出されるflagタグ付C10orf3の大きさと極めて似ていた。4例の癌組織およびそれらに相当する非癌粘膜由来の抽出物を用いてさらにウェスタンブロット解析した結果、4例のうち3例の癌においてその発現が上昇していることが明らかになった(図3b)。

20

【0150】

実施例5

C10orf3の細胞内局在性

C10orf3タンパク質の細胞内局在性を調べるため、本発明者らは抗C10orf3抗体を用いて蛍光免疫組織化学的染色を行った。pFLAG-CMV-5a-C10orf3をトランスフェクションしたCOS7細胞を、抗Flag抗体および抗C10orf3抗体で共染色した。その結果、いずれの抗体も、外因性Flagタグ付C10orf3タンパク質の細胞質への同様の細胞内局在性を示した(図4a)。同様に、本発明者らはSW480、HCT116、およびSNUC5結腸癌細胞を用いて免疫細胞化学的染色を行い、内因性C10orf3タンパク質について調べた。一貫して、この解析から、これら3つの細胞株において、C10orf3の細胞質への同様の細胞内局在性が実証された(図4b)。

30

【0151】

実施例6

C10orf3 siRNAによる結腸癌細胞の増殖抑制

細胞増殖におけるC10orf3の機能について調べるため、本発明者らはC10orf3に対するsiRNAを発現するプラスミドをSW480細胞およびHCT116細胞にトランスフェクションした。その結果、半定量的RT-PCRから、psiH1BX-C10orf3-Gは対照プラスミド(psiH1BX-EGFP)と比較してC10orf3の発現を有意に抑制することが示された(図5a)。トランスフェクションしてから10日後、psiH1BX-C10orf3-Gをトランスフェクションした細胞の生存数は、psiH1BX-EGFPをトランスフェクションした場合と比較して顕著に減少していた(図5b、c)。プラスミドの増殖阻害効果は、これらの遺伝子サイレンシング活性と十分に相関していた。この結果から、C10orf3が、結腸直腸癌細胞において細胞増殖および/または生存に重要な役割を果たすことが示唆される。

40

【0152】

産業上の利用可能性

以前に行ったゲノム全体にわたるcDNAマイクロアレイの遺伝子発現解析により、特異的

50

に上方制御される遺伝子C10orf3が同定された。本発明により、C10orf3が癌の予防および治療の標的となることが明らかにされた。本発明は、C10orf3の発現に基づき、CRCを同定または検出するための分子診断マーカーを提供する。

【0153】

本明細書に記載の方法はまた、CRCの予防、診断、および治療のためのさらなる分子標的の同定においても有用である。本明細書に報告したデータはCRCの包括的理解の一助となり、新規診断戦略の開発を容易にし、治療薬剤および予防薬剤の分子標的を同定する手がかりを提供する。そのような情報は結腸直腸腫瘍形成のより深い理解に寄与し、CRCの診断、治療、および最終的な予防のための新規戦略を開発するための指標を提供する。

【0154】

本明細書において引用した特許、特許出願、および刊行物は全て、その全文が参照により組み入れられる。さらに、本発明は詳細にかつその特定の態様に関連して記述してきたが、本発明の精神および範囲を逸脱することなく様々な改変および変更が行われ得ることは当業者に明らかであると考えられる。

