

(43) 国際公開日
2007 年 10 月 25 日 (25.10.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/119692 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 48/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2007/057733

(22) 国際出願日: 2007 年 4 月 6 日 (06.04.2007)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2006-109310 2006 年 4 月 12 日 (12.04.2006) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人千葉大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1 番 3 3 号 Chiba (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 島田 英昭 (SHIMADA, Hideaki) [JP/JP]; 〒2608670 千葉県千葉市中

央区亥鼻 1 丁目 8 番 1 号 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内 Chiba (JP). 松下一之 (MATSUSHITA, Kazuyuki) [JP/JP]; 〒2608670 千葉県千葉市中央区亥鼻 1 丁目 8 番 1 号 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内 Chiba (JP). 朝長 毅 (TOMONAGA, Takeshi) [JP/JP]; 〒2608670 千葉県千葉市中央区亥鼻 1 丁目 8 番 1 号 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内 Chiba (JP). 野村 文夫 (NOMURA, Fumio) [JP/JP]; 〒2608670 千葉県千葉市中央区亥鼻 1 丁目 8 番 1 号 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内 Chiba (JP). 落合 武徳 (OCHIAI, Takenori) [JP/JP]; 〒2608670 千葉県千葉市中央区亥鼻 1 丁目 8 番 1 号 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内 Chiba (JP).

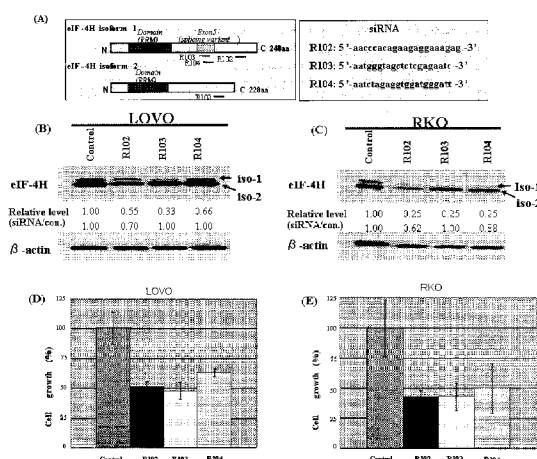
(74) 代理人: 阿部 正博 (ABE, Masahiro); 〒2740825 千葉県船橋市前原西二丁目 1 4 番 1 号ダイアパレス津田沼 1001 号 Chiba (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF INHIBITING CANCER CELL PROLIFERATION BY REGULATING eIF4H EXPRESSION

(54) 発明の名称: eIF4H発現抑制による癌細胞の増殖阻害方法



(57) Abstract: It is intended to enable more effective and sure detection, diagnosis and treatment against cancers, in particular, digestive cancers such as colon cancer, and provide various biomolecules which are usable in developing systems for gene diagnosis and clinical studies on gene therapy for the cancers as described above. Namely, a method of inhibiting the proliferation of cancer cells which comprises regulating the expression of eIF-4H; a medicinal composition which contains an siRNA specific to eIF-4H as the active ingredient; a method of screening a substance having an activity of inhibiting the proliferation of cancer cells based on the expression amount of eIF-4H; and so on.

(57) 要約: 本は集め意の目的は、癌、特に大腸癌に代表される消化器癌等のより有効で確実な検出・診断・治療を提供すること、及び、このような癌の遺伝子診断システムと遺伝子治療臨床研究システムの開発に利用される各種の生体分子の提供することである。本発明は、eIF-4Hの発現を抑制することから成る、癌細胞の増殖阻害方法、eIF-4Hに特異的な siRNAを活性成分として含有する医薬組成物、及び、eIF-4Hの発現量に基づく、癌細胞増殖阻害活性を有する物質のスクリーニング方法等に関する。



DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,

IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

eIF4H発現抑制による癌細胞の増殖阻害方法

技術分野

- [0001] 本発明は、真核生物翻訳開始因子(eucaryotic Initiation Factor 4H: eIF-4H)、特にヒトのeIF-4H(以降、本明細書において、特に断わりのない限り、「eIF-4H」はヒト由来のeIF-4Hを意味する)の発現を抑制することから成る、癌細胞の増殖阻害方法、eIF4Hに特異的な siRNAのようなeIF4Hの発現を抑制し得る物質を活性成分として含有する癌細胞増殖阻害剤、及び、eIF-4Hの発現量に基く、癌細胞増殖阻害活性を有する物質のスクリーニング方法等に関する。

背景技術

- [0002] 今までに、二次元電気泳動(2-DE)及び質量分析等の種々のプロテオミクス技術によって、癌の診断・治療に有用な癌特異的な蛋白質が同定されている。このような癌特異的な蛋白質に関する研究の多くは、疾患特異的な様式で増加調節又は減少調節されるものに焦点が当てられてきた。しかしながら、蛋白質の選択的スプライシング変異体及び蛋白質の翻訳後修飾に関する報告は余りない。
- [0003] ヒト遺伝子の60%が少なくとも一つの選択的スプライシング変異体(バリエント)を有しているといわれており(Black, D.L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72, 291-336)、このような変異体が癌等のヒトの疾患において重要な役割を担っていることも報告されている(Brinkman, B.M. (2004). Splice variants as cancer biomarkers. *Clin Biochem* 37, 584-594)。従って、このような選択的スプライシング変異体は有力な診断ツール又は薬剤ターゲットに成る可能性があると考えられる。
- [0004] 真核生物翻訳開始因子4H(eucaryotic Initiation Factor 4H: eIF-4H)は最初にウサギ赤血球における翻訳を刺激する物質として同定された(Rogers, G.W., Jr., Richter, N.J., and Merrick, W.C. (1999). Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A. *J Biol Chem* 274, 12236-12244)。eIF-4Hは真核生物における翻訳開始因子ファミリーの一員として、eIF-4F複

