(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2004-329151
(P2004-329151A)
(43)公開日　平成16年11月25日(2004.11.25)

(51)Int.Cl.[7]		F I			テーマコード（参考）
C12N	15/09	C12N	15/00	A	2G045
A61K	45/00	A61K	45/00		4B024
A61P	35/00	A61P	35/00		4B063
C12Q	1/68	C12Q	1/68	A	4C084
G01N	33/15	G01N	33/15	Z	

審査請求 未請求　請求項の数 6　ＯＬ　（全 7 頁）　最終頁に続く

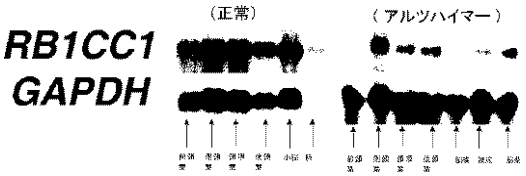
(21)出願番号　特願2003-132095(P2003-132095)
(22)出願日　平成15年5月9日(2003.5.9)

(71)出願人　502198836
茶野　徳宏
滋賀県草津市野村５丁目９－３４－８０９
(71)出願人　502198847
岡部　英俊
京都府京都市伏見区桃山南大島町１０１－５
(74)代理人　100088904
弁理士　庄司　隆
(74)代理人　100124453
弁理士　資延　由利子
(72)発明者　茶野　徳宏
〒５２５－００２７　草津市野村５丁目９－３４－８０９

最終頁に続く

(54)【発明の名称】細胞・組織の機能評価方法

(57)【要約】　（修正有）
【課題】癌抑制遺伝子ＲＢ１ＣＣ１又その遺伝子産物の生体内、とりわけ細胞又は組織内での発現、分解、又はその増減を指標として、生体機能を評価する方法を提供することである。
【解決手段】ＲＢ１ＣＣ１は正常な細胞においても発現されていること、さらに、神経変性疾患では変性してくる神経細胞で、他のmRNAが発現されており、細胞形態も維持されている病早期でも既にＲＢ１ＣＣ１の発現が低下してくること、さらには各種の培養細胞のなかで、化学療法剤等で致死過程に至らせるとき、早期よりＲＢ１ＣＣ１が減少してくることから、ＲＢ１ＣＣ１の発現、分解、又は増減を指標として生体機能を評価できる。
【選択図】図２



【特許請求の範囲】
【請求項１】
癌抑制遺伝子ＲＢ１ＣＣ１及び／又はその遺伝子産物の発現、分解、又は増減を指標とする生体機能評価方法。
【請求項２】
ＲＢ１ＣＣ１遺伝子又はその遺伝子産物の発現又は分解を制御する手段を用いる請求項１に記載の方法。
【請求項３】
薬剤又は遺伝子導入或いは遺伝子欠失手段によりＲＢ１ＣＣ１遺伝子又はその遺伝子産物の発現又は分解を制御する手段を用いる請求項２に記載の方法。
【請求項４】
請求項１～３に記載の方法に用いる診断薬及びキット。
【請求項５】
癌抑制遺伝子ＲＢ１ＣＣ１及び／又はその遺伝子産物の発現、分解、又は増減を指標とする生体機能制御物質のスクリーニング方法。
【請求項６】
請求項５の方法で選別された生体機能制御物質。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、癌抑制遺伝子（レチノブラストーマ遺伝子：ＲＢ１遺伝子）の発現を誘導しうる癌抑制遺伝子（ＲＢ１ＣＣ１）及びその遺伝子産物の生体内での発現、分解、又は増減を指標として、生体の機能評価に用い、疾病の診断又は治療に役立てようとするものである。
【０００２】
【従来の技術】
ＲＢ１は細胞の増殖を抑え、がん化のブレーキとなっている有名な蛋白である。そのＲＢ１の上流で働き、ＲＢ１の発現を制御している、癌抑制遺伝子ＲＢｌＣＣ１は２００２年に本発明者らによって見出された（非特許文献１）。ＲＢ１ＣＣ１遺伝子は２４のエキソンと２３個のイントロンから構成されており、７４－ｋｂ以上の長さを有している。そしてエキソン３の部位に翻訳開始箇所がある。この遺伝子は第８染色体上の８ｑ１１に局在している。ＲＢ１ＣＣ１蛋白質のｃＤＮＡは、６．６－ｋｂの長さを持ち、４７８２ヌクレオチドのオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含み、１８０ｋＤａの分子量で１５９４個のアミノ酸からなる蛋白質をコードしている。ＲＢ１ＣＣ１蛋白質はコンセンサス核局在シグナル配列部位（リジン－プロリン－アルギニン－リジン配列：ＫＰＲＫ）、ロイシンジッパーモチーフ配列部位及びコイルーコイル構造を有しており、ＤＮＡ－結合転写機能を持つ。
【０００３】
ＲＢｌＣＣ１遺伝子ががん抑制遺伝子として存在し、ＲＢｌＣＣ１の機能消失ががん化進展と関係していることを、３５例の原発性乳がんのうち７例（２０％）でＲＢ１ＣＣ１遺伝子の異常を確認することにより確かめられた（非特許文献２）。これら遺伝子変異は全てＲＢ１ＣＣ１遺伝子内で起こっており、これより生じる蛋白はＲＢ１ＣＣ１の機能上重要な部分を消失したものであることがわかった、さらにこれら７症例ではＲＢ１遺伝子自身に大きな異常は無いにも関わらず、ＲＢ１ＣＣ１，ＲＢ１両蛋白の発現が消失していることも確認されている。
【０００４】
実際、ＲＢｌＣＣ１遺伝子が正常な乳がん組織では、ＲＢ１ＣＣ１、ＲＢ１両者ともにがん細胞に存在し、増殖のブレーキ機能は保持されるため、Ｋｉ－６７で示される増殖度も低く、強い増殖、成長を示さない。しかし、ＲＢ１ＣＣ１遺伝子に異常が存在する場合は、がん細胞はＲＢ１ＣＣ１、ＲＢ１両蛋白によるブレーキ機能を消失しているため、Ｋｉ

