

(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2009-232705

(P2009-232705A)

(43) 公開日 平成21年10月15日(2009.10.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	4 B 0 6 3
A 6 1 K 31/5377 (2006.01)	A 6 1 K 31/5377	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/415 (2006.01)	A 6 1 K 31/415	4 C 0 8 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 13 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-80347 (P2008-80347)
 (22) 出願日 平成20年3月26日 (2008. 3. 26)

(71) 出願人 503359821
 独立行政法人理化学研究所
 埼玉県和光市広沢2番1号
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100116311
 弁理士 元山 忠行
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史
 (72) 発明者 近藤 亨
 兵庫県神戸市中央区港島南町2-2-3
 独立行政法人理化学研究所 神戸研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グリオーマの由来の判別方法およびグリオーマ治療剤

(57) 【要約】

【課題】グリオーマ細胞、特にG B Mに特異的に発現する分子を見出し、これをガンの診断や治療等に用いること。

【解決手段】グリオーマ細胞の由来の判別方法であって、グリオーマ細胞におけるD B C C R 1 Lタンパク質またはそのフラグメント、あるいはD B C C R 1 Lタンパク質をコードするヌクレオチド配列からの転写物の存在の有無を検出し、グリオーマ細胞がこれらのうちのいずれかを有している場合に、グリオーマ細胞がオリゴデンドロサイト由来であると判別することを特徴とする方法、ならびにC o x 2阻害剤およびE G F R阻害剤を含む、オリゴデンドロサイト由来のグリオーマに対して有効なグリオーマ治療用医薬組成物。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

グリオーマ細胞の由来の判別方法であって、グリオーマ細胞における D B C C R 1 L タンパク質またはそのフラグメント、あるいは D B C C R 1 L タンパク質をコードするヌクレオチド配列からの転写物の存在の有無を調べ、グリオーマ細胞がこれらのうちのいずれかを有する場合に、グリオーマ細胞がオリゴデンドロサイト由来であると判別することを特徴とする方法。

【請求項 2】

該 D B C C R 1 L タンパク質またはそのフラグメントが下記アミノ酸配列のいずれか：

(a) 配列番号： 1 のアミノ酸配列；

(b) 配列番号： 1 のアミノ酸配列において、 1 または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列；

(c) 配列番号： 1 のアミノ酸配列と 9 5 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列；あるいは

(d) (a) ~ (c) のいずれかのアミノ酸配列のフラグメントのアミノ酸配列を有するものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

該転写物が配列番号： 1 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列から転写される m R N A である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

該 D B C C R 1 L タンパク質またはそのフラグメントの存在の有無を免疫染色法により調べる、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 5】

C o x 2 阻害剤および E G F R 阻害剤を含む、オリゴデンドロサイトに由来するグリオーマを治療するための医薬組成物。

【請求項 6】

C o x 2 阻害剤がセレコキシブであり、 E G F R 阻害剤がゲフィチニブである、請求項 5 記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本発明は、グリオーマの由来の判別方法に関する。詳細には、本発明は、 D B C C R 1 L タンパク質またはそのフラグメントを発現するグリオーマをオリゴデンドロサイト由来であると判別する方法に関する。さらに本発明は、オリゴデンドロサイト由来のグリオーマを治療するための医薬組成物に関する。該医薬組成物は C o x 2 阻害剤および E G F R 阻害剤を含む。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

グリオーマは日本の原発性脳腫瘍の約 2 5 % を占める脳の悪性腫瘍の代表格である。その中でも悪性グリオーマにおいては、この数十年間、手術を基本として放射線治療および化学療法を補助療法とする治療がほとんど変わっておらず、新しい治療法の確立が待たれている。最近の研究から、中枢神経系組織における悪性グリオーマのうち最も悪性である多形神経膠芽腫 (G B M) がガン幹細胞を含むことが示された (非特許文献 1 - 4) 。ガン幹細胞は無期限に自己再生を繰り返し、腫瘍を形成する。これまでにガン幹細胞は組織の幹細胞や分化した細胞から生じると予想されてきたが、白血病以外にはどの細胞に由来するか知られていなかった (非特許文献 5 および 6) 。

【 0 0 0 3 】

本発明者らは、近年、オリゴデンドロサイト前駆細胞 (O P C) において R a s シグナル経路の活性を調節すると、ガン幹細胞の性質、すなわち、腫瘍、特にグリオーマを形成する能力を示すことを見出した (特許文献 1 および非特許文献 7 - 1 0) 。このことは、

10

20

30

40

50

グリオーマ細胞がオリゴデンドロサイト前駆細胞（OPC）に由来することを示唆する。しかしながら、グリオーマ細胞、特にGBMの由来について指標となるものは見出されおらず、グリオーマの由来を判別することは困難であった。

【特許文献1】特願2007-109539

【非特許文献1】Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111 (2001).