合体のサブユニットであるeIF-4Aのヘリカーゼ活性を促進することによって蛋白質合成を刺激することが知られている(Richter-Cook, N.J., Dever, T.E., Hensold, J.O., and Merrick, W.C. (1998). Purification and characterization of a new eukaryotic protein translation factor. Eukaryotic initiation factor 4H. J Biol Chem 273, 7579-7587;)。更に、eIF-4Hは他の幾つかの開始因子の活性を促進して、4E-BP1による阻害等の負調節を打ち消している可能性も指摘されている(Lin, T.A., Kong, X., Haystead, T.A., Pause, A., Belsham, G., Sonenberg, N., and Lawrence, J.C., Jr. (1994). PHA S-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. Science 266, 653-656)。従って、eIF-4Hは、eIF-4E又は-4Gの活性化を通じて直接的又は間接的に様々な悪性腫瘍(癌)関連mRNAの翻訳を変化させることによって、細胞増殖及び腫瘍形成に関与している可能性がある。

[0005] eIF-4H遺伝子は、7q11.23における隣接遺伝子群の欠損が原因である多重人格を発生する疾患であるウィリアムズ症候群で欠損していることが知られているが、これが該症候群の発生とどのような関係があるかについては未だ解明されていない。該遺伝子の選択的スプライシングによって2つ変異体、即ち、アイソフォーム1及びアイソフォーム2(エクソン5が欠失したもの)が生じ、これらは夫々、分子量27kDa及び25kDaを有する。これら2つのアイソフォームの特異的な機能は未だ判っていないが、分子量の小さいアイソフォーム2はヒト細胞においてはより多く存在していることが知られている(Martindale, D.W., Wilson, M.D., Wang, D., Burke, R.D., Chen, X., Duronio, V., and Koop, B.F. (2000). Comparative genomic sequence analysis of the Williams syndrome region (LIMK1-RFC2) of human chromosome 7q11.23. Mamm Genome 11, 890-898:非特許文献1)。

[0006] 本発明者等は既に、原発大腸癌における蛋白質の発現をアガロース2-DEを用いて分析し、腫瘍組織とそれに隣接する正常組織の間で、幾つかの蛋白質に関するpI及び分子量が異なることを見出し、その一つとして、eIF-4Hの選択的スプライシング変異体であるアイソフォーム1の発現が殆どの腫瘍組織において増加していることを見出した(Tomonaga, T., Matsushita, K., Yamaguchi, S., Oh-Ishi, M., Kodera, Y., Maeda, T., Shimada, H., Ochiai, T., and Nomura, F. (2004). Identification of altere

d protein expression and post-translational modifications in primary colorectal cancer by using agarose two-dimensional gel electrophoresis. Clin Cancer Res 10, 2007-2014:非特許文献2)。

非特許文献1: Martindale, D.W., Wilson, M.D., Wang, D., Burke, R.D., Chen, X., Duronio, V., and Koop, B.F. (2000). Comparative genomic sequence analysis of the Williams syndrome region (LIMK1-RFC2) of human chromosome 7q11.23. Mamm Genome 11, 890-898

非特許文献2: Tomonaga, T., Matsushita, K., Yamaguchi, S., Oh-Ishi, M., Kodera, Y., Maeda, T., Shimada, H., Ochiai, T., and Nomura, F. (2004). Identification of altered protein expression and post-translational modifications in primary colorectal cancer by using agarose two-dimensional gel electrophoresis. Clin Cancer Res 10, 2007-2014

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0007] 従って、本発明は、癌、特に大腸癌に代表される消化器癌等のより有効で確実な検出・診断・治療を提供すること、及び、このような癌の遺伝子診断システムと遺伝子治療臨床研究システムの開発に利用される各種の生体分子を提供すること等を目的とする。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者は上記課題を解決すべく、大腸癌における上記のeIF4Hアイソフォーム1の過剰発現が細胞増殖及び腫瘍形成に与える影響を研究した。その結果、eIF4H発現を抑制することによって、大腸癌等の癌細胞の増殖が特異的に阻害され、アポトーシスが誘導されることを見出し、本発明を完成した。

- [0009] 即ち、本発明は、以下の各態様を含むものである。

[1] eIF-4Hの発現を抑制することから成る、癌細胞の増殖阻害方法

[2] eIF-4Hの発現を有意に抑制できる物質を活性成分として含有する医薬組成物。

[3] eIF-4Hの発現量に基く、癌細胞増殖阻害活性を有する物質のスクリーニング方法。

発明の効果

- [0010] 本発明によって、eIF-4H、特に、eIF4Hアイソフォーム1の発現を抑制することによって、癌細胞の増殖を阻害する方法、更に、eIF-4Hに特異的な siRNAのようなeIF-4H発現を抑制する物質を有効成分として含有する癌細胞に対する特異性が高い優れた癌細胞増殖阻害剤(抗癌剤)等が提供される。

図面の簡単な説明

- [0011] [図1]転写レベルにおけるeIF-4Hアイソフォーム1の過剰発現を示すグラフである。
[図2]siRNAを用いたeIF-4Hの抑制による大腸癌細胞の増殖阻害を示す、ウェスタンブロット分析の結果(ポリアクリルアミドゲル電気泳動の写真)等である。
[図3]siRNA用いたeIF-4Hの抑制によっては肺繊維芽細胞株MRC5の増殖は阻害されないことを示す、ウェスタンブロット分析の結果(ポリアクリルアミドゲル電気泳動の写真)等である。
[図4]eIF-4Hアイソフォーム1の発現抑制によりアポトーシスが誘導されることを示す、細胞フローサイトメリー分析である。

発明を実施するための最良の形態

- [0012] 本発明において、癌細胞におけるeIF-4Hの発現の抑制は、当業者に公知の任意のレベル、即ち、例えば、eIF-4H遺伝子の転写レベル若しくはeIF-4H蛋白質の産生、又はeIF-4H蛋白質の活性発現レベルで実施することが可能である。尚、対象となる癌の種類に特に制限はないが、特に、大腸癌等に代表される消化器癌が好適である。
- [0013] 例えば、転写レベルでの抑制には、eIF-4H遺伝子(DNA又はmRNA)を標的とするsiRNA等のRNA干渉(RNAi)を誘導する核酸配列(eIF-4H遺伝子の部分塩基配列に特異的な配列を有する一本鎖RNA又は二本鎖RNA)による遺伝子ノックダウン、アンチセンスRNA、又は各種のリボザイム等を用いる方法を挙げることが出来る。又、eIF-4H蛋白質の活性発現レベルでは、例えば、抗eIF-4H抗体を用いる方法を挙げることが出来る。
- [0014] RNA干渉(RNAi)を誘導する核酸は、eIF-4Hの塩基配列(NM__022170 (isoform 1), NM__031992 (isoform2):データベース参照)に基き、当業者であれば、適宜設計