－６７も強度に染まり、強い細胞増殖、がんの成長を示していることも確認されている（非特許文献３）。
これらは、いずれも癌とＲＢ１ＣＣ１の関連を調べたものであるが、癌以外の種々の疾患とＲＢ１ＣＣ１の関連については、現在のところ全くわかっていない。
【０００５】
【先行文献】
【非特許文献１】Ｏｎｃｏｇｅｎｅ（２００２）２１、１２９５－１２９８
【非特許文献２】Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ（２００２）３１、２８５－２８８
【非特許文献３】Ｓｈｉｇａ　Ｉｄａｉ　Ｎｅｗｓ（２００２）６、６－９
【０００６】
【解決しようとする課題】
本発明が解決しようとする課題は、癌抑制遺伝子ＲＢ１ＣＣ１又その遺伝子産物の生体内、とりわけ細胞又は組織内での発現、分解、又はその増減を指標として、生体機能を評価する方法を提供することである。さらに、生体内でＲＢ１ＣＣ１遺伝子又はその遺伝子産物の発現、分解、又は増減を制御する手段、例えば薬剤又は遺伝子導入或いは遺伝子欠落による生体機能評価方法及びそれに用いる診断薬を提供することである。またＲＢ１ＣＣ１遺伝子又はその遺伝子産物の発現、分解、又は増減を制御する薬剤又は遺伝子を提供することである。
【０００７】
【解決する手段】
課題解決のため、本発明者らは、鋭意研究し、ＲＢ１ＣＣ１は正常な細胞においても発現されていること、さらに、神経変性疾患では変性してくる神経細胞では、他のｍＲＮＡが発現されており、細胞形態も維持されている病早期においても既にＲＢ１ＣＣ１の発現が低下してくること、さらには各種の培養細胞のなかで、化学療法剤等で致死過程に至らせるとき、早期よりＲＢ１ＣＣ１が減少してくること等を見出し、ＲＢ１ＣＣ１の発現、分解、又は増減を指標として生体機能を評価できることを見出し本発明を完成した。
【０００８】
すなわち、本発明は以下の構成よりなる。
１、癌抑制遺伝子ＲＢ１ＣＣ１及び／又はその遺伝子産物の発現、分解、又は増減を指標とする生体機能評価方法。
２、ＲＢ１ＣＣ１遺伝子又はその遺伝子産物の発現又は分解を制御する手段を用いる前記１に記載の方法。
３、薬剤又は遺伝子導入或いは遺伝子欠失手段によりＲＢ１ＣＣ１遺伝子又はその遺伝子産物の発現又は分解を制御する手段を用いる前記２に記載の方法。
４、前記１～３に記載の方法に用いる診断薬及びキット。
５、癌抑制遺伝子ＲＢ１ＣＣ１及び／又はその遺伝子産物の発現、分解、又は増減を指標とする生体機能制御物質のスクリーニング方法。
６、前項５の方法で選別された生体機能制御物質。
【０００９】
【発明の実施の形態】
本発明は癌抑制遺伝子ＲＢ１ＣＣ１及び／又はその遺伝子産物の発現、分解、又は増減を指標とする生体機能評価方法を提供するものである。本発明における生体機能評価方法とは、生体の有する機能全般を含む。それは、細胞、組織又は固体の死、増殖、生長（成長）、発生、分裂、融合、壊死、消滅、萎縮、変性、癌化、伸長等である。具体例として、次のような例が挙げられる。ＲＢ１ＣＣ１のｍＲＮＡがヒトやマウスの発生過程で成長とともに発現していたこと。そして正常の大人の脳でも神経細胞に相当量発現されていたこと。しかし、アルツハイマーやパーキンソンを代表とする神経変性疾患について調べたところ、変性してくる神経細胞がＲＢ１ＣＣ１以外の他の蛋白質のｍＲＮＡを発現しており、なお細胞形態も維持している早期において、既にＲＢ１ＣＣ１の発現が低下していたこと。これ以外にも、ＲＢ１ＣＣ１遺伝子又は蛋白質を指標とする全ての機能評価が含まれ

