

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6914269号
(P6914269)

(45) 発行日 令和3年8月4日(2021.8.4)

(24) 登録日 令和3年7月15日(2021.7.15)

(51) Int.Cl.

F 1

G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z N A Z
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
A 6 1 K	31/5377	(2006.01)	A 6 1 K	31/5377	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1

請求項の数 9 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-548001 (P2018-548001)
 (86) (22) 出願日 平成29年3月7日 (2017.3.7)
 (65) 公表番号 特表2019-512693 (P2019-512693A)
 (43) 公表日 令和1年5月16日 (2019.5.16)
 (86) 國際出願番号 PCT/KR2017/002442
 (87) 國際公開番号 WO2017/155277
 (87) 國際公開日 平成29年9月14日 (2017.9.14)
 審査請求日 令和2年3月5日 (2020.3.5)
 (31) 優先権主張番号 10-2016-0027077
 (32) 優先日 平成28年3月7日 (2016.3.7)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
韓国 (KR)

(73) 特許権者 514070937
メディシナル バイオコンバージェンス
リサーチ センター
大韓民国 443-270 キョンギード
スウォンーシ ョントン一グ クアンギ
ヨーロ 145 アドバンスド インステ
ィチューツ オブ コンバージェンス テ
クノロジー ビードン 8階 (イウイ
ードン)
(74) 代理人 110002354
特許業務法人平和國際特許事務所

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 A I M P 2 - D X 2 と H S P 7 0 との結合を阻害する抗がん剤スクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 試験物質の存在下又は非存在下で、A I M P 2 - D X 2 又はその断片と、H S P 7 0 又はその断片とを接触させる段階；

(b) 試験物質の存在下又は非存在下でのA I M P 2 - D X 2 と H S P 7 0 との結合を測定する段階；

(c) 試験物質の存在下でのA I M P 2 - D X 2 と H S P 7 0 との結合と、試験物質非存在下でのA I M P 2 - D X 2 と H S P 7 0 との結合とを比較して、試験物質によるA I M P 2 - D X 2 と H S P 7 0 との結合水準の変化を判断する段階；

(d) A I M P 2 - D X 2 と H S P 7 0 との結合水準を減少させる試験物質を選別する段階；及び

(e) 選別された試験物質の抗がん活性を、細胞又は動物で確認する段階を含み、前記A I M P 2 - D X 2 の断片は、前記A I M P 2 - D X 2 の1乃至87番目のアミノ酸残基を含み、

前記H S P 7 0 の断片は、前記H S P 7 0 の385乃至536番目のアミノ酸残基を含む、

抗がん剤スクリーニング方法。

【請求項 2】

前記抗がん剤スクリーニング方法は、前記(d)と前記(e)との間に、

(1) 前記試験物質を、A I M P 2 - D X 2 を発現する細胞に接触させる段階；

10

20

(2) 前記細胞と前記試験物質とを接触させない対照群細胞から、A I M P 2 - D X 2 タンパク質の水準を測定する段階；及び

(3) 前記対照群細胞と比較して、前記A I M P 2 - D X 2 タンパク質の水準を減少させる試験物質を選別する段階を追加的に含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記A I M P 2 - D X 2 は、配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項4】

前記A I M P 2 - D X 2 の断片は、配列番号2で表示されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

10

【請求項5】

前記H S P 7 0 は、配列番号3で示されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項6】

前記H S P 7 0 の断片は、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項7】

前記段階(b)の結合を測定する方法は、ツーハイブリッド方法、共同免疫沈降方法(co-immunoprecipitation assay)、共同局所化分析(co-localization assay)、閃光近接測定法(scintillation proximity assay: SPA)、UV又は化学的架橋結合方法、異分子相互作用分析(bimolecular interaction analysis: BIA)、質量分析法(mass spectrometry: MS)、N M R (nuclear magnetic resonance)、蛍光偏光分析法(fluorescence polarization assays, FPA)及び試験管内プルダウンアッセイ(in vitro pull-down assay)からなる群から選ばれるいずれか一つ以上のことにより実施されることを特徴とする請求項1記載の方法。

20

【請求項8】

前記がんは、乳がん、肺がん、結腸がん、肛門がん、星細胞腫、白血病、リンパ腫、頭頸部がん、肝臓がん、精巣がん、子宮頸がん、肉腫、血管腫、食道がん、安岩、喉頭がん、経口がん、中皮腫、骨髄腫、口腔がん、直腸がん、咽喉がん、膀胱がん、子宮がん、卵巣がん、前立腺がん、大腸がん、脾臓がん、腎臓がん、胃がん、皮膚がん、基底細胞がん、黒色腫、扁平上皮がん、口腔扁平上皮がん、大腸直腸がん、橋細胞腫、子宮内膜がん及び悪性脳膠腫からなる群から選ばれたがんであることを特徴とする請求項1記載の方法。

30

【請求項9】

前記抗がん剤は、s i R N A、s h R N A、m i R N A、r i b o z y m e、D N A z y m e、P N A (peptide nucleic acid)、アンチセンスオリゴヌクレオチド、抗体、アプタマー、ペプチド、天然抽出物、及び化学物質からなる群から選ばれたことを特徴とする請求項1乃至8のいずれか一項記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0 0 0 1】

本出願は、2016年3月7日に出願された韓国特許出願第10-2016-0027077号の優先権を主張し、前記明細書全体は本出願の参考文献である

【0 0 0 2】

本発明は、A I M P 2 - D X 2 とH S P 7 0 の結合を阻害する抗がん剤スクリーニング方法に関するもので、より詳細には(a)試験物質の存在下又は非存在下で、A I M P 2 - D X 2 又はその断片と、H S P 7 0 又はその断片とを接触させる段階；(b)試験物質の存在下又は非存在下でのA I M P 2 - D X 2 とH S P 7 0との結合を測定する段階；(c)試験物質の存在下でのA I M P 2 - D X 2 とH S P 7 0との結合と、試験物質非存在下でのA I M P 2 - D X 2 とH S P 7 0との結合とを比較して、試験物質によるA I M P

50

2 - D X 2 と H S P 7 0 との結合水準の変化を判断する段階 ; (d) A I M P 2 - D X 2 と H S P 7 0 との結合水準を減少させる試験物質を選別する段階 ; 及び (e) 選別された試験物質の抗がん活性を、細胞又は動物で確認する段階を含む抗がん剤スクリーニング方法と、前記の方法で選別された抗がん剤を有効成分として含む抗がん用組成物に関するものである。

【背景技術】

【 0 0 0 3 】

がん特異的マーカーの開発は、がんの診断だけでなく、がん特異的な治療のためにも要求されている。サイトトキシン治療 (cytotoxic therapies) は、最初の抗がん治療薬として使用されて以来、50余年間がんの治療に広く使われてきたが、がん細胞の他に分裂速度が比較的速い他の臓器の細胞に非特異的に作用して強い毒性を示し、深刻な副作用をもたらす問題がある。このような従来の抗がん剤の副作用及び耐性を克服するために、正常細胞のがん化過程で示されるがん特異的マーカー (cancer specific marker) を利用して、腫瘍細胞特異的に作用する治療剤開発の研究が進められた。抗がん剤による毒性を最小化するための方案として浮上する、がんターゲット治療 (cancertargeted therapy) の核心は、がん細胞特異的な遺伝子を探し出すことである。

【 0 0 0 4 】

一方、熱衝撃タンパク質 (Heat Shock Protein、H S P) とは、タンパク質の恒常性維持に核心的な役割をする分子的シャペロンである。H S P は低酸素症のようなストレス状況で、細胞の生存にとって重要である。H S P、特に H S P 9 0 と H S P 7 0 は、広範囲の腫瘍 [Morano KA、Annals of the New York Academy of Sciences、1113:1-14、2007; Calderwood SK et al、Trends in biochemical sciences、31:164-72、2006] で多く発現される。いくつかの H S P の発現は、いくつかのがんで腫瘍細胞の増殖、分化、アポトーシス (apoptosis) と相関関係があることが明らかにされ、これは H S P が、それ自身が有する細胞保護の役割のために、がん細胞の生存に重要な役割を示している。H S P 7 0 の過剰発現は、マウス纖維肉腫細胞の腫瘍形成を誘発し、遺伝子導入されたマウスの T - 細胞内 H S P 7 0 が過剰発現されると、そのマウスの T 細胞リンパ腫の増加を誘発すると報告されている [Jaattela M、International journal of cancer Journal international du cancer、60:689-93、1995; Seo JS et al、Biochemical and biophysical research communications、218:582-7、1996; Volloch VZ et al、Oncogene、18:3648-51、1999; Murphy ME、Carcinogenesis、34:1181-8、2013] 。特に、H S P 7 0 は、アポトーシスから細胞を保護する重要な役割をすると知られている。それだけでなく、H S P の発現が増加することは、血管形成、侵襲、転移に関連していることが知られている [Calderwood SK et al、Trends in biochemical sciences、31:164-72、2006; Zhou J et al、The Journal of biological chemistry、279:13506-13、2004; Bruns AF et al、PloS one、7:e48539、2012; Sun J et al、Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology 24:2238-44、2004; Gong W、et al、Oncology reports、2013; Eustace BK et al、Cell cycle、3:1098-100、2004; Eustace BK et al、Nature cell biology、6:507-14、2004] 。

【 0 0 0 5 】

A I M P 2 (ARS-interacting multi-functional protein 2) は、アミノアシル - t R N A 合成酵素複合体 (Aminoacyl-tRNA synthetase : A R S s) の形成に関連したタンパク質の一つで、p 3 8 / J T V - 1 又は p 3 8 とも称される。A I M P 2 が、新規ながん抑制因子 (tumor suppressor) として、S m a d 2 / 3 との直接的相互作用を通じて T G F - の信号伝達を強化する機能を有することが報告されており、がん細胞株及び組織で、A I M P 2 のエキソン 2 が欠損された形態の変異体である A I M P 2 - D X 2 が特異的に発現されることが知られている (韓国登録特許第 1 0 - 0 7 6 2 9 9 5 号公報)。

【 0 0 0 6 】

以上の通り、A I M P 2 - D X 2 及び H S P 7 0 それが腫瘍細胞の分化又は生存と関連していることは知られているが、それらの相互関係ががんにどのような関連性がある

10

20

30

40

50

かについては知られていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】韓国登録特許第10-0762995号公報

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Morano KA、Annals of the New York Academy of Sciences、1113:1-14
、2007

【非特許文献2】Calderwood SK et al、Trends in biochemical sciences、31:164-72、10
2006

【非特許文献3】Jaattela M、International journal of cancer Journal internationale du cancer、60:689-93、1995

【非特許文献4】Seo JS et al、Biochemical and biophysical research communication s、218:582-7、1996

【非特許文献5】Volloch VZ et al、Oncogene、18:3648-51、1999

【非特許文献6】Murphy ME、Carcinogenesis、34:1181-8、2013

【非特許文献7】Zhou J et al、The Journal of biological chemistry、279:13506-13
、2004

【非特許文献8】Bruns AF et al、PloS one、7:e48539、2012

20

【非特許文献9】Sun J et al、Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology 24:2238-44、2004

【非特許文献10】Gong W、et al、Oncology reports、2013

【非特許文献11】Eustace BK et al、Cell cycle、3:1098-100、2004

【非特許文献12】Eustace BK et al、Nature cell biology、6:507-14、2004

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

【発明の詳細な説明】

【技術的課題】

30

そこで、本発明者らはAIMP2-DX2及びHSP70の相互作用を研究中、HSP70がAIMP2-DX2に直接結合してAIMP2-DX2タンパク質を安定化させ、結果的にがん細胞の生存と分化に決定的な役割をすることを確認した。従って、HSP70とAIMP2-DX2との結合を抑制すると、細胞の分裂と増殖を抑制できることに着目して本発明を完成した。

【0010】

従って、本発明の目的は、

(a) 試験物質の存在下又は非存在下で、AIMP2-DX2又はその断片と、HSP70又はその断片とを接触させる段階；

(b) 試験物質の存在下又は非存在下でのAIMP2-DX2とHSP70との結合を測定する段階；

(c) 試験物質の存在下でのAIMP2-DX2とHSP70との結合と、試験物質非存在下でのAIMP2-DX2とHSP70との結合とを比較して、試験物質によるAIMP2-DX2とHSP70との結合水準の変化を判断する段階；