【非特許文献2】Singh, S. K., Clarke, I. D., Hide, T., & Dirks, P. B. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 23, 7267-7273 (2004).

【非特許文献3】Kondo, T. Brain cancer stem-like cells. *Eur. J. Cancer* 42, 1237-1242 (2006).

【非特許文献4】Vescovi, A. L., Galli, R., & Reynolds, B. A. Brain tumour stem cells. *Nat. Rev. Cancer* 6, 425-364 (2006).

【非特許文献5】Huntly, B. J., & Gilliland, D. G. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat. Rev. Cancer* 5, 311-321 (2005).

【非特許文献6】Krivtsov, A. V., & Armstrong, S. A. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat. Rev. Cancer* 7, 823-833 (2007).

【非特許文献7】Liepelt, U. et al. Differentiation potential of a monoclonal antibody-defined neural progenitor cell population isolated from prenatal rat brain by fluorescence-activated cell sorting. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 51, 267-278 (1990).

【非特許文献8】Johe, K. K. et al. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev.* 10, 3129-3140 (1996).

【非特許文献9】Rao, M. S., Noble, M. et al., A tripotential glial precursor cell is present in the developing spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3996-4001 (1998).

【非特許文献10】Wang, S. et al. A role for the helix-loop-helix protein Id2 in the control of oligodendrocyte development. *Neuron* 29, 603-14 (2001).

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

したがって、本発明の解決課題は、悪性腫瘍、特にグリオーマ細胞に特異的に発現している分子を見出し、これをガンの診断や治療等に用いることであった。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行い、オリゴデンドロサイト由来のグリオーマに特異的なマーカー（DBCCR1Lタンパク質およびそれをコードするボリヌクレオチド）を見出した。さらに本発明者らは、Cox2阻害剤およびEGFR阻害剤を組み合わせることで、オリゴデンドロサイト由来のグリオーマを効果的に治療できることも見出した。そして本発明者らは、これらの知見から本発明を完成するに至った。

【0006】

すなわち、本発明は：

(1) グリオーマ細胞の由来の判別方法であって、グリオーマ細胞におけるDBCCR1Lタンパク質またはそのフラグメント、あるいはDBCCR1Lタンパク質をコードするヌクレオチド配列からの転写物の存在の有無を調べ、グリオーマ細胞がこれらのうちのいずれかを有する場合に、グリオーマ細胞がオリゴデンドロサイト由来であると判別することを特徴とする方法、

(2) 該DBCCR1Lタンパク質またはそのフラグメントが下記アミノ酸配列のいずれ

10

20

30

40

50

れか：

(a) 配列番号： 1 のアミノ酸配列；

(b) 配列番号： 1 のアミノ酸配列において、 1 または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列；

(c) 配列番号： 1 のアミノ酸配列と 9 5 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列；あるいは

(d) (a) ~ (c) のいずれかのアミノ酸配列のフラグメントのアミノ酸配列を有するものである、(1) 記載の方法、

(3) 該転写物が配列番号： 1 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列から転写される mRNA である、(1) 記載の方法、

(4) 該 DBCCR1L タンパク質またはそのフラグメントの存在の有無を免疫染色法により調べる、(1) または (2) の方法、

(5) Cox2 阻害剤および EGFR 阻害剤を含む、オリゴデンドロサイトに由来するグリオーマを治療するための医薬組成物、

(6) Cox2 阻害剤がセレコキシブであり、EGFR 阻害剤がゲフィチニブである、(5) 記載の医薬組成物を提供する。

【発明の効果】

【0007】

本発明によれば、グリオーマ、特に最も悪性である多形神経膠芽腫 (GBM) を包含するグリオーマの由来を判定することができ、オリゴデンドロサイト由来のグリオーマである場合に、Cox2 阻害剤および EGFR 阻害剤を組み合わせることで、これを治療することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明は、1 の態様において、グリオーマ細胞の由来の判別方法であって、グリオーマ細胞における DBCCR1L (Deleted in Breast Cancer Chromosome Region 1 Like) タンパク質 (別名：FAM5C タンパク質) またはそのフラグメント、あるいは前記タンパク質をコードするヌクレオチド配列からの転写物の存在の有無を検出し、グリオーマ細胞がこれらのうちのいずれかを有する場合に、グリオーマ細胞がオリゴデンドロサイト由来であると判別することを特徴とする方法を提供する。本発明の方法により由来を判別できるグリオーマ細胞は、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ等の動物あるいは鳥類のものであり、好ましくはヒトのグリオーマ細胞である。動物対象からの生検試料の取得は公知の手法により行うことができる。