【0155】

参考文献

1. Murthy, R. S., Bertolote, J. M., Epping-Jordan, J., Funk, M., Prentice, T., Saraceno, B., and Saxena, S. The World Health Report 2001. A. Haden and B. Campanini (eds.), pp. 144-149. Basel, Switzerland: World Health Organization, 2001.
2. Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando, H., Horii, A., Koyama, K., Utsunomiya, J., Baba, S., and Hedge, P. Mutation of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science (Wash. DC)*, 253: 665-669, 1991.
3. Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., vanTuinen, P., Ledbetter, D. H., Barker, D. F., Nakamura, Y., White, R., and Vogelstein, B. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science (Wash. DC)*, 244: 217-221, 1989.
4. Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science (Wash. DC)*, 275: 1787-1790, 1997.
5. Forrester, K., Almoguera, C., Han, K., Grizzle, W. E., and Perucho, M. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature (Lond.)*, 327: 298-303, 1987.
6. Jones, P. A., and Laird, P. W. Cancer epigenetics comes of age. *Nat. Genet.*, 21: 163-167, 1999.
7. Cui, H., Horon, I. L., Ohlsson, R., Hamilton, S. R., and Feinberg, A. P. Loss of imprinting in normal tissue of colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Nat. Med.*, 4: 1276-1280, 1998.
8. Molina, M. A., Codony-Servat, J., Albanell, J., Rojo, F., Arribas, J., and Baselga, J. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res.*, 61: 4744-4749, 2001.
9. O'Dwyer, M. E., and Druker, B. J. Status of bcr-abl tyrosine kinase inhibitors in chronic myelogenous leukemia. *Curr. Opin. Oncol.*, 12: 594-597, 2000.
10. Afshari CA, Nuwaysir EF and Barrett JC. (1999). *Cancer Res.*, 59, 4759-4760.
11. Kallioniemi OP. (2001). *Ann. Med.*, 33, 142-147.
12. Ono K, Tanaka T, Tsunoda T, Kitahara O, Kihara C, Okamoto A, Ochiai K, Takagi T and Nakamura Y. (2000). *Cancer Res.*, 60, 5007-5011.
13. Kitahara O, Furukawa Y, Tanaka T, Kihara C, Ono K, Yanagawa R, Nita, M, Takagi T, Nakamura Y and Tsunoda T. (2001). *Cancer Res.*, 61, 3544-3549.
14. Okabe H, Satoh S, Kato T, Kitahara O, Yanagawa R, Yamaoka Y, Tsunoda T, Furu

10

20

30

40

50

kawa Y and Nakamura. (2001). Cancer Res ., 61, 2129-2137.

【図面の簡単な説明】

【 0 1 5 6 】

【図1】図1(a)は、cDNAマイクロアレイで調べた、原発性のCRC 11例および腺腫9例におけるC10orf3の相対発現比（癌/非癌）を示す。カットオフフィルターを透過した5例のCRC全ておよび4例の腺腫のうち3例において、上方制御された発現（Cy3/Cy5強度比 > 2）が観察された（Cy3シグナルまたはCy5シグナルのいずれかが20,000を超える）。図1(b)は、C10orf3のゲノム構造および転写物、ならびにその予測タンパク質モチーフを示す図である。白四角はAAA（種々の細胞活性と関連するATPase）ドメインを示す。図1(c)は、さらなる20のCRC症例を用いたC10orf3の半定量的RT-PCR解析を示す写真である。T、腫瘍組織；N、正常組織。GAPDHの発現を内部対照とした。

10

【図2】C10orf3の多組織ノーザンブロット解析を示す写真である。

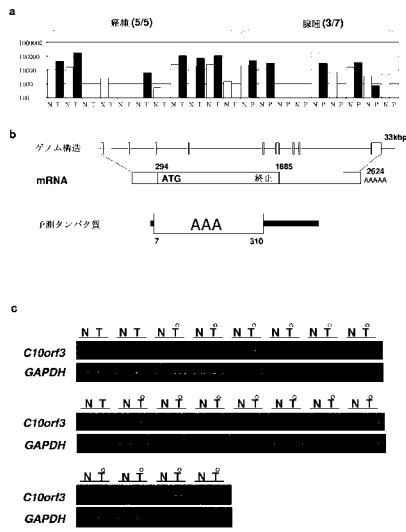
【図3】図3(a)は、SW480、HCT116、HT29、SNUC4、およびSNUC5結腸癌細胞ならびにCOS7細胞におけるC10orf3タンパク質の発現を示す写真である。pFlag-CMV-5a-C10orf3をトランスフェクションしたCOS7細胞におけるflagタグ付C10orf3タンパク質を対照とした。図3(b)は、4例の結腸癌組織および対応する正常組織におけるC10orf3タンパク質の発現を示す写真である。

【図4】図4(a)および(b)は、C10orf3の細胞内局在性を示す写真である。図4(a)から、pFlag-CMV-5a-C10orf3をトランスフェクションしたCOS7細胞が、抗Flagモノクローナル抗体および抗C10orf3ポリクローナル抗体で染色されたことが示される。Flagタグ付タンパク質はFITC結合二次抗マウスIgG抗体およびローダミン結合抗ウサギIgG抗体により可視化した。核を対比染色するためにDAPIを使用した。図4(b)は、結腸癌細胞における内因性C10orf3タンパク質の免疫細胞化学的染色を示す。核を対比染色するためにDAPIを使用した。