る。生体機能評価の対象となるものは、細胞、組織及び固体の全てが含まれ、それらは、例えば、ウイルスや細菌等に感染しているもの、癌化、変性、萎縮しているもの等の他正常なものも含まれる。またその由来や起源は限定されるものではなく、全ての組織、体細胞、生殖細胞、胚細胞が対象となる。

【００１０】

本発明のＲＢ１ＣＣ１遺伝子又はその遺伝子産物の発現、分解を制御する手段には、ＲＢ１ＣＣ１遺伝子又は蛋白質の発現を増減させうる全ての手段が含まれる。例えば薬剤による発現誘導、加速又は阻害、分解等、さらに遺伝子導入や人為的遺伝子操作による遺伝子の改変等の操作による発現誘導、加速又は阻害、分解等が含まれる。

具体的な例として、各種の培養細胞を化学療法剤等で致死過程に至らせるとき、早期よりＲＢ１ＣＣ１が減少してきたこと等が挙げられる。遺伝子操作の例としては、すでに部分的な欠失によりその発現が抑制されていることが確認されている変異を利用することができる。例えばヌクレオチド配列１１－４８００の欠失、３２５－１５８５の欠失、１０－４７９８の欠失、１２３３－４６６３の欠失、９５７－４７８５の欠失、１６３５－４７１９の欠失、２１２－４８１１の欠失、２４１－４６２１の欠失、５９１－４６７８の欠失等の他、一塩基又は複数塩基の置換又は変異を導入することもできる。正常又は疾患を有する組織又は細胞に変異を有するＲＢ１ＣＣ１遺伝子と変異を有しない正常な遺伝子を導入した条件下で、ＲＢ１ＣＣ１の組織や細胞に及ぼす効果を判定する方法等が本発明に含まれる。本発明は上述の手段を用いて、前記の生体機能評価を行う全ての方法が含まれる。

【００１１】

本発明はＲＢ１ＣＣ１遺伝子又はその遺伝子産物の発現、分解を指標として生体機能評価を行うための検査薬及びキットも含まれる。ＲＢ１ＣＣ１遺伝子又は蛋白質を検出する検査薬、ＲＢ１ＣＣ１遺伝子又は蛋白質を発現誘導又は阻害、分解させるような薬剤、遺伝子等を組み込んだ検査薬及びキットが例示される。

【００１２】

本発明は、ＲＢ１ＣＣ１遺伝子又は蛋白質を発現誘導、加速、阻害、分解等の制御する物質にも及ぶ。このような物質として薬剤、遺伝子等が挙げられる。例えばＲＢ１ＣＣ１の発現を維持できる薬剤、もしくはＲＢ１ＣＣ１の分解を阻止できる薬剤である。このような薬剤の投与により、前述の神経変性疾患の予防や治療に非常に有用となる。また、このような疾患に対して、ＲＢ１ＣＣ１の遺伝子を導入することによって、疾患の予防や治療に有用になる。ＲＢ１ＣＣ１の発現が抑えられているがん組織にＲＢ１ＣＣ１の遺伝子を導入することによってがんを治療する遺伝子治療、またＲＢ１ＣＣ１の発現を誘導、分解を阻止しうる薬剤の投与によるがんの治療など、これらに用いる遺伝子、薬剤、物質も含まれる。