【0009】

対象において本発明の判別方法を実施する場合には、グリオーマ細胞における DBCCR1L タンパク質またはそのフラグメントの存在の有無を検出することができる。対象がヒトである場合には、DBCCR1L タンパク質は、配列番号： 1 のアミノ酸配列を有するものであってもよく、あるいは配列番号： 1 のアミノ酸配列において、1 または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列、例えば、1 ~ 9 個、好ましくは、1 ~ 5 個、1 ~ 3 個、さらに好ましくは 1 ~ 2 個、より好ましくは 1 個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列；ならびに配列番号： 1 のアミノ酸配列と 5 0 % 以上の相同性、好ましくは 6 0 % 以上、7 0 % 以上、8 0 % 以上の相同性、より好ましくは 8 5 % 以上、9 0 % 以上の相同性、さらに好ましくは 9 3 %、9 5 %、9 7 %、あるいは 9 9 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するものであってもよい。アミノ酸配列の相同性は、FASTA、BLAST などの一般的な配列分析用ツールを用いて測定することができる。すなわち、本明細書においては、上記のような DBCCR1L タンパク質の変異体もまた DBCCR1L タンパク質に包含されるものとする。また、本発明の判別方法を実施する場合には、グリオーマにおける DBCCR1L タンパク質のフラグメン

10

20

30

40

50

トの有無を調べてもよい。したがって、本明細書において、特に断らないかぎり、D B C C R 1 L タンパク質という場合には、上記の変異体に加えて、D B C C R 1 L タンパク質のフラグメントも包含するものとする。また、本明細書において、「D B C C R 1 L タンパク質」を「D B C C R 1 L ポリペプチド」と言い換えることがある。ここで、本発明におけるフラグメントとは、全長のD B C C R 1 L タンパク質のポリペプチド鎖の一部をいう。また、対象がヒト以外の動物、例えば、マウス、ラット、ウシなどの他の動物の場合であっても、それらのD B C C R 1 L タンパク質は本明細書にいうD B C C R 1 L タンパク質に包含されうる。

【0010】

本発明において、グリオーマ細胞におけるD B C C R 1 L ポリペプチドの存在の有無を調べるために、公知の手段・方法を用いることができる。例えば、免疫染色法、蛍光抗体法、免疫沈降法、ウェスタンブロット法、ラジオイムノアッセイ(R I A)法、E L I S A法、ツーハイブリッドシステムなどの免疫学的なタンパク質の検出方法を含むが、D B C C R 1 L ポリペプチドを検出できる方法であれば、これらだけに限らない。最も好ましくは免疫染色法である。

10

【0011】

また、対象において本発明の判別方法を実施する場合には、グリオーマ細胞におけるD B C C R 1 L タンパク質(配列番号: 1)をコードするヌクレオチド配列から転写された転写物の存在の有無を調べることができる。本発明における転写物とは、D B C C R 1 L タンパク質をコードするヌクレオチド配列から転写された産物を意味し、例えば、m R N Aまたはあらゆる他のタイプのR N A、ならびにこれらのフラグメントなどであってよい。

20

【0012】

本発明において、グリオーマ細胞における上記転写物の存在の有無を調べるために、当業者間で一般的な手法を用いてもよい。例えば、in situ ハイブリダイゼーション法、ノザンブロット法、ドットブロット法、RNアーゼプロテクションアッセイ法、PCR法、RT-PCR法などのポリヌクレオチドの検出法を含んでよい。また、マイクロアレイ(例えば、DNAマイクロアレイ、microRNAマイクロアレイ、プロテインマイクロアレイなど)を用いた遺伝子解析方法を行ってもよいが、これら以外の方法であってもよい。

30

【0013】

本発明において、グリオーマとは神経膠細胞から発生した腫瘍の総称である。本発明の判別方法にて由来を判別できるグリオーマは、上述のごとく動物、好ましくはヒトに由来するものであり、多形神経膠芽腫(G B M)、アストローマ(星細胞腫)、髄芽腫、脳室上位腫、乏突起膠腫、脈絡叢乳頭腫などが例示されるが、これらのグリオーマ細胞に限らない。最も好ましくはG B Mである。これまでに、オリゴデンドロサイト由来のグリオーマ(オリゴデンドログリオーマ)のマーカーとして、O l i g 1、O l i g 2およびM y e l i n B a s i c P r o t e i n (M B P)が周知であったが、これらのタンパク質または遺伝子はほとんどのG B Mにおいて検出されるため、オリゴデンドロサイト由来のG B Mのマーカーとして使用できなかつた。本発明では、D B C C R 1 Lをマーカーとして用いることにより、G B Mを包含するオリゴデンドロサイト由来のグリオーマを検出できる点が最大の技術的特徴である。

