

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 3 月 28 日 (28.03.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/24227 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 45/00, 土狩 1188 協和醸酵工業株式会社 医薬総合研究所内
31/711, 35/76, A61P 35/00, C12N 15/11 Shizuoka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/08139 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) 国際出願日: 2001 年 9 月 19 日 (19.09.2001)
- (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: (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 特願 2000-285371 2000 年 9 月 20 日 (20.09.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 Tokyo (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山下 康治 (YAMASHITA, Yasuji) [JP/JP]; 山下 順範 (YAMASHITA, Yoshinori) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県駿東郡長泉町下
- 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。

(54) Title: TUMOR CELL PROLIFERATION INHIBITORS

(54) 発明の名称: 腫瘍細胞増殖抑制剤

(57) Abstract: A substance inhibiting the proliferation of tumor cells which proliferate due to the excessive production of a nuclear receptor HNF4a protein; tumor cell proliferation inhibitors containing this substance as the active ingredient; and a method of inhibiting the proliferation of tumor cells by using the tumor cell proliferation inhibitors.

(57) 要約:

本発明は、核内受容体 HNF4 α タンパク質の過剰産生により増殖する腫瘍細胞の増殖を抑制する物質、該物質を有効成分として含有する腫瘍細胞増殖抑制剤、および該腫瘍細胞増殖抑制剤を用いる腫瘍細胞増殖抑制方法に関する。



WO 02/24227 A1

明 細 書

腫瘍細胞増殖抑制剤

技術分野

本発明は、核内受容体HNF4 α タンパク質の過剰産生により増殖する腫瘍細胞の増殖を抑制する活性を有効成分として含有する腫瘍細胞増殖抑制剤に関する。

背景技術

脂溶性ホルモンや活性型ビタミンD、レチノイン酸などの生体内で生物活性を持つ低分子の多くは細胞内に存在する核内受容体と称するタンパク質を通して機能を発揮している。これらの核内受容体タンパク質の多くは、ステロイドやビタミンといったリガンドと複合体を形成することにより、リガンド特異的な標的遺伝子の転写を調節する転写因子として機能する〔Mol. Endocrinol., 10, 1489 (1996)〕。構造の類似性から核内受容体であると予想される数多くのタンパク質をコードする遺伝子が発見され報告されているが、その中には、生体内リガンドが不明なオーファン受容体が数多く含まれている。

その一部には、細胞内に過剰発現するだけで機能を発揮し、構成的に転写活性を有するものが存在する。構成的転写活性化活性を示す核内受容体の一つであるHNF4 α タンパク質は、成人の肝、腎、小腸、および脾臓で発現している。マウスでのHNF4 α タンパク質のホモ欠失体は胎生致死であり、さらに脂質代謝、糖代謝およびアミノ酸代謝に関与する遺伝子群の発現を調節することが知られている〔Mol. Cell. Biol., 13, 1708 (1992)、J. Biol. Chem., 268, 16831 (1993)〕。

一方、HNF4 α タンパク質と大腸癌の発症および増殖との関連性は示唆されている(WO99/00116)が、HNF4 α タンパク質の癌細胞増殖への作用を直接示す報告はなく、特に大腸癌組織でのHNF4 α タンパク質の高産生および大腸癌細胞でのHNF4 α タンパク質の産生量の変化に伴う細胞増殖能の変化については報告されていない。またHNF4 α タンパク質に作用するリガンドとして長鎖脂肪酸アシルCoA(パルミトイル-CoA、ミリスチル-CoA、ドデカノイル-CoA、ステアロイル-CoA、オレオイル-CoA、リノレオイル-CoA、リオレノイル-CoA、エイコサペンタエノイル-CoA、ドコサヘキサエノイル-CoA)が報告されているが〔Nature, 392, 512 (1998)〕、これらリガンドによる癌細胞の増殖への作用については解析が行われていない。