【００１３】

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

【００１４】

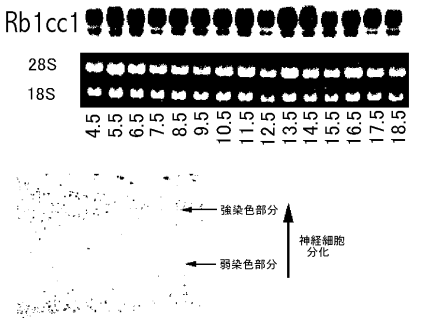
【実施例１】（胚細胞でのＲＢ１ＣＣ１ｍＲＮＡ及び蛋白質の検出）

受精後４－８週で自然流産した母体より採取したヒト胚細胞中のＲＢ１ＣＣ１　ｍＲＮＡ，蛋白質の発現をｉｎ　ｓｉｔｕ　ハイブリダイゼーション法、免疫組織化学法によって調べた。Ｉｎ　ｓｉｔｕ　ハイブリダイゼーション法には、ヒトＲＢ１ＣＣ１　ｍＲＮＡのヌクレオチド配列番号４４３１－４６５４　（Ｇｅｎ　Ｂａｎｋ　Ａｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．　ＡＢ０５９６２２）　の部位を認識するプローブを使用した。免疫組織化学法には抗ヒトＲＢ１ＣＣ１抗血清（？－ＲＢＩＣＣ－６４２）を用いた。その結果、５例の胚細胞の全てでＲＢ１ＣＣ１のｍＲＮＡの発現が認められた。筋骨系、神経、腎等種々の組織でＲＢ１ＣＣ１の豊富な発現が認められた。さらに、受精後４日以降のマウスの胚細胞、胚組織についてもノーザンブロット法、ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション法、免