40

【0014】

グリオーマ細胞がD B C C R 1 L タンパク質、そのフラグメント、または上記転写物を有しているとの判別は、生検試料において、前記タンパク質、そのフラグメント、または転写物が上記方法により腫瘍部位において他の正常部位または正常な時期と比較して高いレベルで検出されることをいい、それらは腫瘍部位のみで検出されることが好ましいが、それ以外の正常部位または正常な時期より高いレベルで検出される場合であってもよい。本発明の判別に用いることができる検出方法として最も好ましいのは免疫染色法であり、免疫染色法にて陽性と判断された場合に、グリオーマ細胞が上記タンパク質またはフラグ

50

メントを有していると判別することができる。なお、免疫染色法の手法は当業者によく知られており、当業者は、D B C C R 1 Lタンパク質およびそのフラグメントの有無を容易に調べることができる。

【0015】

また、本発明の判別に用いることができる検出方法として、例えば、*in situ*ハイブリダイゼーション法であってもよく、*in situ*ハイブリダイゼーション法にて陽性と判断された場合に、グリオーマ細胞が上記転写物、特にmRNAを有していると判別することができる。*In situ*ハイブリダイゼーション法は当業者間において一般的な手法であり、D B C C R 1 Lタンパク質をコードするヌクレオチド配列から転写されたmRNAを容易に検出することができる。

10

【0016】

本発明の別の態様では、オリゴデンドロサイト由来のグリオーマと判別された細胞または部位を除去する工程を含むオリゴデンドロサイト由来のグリオーマの治療方法を提供する。例えば、D B C C R 1 Lタンパク質に対する抗体に細胞を除去するための物質を結合させることによりグリオーマ細胞を除去する工程を含んでもよいが、これ以外のグリオーマ細胞を除去する工程を含んでもよい。

【0017】

本発明の判別方法は、オリゴデンドロサイト由来のグリオーマを除去または治療した後、すなわち予後において、オリゴデンドロサイト由来のグリオーマの存在またはその量を判別するためにも使用することができる。

20

【0018】

本発明は、もう1つの態様において、オリゴデンドロサイト由来のグリオーマの治療のための医薬組成物を提供する。該医薬組成物は、C o x (シクロオキシゲナーゼ) - 2阻害剤およびE G F R阻害剤を含むものである。かかる薬剤の組み合わせは新規である。C o x - 2阻害剤として、例えば、セレコキシブ(アステラス製薬)、メロキシカム、バルデコキシブ、パレコキシブ、パレコキシブナトリウム、デコラキシブ、ロフェコキシブ、エトリコキシブ、シミコキシブなどを含んでもよいが、これらだけに限定されず、好ましくはセレコキシブである。一方、E G F R阻害剤として、例えば、ゲフィチニブ(アストラゼネカ株式会社)、エルロチニブ、ラパチニブ、カネルチニブ、C I - 1 0 3 3 (ファイザー株式会社)、G W 2 0 1 6 (グラクソ・スミスクライン株式会社)、E K B - 5 6 9 (ワイス株式会社)、P K I - 1 6 6 (ノバルティスファーマ株式会社)、C P - 7 2 4、7 1 4 (ファイザー株式会社)、およびB I B X - 1 3 8 2 (ベーリンガーインゲルハイム)などであってもよいが、これらだけに限定されず、好ましくはゲフィチニブである。本発明におけるC o x 2阻害剤とE G F R阻害剤との組み合わせは、例えば、多形神経膠芽腫(G B M)、アストローマ(星細胞腫)、髄芽腫、脳室上位腫、乏突起膠腫、脈絡叢乳頭腫などの脳神経系のグリオーマ、特にG B Mに対して有効である。

30

【0019】

本発明の医薬組成物は、上述のごとく有効成分としてC o x 2阻害剤とE G F R阻害剤の両方を含有する。本発明の医薬組成物は、これらの物質に加えて任意の一般的に使用される制ガン剤や担体などの成分を含有してもよい。本発明の医薬組成物に使用されうる制ガン剤としては、テモゾロマイド、シスプラチンなどが例示されるが、これらだけに限らない。本発明に使用することができる担体は、投与形態および剤形に応じて選択することができる。経口投与用には、例えば、デンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩等を使用してもよい。さらに、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。非経口投与用には、公知方法により、希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、落花生油、大豆油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等に溶解または懸濁させ、必要に応じて殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を添加して調製してもよい。