発明の開示

本発明者らは、正常組織では産生していないHNF 4 α タンパク質の産生量が大腸癌由来の細胞株および大腸癌組織で上昇しており、該タンパク質の産生レベルを抑制することにより腫瘍細胞の増殖を抑制できることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の(1)～(20)に関する。

(1) HNF 4 α タンパク質の過剰産生により増殖する腫瘍細胞の増殖を抑制する活性を有する物質を有効成分として含有する腫瘍細胞増殖抑制剤。

(2) HNF 4 α タンパク質の過剰産生により増殖する腫瘍細胞の増殖を抑制する活性を有する物質が、HNF 4 α タンパク質の発現を阻害する物質である、上記(1)の腫瘍細胞増殖抑制剤。

(3) HNF 4 α タンパク質の発現を阻害する物質が、HNF 4 α タンパク質の発現を阻害するヌクレオチドである、上記(2)の腫瘍細胞増殖抑制剤。

(4) HNF 4 α タンパク質の発現を阻害するヌクレオチドが、HNF 4 α タンパク質をコードするDNA (以下、HNF 4 α DNAと略す) のアンチセンスヌクレオチドである、上記(3)の腫瘍細胞増殖抑制剤。

(5) アンチセンスヌクレオチドが、5～60塩基のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドである、上記(4)の腫瘍細胞増殖抑制剤。

(6) アンチセンスヌクレオチドが、配列番号7で表される塩基配列を有するDNAである、上記(4)の腫瘍細胞増殖抑制剤。

(7) アンチセンスヌクレオチドが、配列番号7で表される塩基配列の相補配列を有するDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつHNF 4 α タンパク質の発現を阻害するヌクレオチドである、上記(4)の腫瘍細胞増殖抑制剤。

(8) 配列番号7で表される塩基配列を有するDNA。

(9) 配列番号7で表される塩基配列の相補配列を有するDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつHNF 4 α タンパク質の発現を阻害するDNA。

(10) 上記(8)または(9)のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

(11) 上記(10)の組換え体DNAを有効成分として含有する、上記(1)の腫瘍細胞増殖抑制剤。

(12) HNF 4 α タンパク質の過剰産生により増殖する腫瘍細胞の増殖を抑

制する活性を有する物質が、HNF 4 α タンパク質による転写の活性化を阻害する物質である、上記（１）の腫瘍細胞増殖抑制剤。

（１３） HNF 4 α タンパク質による転写の活性化を阻害する物質が、転写を活性化する機能が欠損したHNF 4 α タンパク質である、上記（１２）の腫瘍細胞増殖抑制剤。

（１４） 転写を活性化する機能が欠損したHNF 4 α タンパク質が、HNF 4 α タンパク質のリガンド結合部位の一部またはすべてを欠失したHNF 4 α タンパク質である、上記（１３）の腫瘍細胞増殖抑制剤。

（１５） 転写を活性化する機能が欠損したHNF 4 α タンパク質が、HNF 4 α タンパク質の転写促進部位またはDNA結合部位のみを有するHNF 4 α タンパク質である、上記（１３）の腫瘍細胞増殖抑制剤。

（１６） 転写を活性化する機能が欠損したHNF 4 α をコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを有効成分として含有する、上記（１）の腫瘍細胞増殖抑制剤。

（１７） 組換え体DNAに用いられるベクターがウイルスベクターである、上記（１１）または（１６）の腫瘍細胞増殖抑制剤。

（１８） HNF 4 α タンパク質による転写の活性化を阻害する物質が、HNF 4 α 受容体のアンタゴニストである、上記（１２）の腫瘍細胞増殖抑制剤。

（１９） 腫瘍細胞増殖抑制剤が、大腸癌細胞の増殖抑制剤である、上記（１）～（７）、（１１）～（１８）いずれか１つの腫瘍細胞増殖抑制剤。

（２０） 上記（１）～（７）、（１１）～（１９）いずれか１つの腫瘍細胞増殖抑制剤を腫瘍細胞に作用させることを特徴とする腫瘍細胞増殖抑制方法。

本発明の腫瘍細胞増殖抑制剤は、HNF 4 α タンパク質の過剰産生により増殖する腫瘍細胞の増殖を抑制する活性を有する物質を有効成分として含有する。

本発明において、HNF 4 α タンパク質とは、HNF 4 α 受容体を構成するタンパク質、該タンパク質のアイソフォームおよび該タンパク質の相同タンパク質をいう。