して調製することが出来る。その代表的な例としては、以下に示すいずれかの塩基配列又はその一部の連続する塩基配列(例えば、18～20個の連続する塩基配列)を含む15～30個の塩基から成るオリゴヌクレオチド及びその相補的オリゴヌクレオチドから成る核酸配列、特に、21～23個の塩基から成るsiRNA(二本鎖RNA)を挙げることが出来る。尚、かかるsiRNAには、細胞内で上記核酸配列がDicerにより消化されて生成されるものも含まれる。

[0015] (R102) 5'-aaccacagaagaggaaagag-3' ;

(R103) 5'-aatgggtagctctcgagaatc-3' ;

(R104) 5'-aatctagaggtggatgggatt-3' 。

[0016] 特に、癌細胞で過剰発現しているeIF4Hアイソフォーム1に対して特異的に反応する塩基配列である(103)又は(104)を含むオリゴヌクレオチドが好ましい。

[0017] 従って、本発明の医薬組成物、例えば、癌細胞増殖阻害剤は、上記に示したようなeIF-4Hの発現を有意に抑制できる物質を活性成分として含有するものである。

[0018] 更に、上記の活性成分中で、RNA又はDNAのような核酸分子は適当な発現ベクター等の当業者に公知の任意の各種の運搬ビークル内に組み込まれた状態で使用することも可能である。

[0019] このような活性成分は当業者に公知の任意の方法、例えば、活性成分がsiRNAのような核酸分子である場合には、形質得転換法に使用される方法、例えば、リン酸カルシウム法又はDOSPA(リポフェクタミン)等により構成される人工リポソームでDNAを包み込むリポフェクション法等に基き対象細胞に取り込まれるようにすることが出来る。

[0020] 又、上記の医薬組成物には、各種の有効成分と組合せて、薬学上許容できる、当業者に公知の任意の医薬キャリアー又は希釈剤等のその他の成分を含むことが出来る。

[0021] 本発明の有効成分の薬学的な有効量及び投与方法又は投与手段は、有効成分の種類、病状の重さ、治療方針、患者の年齢、体重、性別、全般的な健康状態、及び患者の(遺伝的)人種的背景に応じて、当業者が適宜選択することができる。例えば、該有効成分の投与量は0.1～100mg/日/成人、より一般的には1～10mg/日

／成人である。

[0022] 本発明の医薬組成物は投与方法・投与経路等に応じて当業者に公知の任意の形状とすることが出来る。それらは適当な方法で投与することが出来る。例えば、形状としては、液体状、粉末状、及びコロイド状等があり、上記のキャリアー又は希釈剤を伴った形で、静脈内、腹腔内、皮下に注射するか、又は、経口投与等が挙げられる。

[0023] 本発明のスクリーニング方法は、例えば、以下の工程で実施することが出来る。

- (a)被検物質の存在下に細胞を培養する工程、
- (b)該細胞におけるeIF-4H遺伝子の発現量を測定する工程、及び
- (c)発現量を抑制させる物質を選択する工程。

[0024] ここで、工程(b)におけるeIF-4H遺伝子の発現量は、当業者に公知の任意のレベル、即ち、例えば、eIF-4H遺伝子の転写レベル若しくはeIF-4H蛋白質の産生、又はeIF-4H蛋白質の活性発現レベルで測定することが可能である。

[0025] eIF-4H遺伝子の発現量を測定は、測定方法・原理に応じて、定量的、半定量的、又は定性的であり得る。特に、eIF-4Hアイソフォームは癌細胞で過剰発現しているので、その発現の抑制は定性的な判定で有意に検出することが可能となる。尚、発現量を抑制させる物質の選択は、例えば、被検物質の非存在下でのeIF-4H遺伝子の発現量との比較をすることにより実施することが出来る。

[0026] eIF-4H蛋白質の産生量は、当業者に公知の任意の方法で測定することが可能である。例えば、適当な抗体を用いたウェスタンブロット等の免疫染色及びEIA等の各種の免疫学的特異反応を利用する方法、エドマン法を用いた気相シーケンサー等ペプチドのアミノ酸配列分析法、更には、MALDI-TOF/MS及びESI Q-TOF/MS法等に代表される質量分析によって検出することが出来る。

[0027] 上記の方法の中でも、eIF-4Hに特異的な抗体との抗原抗体反応によって該蛋白質の発現量を測定する検査方法が好適である。尚、ウェスタンブロット法においては、分子量の違いに基き、アイソフォーム1及びアイソフォーム2の夫々の発現量の変化を測定することが可能となる。

[0028] 従って、上記抗体は、eIF-4H又はその適当な部分ポリペプチド(ペプチド断片)又はそれらの各種誘導体又は複合体等を抗原物質又は免疫原として用いて、当業者に

公知の適当な方法で調製することが可能である。例えば、ポリクローナル抗体の場合には、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ニワトリ等の適当な動物に投与し、その抗血清から調製することが可能である。或いは、モノクローナル抗体作成法(「単クローン抗体」、長宗香明、寺田弘共著、廣川書店、1990年; “Monoclonal Antibody” James W. Goding, third edition, Academic Press, 1996)等に記載の公知の細胞融合を用いる方法でモノクローナル抗体として調製することも可能である。