40

【0020】

50

本発明の医薬組成物の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的およびこれに適用される動物種、患者の年齢、体重、症状によって適宜決定され、一定ではないが、一般には製剤中に含有される有効成分の量が $10 \mu\text{g} \sim 200 \text{mg} / \text{kg}$ である。投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の医薬組成物の有効成分であるセレコキシブとゲフィチニブの投与量は、セレコキシブについては、好ましくは1日あたり $60 \text{mg} / \text{kg}$ であり、ゲフィチニブについては、好ましくは1日あたり $200 \text{mg} / \text{kg}$ である。

【0021】

本発明の医薬組成物の投与経路は、経口、非経口（例えば筋肉注射、皮内、腫瘍内、静脈内、又は皮下、又は直接注射）、局所、経皮などを含み、当業者により適宜決定されるが、好ましくは経口投与である。また、本発明の医薬組成物と従来の制ガン療法、例えば放射線治療や化学療法などを併用してもよい。

10

【0022】

次に、下記の実施例に用いた主な材料および方法を示すが、本発明を限定するものではない。

【0023】

動物および試薬類

動物を理化学研究所発生・再生科学総合研究センター（CDB）変異マウス開発チームおよび日本チャールズ・リバー株式会社から得た。全てのマウス実験を理研CDBの動物管理使用委員会に認可された以下のプロトコルで実施した。遺伝子型の解析を以前に記載した通りにPCRにより行った（Tsukada, T. et al. Oncogene 8, 3313-3322 (1993)）。特に記載がない限り、試薬類および増殖因子をそれぞれSigmaおよびPeprrotechから購入した。

20

【0024】

グリオーマ細胞塊の細胞株の樹立

ヒトグリオーマを、以前に記載した通りに、PBSで2回洗浄し、酵素で解離させ、ヒトグリオーマ細胞塊の細胞株GSC1とGSC2を樹立した（Singh, S.K. et al., Cancer Res. 63, 5821-5828 (2003)）。GSC1は未分化オリゴデンドロサイト（WHOグレードIII）に由来すると判断されている。次いで、グリオーマ細胞塊をヒトLIF（ $10 \text{ng} / \text{ml}$ 、サンタクルーズ、カタログ番号sc-4377）を含有する完全マウスNSC培地中で培養した。

30

【0025】

ヒト脳腫瘍

11種のGBM、5種の未分化アストロサイトーマ、5種の未分化オリゴデンドログリオーマ、3種の未分化オリゴアストロサイトーマ、1種のオリゴデンドログリオーマ、1種の毛様細胞性アストロサイトーマ、1種の神経膠肉腫、および2種のGSC（GSC1とGSC2）を理化学研究所発生・再生科学総合研究センターと熊本大学医学研究科の研究指針に従って使用した。ポリ（A）+RNAをグリオーマ細胞塊からQuickPrep mRNA精製キット（GE Healthcare）を用いて調製し、cDNAをTranscription First Strand cDNA合成キット（Roche）を用いて合成した。

40

【0026】

ヌードマウスの脳への頭蓋内細胞移植

コントロール細胞およびトランスフェクト細胞を $5 \mu\text{l}$ の培養培地中に懸濁させ、5～8週齢の雌のヌードマウスの脳に、10%ペントバルビタールで麻酔した後に注入した。注入部位の定位はラムダの前方2mm、矢状縫合の側方2mmおよび深さ5mmであった。

【0027】

形質転換細胞を注入したマウスへの薬物の経口投与

EGFR阻害剤ゲフィチニブ（ $200 \text{mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、アストラゼネカ株式会社）、お

50

よび Cox - 2 阻害剤セレコキシブ (60 mg / kg / 日、アステラス製薬) を、ディスポーザブル可動型動物摂食ニードル (フチガミ器械) を用いて手術後毎日経口投与した。

【 0028 】

RT - PCR

RT - PCR を以前に記載した通りに行った (Kondo, T. & Raff, M. Science 289, 1754-1757 (2000).). サイクルパラメーターは、94 20 秒、58 40 秒および 72 45 秒を 35 サイクルであった。以下のオリゴヌクレオチド DNA プライマーを合成した : dbccr1l 用、5' プライマー、5' - GACAGTACACATCTACCTGAG - 3' (配列番号 : 2)、3' プライマー、5' - CTCACCACTCACTAGTAGAC - 3' (配列番号 : 3)。

10

【 0029 】

ヒトグリオーマの免疫組織化学的染色

ヒトグリオーマ試料を組織学的解析用にホルマリンで固定し、パラフィンで包埋した。切片 (3 μm の厚さ) をヘマトキシリンとエオシン (H & E) で染色し、DBCCR1L で免疫標識した。免疫検出を Elite Vector Stain ABC システム (Vector Laboratories) を用いて行った。免疫標識した切片をヘマトキシリンで染色することにより核を標識した。