(d) AIMP2-DX2とHSP70との結合水準を減少させる試験物質を選別する段階；及び

(e) 選別された試験物質の抗がん活性を、細胞又は動物で確認する段階を含む抗がん剤スクリーニング方法を提供することである。

【0011】

本発明の他の目的は、

50

前記抗がん剤スクリーニングの方法で選別された抗がん剤を有効成分として含むがんの予防又は治療用薬学的組成物を提供することである。

【0012】

また、本発明の他の目的は、

前記抗がん剤スクリーニングの方法で選別された抗がん剤を有効成分として構成されるがんの予防又は治療用薬学的組成物を提供することである。

【0013】

また、本発明の他の目的は、

前記抗がん剤スクリーニングの方法で選別された抗がん剤を有効成分として必須的に構成されるがんの予防又は治療用薬学的組成物を提供することである。

10

【0014】

本発明の他の目的は、

がんの予防又は治療用製剤を製造するための、前記抗がん剤スクリーニング方法で選別された抗がん剤の使用を提供することである。

【0015】

本発明の他の目的は、

前記抗がん剤スクリーニング方法で選別された抗がん剤の有効量を、これを必要とする個体に投与することを特徴とするがんの予防又は治療方法を提供することである。

【0016】

[技術的解決方法]

20

前記のような目的を達成するために、本発明は、

(a) 試験物質の存在下又は非存在下で、AIMP2-DX2又はその断片と、HSP70又はその断片とを接触させる段階；

(b) 試験物質の存在下又は非存在下でのAIMP2-DX2とHSP70との結合を測定する段階；

(c) 試験物質の存在下でのAIMP2-DX2とHSP70との結合と、試験物質非存在下でのAIMP2-DX2とHSP70との結合とを比較して、試験物質によるAIMP2-DX2とHSP70との結合水準の変化を判断する段階；

(d) AIMP2-DX2とHSP70との結合水準を減少させる試験物質を選別する段階；及び

30

(e) 選別された試験物質の抗がん活性を、細胞又は動物で確認する段階を含む抗がん剤スクリーニング方法を提供する。

【0017】

本発明の他の目的を達成するために、本発明は、

前記抗がん剤スクリーニングの方法で選別された抗がん剤を有効成分として含む抗がん用組成物を提供する。

【0018】

また、本発明の他の目的を達成するために本発明は、

有効成分として、前記抗がん剤スクリーニングの方法で選別された抗がん剤からなる抗がん用組成物を提供する。

40

【0019】

また、本発明の他の目的を達成するために本発明は、

有効成分として、本質的に、前記抗がん剤スクリーニングの方法で選別された抗がん剤からなる抗がん用組成物を提供する。

【0020】

本発明の他の目的を達成するために本発明は、

がんの予防又は治療用製剤を製造するための、前記抗がん剤スクリーニング方法で選別された抗がん剤の使用を提供する。

【0021】

本発明の他の目的を達成するために本発明は、

50

前記抗がん剤スクリーニング方法で選別された抗がん剤の有効量を、これを必要とする個体に投与することを特徴とするがん治療方法を提供する。

【0022】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0023】

本発明は、

(a) 試験物質の存在下又は非存在下で、A IMP 2 - DX 2 又はその断片と、HSP 70 又はその断片とを接触させる段階；

(b) 試験物質の存在下又は非存在下での A IMP 2 - DX 2 と HSP 70 との結合を測定する段階；

10

(c) 試験物質の存在下での A IMP 2 - DX 2 と HSP 70 との結合と、試験物質非存在下での A IMP 2 - DX 2 と HSP 70 との結合とを比較して、試験物質による A IMP 2 - DX 2 と HSP 70 との結合水準の変化を判断する段階；

(d) A IMP 2 - DX 2 と HSP 70 との結合水準を減少させる試験物質を選別する段階；及び

(e) 選別された試験物質の抗がん活性を、細胞又は動物から確認する段階を含む抗がん剤スクリーニング方法を提供する。

【0024】

本発明者らは HSP 70 が、元来の機能の他に、A IMP 2 - DX 2 に結合して A IMP 2 - DX 2 タンパク質を分解されないように安定化させ、A IMP 2 - DX 2 による腫瘍細胞の分化と成長を促進させる作用を示すことを発見した。HSP 70 の発現を抑制して A IMP 2 - DX 2 と反応することができる HSP 70 の水準を減少させるか、又は HSP 70 と A IMP 2 - DX 2 の反応を直接阻害することができる因子は、A IMP 2 - DX 2 タンパク質の水準を減少させ、結果的に腫瘍細胞の成長と分化が阻害されるようになる。本発明者らは、このような HSP 70 と A IMP 2 - DX 2 の機能的な関係に対する発見に基づいて、HSP 70 と A IMP 2 - DX 2 との結合を阻害することができる製剤をスクリーニングして、抗がん剤として選別することができる抗がん剤スクリーニング方法を本明細書で初めて公開する。

20

【0025】

前記 (a) 試験物質の存在下又は非存在下で、A IMP 2 - DX 2 又はその断片と、HSP 70 又はその断片とを接触させる段階である。

30

【0026】

本発明で “タンパク質” は “ポリペプチド (polypeptide)” 又は “ペプチド (peptide)” と互換性を有して使用され、例えば、自然状態のタンパク質から一般的に発見されるような、アミノ酸残基の重合体を意味する。前記 “断片” は、タンパク質の一部分を意味する。また、本発明で “ポリヌクレオチド (polynucleotide)” 又は “核酸” は、単一の又は二重鎖の形態をなすデオキシリボヌクレオチド (DNA) 又はリボヌクレオチド (RNA) を意味する。他の制限がない限り、自然に生成されるヌクレオチドと類似した方法で核酸に混成化される自然のヌクレオチドの公知のアナログも含まれる。“mRNA” は、タンパク質合成の過程で、特定の遺伝子の塩基配列の遺伝情報を、ポリペプチドを形成するリボソームに伝達する RNA である。

40

【0027】

本発明で、前記 “A IMP 2 - DX 2” は、A IMP 2 タンパク質配列 (312aa version : AAC50391.1 または GI : 1215669; 320aa version : AAH13630.1, GI : 15489023, BC013630.1) の中のエキソン 2 の領域が欠失された変異体として、A IMP 2 同等物 (アミノ酸配列の置換、欠失、挿入、またはこれらの組み合わせによる変形体として、A IMP 2 と実質的に同等の活性を有する機能的同等物、または物理化学的性質を増加または減少させる変形を有し、A IMP 2 と実質的に同等の活性を有する機能的誘導体) からエキソン 2 の領域が欠失されたタンパク質を含む。本発明で、A IMP 2 タンパク質配列のうち “エキ”

50

ソン2の領域が欠失”したとは、AIMP2タンパク質からエキソン2領域のアミノ酸配列が部分的に、又は全体的に失われて生じた変異体が、AIMP2タンパク質とヘテロダイマーを形成して、AIMP2の正常的な機能を妨害することを意味する。従って、AIMP2-DX2タンパク質は、AIMP2タンパク質のエキソン2のアミノ酸配列がすべて欠失されたり、この領域のアミノ酸配列を含むエキソン1、エキソン3、エキソン4、又はこれらの領域の全てから、これらの領域の一部も欠失されたり、エキソン2のアミノ酸配列の一部のみが欠失されたタンパク質を含む。

【0028】

本発明の方法を実施するためのAIMP2-DX2タンパク質は、好ましくは、ヒトを含む哺乳類に由来するものでもあって、最も好ましくは、配列番号1で示されるヒトのAIMP2-DX2タンパク質のアミノ酸配列を含むものもある。10

【0029】

また、前記AIMP2-DX2の断片は、AIMP2-DX2においてHSP70との結合に必要な部分を含む断片を意味する。本発明者らは、AIMP2-DX2のタンパク質から、AIMP2部分ではなく、DX2部分が、HSP70と結合することを確認した。従って、本発明を実施するためのAIMP2-DX2の断片は、配列番号1で表示されるヒトのAIMP2-DX2アミノ酸配列から1乃至87番目のアミノ酸を含んでいることが好ましく、最も好ましくは、配列番号2で表されるアミノ酸配列ができるが、これに限定されるものではない。20

【0030】

本発明で、“HSP70”は、熱衝撃タンパク質70(Heat Shock Protein, HSP)であって、タンパク質の恒常性の維持に核心的な役割をする分子的シャペロンである。HSP70は、低酸素症のようなストレス状況で、細胞の生存にとって重要である。一方、HSP70は、広範囲の腫瘍[Morano KA、Annals of the New York Academy of Sciences、1113:1-14、2007; Calderwood SK et al、Trends in biochemical sciences、31:164-72、2006]で多く発現される。HSP70の発現は、いくつかのがんで腫瘍細胞の増殖、分化、アポトーシス(apoptosis)との相関関係があることが明らかにされており、これはHSP70自体が有する細胞保護役割のために、がん細胞の生存に重要な役割を示している。HSP70の過剰発現は、マウス纖維肉腫細胞の腫瘍形成を誘発して、遺伝子導入されたマウスのT-細胞内HSP70が過剰発現されると、そのマウスのT細胞リンパ腫の増加を誘発すると報告されている[Jaattela M、International journal of cancer Journal international du cancer、60:689-93、1995; Seo JS et al、Biochemical and biophysical research communications、218:582-7、1996; Volloch VZ et al、Oncogene、18:3648-51、1999; Murphy ME、Carcinogenesis、34:1181-8、2013]。30

【0031】

本発明の方法を実施するためのHSP70タンパク質は、好ましくは、ヒトを含む哺乳動物に由来するものでもあって、最も好ましくは、配列番号3で示されるアミノ酸配列を含むものもある。

【0032】

また、前記HSP70の断片は、AIMP2-DX2との結合に必要な部分を含んでいる断片を意味する。本発明者らは、AIMP2-DX2が、HSP70の基質結合ドメイン(Substrate binding domain)部位に結合することを確認した。具体的には、ヒトのHSP70のアミノ酸(配列番号3)配列における385乃至536番目のアミノ酸(配列番号4)を含む断片が、AIMP2-DX2と結合することを明らかにした。従って、本発明を実施するためのHSP70の断片は、配列番号3における385乃至536番目のアミノ酸(配列番号4)配列を含む断片でもある。40

【0033】

また、本発明に係るAIMP2-DX2又はその断片、さらに、HSP70又はその断片は、これらの機能的同等物を含んでいる。前記“機能的同等物”とは、前記AIMP2-DX2とその断片、さらに、HSP70又はこれらの断片のアミノ酸配列と少なくとも50

70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の配列相同性（つまり、同一性）を有するポリペプチドを意味するもので、配列番号1で示されるA I M P 2 - D X 2と、配列番号3で示されるH S P 7 0のポリペプチドと実質的に同質の生理活性を示すポリペプチドを意味する。ここで“実質的に同質の生理活性”とは、野生型A I M P 2 - D X 2と野生型H S P 7 0との間の直接的で特異的な結合を再現できることを意味する。つまり、A I M P 2 - D X 2の断片の機能的同等物は、全体の長さのH S P 7 0又はその断片に結合することができる活性を有するものであり、H S P 7 0の断片の機能的同等物とは、全体の長さのA I M P 2 - D X 2又はA I M P 2 - D X 2におけるH S P 7 0に結合する部位に結合できる活性を有するものを意味する。前記機能的同等物は、アミノ酸配列の一部が付加、置換又は欠失された結果、生成されたものもある。前記でアミノ酸の置換は好ましくは保存的置換である。天然に存在するアミノ酸の保存的置換の例は、以下の通りである；脂肪族アミノ酸（G l y、A l a、P r o）、疎水性アミノ酸（I l e、L e u、V a l）、芳香族アミノ酸（P h e、T y r、T r p）、酸性アミノ酸（A s p、G l u）、塩基性アミノ酸（H i s、L y s、A r g、G l n、A s n）及び硫黄含有アミノ酸（C y s、M e t）、又は前記機能的同等物には、アミノ酸配列上でアミノ酸の一部が欠失された変形体も含まれる。前記アミノ酸の欠失又は置換は、好ましくは、本発明のポリペプチドの生理活性に直接的に関連していない領域に位置している。また、アミノ酸の欠失は好ましくは、A I M P 2 - D X 2又はH S P 7 0ポリペプチドの生理活性に直接関与していない部分に位置する。従って、前記アミノ酸配列の両末端又は配列内に幾つかのアミノ酸が付加された変形体も含まれる。また、本発明の機能的同等物の範囲には、本発明によるポリペプチドの基本骨格及びその生理活性を維持しながら、ポリペプチドの一部の化学構造が変形されたポリペプチド誘導体も含まれる。例えば、本発明のポリペプチドの安定性、貯蔵性、揮発性又は溶解度等を変更させるための構造変更がこれに含まれる。10

【0034】

本発明の方法で“接触（contacting）”とは、一般的な意味であり、2つ以上の製剤（例えば、2つのポリペプチド）を結合させたり、製剤と細胞（例えば、タンパク質と細胞）を結合させることを意味する。接触は試験管内（*in vitro*）で起こり得る。例えば、試験管（test tube）又は他のコンテナ（container）で2つ以上の製剤を結合させたり、試験製剤と細胞とを、又は細胞溶解物と試験製剤とを結合させることである。また、接触は、細胞又はインシチュー（*in situ*）で起こることもある。例えば、2つのポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドを細胞内で共同発現（coexpression）させることで、細胞又は細胞溶解物から2つのポリペプチドを接触させることである。また、テストしようとするタンパク質が固定相の表面に配列されたタンパク質チップ（protein chip）やタンパク質アレイ（protein array）を利用することもできる。20