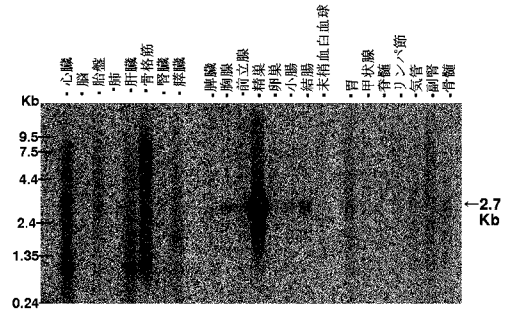
20

【図5】図5(a)～(c)は、C10orf3の発現およびSW480細胞またはHCT116細胞の生存度に及ぼすC10orf3-siRNAの効果を示す。図5(a)は、C10orf3-siRNAに対するsiRNAを発現するプラスミドまたは対照プラスミドをトランスフェクションした細胞由来のRNAを用いた半定量的RT-PCR解析を示す写真である。図5(b)および(c)は、ギムザ染色(b)およびMTTアッセイ(c)によって確認した、SW480細胞またはHCT116細胞の生存度に及ぼすC10orf3-siRNAの効果を示す。

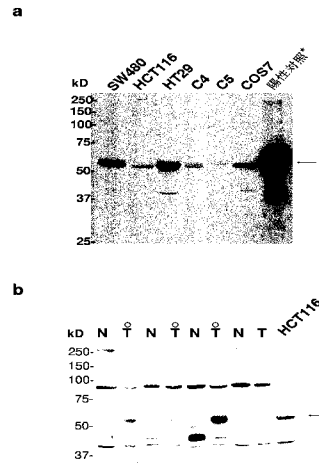
【 図 1 】



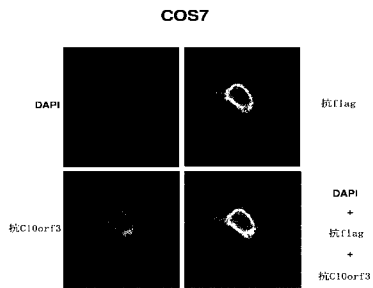
【 図 2 】



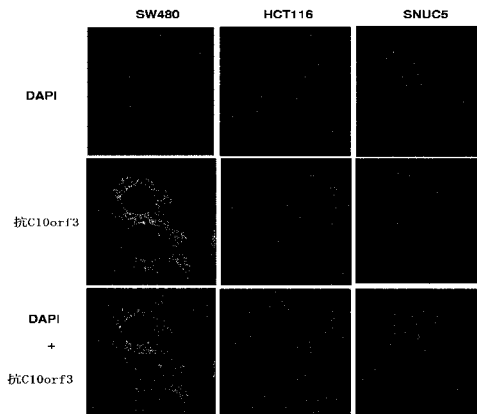
【 図 3 】



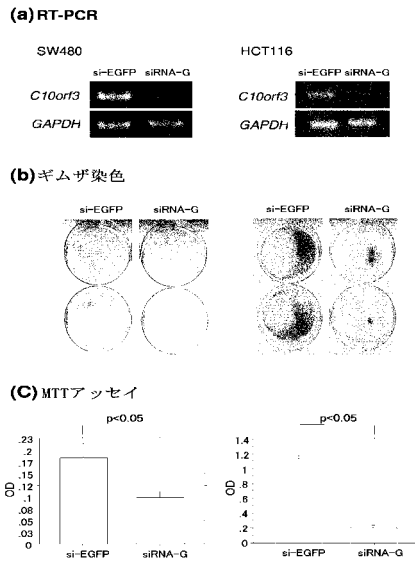
【 図 4 a 】



【 図 4 b 】



【 図 5 】



【 配列表 】

[2007522791000001.app](#)

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成19年2月16日 (2007.2.16)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

対象におけるCRCまたはCRCを発症する素因を診断する方法であって、患者由来生体試料におけるC10orf3の発現レベルを決定する段階を含み、ここで該遺伝子の正常対照レベルと比較した場合の該レベルの増加により、該対象がCRCを患っているかまたは発症する危険性があることが示される方法。