- [0029] 尚、このような抗体は、その元来の抗体活性を失わない限り、遺伝子工学(DNA組換え技術)により、例えば、Fab、F(ab')₂、Fv断片等の完全な抗体由来の各種誘導体を含む、当業者に公知の様々な形態に改変された誘導体、組換え体又はフラグメントであっても良い。
- [0030] 更に、eIF-4Hアイソフォーム1のみ特異的に反応する抗体を使用して、例えば、EIA等の酵素免疫測定法により測定することが可能である。このような抗体には、酵素、放射性同位体蛍光色素、及び金属原子等の当業者に公知の各種の標識物質で標識されているものも含まれる。
- [0031] eIF-4HをコードするcDNA又はそれに対応するmRNAを含む核酸分子又はそれらの一部からなるオリゴヌクレオチド、又は、eIF-4Hの各アイソフォームに特異的な塩基配列から成るDNAは、例えば、eIF-4H遺伝子の塩基配列に基づき適宜設計したプライマー又はプローブを使用したRT-PCR法、リアルタイムPCR等の各種定量的PCR法、並びに各種のマイクロアレイ(DNAチップ)法等の当業者に公知の方法で増幅・検出することが出来る。PCR法で増幅された核酸分子の検出・同定は、その塩基配列を直接決定する方法(シーケンス法)、又は電気泳動との組み合わせ等、適当な方法で行うことが出来る。
- [0032] 上記のプライマー又はプローブの塩基配列は、鋳型との特異的な結合が可能となるような塩基数、例えば、15-40塩基、より具体的には、15-25塩基程度を有することが好ましく、更には、プライマー内でヘアピン構造をとったり、センス鎖とアンチセンス鎖とが互いにアニーリングしないような塩基配列とすることも重要である。例えば、OligoTM(National Bioscience Inc.製)のような市販のプライマー設計用のソフトウェアを使用することも可能である。

[0033] 本発明のスクリーニング方法に使用されるキットは、測定対象又は測定原理等に応じて、適当な構成をとることが出来る。該キットは、その構成要素として、例えば、抗eIF-4H抗体、各種の二次抗体(標識抗体)、上記のmRNA(cDNA)の増幅用プライマー及びDNAチップ等で使用するハイブリダイゼーション用のプローブ(例えば、10～100個程度の連続した塩基配列から成る)を含むことが出来る。更に、上記キットには、その構成・使用目的などに応じて、当業者に公知の他の要素又は成分、例えば、各種試薬、酵素、緩衝液、反応プレート(容器)等が含まれる。

実施例

[0034] 以下、本発明を実施例によって詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例の記載によって何ら限定して解釈されるものではない。又、特に記載のない場合には、以下の実施例は、例えば、Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning—A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995等に記載されている、当業者に公知の標準的な遺伝子工学及び分子生物学的技術に従い、実施することが出来る。又、本明細書中に引用された文献の記載内容は本明細書の開示、及び、内容の一部を構成するものである。

[0035] ヒト組織試料の採取

原発性大腸癌患者(10名)から術前に文書による同意を得て、術後1時間以内に癌部及び癌部から5～10cm以内に位置する非癌組織を採取し、直ちに－80℃の液体窒素中で保存した。

[0036] 細胞培養

2つの大腸癌細胞であるLOVO及びRKO、並びに肺繊維芽細胞株MRC5 はRIKEN Cell Bank(日本茨城県つくば市)から購入した。腫瘍細胞であるLOVO及びRKO、並びに、正常細胞であるMRC5 は、夫々、10%牛胎児血清、100U/mlペニシリン及び100 µg/mlストレプトマイシン(これらは全て、Invitrogen, Carlsbad, CA から購入)添加のRPMI-1640及びIMDM を用いて、5%CO₂ 条件下、37℃培養した。

[0037] リアルタイム定量的RT-PCR

Total RNAは癌部、非癌部からRNeasyTM Mini Kit (Qiagen)を用いて抽出した。cDNA

はtotal RNAから 1st strand cDNA Synthesis Kit を用いて合成した (Roche, Mannheim, Germany)。LightCyclerTM (Roche, Mannheim, Germany) を用いたeIF-4H cDNA の Real-time quantitative PCR は、LightCycler キャピラリー中のLightCyclere DNA Master SYBR Green I (FastStart TaqDNA polymerase, deoxynucleotide triphosphate, buffer, SYBR Green I)、3.0 mM MgCl₂、及び0.5 μ M の各プライマー配列 (forward primer: 5'-TTCCTCTCGGAGCGGAGACG-3', reverse primer: 5'-GGAATCCCATCCACCTCTAG-3')を含有する反応液 (20 μ l) で行った。鋳型cDNAの段階的希釈によりPCR産物を直線領域で最適化した。定量的PCRの分析はLightCyclerソフトウェア3.3 版を用いて行った。

[0038] siRNAによる遺伝子ノックダウン

eIF-4HRNAを標的とするsiRNAを用いてeIF-4Hの発現を抑制した。siRNAは化学合成のより作製した (Japan Bio Services 日本、埼玉県) その塩基配列は以下の通りである (図2)。尚、カッコ内の数字はeIF-4H遺伝子における塩基配列番号を示す。

(R102) 5'-aacccacagaagaggaaagag-3'; (596-616)

(R103) 5'-aatgggtagctctcgagaatc-3'; (411-431)

(R104) 5'-aatctagaggtggatgggatt-3' (428-448)。

ここで、siRNA-102塩基配列は2つの選択的スプライシング変異体であるアイソフォーム1及びアイソフォーム2に共通するものであり、一方、siRNA-103及びsiRNA-104はアイソフォーム1のみに特異的なものである。Blast 分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) によると該標的配列と他のヒト遺伝子との間に共通する領域は見出せなかった。各細胞を6ウェルプレートで培養し、リポフェクタミン2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて上記のsiRNAをトランスフェクションした。48時間後に大腸癌及び正常繊維芽細胞を採取し、以下のウェスタンブロット分析、細胞増殖アッセイ (MTS アッセイ)、及び細胞周期分析に供した。

[0039] ウェスタンブロット分析

各細胞溶解物からの蛋白質 (総30 μ g) を10-20%勾配ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Bio-Rad, Hercules, CA) にかけて分離した。Tank-transfer装置 (Bio-Rad) を用い

て蛋白質をポリビニリデンフルオライド膜 (Milipore, Bedford, MA) に移し、この膜を5% スキムミルク含有PBSでブロックした。ウサギ抗eIF-4H抗体 (Japan Bio Services調製) 及びヤギ抗 β -アクチン抗体 (Cappel, West Chester, PA) を上記ブロッキング緩衝液中で1:500に希釈したものを一次抗体として使用した。更に、夫々、ブロッキング緩衝液中で3000倍希釈のヤギ抗ウサギIgG西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗体 (Bio-Rad)、及び、ブロッキング緩衝液中で500倍希釈のウサギ抗ヤギIgG西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗体 (Cappel, West Chester, PA) を二次抗体として使用した。膜上の抗原蛋白質はECLTM detection reagents (Amersham Pharmacia Biothech) で検出した。