【0035】

本発明の方法を、細胞内で実施するときには、A I M P 2 - D X 2とH S P 7 0は、細胞内在的に発現されることを利用したり、A I M P 2 - D X 2やその断片、H S P 7 0又はその断片をコードする核酸を細胞内に導入して形質転換させることで過発現されるようにして、実施することができる。また、本発明の方法を試験管内又はタンパク質アレイのような*in situ*で実施するときには、A I M P 2 - D X 2又はその断片、H S P 7 0又はその断片は、天然から抽出したり、遺伝工学的方法により製作して準備することができる。例えば、通常の方法によって、前記ポリペプチド又はその機能的同等物をコードする核酸と組換えて発現ベクターを作製して、適切な宿主細胞において発現させて得ることができる。また、本発明の方法を実施するために必要な前記ポリペプチドは、当業界において公知である化学的合成方法でも製作することができる。40

【0036】

また、本発明の方法で“試験物質”とは、試験製剤（test agent）又は製剤（agent）と互換可能に使用することができるもので、任意の物質（substance）、分子（molecule）、元素（element）、化合物（compound）、実在物（entity）又はこれらの組み合わせ50

を含む。例えばタンパク質、ポリペプチド、低分子有機化合物 (small organic molecule)、多糖類 (polysaccharide)、ポリヌクレオチドなどを含む。また、天然産物 (natural product)、合成化合物又は化学化合物又は2つ以上の物質の組み合わせでもある。

【0037】

具体的には、本発明の方法を通じて選別される抗がん剤は、A IMP 2 - DX 2 と HSP 70 とのタンパク質結合を阻害したり、HSP 70 と結合できる A IMP 2 - DX 2 タンパク質の発現水準を下げるができるものであれば物質の特性に制限されず、例えば、siRNA、shRNA、miRNA、ribozyme、DNazyme、PNA (peptide nucleic acid)、アンチセンスオリゴヌクレオチド、抗体、アブタマー、ペプチド、天然抽出物、及び化学物質などもある。好ましくは、A IMP 2 - DX 2 の発現を下げができる shRNA、siRNA 又は化学物質でもあるがこれに限定されるものではない。10

【0038】

前記 (b) 段階は、(a) 段階で試験物質の存在下又は非存在下で接触させた A IMP 2 - DX 2 と HSP 70 との結合を測定する段階である。

【0039】

前記 A IMP 2 - DX 2 と HSP 70 との結合を測定する段階は、二つのタンパク質の結合程度を測定するために、当業界で通常的に使用されるものであれば制限なく選択して使用することができる。例えば、ツーハイブリッド (two hybrid) 方法、共免疫沈降方法 (co-immunoprecipitation assay, co-IP)、組織免疫染色と共に局所化分析 (co-localization assay)、シンチレーション (閃光) 近接測定法 (scintillation proximity assay, SPA)、UV 又は化学的架橋結合方法、二分子相互作用分析 (bimolecular interaction analysis, BIA)、質量分析法 (mass spectrometry, MS)、NMR (nuclear magnetic resonance)、蛍光偏光分析法 (fluorescence polarization assays, FPA) 及び試験管内プル - ダウンアッセイ (in vitro pull-down assay)、ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)、タンパク質チップ (protein chip) 又はアレー (array)、Venus BiFC (bimolecular fluorescence complementation, BiFC) などから適宜選択して、A IMP 2 - DX 2 と HSP 70 との結合を測定することができる。20

【0040】

本発明の具体的な実施例では、細胞内に HA、Strep、放射性同位元素等で適切に標識された DX 2 と HSP 70 を過発現させ、co-IP 実験を行ったり、GST pull-down 実験を利用して、DX 2 に結合している HSP 70 タンパク質の水準を測定したり、逆に HSP 70 に結合している DX 2 のタンパク質の水準を測定した。30

【0041】

前記 (c) 段階は、(b) で測定した試験物質の存在下での A IMP 2 - DX 2 と HSP 70 との結合と、試験物質非存在下での A IMP 2 - DX 2 と HSP 70 との結合とを比較して、試験物質による A IMP 2 - DX 2 と HSP 70 との結合水準の変化を判断する段階である。

【0042】

つまり、(b) 段階で導出された試験物質の存在下又は非存在下で接触させた A IMP 2 - DX 2 と HSP 70 とのタンパク質の結合水準の差を把握して、試験物質が A IMP 2 - DX 2 と HSP 70 との結合に及ぼす影響を判断する段階である。40

【0043】

前記 (d) 段階は、A IMP 2 - DX 2 と HSP 70 との結合水準を減少させる試験物質を選別する段階である。

【0044】

本発明者らは、具体的な実施例で、A IMP 2 - DX 2 と HSP 70 とは細胞内で特異的に直接結合し、HSP 70 との結合を通じて A IMP 2 - DX 2 は分解されないように安定化され、結果的に A IMP 2 - DX 2 による細胞の増殖と分化が維持されることを確50

認した。A I M P 2 - D X 2 タンパク質の安定化は、H S P 7 0 タンパク質との直接的な結合を通じて行われるもので、A I M P 2 - D X 2 タンパク質がH S P 7 0 タンパク質から解離されると、A I M P 2 - D X 2 タンパク質が不安定になり、分解されてその水準が減少するようになり、結果的にA I M P 2 - D X 2 による細胞の増殖と分化が阻害される。このような効果は、H S P 7 0 の発現を抑制する s i R N A 又はH S P 7 0 阻害剤を利用して確認することができた。A I M P 2 - D X 2 とH S P 7 0 との間の結合を抑制することにより、非正常的に細胞分裂するがん細胞の発生と増殖を抑制できることが分かった。

【 0 0 4 5 】

また、他の実施例では、腫瘍発生関連細胞実験と異種移植 (xenograft) の動物実験を通じて、A I M P 2 - D X 2 とH S P 7 0 との間の結合を抑制すると、がん細胞の増殖、腫瘍の形成と成長が抑制されることを確認した。

【 0 0 4 6 】

以上の本発明者らの発見を通じて、当業者は、A I M P 2 - D X 2 とH S P 7 0 との間の結合を抑制又は結合水準を減少させる物質が、A I M P 2 - D X 2 を不安定にしてがん細胞の増殖と分化を抑制できることが分かる。前記A I M P 2 - D X 2 とH S P 7 0 との結合水準を減少させる物質は、代表的には、A I M P 2 - D X 2 とH S P 7 0 との結合 자체を阻害する物質、又はA I M P 2 - D X 2 と結合可能なH S P 7 0 タンパク質の量を減少させる物質である。本発明の抗がん剤スクリーニング方法によって選別された抗がん剤に対する具体的な例は、本発明によるがんの予防又は治療用薬学的組成物に対する説明に記述されている。

【 0 0 4 7 】

前記 (e) 段階は、(d) 段階で選別された物質の抗がん活性を細胞又は動物で確認する段階である。

【 0 0 4 8 】

(e) 段階は、(d) 段階でA I M P 2 - D X 2 とH S P 7 0 との結合水準を減少させるものに選別された試験物質が、具体的にがん又は腫瘍モデルの細胞又は動物からA I M P 2 - D X 2 タンパク質の不安定化と予測される抗がん活性を有するかを確認する段階である。前記抗がん活性は、非正常的な細胞分裂の増加、正常細胞のがん細胞への転換、がん細胞の細胞分裂と増殖、腫瘍の発生と成長などを抑制することを意味する。

【 0 0 4 9 】

前記がん又は腫瘍モデルの細胞又は動物は、当業界で通常に使用されるものであれば適宜選択して、(d) 段階で選別された物質の抗がん活性を確認することができる。本発明の具体的な実施例では、ヒトのがん細胞株をマウスに注入する異種移植を利用して、体内腫瘍の発生と形成過程を観察している。

【 0 0 5 0 】

本発明に係る抗がん剤スクリーニング方法は、前記 (d) と (e) 段階の間に追加的に (1) 試験物質を、A I M P 2 - D X 2 を発現する細胞に接触させる段階； (2) 前記細胞と試験物質とを接触しない対照群細胞でA I M P 2 - D X 2 タンパク質の水準を測定する段階；及び (3) 対照群細胞と比較してA I M P 2 - D X 2 タンパク質の水準を減少させる試験物質を選別する段階を実施することができる。

【 0 0 5 1 】

本発明によれば、A I M P 2 - D X 2 が分解されないように安定化するにはH S P 7 0 との直接的な結合が必要なため、A I M P 2 - D X 2 とH S P 7 0 との結合水準が減少すると、A I M P 2 - D X 2 のタンパク質水準が減少することを理解できる。前記 (1) 乃至 (3) の段階は、(d) 段階でA I M P 2 - D X 2 とH S P 7 0 との結合水準を減少させるものに選別された試験物質が、A I M P 2 - D X 2 タンパク質の水準を減少させるか否かをさらに確認することである。前記の追加的な段階は、(d) 段階でA I M P 2 - D X 2 とH S P 7 0 との結合水準を減少させる製剤として選別されたが、偽陰性 (false-po

10

20

30

40

50

sitive) である場合、又は A I M P 2 - D X 2 と H S P 7 0 との結合を阻害する水準が A I M P 2 - D X 2 の不安定化を引き起こすことに不足した場合を判断して除去するために、実施することができる。

【 0 0 5 2 】

前記(1)段階は、(d)段階で選別された試験物質を A I M P 2 - D X 2 を発現する細胞に接触させる段階である。

【 0 0 5 3 】

前記 A I M P 2 - D X 2 を発現する細胞は、A I M P 2 - D X 2 を内在的に発現する細胞でもあって、A I M P 2 - D X 2 をコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターに形質転換されて A I M P 2 - D X 2 を過剰発現する細胞もある。例えば、A I M P 2 - D X 2 を発現する多様ながん細胞株の中から適宜選択して、試験物質の A I M P 2 - D X 2 不安定化効果を検証することができる。前記“接触”的意味は先に説明した通りである。

【 0 0 5 4 】

前記(2)段階は、(1)段階で試験物質と接触した細胞と試験物質を接触していない対照群細胞から A I M P 2 - D X 2 タンパク質水準を測定する段階である。

【 0 0 5 5 】

前記 A I M P 2 - D X 2 タンパク質の水準を測定するために、当業界で通常に使用されるタンパク質検出方法を制限なく選択して使用することができ、例えば、ウェスタンウェスタンプロット(western blotting)、ドットブロッティング(dot blotting)、酵素結合免疫吸着分析法(enzyme linked immunosorbent assay, E L I S A)、放射免疫分析法(R I A)、放射免疫拡散法、オウクテロニ免疫拡散法、ロケット免疫電気泳動、免疫組織化学染色、免疫沈降法(immunoprecipitation)、補体固定分析法、フローサイトメトリー(F A C S)又はタンパク質チップ(chip)方法などを使用することができる。

【 0 0 5 6 】

前記(c)段階は、対照群の細胞と比較して A I M P 2 - D X 2 タンパク質の水準を減少させる試験物質を選別する段階である。

【 0 0 5 7 】

前記(c)段階は、先に(b)のステップで測定した試験物質を接触した細胞と接触していない対照群細胞とで測定した A I M P 2 - D X 2 タンパク質の水準を比較し、A I M P 2 - D X 2 タンパク質水準が実際に減少したことが示された試験物質をさらに選別することになる。

【 0 0 5 8 】

本発明では、前記がんは乳がん、肺がん、結腸がん、肛門がん、星状細胞腫、白血病、リンパ腫、頭頸部がん、肝臓がん、睾丸がん、子宮頸部がん、肉腫、血管腫、食道がん、眼がん、喉頭がん、経口がん、中皮腫、骨髄腫、口腔がん、直腸がん、咽喉がん、膀胱がん、子宮がん、卵巣がん、前立腺がん、大腸がん、膵臓がん、腎臓がん、胃がん、皮膚がん、基底細胞がん、黒色腫、扁平上皮がん腫、口腔扁平上皮がん腫、大腸直腸がん、膠芽腫(膠細胞腫)、子宮内膜がん及び悪性脳膠腫からなる群から選ばれ得るがこれらに限定されるものではない。