【 0030 】

免疫染色法

免疫染色法を以前に記載した通りに実施した (Kondo, T. & Raff, M. Science 289, 1754-1757 (2000).). ウサギ抗 DBCCR1L (1 : 50 ; Protein Tech Group Inc) を用いて抗原を検出し、この抗体をヤギ抗ウサギ IgG - Cy3 (1 : 400 ; Jackson ImmunoResearch) を用いて検出した。核を可視化するために、細胞を 4', 6 - ジアミノ - 2 - フェニルインドール (DAPI) (1 μg / ml) で対比染色した。

20

【 0031 】

統計的解析

生存データを GraphPad Prism version 4 ソフトウェアを用いる Kaplan - Meier 法により分析して有意性を求めた (p - 値を Log - rank 検定で計算した)。

30

【 0032 】

以下に実施例を示して本発明を具体的かつ詳細に説明するが、実施例は本発明を限定するものと解してはならない。

【 実施例 1 】

【 0033 】

本発明者らは、胚期 13.5 日の p53 (- / -) マウス (Tsukada, T., et al., Oncogene 8, 3313-3322 (1993)) の脳から細胞を分離し、神経上皮細胞から神経幹細胞 (NSC) を調製し、次いでこの細胞から一定条件下でアストロサイト (AST) およびオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) をすでに誘導している (特願 2007 - 109539、Liepelt, U. et al., Brain Res. Dev. Brain Res. 51, 267-278 (1990)、Johe, K. et al., Genes Dev. 10, 3129-3140 (1996)、Rao, M. S., Noble, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 3996-4001 (1998)、および Wang, S. et al., Neuron 29, 603-14 (2001))。さらに本発明者らは、これらの細胞にコントロールベクター (GFP) または HRas^{L61} 発現ベクターをトランスフェクトし、Ras 活性と p53 欠失の組み合わせが AST ではなく NSC と OPC を形質転換させることを示した (特願 2007 - 109539 および Bizub, D., Blair, D., Alvord, G. & Skalka, A. M., Oncogene 3, 443-448 (1988))。HRas^{L61} 発現ベクターにより形質転換された細胞をそれぞれ NSC - L61、AST - L61、OPC - L61 と名付けた (特願 2007 - 109539)。インビボへの細胞移植実験、組織学的な観察、および遺伝子発現解析などにより、これらの形質転換された細胞のうち OPC - L61 は腫瘍形成能、すなわちガン幹細胞と

40

50

しての性質を有することが示唆された（特願2007-109539）。本発明者らは、これらの形質転換された細胞およびヒトグリオーマから樹立させた細胞（GSC1とGSC2）を用いて以下の実験を行った。

【0034】

本発明者らは、NSC-L61またはGSC2ではなく、OPC1-L61とGSC1の両方がOPCの新規マーカーであるDBCCR1Lタンパク質を発現していることを知見した。まず、RT-PCR法により、DBCCR1Lタンパク質をコードするヌクレオチド配列からのmRNAの転写がOPC、OPC-L61およびGSC1において行われることを示した（図3）。ここで、GSC1はオリゴデンドロサイト由来であると判断されている（WHOグレードIII）。次に、DBCCR1Lのタンパク質レベルにおける発現を免疫染色法を用いて調べ、DBCCR1Lタンパク質の存在をNSC-L61（図4a）およびGSC2（図4d）では陽性と判断できないのに対して、OPC-L61（図4b）およびGSC1（図4c）においては明らかに陽性であることがわかった。さらに、DBCCR1Lタンパク質がOPC-L61とGSC1でより強く発現されることをDBCCR1L抗体陽性の細胞数の割合をカウントすることにより定量的に確認した（図5）。以上の結果は、オリゴデンドロサイト由来のグリオーマがDBCCR1Lタンパク質、そのフラグメント、またはDBCCR1Lタンパク質をコードするヌクレオチド配列からの転写物を有することを示すものである。