HNF 4 α タンパク質の過剰産生により増殖する腫瘍細胞としては、HNF 4 α タンパク質の過剰産生により増殖する腫瘍細胞であれば、いずれの腫瘍細胞でもよい。該腫瘍細胞の例としては、例えば、大腸癌細胞があげられる。

該腫瘍細胞の増殖を抑制する活性を有する物質としては、例えば（１）HNF 4 α タンパク質の発現を阻害する物質、（２）HNF 4 α タンパク質による転写の活性化

を阻害する物質があげられる。

HNF 4 α タンパク質による転写の活性化を阻害する物質としては、例えば (a) 転写を活性化する機能が欠損した HNF 4 α タンパク質、(b) HNF 4 α タンパク質のアンタゴニストがあげられる。

以下に、これらの物質について説明する。

(1) HNF 4 α タンパク質の発現を阻害する物質

HNF 4 α DNA としては、例えば、ヒト HNF 4 α 1、ヒト HNF 4 α 2、ヒト HNF 4 α 4、およびラット、マウス、アフリカツメガエル由来の HNF 4 α があげられる。好ましくは HNF 4 α 2 [Mol. Cell. Biol., 16, 925 (1996)、Gene, 147, 269 (1994)] があげられる。

HNF 4 α DNA は、Mol. Cell. Biol., 16, 925 (1996)、Gene, 147, 269 (1994) 等において開示された塩基配列より HNF 4 α DNA に特異的なプライマーまたはプローブを作製し、該プライマーあるいはプローブを用いてヒトの肝臓、腎臓、脾臓あるいは小腸由来の cDNA ライブラリー等をスクリーニングすることにより、容易にクローニングすることができる。

cDNA ライブラリー作製法としては、[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング 第2版と略す)]、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995) 等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング [SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning ; Gibco BRL 社製] や ZAP-cDNA Synthesis Kit [Stratagene 社製] を用いる方法などがあげられる。更に、市販の cDNA ライブラリー、例えば Life Technologies 社製のヒト白血球 cDNA ライブラリー等を利用することもできる。

cDNA ライブラリーを作成するためのクローニングベクターとしては、大腸菌 K12 株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いづれでも使用できる。具体的には、ZAP Express [Stratagene 社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、 λ zap II (Stratagene 社製)、 λ gt10、 λ gt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、 λ TriplEx (クロンテック社製)、 λ BlueMid (クロンテック社製)、 λ ExCell (ファルマシア社製)、

pT7T318U (ファルマシア社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)] 等をあげることができる。

cDNAを組み込んだベクターを導入する大腸菌としては、大腸菌に属する微生物であればいずれも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF' [Stratagene社製、Strategies, 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、Escherichia coli JM105 [Gene, 38, 275 (1985)] 等を用いることができる。

クローニングの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング 第2版等に詳細に記載されている。具体的には、ハイブリダイゼーションを用いる方法、あるいはPCRを用いる方法等があげられる。

クローニングされたHNF4 α DNAの塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー(Sanger)らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] あるいは373A・DNAシーケンサー [PERKIN ELMER社製] 等の塩基配列分析装置を用いて決定することができる。

該DNA断片、または全長cDNAを、発現ベクター、遺伝子導入ベクター等のベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクター、遺伝子導入ベクター等の組換え体DNAを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入する。宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞等を用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なしは染色体中への組込が可能で、本発明のポリペプチドをコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等をあげることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF α 1プロ