【 0 0 5 9 】

さらに、本発明は、本発明に係る抗がん剤スクリーニングの方法で選別された抗がん剤を有効成分として含むがんの予防又は治療用薬学的組成物を提供する。

【 0 0 6 0 】

また、本発明は、有効成分として、本発明に係る抗がん剤スクリーニングの方法で選別された抗がん剤からなるがんの予防又は治療用薬学的組成物を提供する。

【 0 0 6 1 】

また、本発明は、有効成分として、本質的に、本発明に係る抗がん剤スクリーニングの方法で選別された抗がん剤からなるがんの予防又は治療用薬学的組成物を提供する。

【 0 0 6 2 】

10

20

30

40

50

本発明の方法により選別された抗がん剤は、A I M P 2 - D X 2 と H S P 7 0 との結合水準を減少させ、A I M P 2 - D X 2 タンパク質を不安定化してがん細胞の増殖と分化を抑制できるものであれば物質の特性に特別な制限はないが、作用機作によって代表的に A I M P 2 - D X 2 と H S P 7 0 二つのタンパク質の結合自体を阻害する物質又は H S P 7 0 の発現を抑制して H S P 7 0 と結合可能な A I M P 2 - D X 2 タンパク質の水準をさげる物質を考えてみる。

【 0 0 6 3 】

本発明の方法で選別された抗がん剤は具体的には s i R N A 、 s h R N A 、 m i R N A 、リボザイム、D N A ザイム、P N A (peptide nucleic acid) 、アンチセンスオリゴヌクレオチド、抗体、アプタマー、ペプチド、天然抽出物及び化学物質からなる群から選ばれたものもある。

10

【 0 0 6 4 】

本発明者らは H S P 7 0 に特異的な s i R N A (s i - H S P 7 0) 、又は H S P 7 0 阻害剤を使用して、がん細胞から、H S P 7 0 の発現を抑制すると H S P 7 0 に結合した A I M P 2 - D X 2 の水準が減少して A I M P 2 - D X 2 タンパク質が分解して減少し、結果的に A I M P 2 - D X 2 によるがん細胞の増殖と分化が抑制されることを確認した。

【 0 0 6 5 】

これは、s i R N A 又は H S P 7 0 阻害剤など H S P 7 0 の発現を抑制できる製剤は、がん疾患の予防又は治療に効果的に利用できることを示した。

【 0 0 6 6 】

20

従って、本発明に係る抗がん剤スクリーニングで選別された抗がん剤は、H S P 7 0 特異的な s i R N A 、 s h R N A 、又は H S P 7 0 阻害剤でもある。前記 s i R N A 又は s h R N A は、H S P 7 0 m R N A に特異的に結合して m R N A の分解を誘導することができる 10 乃至 30 個の塩基配列からなり、当業界において公知の方法により通常の技術者が容易に製作することができる。

【 0 0 6 7 】

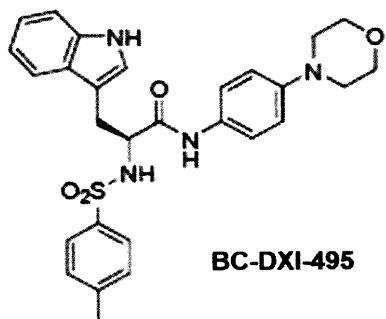
本発明の具体的な実施例では、下記化学式 1 の化合物が A I M P 2 - D X 2 と H S P 7 0 との結合を濃度依存的に阻害し、結果的に A I M P 2 - D X 2 が不安定化してその発現が阻害されることによりがん細胞の増殖と分化が抑制されることを確認した。

【 0 0 6 8 】

30

【 化 1 】

[化学式 1]



40

【 0 0 6 9 】

本発明に係るがんの予防又は治療用薬学的組成物は、経口的又は非経口的に投与することができる。非経口的投与方法は、これに限定はされないが、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髓内、境膜内、心臓内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸管、局所、舌下又は直腸内投与でもあって、好ましくは血管内投与でもある。

50

【0070】

また、本発明に係るがん疾患の予防又は治療用組成物は、薬学的に許容される担体と共に、当業界において公知の方法で、投与経路により多様に剤形化することができる。“薬学的に許容される”とは、生理学的に許容されてヒトに投与されるとき、活性成分の作用を阻害しない、通常的に胃腸障害、めまいのようなアレルギー反応又はこれと類似した反応を起こさない非毒性の組成物を意味する。前記担体には全ての種類の溶媒、分散媒質、水中油又は油中水エマルジョン、水性組成物、リポソーム、マイクロビーズ及びマイクロソームが含まれる。

【0071】

本発明の薬学的組成物を非経口的に投与する場合、本発明の組成物は、適切な非経口用担体と共に、注射剤、経皮投与剤及び鼻腔吸込剤の形態で、当該技術分野で公知の方法により製剤化することができる。前記注射剤の場合には、必ず滅菌しなければならず、バクテリア、真菌のような微生物の汚染から保護されるべきである。注射剤の場合、適切な担体の例としては、これに限定されないが、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレン glycol 及び液体ポリエチレン glycol 等）、これらの混合物及び／又は植物油を含む溶媒又は分散媒質でもある。より好ましくは、適切な担体としては、ハンクス溶液、リングル液、トリエタノールアミンが含有された P B S (phosphate buffered saline ; リン酸緩衝生理食塩水) 又は注射用滅菌水、10% エタノール、40% プロピレン glycol 及び 5% デキストロースのような等張溶液などを使用することができる。前記注射剤を微生物汚染から保護するためには、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、ティーメロサルなどのような多様な抗菌剤及び抗真菌剤をさらに含むことができる。また、前記注射剤は、殆どの場合、糖又は塩化ナトリウムのような等張化剤をさらに含むことができる。

10

20

【0072】

経皮投与剤の場合、軟膏剤、クリーム剤、ローション剤、ゲル剤、外用液剤、パスタ剤、リニメント剤、エアロゾル剤などの形態が含まれる。前記で“経皮投与”とは、本発明の組成物を局所的に皮膚に投与して組成物に含有された有効な量の活性成分が皮膚内に伝達されることを意味する。例えば、本発明の組成物を注射型剤形で製造してこれを 30 ゲージの細い注射針で皮膚を軽く淡刺 (prick ; プリック) 又は皮膚に直接的に塗布する方法で投与することができる。これらの剤形は、製薬化学において一般的に公知である処方の文献 (Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania) に記述されている。

30

【0073】

吸込投与剤の場合、本発明に係る組成物は、適切な推進剤、例えば、ジクロロフルオロメタン、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、二酸化炭素又は他の適切な基体を使用して、加圧パック又は煙霧器からエアロゾルスプレーの形態で伝達することができる。加圧エアロゾルの場合、投薬単位は計量された量を伝達するバルブを提供して決定することができる。例えば、吸込器又は吹込器に使用されるゼラチンカプセル及びカートリッジは、化合物及びラクトース又は澱粉のような適切な粉末基剤の粉末混合物を含有するように製剤化することができる。

40

【0074】

その他の薬学的に許容される担体としては、次の文献に記載されていることを参考にすることができる (Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995)。

【0075】

また、本発明に係る薬学的組成物は、一つ以上の緩衝剤（例えば、食塩水または P B S ）、カーボハイドレート（例えば、グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン）、抗酸化剤、静菌剤、キレート化剤（例えば、EDTA またはグルタチオン）、アジュバント（例えば、アルミニウムヒドロキシサイド）、懸濁剤、濃厚剤及び／又は保存剤をさらに含むことができる。

50

【0076】

また、本発明の薬学的組成物は、哺乳動物に投与された後、活性成分の迅速化、遅速化又は遅延化された放出を提供することができるよう、当業界に公知の方法を使用して、多様に剤形化することができる。本発明の組成物は、また、がん疾患を予防又は治療する効果がある公知の化合物と併用して投与することができる。

【0077】

本発明は、がんの予防又は治療用製剤を製造するための、前記抗がん剤スクリーニング方法で選別された抗がん剤の使用を提供する。

【0078】

本発明は、前記抗がん剤スクリーニング方法で選別された抗がん剤の有効量を、これを必要とする個体に投与することを特徴とするがん治療方法を提供する。 10

【0079】

本発明の前記“有効量”とは、個体に投与したとき、がんの改善、治療、予防、検出、診断、又はがん転移抑制又は減少効果を示す量を意味し、前記“個体”とは、動物、好ましくは哺乳動物、特にヒトを含む動物でもあって、動物に由来する細胞、組織、器官等でもある。前記個体は、前記の効果が必要な患者(patient)である。

【0080】

本発明の前記“治療”とは、がん又はがん関連疾患の症状を改善させることを包括的に指して、これはこれらの疾患を治癒したり、実質的に予防するか、又は状態を改善させることを含むことができ、がん又はがん関連疾患から始まった一つの症状又は殆どの症状を緩和させたり、癒したり、予防することを含むが、これに制限されるものではない。 20

【0081】

本発明の用語“～を含む(comprising)”とは、“含有する”又は“特徴とする”と同じく使用され、組成物又は方法において、記載されていない追加的な成分、要素又は方法段階などを排除しない。用語“～からなる(consisting of)”とは別に記載されていない追加的な要素、段階又は成分などを除外することを意味する。用語“本質的に～からなる(essentially consisting of)”とは、組成物又は方法の範囲において、記載された成分の要素又は段階と共に、この基本的な特性に実質的に影響を与えない成分要素又は段階などを含むことを意味する。

【発明の効果】 30

【0082】

[有利な効果]

従って、本発明は、HSP70が、がん発生の主な原因タンパク質の一つであるAIMP2-DX2と直接結合して安定化させるという発見に基づいて、AIMP2-DX2又はその断片と、HSP70又はその断片とを利用して、AIMP2-DX2と、HSP70との結合水準を減少させる物質を抗がん剤として選別する抗がん剤スクリーニング方法と、前記方法で選別された抗がん剤を有効成分として含むがんの予防又は治療用薬学的組成物を提供する。本発明に係るHSP70の発現を抑制するsiRNA、shRNAなどの製剤、HSP70とAIMP2-DX2との結合を抑制する化合物などは、がんにおけるAIMP2-DX2タンパク質の水準を下げる、がんの発生と進行を抑制する効果が優れている。 40

【図面の簡単な説明】

【0083】

各図面に記載されたDX2はAIMP2-DX2の略称である。

【0084】

【図1A】図1Aは、AIMP2-DX2とAIMP2との相互関係をマススペクトロメトリー(mass spectrometry)技法で分析した模式図及び結果を示した図である。

【図1B】図1Bは、AIMP2-DX2又はAIMP2に、いくつかのHSP70アイソフォームが結合する様相を質量分析(mass analysis)で検出した結果である(赤棒:AIMP2-DX2、青棒:AIMP2)。 50

【図2A】図2Aは、EGFの処理により内在性(endogenous)HSP70のAIMP2-DX2タンパク質との結合が増加することを免疫沈降法(immune-precipitation, IP)及びウェスタンプロットを通じて確認した結果である(WCL:whole cell lysate;全細胞可溶化物)。

【図2B】図2Bは、EGFの処理により内在性(endogenous)AIMP2-DX2のHSP70タンパク質との結合が増加することを免疫沈降法とウェスタンプロットを通じて確認した結果である(WCL:whole cell lysate)。

【図2C】図2Cは、RFP-AIMP2-DX2、GFP-HSP70が一緒に過剰発現された293T細胞をEGFで30分間処理した後、RFP-AIMP2-DX2とGFP-HSP70との結合が増加することを共焦点顕微鏡(confocal microscopy)で確認した結果である。 10

【図2D】図2Dは、AIMP2-DX2とHSP70との結合KD値をSPR(surface plasmon resonance; 表面プラズモン共鳴)装備を利用して評価した結果である。

【図3A】図3Aは、AIMP2-DX2タンパク質の断片及びその略語を示した模式図である。

【図3B】図3Bは、いくつかのHSP70アイソフォーム(HSPA1A、HSPA4、HSPA5、HSPA8、HSPA9、HSPD1)がAIMP2-DX2各断片に結合する程度を測定した結果である。

【図3C】図3Cは、AIMP2-DX2各断片がHSP70と結合する程度をウェスタンプロットを通じて確認した結果である。 20

【図3D】図3Dは、AIMP2-DX2とHSP70とが結合する各タンパク質内の位置を示した模式図である。

【図3E】図3Eは、HSP70タンパク質の断片及びその略語を示した模式図である。

【図3F】図3Fは、HSP70タンパク質のいくつかの断片の中でAIMP2-DX2と結合する断片をウェスタンプロットを通じて確認した結果である(WCL:whole cell lysate)。

【図4】図4は、AIMP2-DX2とHSP70との結合関係で、各タンパク質の内、いずれかの位置で結合が行われるかを示す模式図である。

【図5A】図5Aは、HSP70タンパク質で細胞を処理したとき、又はsi-HSP70で処理してHSP70の発現を阻害したときのそれぞれについて、AIMP2-DX2の発現変化をタンパク質水準及び遺伝子水準で観察した結果である。 30