[0040] 細胞増殖アッセイ

翌日に50%集密 (コンフルエント) 状態になるように細胞を96穴ウェルに播き、Lipofectamine 2000試薬を用いて上記のsiRNAをトランスフェクションした。細胞を37℃、5%CO₂条件下で48時間培養した。試薬製造者の指示に従い、3-(4, 5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム (MTS) 染料の吸収を測定することにより、細胞の増殖を評価した。吸収は、Wallac 1420 ARVOsx Multilabel Counter (Perkin-Elmer, Tokyo, Japan)を用いて行った。実験は2回の独立系で、夫々、平行して8回繰り返した。

[0041] 細胞周期分析

LOVO、RKO及びMRC5細胞を6穴ウェルに播き、翌日、上記のようにsiRNAをトランスフェクションし、48時間培養した。その後、70%エタノールで固定し、200 μ g/ml Rnase 存在下50 μ g/mlヨウ化プロピジウム (和光純薬、日本) 含有PBS溶液で処理した。次いで、FACS Caliber cytometer (Beccton Dickinson, SanJose, CA, USA)を用いて細胞を細胞周期分析した。各試料につき少なくとも10,000個の細胞を計測し、得られたデータはCell Quest プログラム (Beccton Dickinson, SanJose, CA, USA) により分析した。

[0042] 結果(1): 転写レベルにおけるeIF-4Hアイソフォーム1の過剰発現

既に記載したように、本発明者が以前に、eIF-4Hの選択的スプライシング変異体であるアイソフォーム1が原発性大腸癌の殆どの腫瘍組織において過剰発現しているこ

とを報告している。このeIF-4Hアイソフォーム1の過剰発現を転写レベルで確認すべく、上記のようにリアルタイム定量的RT-PCRを行った。その結果、eIF-4Hアイソフォーム1 mRNAレベルは腫瘍組織において有意 ($P < 0.01$) に増加していることが示され、過剰発現が転写レベルで起こっていることが確認された (図1)。

[0043] 結果(2): eIF-4Hの抑制による大腸癌細胞の増殖阻害

eIF-4Hアイソフォーム1が細胞増殖及び腫瘍形成に関与しているか否かを検討すべく、RNAi法を用いてeIF-4H発現を抑制した。これに用いた3種類のsiRNAはeIF-4H読取枠の夫々異なる領域を標的をすべく設計された (図2A, B)。2つの大腸癌細胞であるLOVO及びRKOのsiRNA処理後48時間後に、(R102)はeIF-4Hの2つのアイソフォームの両方を抑制した。一方、(R103)及び(R104)はeIF-4Hアイソフォーム1のみを抑制した (図2B, C)。従って、これら3種類のsiRNAを更なる分析に使用した。

[0044] 即ち、siRNA処理後48時間後に実施したMTSアッセイの結果によれば、eIF-4Hの2種類のアイソフォームの発現が(R102)により抑制されると、細胞増殖が50%も顕著に阻害された。驚くべきことに、(R103)及び(R104)を用いてeIF-4Hアイソフォーム1のみを抑制した場合にも、細胞増殖が同様の程度阻害された (図2D, E)。尚、(R104)と比べて、(R103)の方が増殖阻害効果が高く、これはeIF-4Hアイソフォーム1のノックダウンレベルの結果 (図2B, C) とも一致した。これらの結果から、eIF-4Hアイソフォーム1が大腸癌細胞の増殖において重要な役割を担っていることが示された。

[0045] 結果(3): eIF-4Hの抑制による肺繊維芽細胞株の増殖阻害

eIF-4Hアイソフォーム1による細胞増殖効果が癌細胞に特異的なか、又はより一般的な特徴かどうかという問題を解決すべく、正常ヒト肺繊維芽細胞株MRC5の増殖に対するeIF-4H抑制による効果を検討した。siRNA処理48時間後のウェスタンブロット分析の結果によれば、MRC5におけるeIF-4Hアイソフォーム1の発現レベルは大腸癌細胞株のそれよりも低いにも拘らず、その発現レベルは検出不可能なレベルまで減少した (図3A)。しかしながら、大腸癌細胞株の場合と対照的に、MRC5の細胞増殖に対するRNAiによる阻害効果は得られなかった (図3B)。別の正常ヒト肺繊維芽細胞株WI38を用いた実験でも同様な結果が得られた。以上の結果から、eIF-4Hアイソフォーム1の発現抑制により癌細胞の増殖が阻害されるが、正常ヒト肺繊維芽細胞株の

増殖は阻害されないことが判明し、eIF-4Hアイソフォーム1は大腸癌の治療剤の標的として適当である可能性があることが示された。

[0046] 結果(4):eIF-4H1の抑制によるアポトーシスの誘導

eIF-4Hアイソフォーム1の発現抑制による細胞増殖の阻害効果が細胞周期の停止によるものであるか否かを検討するために、フローサイトメトリー分析を実施した。siRNA処理した大腸癌細胞の細胞周期分布をコントロールのそれと比較した(図4)。その結果、(R103)で処理した細胞はコントロールと比較して、sub-G1期細胞数が3倍に増加し、S期細胞が減少した。このことは、RNAiによる細胞増殖阻害がアポトーシスの誘導に依るものであること示唆している。これについては、eIF-4Hが低いレベルになった為に、mRNAに対するeIF-4Aの親和性が減少し抗アポトーシス因子の翻訳効率が低下した為である、という説明が可能である。従って、以上の結果から、eIF-4Hアイソフォーム1はアポトーシスから癌細胞を保護することによって増殖を刺激していることが示唆された。