【 請求項 2 】

増加が正常対照レベルよりも少なくとも10%高い、請求項1記載の方法。

【 請求項 3 】

以下からなる群より選択されるいずれか1つの方法によって発現レベルが決定される、請求項1記載の方法：

(a) C10orf3のmRNAの検出、

(b) C10orf3によってコードされるタンパク質の検出、および

(c) C10orf3によってコードされるタンパク質の生物活性の検出。

【 請求項 4 】

患者由来生体試料の遺伝子転写物に対するC10orf3プローブのハイブリダイゼーション

を検出することで発現レベルが決定される、請求項1記載の方法。

【請求項5】

ハイブリダイゼーション段階がDNAアレイで行われる、請求項4記載の方法。

【請求項6】

生体試料が上皮細胞を含む、請求項1記載の方法。

【請求項7】

生体試料がCRC細胞を含む、請求項1記載の方法。

【請求項8】

生体試料がCRCに由来する上皮細胞を含む、請求項4記載の方法。

【請求項9】

以下の段階を含む、CRCを治療または予防するための化合物をスクリーニングする方法：

- (a) 被験化合物をC10orf3の核酸によってコードされるポリペプチドと接触させる段階；
- (b) 前記ポリペプチドと被験化合物との間の結合活性を決定する段階；および
- (c) 前記ポリペプチドに結合する化合物を選択する段階。

【請求項10】

以下の段階を含む、CRCを治療または予防するための化合物をスクリーニングする方法：

- (a) 候補化合物をC10orf3を発現する細胞と接触させる段階；および
- (b) C10orf3の発現レベルを低減させる化合物を選択する段階。

【請求項11】

細胞が結腸直腸癌細胞を含む、請求項10記載の方法。

【請求項12】

以下の段階を含む、CRCを治療または予防するための化合物をスクリーニングする方法：

- (a) 被験化合物をC10orf3の核酸によってコードされるポリペプチドと接触させる段階；
- (b) 段階(a)のポリペプチドの生物活性を検出する段階；および
- (c) 被験化合物の非存在下で検出される生物活性と比較して、C10orf3の核酸によってコードされるポリペプチドの生物活性を抑制する化合物を選択する段階。

【請求項13】

ポリペプチドの生物活性が細胞増殖活性である、請求項12記載の方法。

【請求項14】

ポリペプチドの生物活性がATP-ase活性である、請求項12記載の方法。

【請求項15】

以下の段階を含む、CRCを治療または予防するための化合物をスクリーニングする方法：

- (a) 候補化合物を、C10orf3の転写制御領域およびその転写制御領域の制御下で発現されるレポーター遺伝子を含むベクターを導入した細胞と接触させる段階；
- (b) 該レポーター遺伝子の活性を測定する段階；ならびに
- (c) 対照と比較して、該レポーター遺伝子の発現レベルを低減させる化合物を選択する段階。

【請求項16】

C10orf3の核酸配列またはポリペプチドに結合する検出試薬を含むキット。

【請求項17】

有効成分として、C10orf3のポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチドまたは低分子干渉RNAの薬学的有効量、および薬学的に許容される担体を含む、CRCを治療または予防するための組成物。

【請求項18】

siRNAが、標的配列として配列番号:21のヌクレオチド配列を含むセンス鎖を含む、請求項17記載の組成物。

【請求項19】

siRNAが一般式5'-[A]-[B]-[A']-3'を有し、式中、

[A]は配列番号:21のヌクレオチド配列に相当するリボヌクレオチド配列であり、
[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、および

[A']は[A]の相補配列からなるリボヌクレオチド配列である、請求項18記載の組成物。

【請求項20】

有効成分として、C10orf3の核酸によってコードされるタンパク質に結合する抗体またはその断片の薬学的有効量、および薬学的に許容される担体を含む、CRCを治療または予防するための組成物。

【請求項21】

C10orf3の核酸によってコードされるポリペプチドもしくは該ポリペプチドの免疫学的活性断片、またはこのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むワクチン。

【請求項22】

センス鎖が配列番号:21に相当するリボヌクレオチド配列を含み、ならびにアンチセンス鎖が該センス鎖に相補的であるリボヌクレオチド配列を含み、該センス鎖および該アンチセンス鎖が互いにハイブリダイズして二本鎖分子を形成し、C10orf3遺伝子を発現する細胞に導入された場合に該二本鎖分子が該遺伝子の発現を阻害する、センス鎖およびアンチセンス鎖を含む二本鎖分子。