【図5B】図5Bは、H460細胞を、HSP70阻害剤であるPES(ピフィスリン-u)、VER(VER155008)で処理したとき、又はHSP90阻害剤であるGe1(Geldanamycin; ゲルダナマイシン)、PU(PUH71)で処理したときのAIMP2-DX2の発現変化を、タンパク質及び遺伝子水準で観察した結果である(WB: ウェスタンプロット、RT: RT-PCR)。

【図6A】図6Aは、AIMP2-DX2が過剰発現されている293T細胞をHSP70阻害剤であるPES(ピフィスリン-u)、VER(VER155008)で処理したとき、又はHSP90阻害剤であるGe1(Geldanamycin)、PU(PUH71)で処理したとき、細胞の成長が阻害されるか否かを確認した結果である。 40

【図6B】図6Bは、si-HSP70によってHSP70の発現が阻害された細胞から細胞の成長を観察した結果である。

【図6C】図6Cは、si-RNAの技法を通じてHSP70の発現を減少させた後、AIMP2-DX2による細胞成長の結果物であるDNA合成をEdUアッセイを通じて観察した結果である。

【図7A】図7Aは、AIMP2-DX2を減少させる化合物を探索するためのAIMP2-DX2モニタリングアッセイの模式図を示したものである。

【図7B】図7Bは、AIMP2-DX2モニタリングアッセイを通じて選別されたAIMP2-DX2とHSP70の結合阻害剤であるBC-DXI-495化合物の構造式を示した図である。 50

【図8A】図8Aは、BC-DXI-495化合物の処理によってAIMP2-DX2とHSP70との結合が阻害されるか否かをウェスタンプロットを通じて確認した結果である。

【図8B】図8Bは、AIMP2-DX2又はAIMP2が過剰発現された細胞に、BC-DXI-495化合物を、各濃度別に処理した後、AIMP2-DX2又はAIMP2の発現の変化をルシフェラーゼアッセイを通じて確認した結果である。

【図8C】図8Cは、図8Bの結果を数値化して各タンパク質の発現を50%阻害する濃度(ICI50)を計算した結果である。

【図8D】図8Dは、BC-DXI-495化合物をH460細胞に濃度別(2.5、5、10μM)に12時間処理した後、AIMP2-DX2、AIMP2、Actin(アクチン)タンパク質発現と、AIMP2-DX2、AIMP2、Actin mRNA発現を、ウェスタンプロットとRT-PCRで観察した結果である。 10

【図8E】図8Eは、BC-DXI-495化合物でH460細胞を濃度別(2.5、5、10μM)に12時間処理した後、AIMP2-DX2、AIMP2、Actinタンパク質発現と、AIMP2-DX2、AIMP2、Actin mRNA発現を、ウェスタンプロットとRT-PCRで観察した結果である。

【図9A】図9Aは、肺がん細胞のA549細胞株と正常肺細胞のWI-26をBC-DX1-495化合物で濃度依存的に処理した後、細胞の生存率を評価した結果である。

【図9B】図9Bは、ドキシサイクリン(Sigma)によってAIMP2-DX2の発現を誘導できる肺がん細胞であるA549を、ドキシサイクリン(0.5mg/ml)で処理して、AIMP2-DX2による細胞の成長を誘導し、7日目に、BC-DXI-495(40μM)で処理して、96時間、細胞成長抑制及び死滅を確認した結果である。 20

【図9C】図9Cは、AIMP2-DX2発現量が多様な2つの肺の正常細胞(WI-26, WI-38)と7つの肺がん細胞(NCI-H2087, HCC-1399, HC-C-95, HCC-366, HCC-1588, NCI-H460)を、BC-DXI-495化合物で濃度別に処理した後、MTTアッセイを行い、GIC50を計算した結果である。

【図10A】図10Aは、AIMP2-DX2発現が高いH460細胞をマウスに移植(xenograft)した後、BC-DXI-495化合物又はTaxolを投与した後、腫瘍の大きさの変化を観察した結果である(腫瘍の肉眼観察写真)。 30

【図10B】図10Bは、AIMP2-DX2発現が高いH460細胞をマウスに移植(xenograft)した後、BC-DXI-495化合物又はTaxolを投与した後、腫瘍の大きさの変化を観察した結果である(腫瘍の体積変化)。

【図10C】図10Cは、AIMP2-DX2発現が高いH460細胞をマウスに移植(xenograft)した後、BC-DXI-495化合物又はTaxolを投与した後、腫瘍の大きさの変化を観察した結果である(腫瘍の重量変化)。

【図10D】図10Dは、AIMP2-DX2発現が高いH460細胞をマウスに移植(xenograft)した後、BC-DXI-495化合物又はTaxolを投与した後、腫瘍の大きさの変化を観察した結果である(動物の体重変化)。

【発明を実施するための形態】

40

【0085】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0086】

但し、下記の実施例は、本発明を例示するのみのものであって、本発明の内容が下記の実施例に限定されるものではない。

【0087】

<実施例1>

AIMP2-DX2及びHSP70の結合関係分析

Strep-AIMP2-DX2 strep-AIMP2をそれぞれ発現させた293T細胞のlysateを、strep-tag column(GE Healthc 50

area)を利用して免疫沈降(immunoprecipitation, IP)した後、カラムによって沈降されたタンパク質をSDS-PAGEで分離した。分離されたタンパク質は、trypsin(Hyclone)を利用して、ゲル内消化(in-gel digestion)方法でペプチドの水準に分解し、このペプチドをLC-マススペクトロメトリー(Thermo)装備を通じて分析した(図1A)。

【0088】

293T細胞は、ATCCから供給を受けて使用し、Strep-AIMP2-DX2 strep-AMPA2はDX2、AMPA2配列をそれぞれpEXPR-I B A 5ベクターにクローニングして入れた後、293T細胞にTurbofect(Thermo)と称される遺伝子導入試薬(transfection reagent)を利用して過剰発現した。

10

【0089】

細胞の溶解(lysis)は、適量の溶解バッファー(50mM Tris(pH7.4)、100mM NaCl、10% Glycerol、1mM EDTA、0.5% Triton X-100、PBS)を入れて30分間、4°Cでインキュベーションすることによって行い、溶解させた細胞可溶化物(cell lysate)を13200 rpmで15分間、遠心分離した後、細胞可溶化物から分離された上澄み液のみを採った後、上澄み液をstrep-tagカラム(thermo)に通過させた。上澄み液を通過させた後、提供される溶出バッファーを利用して、カラムに結合されているタンパク質を溶出して集めた後、集められたタンパク質をSDS-PAGEで分離した。

【0090】

20

図1Aに示した通り、AMPA2-DX2とAMPA2の相互作用をマススペクトロメトリー技法で分析した結果、AMPA2-DX2の結合タンパク質107個、AMPA2の結合タンパク質148個を確認できた。その中で45個の結合タンパク質が重なることを確認した。

【0091】

一方、図1Bに示した通り、AMPA2と比較してAMPA2-DX2にHSP70タンパク質が優勢で結合することが確認できた。

【0092】

より具体的には、図1Bの赤色のグラフは、AMPA2-DX2、青色のグラフは、AMPA2の結合タンパク質を示すグラフである。mass analysis(質量分析)で多く検出するほどグラフの横軸の左側に表示されるようなり、検出された頻度が縦軸に表示される。図1Bの赤色のグラフでAMPA2-DX2結合タンパク質で示されたHSPA8、HSPD1、HSPA5、HSPA9、HSPH1、HSPA2、HSPA1L、HSPA4、HSPA1Aは全てHSP70のアイソフォームである。一方、青色のグラフのAMPA2の場合には、HSP70のアイソフォーム(HSPA4)が一つだけ検出されることを確認した。のみならず、AMPA2の場合には、DX2では観察されなかったHSP90のアイソフォームであるHSP90B1が検出されることを確認した。以上の結果の通り、HSP70がAMPA2-DX2に優勢して結合する結論を得ることができた。

30

【0093】

40

<実施例2>

AMPA2-DX2とHSP70の結合関係の確認

H460細胞に内皮成長因子(endothelial growth factor, EGF(Peprotech))を30分間処理した後、IPバッファー(50mM Tris(pH7.4)、100mM NaCl、10% Glycerol、1mM EDTA、0.5% Triton X-100、PBS)で30分間、4°Cで細胞を溶解させた。細胞の可溶化物をHSP70抗体(Abcam)を利用してIPした。IP後、SDS-PAGEとウェスタンプロットを通じて、DX2、AMPA2、HSP70タンパク質を確認した。Actin(Sigma)は、添加対照/loading control)を意味し、WCLは、全細胞可溶化物(whole cell lysate)を意味する。

50

【0094】

図2Aに示した通り、EGF処理により内在性(endogenous)HSP70のAIMP2-DX2タンパク質との結合が増加することを確認し、この時、AIMP2はHSP70と結合していないことが分かった。

【0095】

Strep-AIMP2-DX2が過剰発現された293T細胞をEGFで30分間処理した。前記実験方法と同様に細胞を溶解させた後、Strep-tagカラム(GE Healthcare)を利用してIPを行った。IP後、SDS-PAGE、ウェスタンプロットを行い、Strep-AIMP2-DX2、HSP70、HSP90の量を確認する。先のタンパク質は、StrepMAB-Classic-HRP(IBA)、HSP70特異的抗体(Santa Cruz)、HSP90特異的抗体(Santa Cruz)を利用して確認した。
10

【0096】

図2Bに示した通り、EGF処理により外来性(exogenous)AIMP2-DX2のHSP70タンパク質との結合が増加することを確認し、この時、HSP90は、AIMP2-DX2との結合が極めて弱く、EGFにより結合が増加しないことが分かった。

【0097】

RFP-AIMP2-DX2、GFP-HSP70が共に過剰発現された293T細胞にEGFを30分間処理した。EGF処理後、冷たいPBSを利用して3回洗浄した後、冷たいメタノールを使用して、細胞を10分間固定した。固定後、冷たいPBSで再び3回洗浄し、DAPI(Invitrogen)溶液を利用して核を染色した。染色が終わった後、共焦点顕微鏡を利用して各蛍光を観察した。
20

【0098】

図2Cに示した通り、EGF処理によりRFP-AIMP2-DX2とGFP-HSP70の結合が増加することを共焦点顕微鏡で確認できた。

【0099】

HSP70タンパク質とAIMP2-DX2タンパク質との間の結合をSPR装置(surface plasmon resonance(GE))を通じて分析した。HSP70タンパク質を固定させた後、AIMP2-DX2タンパク質を濃度別に流して各タンパク質の結合、分離値を得た後、KD値を計算した。
30

【0100】

図2Dに示した通り、精製されたAIMP2-DX2、HSP70タンパク質が、KD値 4.79×10^{-10} 水準に直接結合することを、SPRアッセイを通じて観察した。

【0101】

<実施例3>

AIMP2-DX2とHSP70の結合構造分析

GST-tagが融合したAIMP2-DX2タンパク質のいくつかの断片(DM1乃至DM5)と、293T細胞可溶化物とを混合した。混合した後、glutathione-sepharose(GE Healthcare)を利用して、各AIMP2-DX2タンパク質をプルダウン(pull down)した。AIMP2-DX2タンパク質と一緒にプルダウンされたいいくつかのHSP70タンパク質の量は、マススペクトロメトリー技法を利用して確認した。実験に使用したAIMP2-DX2タンパク質断片のアミノ酸位置を図3Aに示した。
40

【0102】

図3Bに示した通り、AIMP2-DX2タンパク質の断片のうち、配列番号2のアミノ酸配列を有するDM1(配列番号1のアミノ酸配列のうち1-87番目のアミノ酸に対応する断片)にいくつかのHSP70ファミリーが優勢して結合することをマススペクトロメトリー技法を通じて確認することができた。

【0103】

次に、AIMP2-DX2とHSP70との結合構造をより具体的に確認するための実

験を行った。

【0104】

G S T - E V、G S T - A I M P 2 - D X 2 full、G S T - A I M P 2 - D X 2 断片 (D M 1 - D M 5) を G F P - H S P 7 0 が過剰発現された 2 9 3 T 細胞可溶化物と混合した。混合した後、G S T タンパク質を glutathione - sepharose を利用してプルダウンし、プルダウンされたタンパク質を、S D S - P A G E、ウェスタンプロットを通じて分析した。G F P タンパク質は、G F P 特異的抗体を利用して確認し、G S T タンパク質はクーマシー染色 (coomassie staining) を通じて確認した。

【0105】

図 3 C 及び図 3 D に示した通り、A I M P 2 - D X 2 タンパク質断片のうち、1 - 8 7 アミノ酸を含む配列番号 2 のアミノ酸配列を有する D M 1 断片が、H S P 7 0 に結合することが分かった。
10