産業上の利用可能性

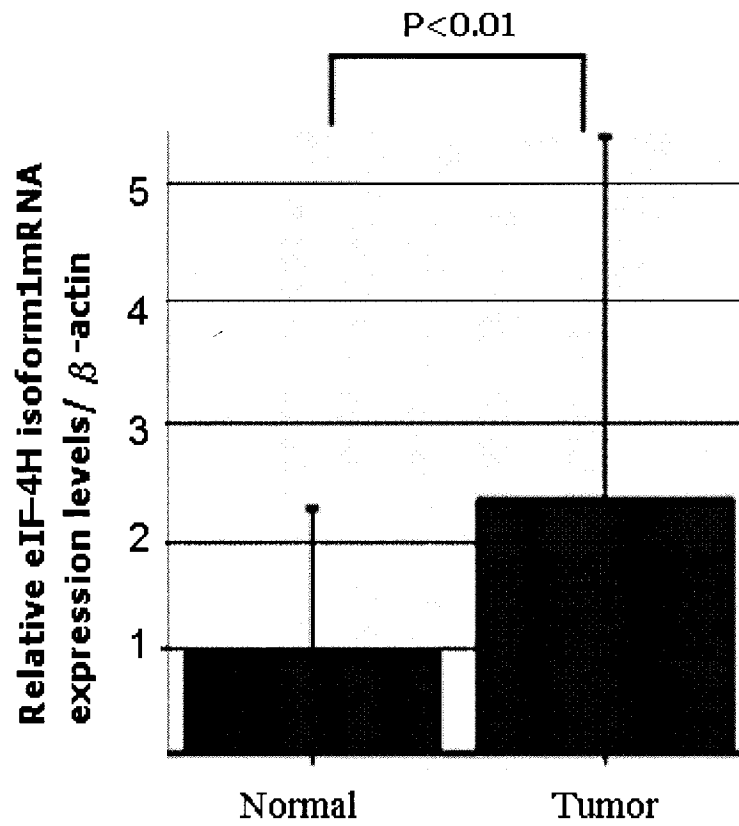
[0047] 本発明によって、癌、特に大腸癌に代表される消化器癌等のより有効で確実な検出・診断・治療を提供すること、及び、このような癌の遺伝子診断システムと遺伝子治療臨床研究システムの開発に利用される各種の生体分子を提供される。特に、eIF-4Hアイソフォーム1は大腸癌等の癌治療において、正常細胞に損傷をあたえず癌細胞のみに特異的に作用する「magic bullets」(Khosla, S. (2005). Magic bullets to kill nasty osteoclasts, Endocrinology 146, 3233-3234)開発のための、有望な標的分子となる可能性がある。

請求の範囲

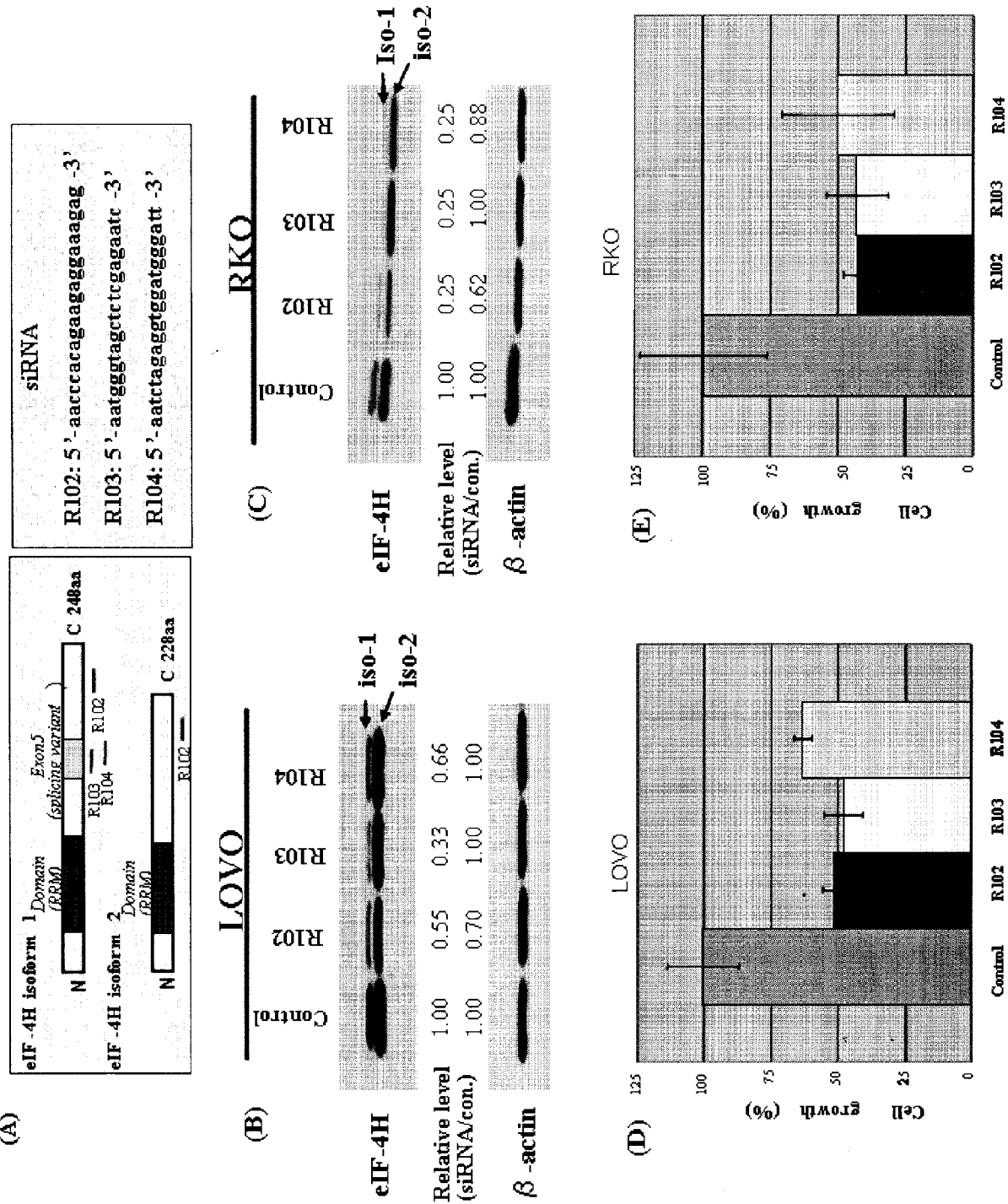
- [1] eIF-4Hの発現を抑制することから成る、癌細胞の増殖阻害方法。
- [2] eIF-4HがeIF4Hアイソフォーム1である、請求項1記載の方法。
- [3] 発現の抑制が転写レベルで行われる、請求項1又は2記載の方法。
- [4] eIF-4Hに特異的な siRNAによる遺伝子ノックダウンを用いる、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [5] siRNAが以下に示すいずれかの塩基配列又はその一部の連続する塩基配列を含む21～23個の塩基から成るオリゴヌクレオチド及びその相補的オリゴヌクレオチドから成る二本鎖RNAである、請求項4記載の方法：
(R102) 5'-aacccacagaagaggaaagag-3';
(R103) 5'-aatggtagctctcgagaatc-3';
(R104) 5'-aatctagaggtggatgggatt-3'。
- [6] 癌が消化器癌である、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。
- [7] 癌が大腸癌である、請求項6記載の方法。
- [8] アポトーシスが誘導されることにより癌細胞の増殖が阻害される、請求項1～7のいずれか一項記載の方法。
- [9] eIF-4Hに特異的な siRNAを活性成分として含有する医薬組成物。
- [10] 癌細胞増殖阻害剤である、請求項9記載の医薬組成物。
- [11] eIF-4HがeIF-4Hアイソフォーム1である、請求項10記載の癌細胞増殖阻害剤。
- [12] siRNAが以下に示すいずれかの塩基配列又はその一部の連続する塩基配列を含む21～23個の塩基から成るオリゴヌクレオチド及びその相補的オリゴヌクレオチドから成る二本鎖RNAである、請求項10又は11記載の癌細胞増殖阻害剤：
(R102) 5'-aacccacagaagaggaaagag-3';
(R103) 5'-aatggtagctctcgagaatc-3';
(R104) 5'-aatctagaggtggatgggatt-3'。
- [13] 癌が消化器癌である、請求項10～12のいずれか一項記載の癌細胞増殖阻害剤。
- [14] eIF-4Hの発現量に基づく、癌細胞増殖阻害活性を有する物質のスクリーニング方法。
- [15] 請求14に記載のスクリーニング方法であって、