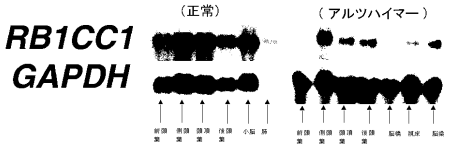
疫組織化学法にてマウスＲＢ１ＣＣ１の発現を調べた。ノーザンブロット法、ｉｎ　ｓｉｔｕ　ハイブリダイゼーション法にはマウスＲＢ１ＣＣ１　ｍＲＮＡのヌクレオチド配列番号１５５９－３５２３、ヌクレオチド配列番号４３４５－４５６９　（Ｇｅｎ　Ｂａｎｋ　Ａｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．　ＡＢ０７０６１９）　の部位を、それぞれ認識するプローベを用いた。免疫組織化学法には抗ヒトＲＢ１ＣＣ１抗血清（？－ＲＢＩＣＣ－６４２）を用いた。その結果、マウスにおいても４－２０日の胚組織、細胞においてマウスＲＢ１ＣＣ１のｍＲＮＡ、蛋白質の発現が認められた（図１）。
以上の結果、ＲＢ１ＣＣ１のｍＲＮＡ、蛋白質の発現は個体発生の初期より広く発現されており、器官、組織形成の過程においても重要な働きをしていることが明らかとなった。
【００１５】
【実施例２】（神経細胞でのｍＲＮＡ及び蛋白質の発現）
ヒト成人脳の神経細胞でのＲＢ１ＣＣ１のｍＲＮＡ、蛋白質の発現を実施例１と同様にノーザンブロット法、ｉｎ　ｓｉｔｕ　ハイブリダイゼーション法、免疫組織化学法を用いて行った。
その結果、正常なヒト脳神経細胞に比し、アルツハイマー型痴呆症およびパーキンソン病の脳神経細胞では図２及び図３に示すようにその病態とＲＢ１ＣＣ１　ｍＲＮＡ、蛋白の発現量が大きく変化することがわかった。正常な脳神経細胞においては多量のＲＢ１ＣＣ１　ｍＲＮＡ、蛋白質が発現していた。一方、アルツハイマー型痴呆症やパーキンソン病ではコントロールに用いたグリセロアルデヒド－３－リン酸脱水素酵素（ＧＡＰＤＨ）、やｐｏｌｙ－Ａ　ｔａｉｌｅｄ　ＲＮＡ　（発現されている全てのｍＲＮＡを含む）の発現は正常と変わらず、組織形態学上も大きな変性、萎縮のみられない時期に、神経細胞の萎縮に先駆け、より早期よりＲＢ１ＣＣ１のｍＲＮＡ、蛋白質の発現が大きく低下していることがわかった。以上の結果、ＲＢ１ＣＣ１の発現はアルツハイマー型痴呆症やパーキンソン病のように神経細胞の変性を伴う疾患ではその発現低下が病態の進行と大きく関係していることがわかった。
【００１６】
【実施例３】（化学療法剤によるＲＢ１ＣＣ１のｍＲＮＡ及び蛋白質発現制御）
化学療法剤（ドキソルビシン）に対して致死性の培養細胞（Ｕ－２ＯＳ，　Ｒａｔ１）を化学療法剤（ドキソルビシン）添加のもとで培養し、細胞を致死状態に誘導した。
一方、コントロールとして耐性株の細胞（Ｕ－２ＯＳ／ＤＸ５８０）を同条件下で培養し、その細胞増殖とＲＢ１ＣＣ１のｍＲＮＡ、蛋白質の発現の関係を調べた。
その結果を図４に示した。遺伝子発現の指標として用いたＧＡＰＤＨの発現は細胞増殖、致死に拘わらず強い発現が認められ、また細胞増殖が盛んな耐性株ではＲＢ１ＣＣ１のｍＲＮＡ及び蛋白質の強い発現が認められた。一方、致死性の培養細胞では致死の進行とともにＲＢ１ＣＣ１のｍＲＮＡの発現量、追って蛋白質の発現量が減少していくことがわかった。すなわちＲＢ１ＣＣ１の発現低下、分解は細胞の致死と相関した関係にあり、ＲＢ１ＣＣ１の発現、分解が細胞の増殖、細胞死のマーカーになりうることがわかった。
【００１７】
【発明の効果】
本発明は、ＲＢ１ＣＣ１の発現は正常細胞と比べて神経変性や細胞の致死過程では発現が有意に抑制されていることから、ＲＢ１ＣＣ１の消長を調べることは種々の疾患の診断に有用である。さらに人工的にＲＢ１ＣＣ１の発現維持、分解阻止は神経変性疾患の予防や治療に有用である。
【００１８】
【図面の簡単な説明】
【図１】マウス胎児発生期のＲＢ１ＣＣ１発現を調べた結果である。
（ａ）ノーザンブロットによるｍＲＮＡの発現を示した図である。
（ｂ）マウス胎児神経組織のＲＢ１ＣＣ１の免疫組織染色の結果である。
【図２】ヒト正常脳及びアルツハイマー病の脳のＲＢ１ＣＣ１ｍＲＮＡの発現をノーザンブロットで調べた結果である。

【図３】ヒト正常脳及びアルツハイマー病の脳のＲＢ１ＣＣ１の発現を調べた結果である。
上段は免疫組織染色、中段はｉｎ　ｓｉｔｕ　ハイブリダイゼーション、下段はｐｏｌｙＡ－ＲＮＡのｉｎ　ｓｉｔｕ　ハイブリダイゼーションの結果である。
【図４】細胞増殖とＲＢ１ＣＣ１の発現を調べた結果である。
上図は細胞増殖、下図上段及び中段はノーザンブロット、下段はウエスタンブロットの結果である。

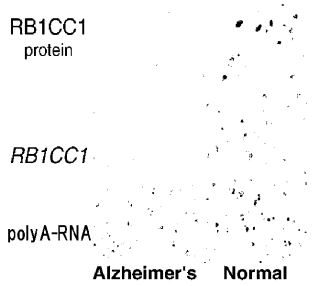
【図１】



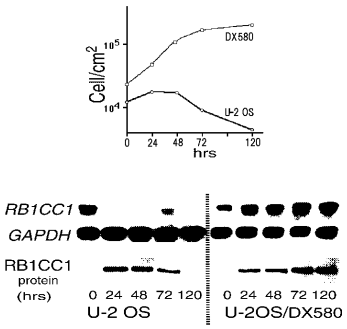
【図２】



【図３】



【図４】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	F I	テーマコード（参考）
Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｇ０１Ｎ 33/50 Ｚ	

Ｆターム(参考) 2G045 AA26 AA40 BB24 CB01 CB02 DA12 DA13 DA14 DA78 FB02
FB03 FB05
4B024 AA12 CA04 CA09 CA12 HA12
4B063 QA08 QQ53 QR32 QR40 QR55 QR62 QS25 QS34
4C084 AA17 NA14 ZB262