【請求項23】

センス鎖が配列番号:1由来の約19~約25の連続したヌクレオチドを含む、請求項22記載の二本鎖分子。

【請求項24】

センス鎖が配列番号:21に相当するリボヌクレオチド配列からなる、請求項22記載の二本鎖分子。

【請求項25】

単一のリボヌクレオチド転写物がセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、二本鎖が該センス鎖と該アンチセンス鎖を連結する一本鎖リボヌクレオチド配列をさらに含む、請求項22記載の二本鎖分子。

【請求項26】

請求項22記載の二本鎖分子をコードするベクター。

【請求項27】

二次構造を有する転写物をコードし、この転写物がセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む、請求項26記載のベクター。

【請求項28】

転写物がセンス鎖とアンチセンス鎖を連結する一本鎖リボヌクレオチド配列をさらに含む、請求項26記載のベクター。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/JP2004/002145

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 G01N33/574 G01N33/68 C12N15/11 A61K38/17 A61K39/00		
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) IPC 7 C12Q G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/60860 A (MILLENNIUM PREDICTIVE MEDICINE) 23 August 2001 (2001-08-23) see SEQ ID NO:21355 and SEQ ID NO:27197: said SEQs show 99,9%identity to SEQ ID NO:1, respectively C10orf3 in 2616nt overlap abstract page 24, line 6 - line 26 page 35, line 14 - page 37, line 28; claims 8,46-48; tables 1-9	16,25, 28,30, 31,33-36
Y	WO 2004/001072 A (ONCOTHERAPY SCIENCE INC ; FURUKAWA YOICHI (JP); NAKAMURA YUSUKE (JP);) 31 December 2003 (2003-12-31) the whole document -/--	1-15, 17-23, 26,27,32
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
^a Special categories of cited documents :		
<ul style="list-style-type: none"> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document 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. *B* document member of the same patent family 		
Date of the actual completion of the international search 27 October 2004		Date of mailing of the international search report 08. 11. 2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mossier, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP2004/002145

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	-& LIN Y-M ET AL: "MOLECULAR DIAGNOSIS OF COLORECTAL TUMORS BY EXPRESSION PROFILES OF 50 GENES EXPRESSED DIFFERENTIALLY IN ADENOMAS AND CARCINOMAS" ONCOGENE, BASINGSTOKE, HANTS, GB, vol. 21, no. 26, 13 June 2002 (2002-06-13), pages 4120-4128, XP001157022 ISSN: 0950-9232 the whole document	
Y	----- WO 02/21996 A (EOS BIOTECHNOLOGY INC ; GISH KURT C (US); MACK DAVID H (US); WILSON KE) 21 March 2002 (2002-03-21) page 2, line 30 - page 5, line 25 page 20, line 5 - line 11 page 58, line 30 - page 59, line 21	1-15, 17-23, 26,27,32
Y	----- WO 00/50588 A (INCYTE PHARMA INC ; KLINGLER TOD M (US); LAL PREETI (US); VOLKMUTH WAY) 31 August 2000 (2000-08-31) page 1, line 4 - page 3, line 4 page 11, line 4 - page 14, line 33; table 4	1-15, 17-23, 26,27,32
Y	----- KITAHARA O ET AL: "ALTERATIONS OF GENE EXPRESSION DURING COLORECTAL CARCINOGENESIS REVEALED BY CDNA MICROARRAYS AFTER LASER-CAPTURE MICRODISSECTION OF TUMOR TISSURES AND NORMAL EPITHELIA" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 61, no. 9, 1 May 2001 (2001-05-01), pages 3544-3549, XP001157021 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-15, 17-23, 26,27,32
Y	----- YANAGAWA R ET AL: "GENOME-WIDE SCREENING OF GENES SHOWING ALTERED EXPRESSION IN LIVER METASTASES OF HUMAN COLORECTAL CANCERS BY CDNA MICROARRAY" NEOPLASIA, DOYMA, BARCELONA,, ES, vol. 3, no. 5, September 2001 (2001-09), pages 395-401, XP009024057 ISSN: 0212-9787 abstract; table 2 page 400, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 4	1-15, 17-23, 26,27,32
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/JP2004/002145

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BUCKHAULTS P ET AL: "Secreted and cell surface genes expressed in benign and malignant colorectal tumors" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 61, 1 October 2001 (2001-10-01), pages 6996-7001, XP002960006 ISSN: 0008-5472 abstract; figures 1-5; tables 1-4 page 7001, column 1, paragraph 2 -----	1-15, 17-23, 26,27,32
A	ZHANG L ET AL: "Gene expression profiles in normal and cancer cells" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 276, 23 May 1997 (1997-05-23), pages 1268-1272, XP002083785 ISSN: 0036-8075 abstract; figures 1,2; tables 1-4 -----	1-23, 25-28, 30-36
A	EP 0 284 362 A (ICI PLC) 28 September 1988 (1988-09-28) -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/002145