【0106】

一方、H S P 7 0 タンパク質内で A I M P 2 - D X 2 に結合する部分を確認するための実験を行った。

【0107】

S t r e p - A I M P 2 - D X 2 と共に、G F P - H S P 7 0 full、G F P - H S P 7 0 断片 (A D、S B、L i d) を 2 9 3 T 細胞に過剰発現させた後、2 9 3 T 細胞の可溶化物を s t r e p - t a g カラムを利用して I P た。S t r e p - A I M P 2 - D X 2 と I P されたタンパク質は、S D S - P A G E を通じて分離され、各 G F P タンパク質の結合は、G F P 特異的抗体を利用してウェスタンプロットを通じて確認した。H S P 7 0 タンパク質内で実験に使用されたそれぞれの断片 (A D、S B、L i d) のアミノ酸位置を図 3 E に示した。
20

【0108】

図 3 F 及び図 4 に示した通り、H S P 7 0 タンパク質断片のうち、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する S B (substrate binding domain) 部分を含む断片だけが A I M P 2 - D X 2 と結合することが分かった。

【0109】

< 実施例 4 >

H S P 7 0 による A I M P 2 - D X 2 の安定化增加

30

H 4 6 0 細胞に G F P - E V、G F P - H S P 7 0 を遺伝子導入 (transfection) を通じて過剰発現させた。また、H S P 7 0 に特異的な s i - R N A (s i - H S P 7 0, Santa Cruz) を利用して、H S P 7 0 の発現を減少させ、この時、対照群として s i - c o n t r o l (Invitrogen) を使用した。H S P 7 0 の発現を増加、減少させた H 4 6 0 細胞のタンパク質発現量は、ウェスタンプロット、m R N A 発現量は、R T - P C R を用いて確認した。H S P 7 0 特異的プライマー配列には F : G C G
T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G A G A A T G C C C C
C A G C T A C G T G G C C T T C, R : G C G T A A T A C G A C
T C A C T A T A G G G A G A T A A A G C T T G G C G T C G C
G C A G A G C を利用した。
40

【0110】

図 5 A に示した通り、H S P 7 0 過剰発現によって A I M P 2 - D X 2 タンパク質が増加し、s i - R N A 技法を通じた H S P 7 0 の減少により A I M P 2 - D X 2 タンパク質が減少することを確認した。この時、A I M P 2 - D X 2 の転写には影響がないことにより、H S P 7 0 による A I M P 2 - D X 2 の調節は、転写後に調節、つまりタンパク質水準での調節であることが分かった。

【0111】

一方、H 4 6 0 細胞に H S P 7 0 阻害剤であるピフィスリン - μ (T o c r i s)、V E R 1 5 5 0 0 8 (Sigma) と H S P 9 0 阻害剤であるゲルダナマイシン (T o c r i s)、P U H 7 1 (T o c r i s) を処理した後、ウェスタンプロット、R T - P C R
50

技法を通じてタンパク質、mRNA発現量を確認した。AIMP2-DX2タンパク質の発現量は、AIMP2-DX2特異的抗体(Cell signaling)を利用して確認した。

【0112】

図5Bに示した通り、HSP70阻害剤であるPES(ピフィスリン-μ)、VER(VER155008)処理によってAIMP2-DX2タンパク質の発現が減少することが分かった。HSP90阻害剤Gel1(Geldanamycin)、PU(PUH71)処理によつては、AIMP2-DX2タンパク質の発現に影響がないことを確認し、HSP70、HSP90阻害剤によってAIMP2の発現は影響がないことが分かった。のみならず、各抑制剤処理によりAIMP2-DX2の転写には影響がないことにより、HSP70抑制剤処理によるAIMP2-DX2の調節は、転写後の調節、つまりタンパク質水準での調節であることが分かった。
10

【0113】

以上の結果を通じて、HSP70は、AIMP2-DX2タンパク質を特異的に安定化するものと判断された。

【0114】

<実施例5>

DX2を経由したHSP70の細胞分裂調節

Strep-AIMP2-DX2を過剰発現した293T細胞と過剰発現していない293T細胞を、HSP70阻害剤であるピフィスリン-μ(PES)、VER155008(VER)及びHSP90阻害剤であるゲルダナマイシン(Gel1)、PUH71(Pu)で12時間処理した後、MTT(Amresco)アッセイを行った。各実験は3回独立的に行い、HSP70に特異的なsi-RNA(si-HSP70)を利用してHSP70の発現を減少させた293T細胞にStrep-AIMP2-DX2を過剰発現した後、MTTアッセイを行った。各実験は3回独立的に行った。
20

【0115】

これに対する結果を図6A及び6Bに示した。

【0116】

図6Aに示した通り、HSP70抑制剤PES、VER、HSP90抑制剤Gel1、Puを処理した後、AIMP2-DX2によって増加する細胞の成長を観察した結果、HSP70抑制剤を処理した場合、AIMP2-DX2による細胞成長の増加が観察されなかつた。また、図6Bに示した通り、si-RNA技法を通じてHPS70の発現を減少させた結果、AIMP2-DX2による細胞成長が観察されなかつた。これらの結果を通じてHSP70がDX2を通じて細胞の成長を調節していることが分かつた。
30

【0117】

一方、si-RNAの技法を通じてHSP70の発現を減少させた後、AIMP2-DX2による細胞成長の結果物のDNA合成をEdUアッセイを通じて観察した結果、HSP70の発現が減少したとき、AIMP2-DX2について、発現を通じて増加されるDNA合成が観察されないことが分かる(図6C)。

【0118】

<実施例6>

AIMP2-DX2とHSP70の結合阻害剤の探索

図7Aに示した通り、AIMP2-DX2モニタリングアッセイを作成した後、本発明に係る化合物ライブラリに存在するいくつかの化合物で処理して、AIMP2-DX2を減少させる化合物を一次に選別した。一次に選別された化合物の中で、AIMP2は減少させず、MTTアッセイを通じて細胞生存率を測定して正常細胞に影響を与える化合物を最終的に選別した。
40

【0119】

選別された化合物をBC-DXI-495と命名し、その構造を図7Bに示した。

【0120】

< 実施例 7 >

B C - D X I - 4 9 5 の A I M P 2 - D X 2 と H S P 7 0 の結合阻害能及び D X 2 発現阻害能

前記実施例 6 を通じて選別された B C - D X I - 4 9 5 が A I M P 2 - D X 2 と H S P 7 0 との結合を阻害できるか否かを評価した。S t r e p - D X 2 が過剰発現された 2 9 3 T 細胞を、B C - D X I - 4 9 5 化合物で、濃度別 (2 . 5、5、10 μM) に 12 時間処理した後、細胞を 1% t r i t o n X - 1 0 0 (B D S c i e n c e) が含まれた P B S で溶解した。可溶化物を 1 3 2 0 0 r p m の速度で遠心分離した後、分離された浮遊物と沈殿物からウェスタンプロットを通じて A I M P 2 - D X 2、A I M P 2 のタンパク質発現量を確認した。A I M P 2 - D X 2 の発現は、S t r e p M A B - C l a s s i c - H R P (I B A) を利用して確認した。
10

【 0 1 2 1 】

これに対する結果を図 8 A に示した。

【 0 1 2 2 】

図 8 A に示した通り、B C - D X I - 4 9 5 化合物で濃度依存的に処理する場合、A I M P 2 - D X 2 と H S P 7 0 との結合が濃度依存的に減少することを確認した。

【 0 1 2 3 】

B C - D X I - 4 9 5 化合物による A I M P 2 - D X 2、A I M P 2 の減少を確認するために、A 5 4 9 細胞に n a n o l u c i f e r a s e - A I M P 2 - D X 2、n a n o l u c i f e r a s e - A I M P 2 をそれぞれ過剰発現した後、B C - D X I - 4 9 5 化合物を濃度依存的 (2 . 5、5、10、20、40 μM) に 4 時間処理した。処理後、細胞内にある A I M P 2 - D X 2、A I M P 2 タンパク質の量をルシフェラーゼアッセイ (c a t #) を通じて確認した。各濃度でのルシフェラーゼ阻害程度を測定して、A I M P 2 - D X 2、A I M P 2 を 50 % 減少させる化合物の濃度を計算し、これを I C 5 0 で示した。また、B C - D X I - 4 9 5 化合物で H 4 6 0 細胞を濃度別 (2 . 5、5、10 μM) に 12 時間処理した後、A I M P 2 - D X 2、A I M P 2、A c t i n タンパク質発現と、A I M P 2 - D X 2、A I M P 2、A c t i n m R N A 発現をウェスタンプロットと R T - P C R で観察した。
20

【 0 1 2 4 】

その結果、図 8 B 及び 8 C に示した通り、B C - D X I - 4 9 5 化合物は A I M P 2 発現に影響を与えず (I C 5 0 > 1 0 0 μM)、A I M P 2 - D X 2 発現のみを特異的に減少させることができ確認され (I C 5 0 : 4 . 2 μM)、B C - D X I - 4 9 5 化合物で濃度依存的に処理する場合、A I M P 2 に影響を与える A I M P 2 - D X 2 タンパク質のみを特異的に減少させることができ確認された (図 8 D)。また、B C - D X I - 4 9 5 化合物で濃度依存的に処理する場合、s o l u b l e A I M P 2 - D X 2 タンパク質 (浮遊層分画) が減少して、i n s o l u b l e A I M P 2 - D X 2 タンパク質 (沈殿物分画) が増加することが分かった (図 8 E)。
30

【 0 1 2 5 】

< 実施例 8 >

B C - D X I - 4 9 5 の抗がん効能評価

< 8 - 1 > B C - D X I - 4 9 5 の細胞毒性

B C - D X I - 4 9 5 化合物により肺がん、正常肺細胞の細胞活性がどのように変化するかを確認するために、A 5 4 9 (肺がん細胞)、W I - 2 6 (正常肺細胞) を、B C - D X I - 4 9 5 化合物で濃度依存的 (2 . 5、5、10、20、40 μM) に処理した。処理後、M T T アッセイを行い、各細胞の活性を測定した。細胞の活性を 50 % 減少させる化合物濃度を計算し、これを G I 5 0 で示した。

【 0 1 2 6 】

図 9 A に示した通り、肺がん細胞である A 5 4 9 と正常肺細胞である W I - 2 6 を、B C - D X I - 4 9 5 化合物で濃度依存的に処理した結果、正常細胞には影響せず、肺がん細胞にのみ細胞死滅を誘導することが分かった。
50

【0127】

また、ドキシサイクリン (Sigma) によってAMP2-DX2の発現を誘導することができる肺がん細胞のA549を、ドキシサイクリン (0.5mg/ml) で処理して、AMP2-DX2による細胞の成長を誘導した。48時間毎にドキシサイクリンで処理し、7日目にBC-DXI-495 (40μM) を処理して、96時間、細胞成長抑制及び死滅を確認した。

【0128】

図9Bに示した通り、AMP2-DX2タンパク質の発現を誘導する場合 (ピンクグラフ)、そうでない場合に比べて、BC-DXI-495化合物による細胞毒性がより大きく誘導されることが分かった。

10

【0129】

また、AMP2-DX2発現量が多様な二つの肺正常細胞 (WI-26、WI-38) と、7つの肺がん細胞 (NCI-H2087、HCC-1359、HCC-95、HCC-366、HCC-1438、HCC-1588、NCI-H460) を、BC-DXI-495化合物で濃度別に処理した後、MTTアッセイを行い、GI50を計算した。各細胞のAMP2-DX2発現量は、ウェスタンプロットを通じて確認した。

【0130】

図9Cに示した通り、内在性AMP2-DX2タンパク質発現程度に応じ肺がん細胞を3群 (Low (低)、Median (中)、High (高)) に分けた後、BC-DXI-495で処理して、細胞毒性程度 (GI50) を測定した結果、AMP2-DX2発現が高い細胞において化合物による細胞死滅効果が優れていることが分かった。

20

【0131】

<8-2> BC-DXI-495のin vivo抗がん効果の評価

H460細胞 5×10^6 個を8週齢Balb/cヌードマウスなどの表皮に注射して腫瘍を形成させた後、BC-DXI-495化合物を50mg/kgの濃度で週5回注射して計10回注射し、陽性対照物質であるTaxolは15mg/kgの濃度で週2回合計5回注射した。実験終了後、腫瘍を分離して重量を測定した。実験動物の体重及び腫瘍の大きさは週2回測定した。

【0132】

AMP2-DX2発現が高いH460細胞をマウスに移植 (xenograft) した後、BC-DXI-495化合物を50mg/kgで投与した結果、対照群であるTaxol (15mpk) と類似する程度にがん細胞の成長を抑制することが分かった。一方、このような腫瘍抑制効果は、腫瘍の重量からも同じく確認された (図10A、10B及び10C)。実験の進行過程の間にマウスの体重には影響がなかった (図10D)。