ロモーター、CUP 1プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、Saccharomyces属、Schizosaccharomyces属、Kluyveromyces属、Trichosporon属、Schwanniomyces属、Pichia属、Candida属等に属する微生物、例えば、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Candida utilis等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Methods Enzymol., 194, 182 (1990)〕、スフェロプラスト法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)〕、酢酸リチウム法〔J. Bacteriology, 153, 163 (1983)〕、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978) 記載の方法等をあげることができる。

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNAI、pcDM8 (フナコシ社製)、pAGE107〔特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、pAS3-3 (特開平2-227075)、pCDM8〔Nature, 329, 840 (1987)〕、pcDNAI/Amp (Invitrogen社製)、pREP4 (Invitrogen社製)、pAGE103〔J. Biochem., 101, 1307 (1987)〕、pAGE210等をあげることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で機能するものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299) 等をあげることができる。

動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕、Virology, 52, 456 (1973)等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主細胞として用いる場合には、例えばCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory

Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、HNF 4 α タンパク質を産生することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させることにより、昆虫細胞にHNF 4 α タンパク質を産生させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII（ともにInvitrogen社製）等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21〔Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)〕、Trichoplusia niの卵巣細胞であるHigh 5（Invitrogen社製）等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム（Agrobacterium）

（特開昭59-140885、特開昭60-70080、WO94/00977）、エレクトロポレーション法（特開昭60-251887）、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法（特許第2606856、特許第2517813）等をあげることができる。

HNF 4 α タンパク質の発現方法は、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング 第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合タンパク質生産等を行

うことができる。

上記方法により得られる形質転換細胞は、HNF 4 α タンパク質を発現するので、本発明に用いられるHNF 4 α タンパク質の発現を阻害する物質のスクリーニングに用いることができる。

具体的には、被検物質を形質転換体に接触させ、HNF 4 α DNAの転写活性、HNF 4 α タンパク質の発現量を測定するなどして、HNF 4 α DNAの転写またはHNF 4 α タンパク質への翻訳を抑制する活性を有する被検物質を、HNF 4 α タンパク質の発現を阻害する物質として選択することができる。

被験物質としては、合成化合物、天然に存在する蛋白質、人工的に合成された蛋白質、ペプチド、糖質、脂質、これらの修飾体、誘導体を、また哺乳動物(例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、ヒト等)の尿、体液、組織抽出物、細胞培養上清、細胞抽出物を、更に、微生物の発酵生産物、植物その他の生物の抽出物等をあげられる。

上記HNF 4 α 発現阻害物質を形質転換体に接触させる方法としては、該形質転換体を培養液に添加する方法があげられる。

該形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

該形質転換体を培養する培地として、該形質転換体が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、該形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該形質転換体が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カル

シウム等を用いることができる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中のpHは3.0～9.0に保持することが好ましい。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターを導入した形質転換体を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、ダルベッコ改変MEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)〕またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地（Pharming社製）、Sf-900 II SFM培地（Life Technologies社製）、ExCell400、ExCell405（いずれもJRH Biosciences社製）、Grace's Insect Medium〔Nature, 195, 788 (1962)〕等を用いることができる。

培養は、通常pH6～7、25～30℃等の条件下で、1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、

一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ(MS)培地、ホワイト(White)培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH 5～9、20～40℃の条件下で3～60日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

このようにして培養された形質転換体中でのHNF4 α タンパク質をコードするmRNAの発現量は、例えば、HNF4 α DNAまたは該DNAより得られるオリゴヌクレオチドを用い、ノーザンハイブリダイゼーション法(モレキュラー・クローニング 第2版)またはPCR法[PCR Protocols, Academic Press(1990)]、Real Time PCR法[Junko Stevens, 実験医学(増刊), 15, 46-51 (1997)]により、測定することができる。また、HNF4 α タンパク質の発現量は、例えば、HNF4 α タンパク質と特異的に結合する抗体を用い、ウエスタンブロッティング法(モレキュラー・クローニング 第2版)により、測定することができる。