Box 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.: 24, 29
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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 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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/JP2004/002145

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 1 - 8 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 17 - 23 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Present claims 24 and 29 relate to an extremely large number of possible compounds or formulations comprising the same. No support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for any compound identifiable by methods according to claims 9 - 15. The compounds recited in claims 24 and 29 are therefore purely hypothetical. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search is impossible. Consequently, no search has been carried out.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

JP/JP2004/002145

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0160860	A	23-08-2001	AU 4154101 A WO 0160860 A2	27-08-2001 23-08-2001
WO 2004001072	A	31-12-2003	WO 2004001072 A2	31-12-2003
WO 0221996	A	21-03-2002	US 2003077568 A1 AU 9090201 A CA 2422278 A1 EP 1317669 A2 JP 2004515225 T WO 0221996 A2 US 2002102544 A1	24-04-2003 26-03-2002 21-03-2002 11-06-2003 27-05-2004 21-03-2002 01-08-2002
WO 0050588	A	31-08-2000	AU 3479700 A CA 2361743 A1 EP 1155126 A2 JP 2002536995 A WO 0050588 A2	14-09-2000 31-08-2000 21-11-2001 05-11-2002 31-08-2000
EP 0284362	A	28-09-1988	AU 625169 B2 AU 1337888 A DK 159788 A EP 0284362 A2 FI 881388 A JP 1034291 A NO 881273 A NZ 223985 A PT 87055 A ,B ZA 8802082 A	02-07-1992 22-09-1988 24-09-1988 28-09-1988 24-09-1988 03-02-1989 26-09-1988 28-05-1991 01-04-1988 28-12-1988

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I			テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	H	4 C 0 8 6
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D	
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	M	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N	37/00	1 0 2	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z	
	G 0 1 N	33/15	Z	

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

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA11 CA20 DA02 EA04 HA11
 4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ42 QR32 QR66 QR82 QS34 QS36
 QX01 QX02
 4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 BA22 BA23 BA35 BA50 CA18 MA17
 MA22 MA23 MA31 MA35 MA37 MA41 MA43 MA52 MA56 MA59
 MA60 MA66 NA14 ZA662 ZB052 ZB092 ZB262
 4C085 AA03 BB01 BB11 BB23 DD62 EE01 GG02
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA66 ZB05 ZB09
 ZB26

【要約の続き】

专利名称(译)	诊断结肠直肠癌的方法		
公开(公告)号	JP2007522791A	公开(公告)日	2007-08-16
申请号	JP2006520608	申请日	2004-02-24
[标]申请(专利权)人(译)	肿瘤疗法科学股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	ONCO疗法科学股份有限公司		
[标]发明人	中村祐輔 古川洋一		
发明人	中村 祐輔 古川 洋一		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 A61K48/00 A61K31/7088 A61K39/00 G01N33/53 G01N37/00 G01N33/50 G01N33/15 A61K38/17 C12N15/11 G01N33/574 G01N33/68		
CPC分类号	A61K39/0011 A61P1/00 C12Q1/6886 C12Q2600/136 G01N33/57419 G01N2500/10 A61K2039/82		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/02 C12Q1/68.A A61K48/00 A61K31/7088 A61K39/00.H G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.102 G01N33/50.Z G01N33/15.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FA18 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045 /GC12 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063 /QR32 4B063/QR66 4B063/QR82 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA35 4C084/BA50 4C084 /CA18 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA31 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA41 4C084/MA43 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084 /ZA662 4C084/ZB052 4C084/ZB092 4C084/ZB262 4C085/AA03 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085 /BB23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG02 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA66 4C086/ZB05 4C086/ZB09 4C086/ZB26		
代理人(译)	清水初衷		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文描述了用于检测和诊断结肠直肠癌 (CRC) 的客观方法。在一个实施方案中, 诊断方法包括确定区分CRC和正常细胞的C10orf3的表达水平的步骤。本发明进一步提供筛选可用于治疗CRC的治疗剂的方法, 治疗CRC的方法和用CRC接种受试者的方法。