10

【実施例2】

【0035】

次いで、Cox-2シグナル経路およびEGFRシグナル経路の阻害剤がグリオーマに対して有効性を示すかどうかを調べた。すなわち、かかる組み合わせがGBMに有効であるかどうかを検討するために、NSC-L61、OPC-L61、GSC1、およびGSC2における効果を試験した。EGFR阻害剤ゲフィチニブおよびCox-2阻害剤セレコキシブが濃度依存的にNSC-L61、OPC-L61およびヒトGSCの増殖を抑制し、この組み合わせが相加効果であることを示したが、コントロールのNSCとOPCにも影響した（図1a-d）。次いで、この組み合わせが、インビボにおいて、NSC-L61、OPC-L61またはヒトGSCによって引き起こされる腫瘍形成を阻害するかどうかを調べた。OPC-L61を注入したマウスの生存時間は、コントロール（ 23.0 ± 1.9 d）と比較して薬物処理マウス（ 34.1 ± 9.5 d、 $p = 0.005$ ）では有意に長かった。一方、この組み合わせはNSC-L61細胞を注入したマウスには効果がなかった（処理では 21 ± 2.9 d vs コントロールでは 19.7 ± 6.9 d）（図2aとb）。さらに、GSC1を注入したマウスの生存時間はコントロールマウス（ 44.5 ± 3.4 d）と比較して薬物処理マウス（ 56.2 ± 8.2 d、 $p = 0.0027$ ）において長くなった。一方、この組み合わせはGSC2を注入したマウスには効果がなかった（薬物処理マウスでは 37.6 ± 1.1 d vs コントロールでは 34.6 ± 2.9 d）（図2cとd）。これらのデータは、この組み合わせがDBCCR1L陽性の悪性グリオーマの患者に有効であることを示唆する。

20

30

【0036】

上で説明したように、DBCCR1Lを発現する悪性グリオーマがCox-2阻害剤とEGFR阻害剤の組み合わせで処理することに感受性があることを示した。EGFR経路が放射線と化学治療に対する耐性を媒介すること（Nyati, M. K., Morgan, M. A., Feng, F. Y., & Lawrence, T. S., Nat. Rev. Cancer 6, 876-885 (2006).）、セレコキシブが放射線感受性を高めること（Choy, H., & Milas, L., J. Natl. Cancer Inst. 95, 1440-1452 (2003).）が知られている。これらのことから、本発明のCox-2阻害剤とEGFR阻害剤の組み合わせが照射/化学治療の効率を上昇させることとあいまって、オリゴデンドロサイト由来のグリオーマの治療に極めて有効であるといえる。それゆえ、本発明は最新かつガン幹細胞特異的な治療の新しい臨床アプローチの可能性を指し示すものである。

40

【産業上の利用可能性】

50

【0037】

本発明は、オリゴデンドロサイトに由来するグリオーマを判別し、それを治療する医薬組成物を提供する。そのため、悪性グリオーマの診断方法、グリオーマの新規治療方法および新薬の開発をはじめとする多くの産業分野において利用可能である。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】 Cox-2 阻害因子と EGFR 阻害因子の組み合わせが DBCCR1L を発現する悪性グリオーマ細胞による腫瘍形成を遅延させることを示す。形質転換されたグリオーマ細胞 (a、b 中の黒色の柱、a は NSC-L61、b は OPC-L61)、その親細胞 (a、b 中の白色の柱、a は NSC、b は OPC) およびヒトグリオーマ細胞塊の細胞株 GSC1 (c) と GSC2 (d) におけるゲフィチニブとセレコキシブの細胞毒性の効果を示す。

10

【図2】 Cox-2 阻害因子と EGFR 阻害因子の組み合わせが DBCCR1L を発現する悪性グリオーマ細胞による腫瘍形成を遅延させることを示す。ヌードマウスに NSC-L61 (a)、OPC-L61 (b)、GSC1 (c) または GSC2 (d) を移植し、薬物の組み合わせ (C+G) で処理した後の生存曲線を示す。コントロールマウスには水を投与した (黒色の線)。

【図3】 DBCCR1L が OPC および OPC 由来の悪性グリオーマ細胞で特異的に発現されることを示す。各細胞 (NSC、NSC-L61、OPC、OPC-L61、GSC1 および GSC2) において、RT-PCR 法を用いて DBCCR1L の発現を調べた図である。

20

【図4】 DBCCR1L が OPC 由来の悪性グリオーマの新規マーカーであることを示す図である。DBCCR1L は、NSC-L61 (a) と GSC2 (d) に比べて OPC-L61 (b) と GSC1 (c) において強く発現される。DBCCR1L に対する免疫反応性を検出し、核を DAPI で染色した。

【図5】 DBCCR1L が OPC 由来の悪性グリオーマの新規マーカーであることを示す図である。マウスグリオーマ幹細胞株 (a) とヒト GSC (b) における DBCCR1L 陽性細胞の割合をグラフに表した。