- (a) 被検物質の存在下に細胞を培養する工程、
 - (b) 該細胞におけるeIF-4H遺伝子の発現量を測定する工程、及び
 - (c) 発現量を抑制させる物質を選択する工程、を含む方法。
- [16] 工程(b)におけるeIF-4H遺伝子の発現量の測定を、eIF-4Hに対する抗体を使用してeIF-4H蛋白質の産生量の測定にて実施する、請求項15記載のスクリーニング方法。
- [17] 工程(b)におけるeIF-4H遺伝子の発現量の測定を、eIF-4HをコードするmRNA量の測定にて実施する、請求項15記載のスクリーニング方法。
- [18] 請求項14～17のいずれか一項に記載のスクリーニング方法に用いるスクリーニングキット。

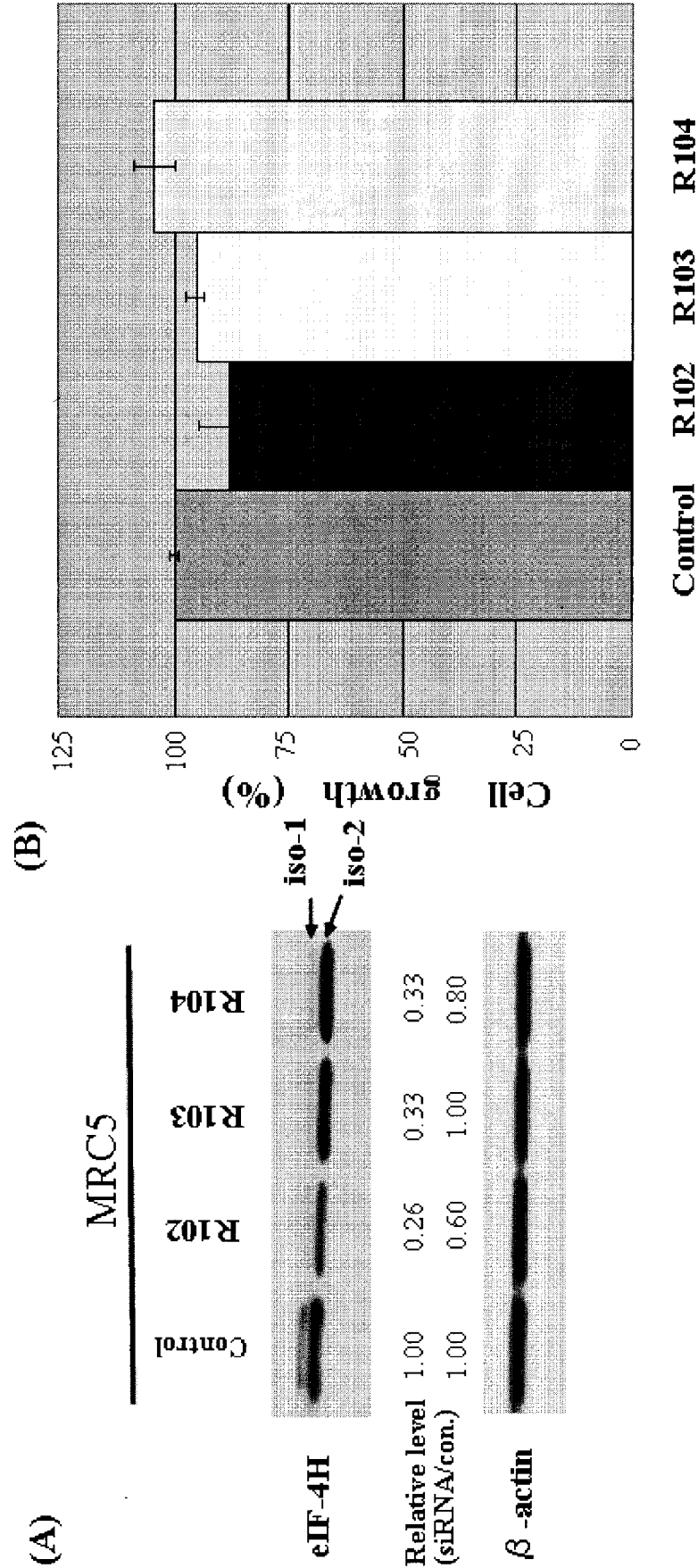
[図1]