上記スクリーニングで得られるHNF4 α タンパク質の発現を阻害する物質としては、例えば、HNF4 α DNAのアンチセンスDNA、アンチセンスRNA等のアンチセンスヌクレオチドがあげられる。

本発明のアンチセンスヌクレオチドとしては、HNF4 α DNAの有する塩基配列(センス配列)に相補する塩基配列を有し、かつセンス配列の転写・翻訳を阻害するヌクレオチドであればいずれでもよい。

本発明のアンチセンスヌクレオチドは、HNF4 α DNAの塩基配列に基づいて、アンチセンスプライマーを作製し、HNF4 α DNAを鋳型にしてPCRを行うことによって得ることができる。また、化学合成によっても調製することができる。化学合成は、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、フォスフォアミダイト法を利用したPERKIN ELMER社製のDNA合成機model392等を用いて行うことができる。本発明のアンチセンスヌクレオチドの例としては、例えば、配列番号7で表される塩基配列を有するDNAがあげられる。

また、配列番号7で表される塩基配列の相補配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつHNF4 α タンパク質の発現を阻害するヌクレオチドも本発明のアンチセンスヌクレオチドに含まれる。

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチドは、配列番号7で表

される塩基配列の相補配列を有するDNAをプローブとして、例えばコロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、ストリンジェントな条件下で、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いて、ハイブリダイゼーションを行うことにより得られる。

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第2版、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。

ストリンジェントな条件とは、 $0.7 \sim 1.0 \text{ mol/l}$ の塩化ナトリウム存在下、 65°C でハイブリダイゼーションを行った後、 $0.1 \sim 2$ 倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、 150 mmol/l 塩化ナトリウム、 15 mmol/l クエン酸ナトリウムよりなる）を用い、 65°C 条件下でフィルターを洗浄する条件があげられる。

ハイブリダイズ可能なDNAとして、例えばBLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] やFASTA [Methods in Enzymology, 183, 63-98 (1990)] 等を用いて計算したときに、配列番号7で表される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

本発明のアンチセンスヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドであってもよい。アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、HNF4 α DNAまたは該DNAの断片を用いて、モレキュラー・クローニング 第2版等に記載の方法により、あるいは該DNAの塩基配列情報よりDNA合成機により、HNF4 α DNAの部分配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチドとして、調製することができる。

該オリゴヌクレオチドとしては、例えばHNF4 α DNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNA、該DNAと相補する塩基配列を有するDNAをあげることができる。

更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体（以下、オリゴヌクレオチド誘導体という）も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

該オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌ

クレオチド中のリン酸ジエステル結合がN 3' - P 5' ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5 プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5 チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5 プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2' - O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2' - メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等をあげることができる〔Nucleic Acids Res., 27, 1788 (1999)、 Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 96, 10010-10015 (1999) 〕。

該アンチセンスヌクレオチドを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換え体ベクターを造成し、後述する方法により、該組換え体ベクターを腫瘍細胞に導入することにより、該腫瘍細胞の増殖を抑制することができる。発現ベクターとしては例えば、pcDNA3.1 (インビトロジェン社製) 等の発現ベクターがあげられる。該発現ベクターは、ウイルスベクターであってもよい。

(2) HNF 4 α タンパク質による転写の活性化を阻害する物質

HNF 4 α タンパク質による転写の活性化を阻害する物質の選択方法としては、被験物質を上記のHNF 4 α タンパク質を発現する形質転換体と接触させ、HNF 4 α タンパク質の転写活性化活性を以下に示す方法で測定することにより、HNF 4 α タンパク質による転写の活性化を阻害する物質を選択する方法があげられる。