30

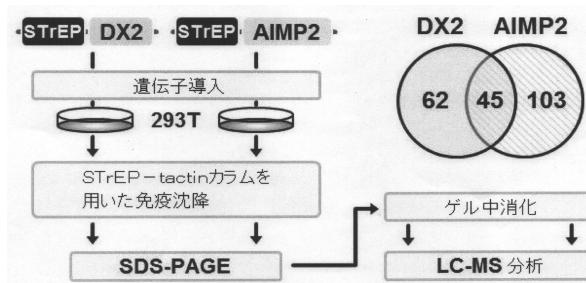
【産業上の利用可能性】

【0133】

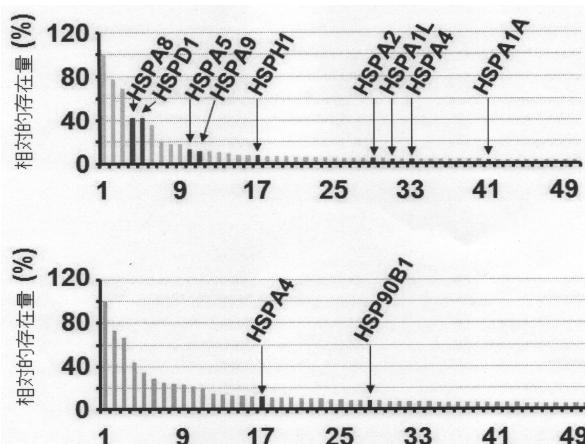
本発明は、HSP70ががんの発生の主な原因タンパク質の一つであるAMP2-DX2と直接結合して安定化させるとの発見に基づいて、AMP2-DX2又はその断片と、HSP70又はその断片とを利用して、AMP2-DX2とHSP70との結合水準を減少させる物質を抗がん剤として選別する抗がん剤スクリーニング方法と、前記の方法で選別された抗がん剤を有効成分として含むがんの予防又は治療用薬学的組成物を提供する。本発明に係るHSP70の発現を抑制するsiRNA、shRNAなどの製剤、さらに、HSP70とAMP2-DX2との結合を抑制する化合物などは、がんにおいてAMP2-DX2タンパク質の水準を下げる、がんの発生と進行を抑制する効果が優れて産業上の利用可能性が極めて優れている。