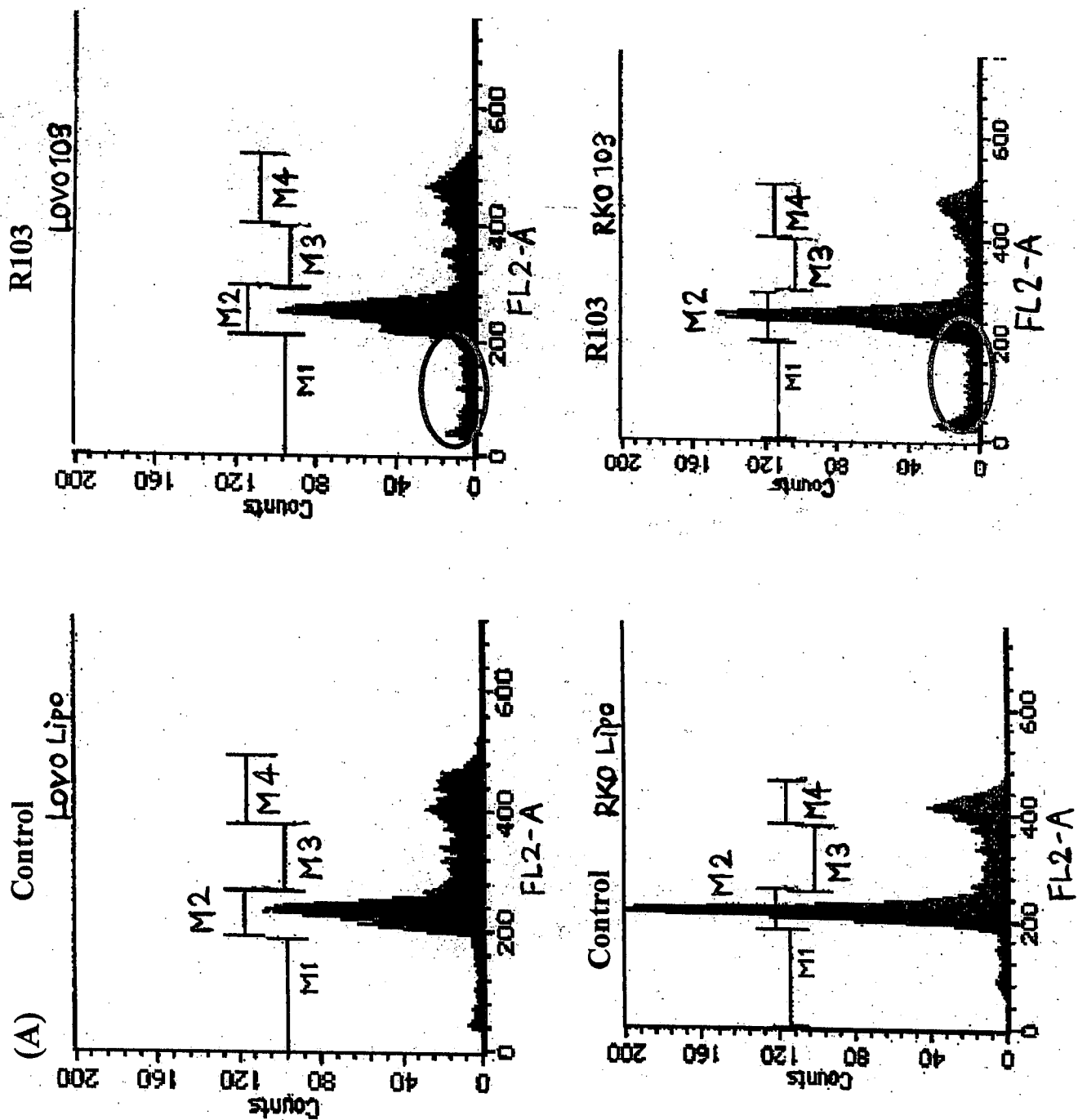
[図2]



[図3]



[図4]



[図4]

(B)

LOVO			
Control	R103	phase	
3.12	10.35	%sub G ₁	
54.20	61.20	% G ₁	
20.12	11.34	%S	
22.72	17.72	% G ₂ /M	

RKO			
Control	R103	phase	
2.56	10.04	%sub G ₁	
67.32	68.41	% G ₁	
14.03	5.44	%S	
16.33	15.32	% G ₂ /M	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/057733

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K48/00(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i,
A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K48/00, A61K31/7105, A61K31/713, A61P35/00, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2007	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2007

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2004-298112 A (Japan Science and Technology Agency), 28 October, 2004 (28.10.04), Full text; particularly, Claim 18; Par. No. [0051] & WO 2004/087921 A1	9-18
A	TOMONAGA, Takeshi et al., Identification of altered protein expression and post-translational modifications in primary colorectal cancer by using agarose two-dimensional gel electrophoresis, Clinical Cancer Research, 2004, Vol.10, No.6, p.2007-2014	9-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 June, 2007 (08.06.07)

Date of mailing of the international search report
03 July, 2007 (03.07.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/057733

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 1 - 8
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1 to 8 pertain to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying 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

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

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K48/00(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K48/00, A61K31/7105, A61K31/713, A61P35/00, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 7 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 7 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 7 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(STN), CAplus(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2004-298112 A (独立行政法人 科学技術振興機構) 2004. 10. 28 全文、特に、請求項 1 8, 段落【0 0 5 1】参照 & WO 2004/087921 A1	9-18
A	TOMONAGA, Takeshi et al., Identification of altered protein expression and post-translational modifications in primary colorectal cancer by using agarose two-dimensional gel electrophoresis, Clinical Cancer Research, 2004, Vol.10, No.6, p. 2007-2014	9-18

☐ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 8 . 0 6 . 2 0 0 7

国際調査報告の発送日

0 3 . 0 7 . 2 0 0 7

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

榎本 佳予子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 9 2

4 P

9 6 3 8

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

- 請求の範囲 1－8 は、治療による人体の処置方法に係るものである。

3. ☒ 請求の範囲_____は、従属請求の範囲であって P C T 規則 6.4 (a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

- 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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