【配列表フリーテキスト】

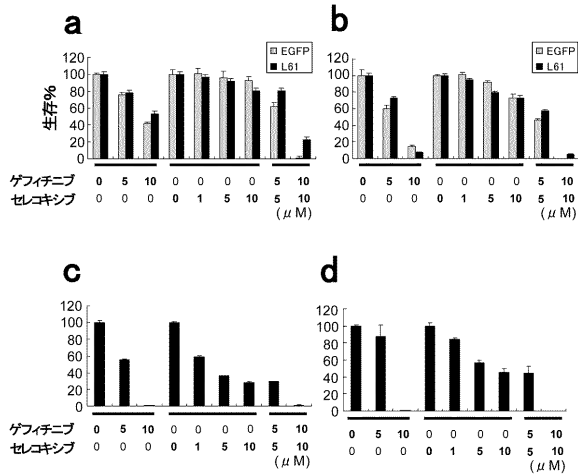
【0039】

SEQ ID NO:2: 5' primer for dbccr1l

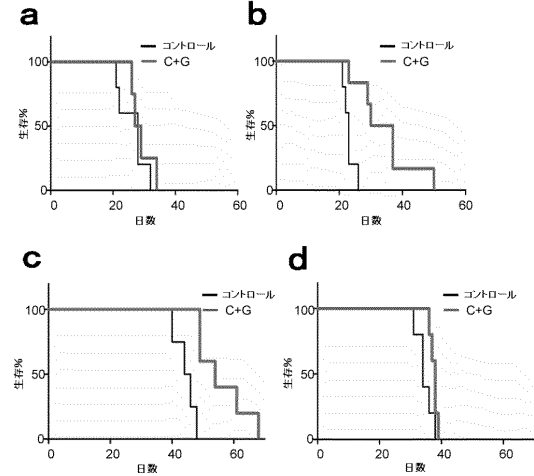
SEQ ID NO:3: 3' primer for dbccr1l

30

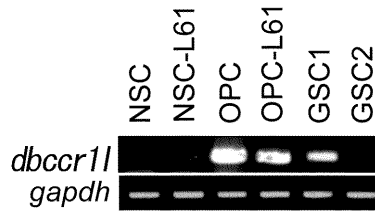
【 図 1 】



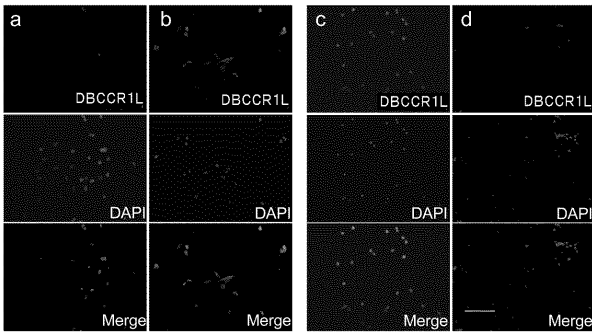
【 図 2 】



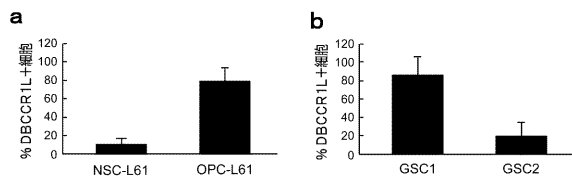
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【配列表】

2009232705000001.app

 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 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA01 CA09 CA12 CA20 HA11
 4B063 QA01 QA13 QA18 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR36 QR55
 QR62 QS25 QX01
 4C084 AA20 MA02 NA14 ZB262 ZC022 ZC202
 4C086 AA01 AA02 BC36 BC73 MA02 MA04 NA05 ZB26 ZC02 ZC20

专利名称(译)	鉴别胶质瘤起源和胶质瘤治疗剂的方法		
公开(公告)号	JP2009232705A	公开(公告)日	2009-10-15
申请号	JP2008080347	申请日	2008-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人理化学研究所		
申请(专利权)人(译)	独立行政法人理化学研究所		
[标]发明人	近藤 亨		
发明人	近藤 亨		
IPC分类号	C12Q1/68 A61K45/06 A61K31/5377 A61K31/415 A61P35/00 A61P43/00 G01N33/53 C12N15/09		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A A61K45/06 A61K31/5377 A61K31/415 A61P35/00 A61P43/00.111 G01N33/53.D C12N15/00.A C12Q1/68.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QX01 4C084/AA20 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C084/ZC022 4C084/ZC202 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC36 4C086/BC73 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/ZB26 4C086/ZC02 4C086/ZC20		
代理人(译)	田中, 三夫 山崎 宏 富田健二		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：寻找在胶质瘤细胞中特异性表达的分子，特别是在GBM（多形性胶质母细胞瘤）中，并将该分子用于诊断和治疗癌症。解决方案：区分神经胶质瘤细胞来源的方法包括检测胶质瘤细胞中DBCCR1L蛋白或其片段的存在或编码DBCCR1L蛋白的核苷酸序列的转录本，当胶质瘤细胞中含有任何一种时，区分神经胶质瘤细胞来源来自少突胶质细胞。用于治疗对少突胶质细胞衍生的神经胶质瘤有效的神经胶质瘤的药物组合物包含Cox2抑制剂和EGFR抑制剂。 Z

【図1】