40

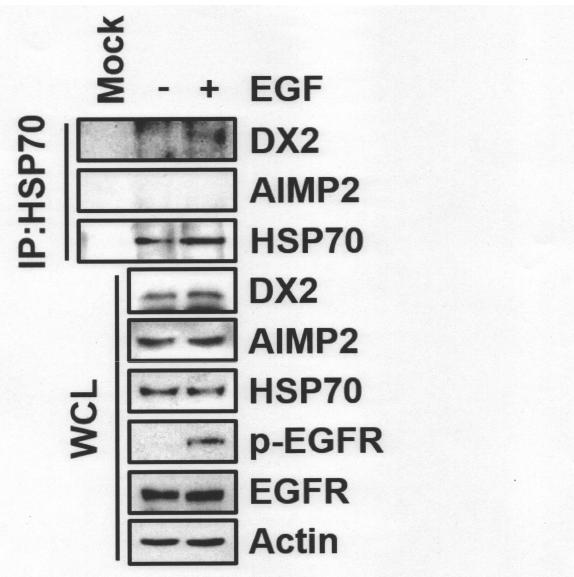
【図 1 A】



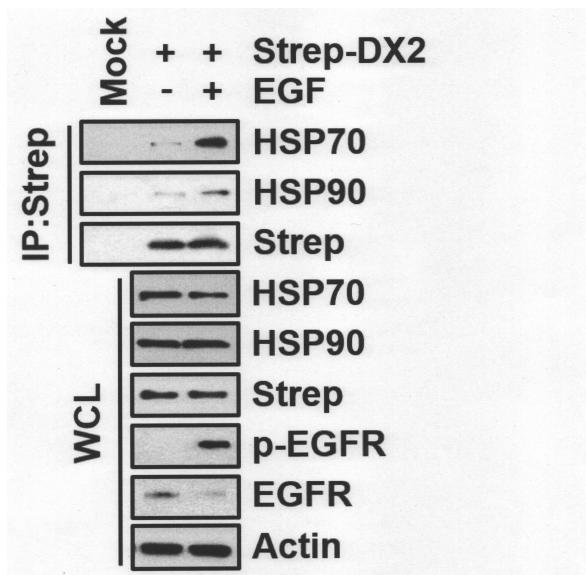
【図 1 B】



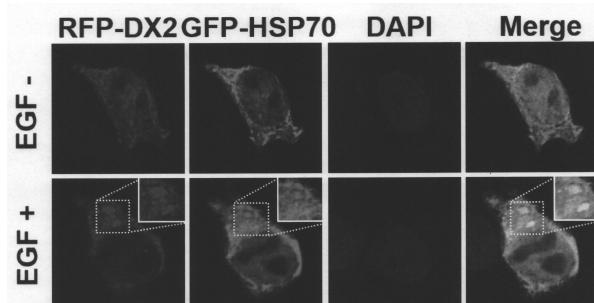
【図 2 A】



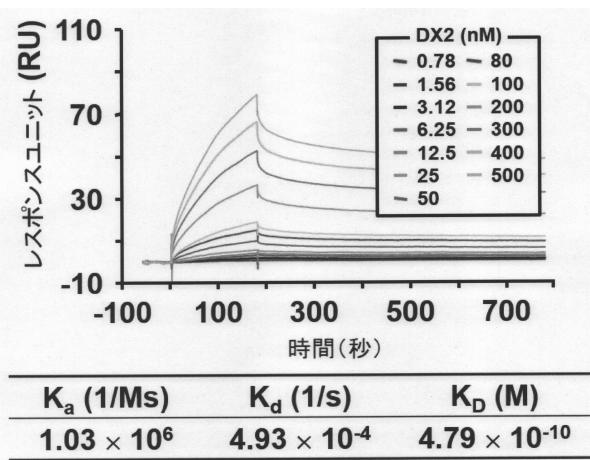
【図 2 B】



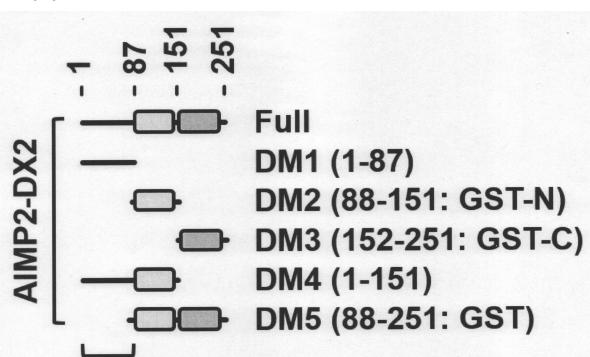
【図 2 C】



【図 2 D】



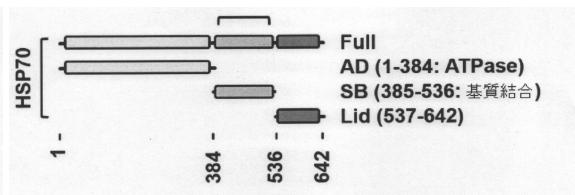
【図 3 A】



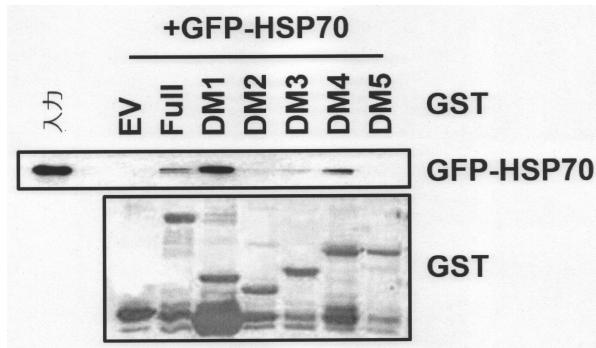
【図3B】

遺伝子	DM1	DM2	DM3	DM4	DM5
HSP70	1.07				
	0.26	0.85	2.29	0.58	
	1.68				
	1.07				
	1.43				
	1.00	1.68	0.77	0.93	

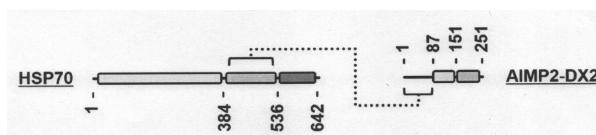
【図3E】



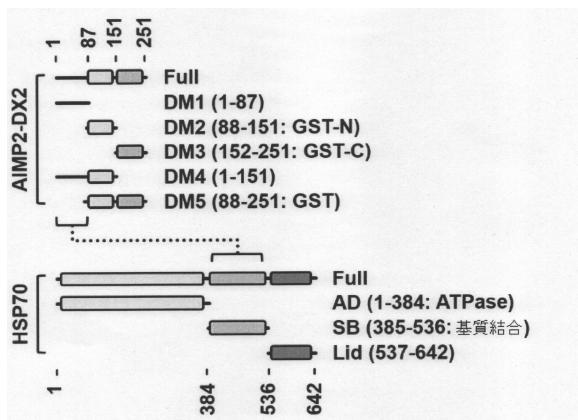
【図3C】



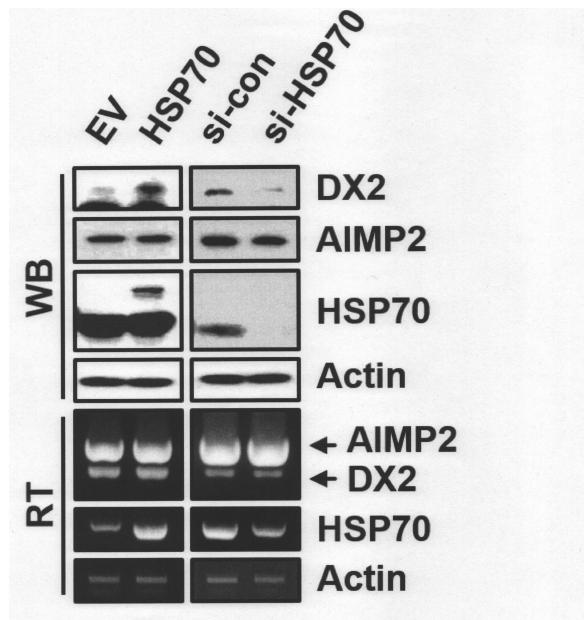
【図3D】



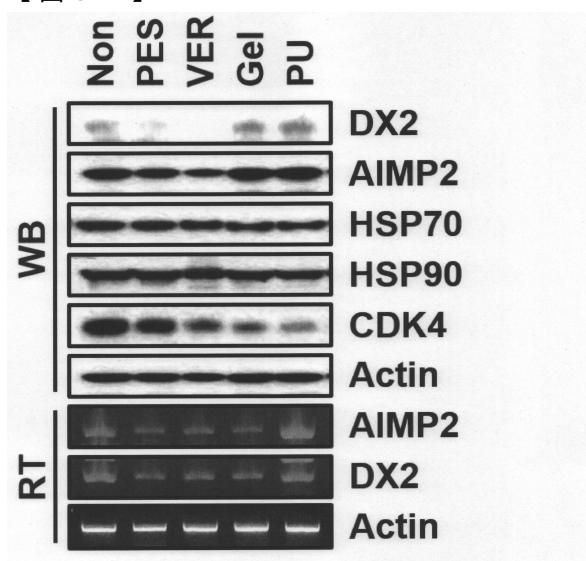
【図4】



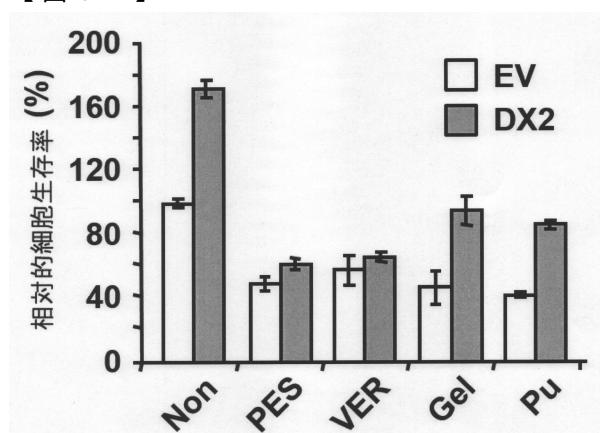
【図5A】



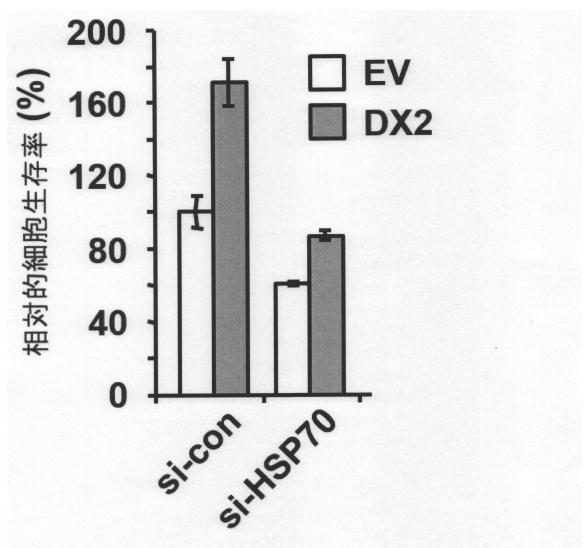
【図 5 B】



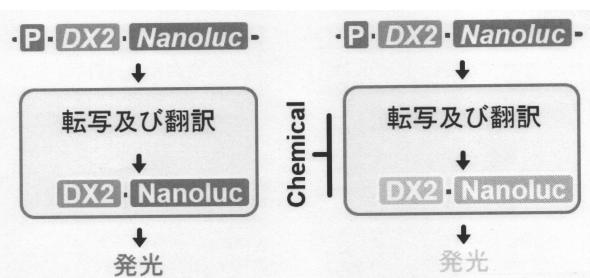
【図 6 A】



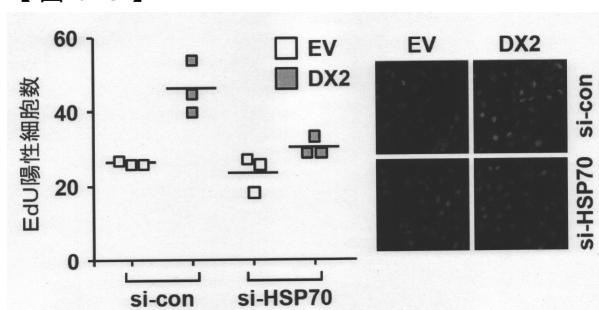
【図 6 B】



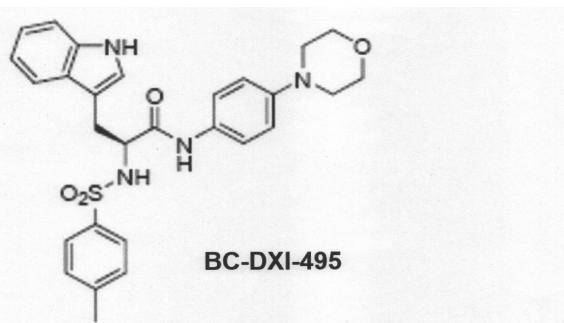
【図 7 A】



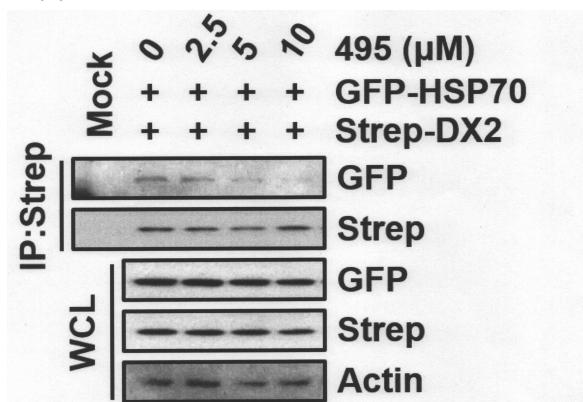
【図 6 C】



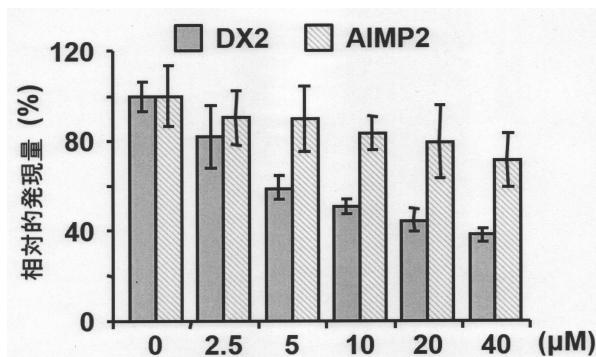
【図 7 B】



【図 8 A】



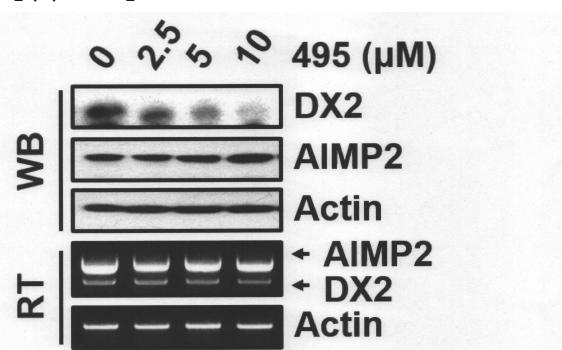
【図 8 B】



【図 8 C】

IC_{50}	DX2	4.2
	AIMP2	>100
GI_{50}	A549	14.25
	WI-26	>100

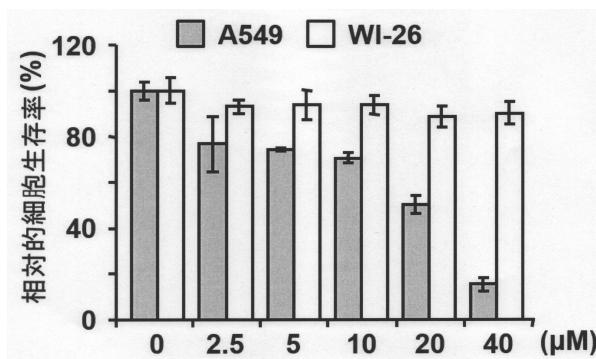
【図 8 D】



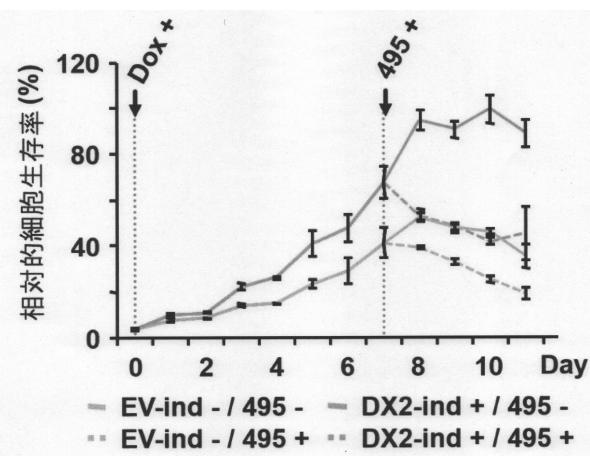
【図 8 E】



【図 9 A】



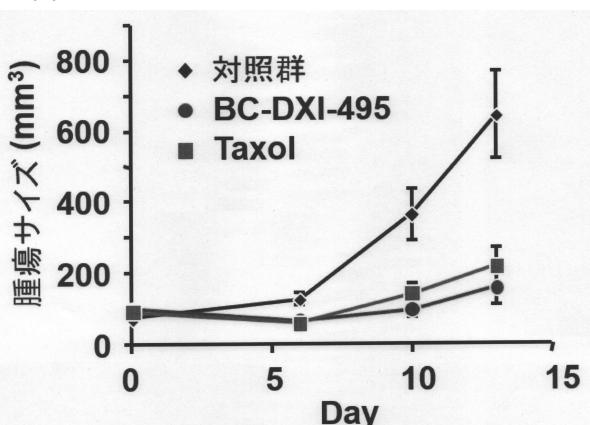
【図 9 B】



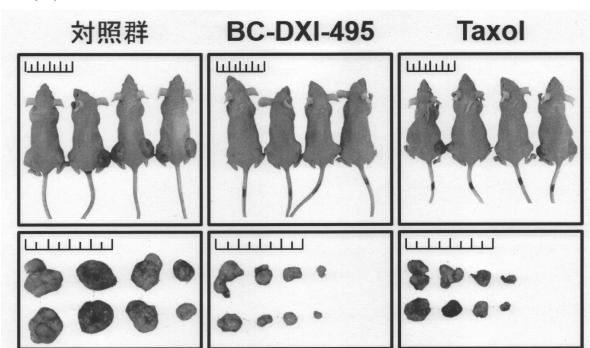
【図 9 C】

発現量	Cell line	GI ₅₀	
低	WI-26	100	最大
	WI-38	100	
	NCI-H2087	100	
中	HCC-1359	100	
	HCC-95	71.66	
	HCC-366	61.12	
高	HCC-1438	38.59	
	HCC-1588	27.38	
	NCI-H460	20.49	最少

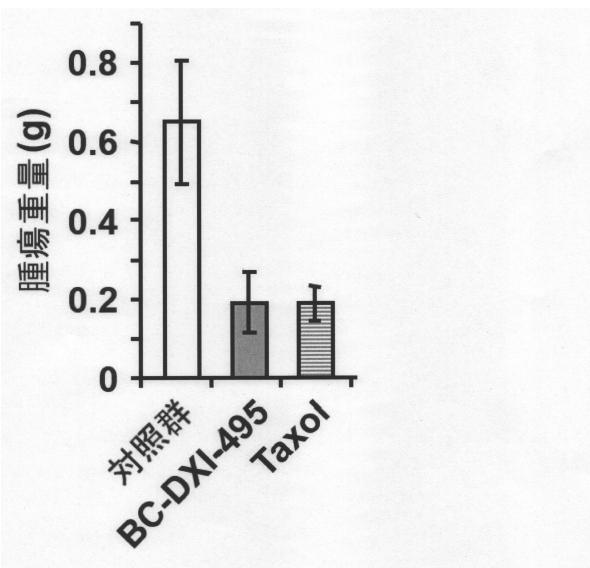
【図 10 B】



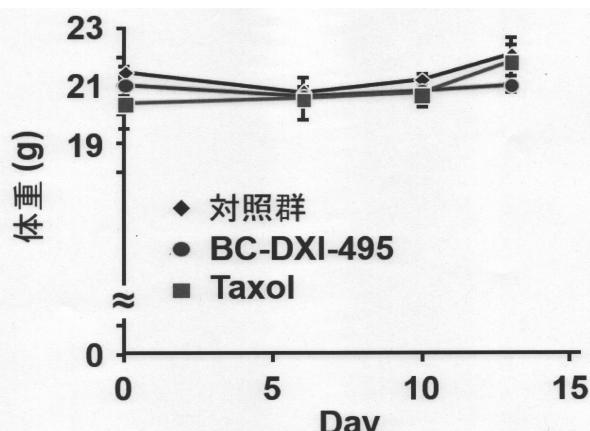
【図 10 A】



【図 10 C】



【図 10 D】



【配列表】

0006914269000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 G 0 1 N 33/68 (2006.01)

A 6 1 P 35/00
 G 0 1 N 33/68

(72)発明者 キム、スンファン

大韓民国 0 6 2 6 9 ソウル、カンナム - グ、3 6 5 - ギル ナムブスナン - 口、4 2、# 4 -
 1 0 0 5 (ドゴク - ドン、ドゴク ハンシン アパート)

(72)発明者 キム、テ ギュ

大韓民国 0 6 2 7 9 ソウル、カンナム - グ、5 7 - ギル サムソン - 口、4 5、# 1 0 8 - 2
 4 0 6 (テチ - ドン、サムスン アパート)

(72)発明者 リム、セミ

大韓民国 0 8 0 9 6 ソウル、ヤンジョン - グ、モクトンドン - 口、1 0 0、# 1 3 1 3 - 1 0
 1 (シンジョン - ドン、モクドン シンシガジ アパート 13 ダンジ)

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特表2 0 0 8 - 5 2 1 3 9 8 (JP, A)

韓国登録特許第1 0 - 1 5 7 7 3 1 5 (KR, B1)

米国特許出願公開第2 0 1 5 / 0 2 5 8 0 6 0 (US, A1)

国際公開第2 0 0 9 / 0 2 3 8 4 6 (WO, A2)

特表2 0 1 4 - 5 3 1 4 0 2 (JP, A)

韓国公開特許第1 0 - 2 0 0 7 - 0 1 1 3 9 2 6 (KR, A)

韓国公開特許第1 0 - 2 0 0 9 - 0 0 4 8 3 8 2 (KR, A)

国際公開第2 0 1 3 / 0 0 6 0 7 6 (WO, A1)

Semi Lim , Targeting the interaction of AIMP2-DX2 with HSP70 suppresses cancer development , NATURE CHEMICAL BIOLOGY , 2 0 2 0 年 1 月 , Vol.16 , Page.31-41

Jin Woo Choi , Splicing variant of AIMP2 as an effective target against chemoresistant ovarian cancer , Journal of Molecular Cell Biology , 2 0 1 2 年 , Vol.4 , Page.164-173

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 5 0

A 6 1 K 3 1 / 5 3 7 7

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 P 4 3 / 0 0

C 1 2 Q 1 / 0 2

G 0 1 N 3 3 / 1 5

G 0 1 N 3 3 / 6 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)