HNF 4 α タンパク質の転写活性化活性は以下の方法により測定できる。

ヒト子宮頸癌由来のHeLa細胞をデキストランをコートしたチャコール処理済み5%牛胎児血清 (JRHバイオサイエンス社製) を含むフェノールレッド不含の最少必須培地 (日本水産社製) で培養し、10cmペトリディッシュで50%コンフルエントになった時点で、0.5 μ gの上記で作成したHNF 4 α DNA発現ベクター、1 μ gのHNF 4 α 応答配列-ルシフェラーゼ レポータープラスミド、3 μ gの β -ガラクトシダーゼ発現ベクターにDNA量が20 μ gになるようにpBluscript+プラスミド (ストラタジーン社製) を混合したDNA混合物をリン酸カルシウム法に

て導入する。また、コントロールとして、HNF 4 α DNA発現ベクターを含まないDNA混合物を導入する。

遺伝子導入後24時間培養し、培地交換を行ってさらに24時間培養した後、細胞をかきとり、常法により β -ガラクトシダーゼ活性を測定してDNAの細胞導入効率を確認する。導入効率を揃えるために細胞抽出液10単位を用いて、ルシフェリンおよびATPを反応させ、MicroLumat LB96P (EG & GBERTHOLD社製) にてルシフェラーゼ酵素活性測定することにより、HNF 4 α タンパク質の転写活性化活性を測定することができる。

HNF 4 α タンパク質による転写の活性化を阻害する物質としては、例えば転写を活性化する機能が欠損したHNF 4 α タンパク質、HNF 4 α 受容体のアンタゴニストがあげられる。

(a) 転写を活性化する機能が欠損したHNF 4 α タンパク質

転写を活性化する機能が欠損したHNF 4 α タンパク質としては、例えばリガンド結合部位の一部またはすべてを欠失したHNF 4 α タンパク質、転写促進部位またはDNA結合部位のみを有するHNF 4 α タンパク質等、人為的に作製したHNF 4 α タンパク質の改変タンパク質、あるいは生体内に存在するHNF 4 α タンパク質が有する転写を活性化する機能が欠損したHNF 4 α タンパク質のアイソフォーム等があげられる。

転写を活性化する機能が欠損したHNF 4 α タンパク質の具体例としては、例えばラットHNF 4 α タンパク質が有するアミノ酸配列のうち、第355位以降が欠失したラットHNF 4 欠失変異タンパク質があげられる [Mol. Cell. Biol., 15, 2135 (1995)]。

核内受容体は、その構造上の特徴から、A領域～F領域より構成されており、そのうちA/B領域は転写促進に、C領域はDNA結合に、そしてE領域はリガンドとの結合に関与することが判明している [Cell., 83, 841 (1995)]。上記ラットHNF 4 欠失変異タンパク質は、E/F領域の一部のアミノ酸が欠失したものである。

したがって、転写を活性化する機能が欠損したHNF 4 α タンパク質としては、上記以外にも、C領域のみを保持するHNF 4 α タンパク質の欠失変異体、あるいはA/B領域のみを保持するHNF 4 α タンパク質の欠失変異体も含まれる。

転写を活性化する機能が欠損したHNF 4 α タンパク質は、HNF 4 α タンパク質による転写の活性化を阻害するため、HNF 4 α タンパク質の過剰産生により増殖する腫瘍細胞の増殖を抑制する活性を有する。

該タンパク質は、HNF 4 α DNAの構造遺伝子部位に、例えば部位特異的突然変異誘発〔Methods in Enzymology, 100, 448 (1983)〕やPCR法〔Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edt., 15章, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)、PCR A Practical Approach, IRL Press 200-210(1991)〕等の手法により変異を導入することにより、作製することができる。また、生体内に存在するアイソフォームの場合は、上記の如くHNF 4 α DNA特異的なプライマーあるいはプローブを用い、ヒトの肝臓、あるいは腎臓等のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、クローニングすることができる。

該タンパク質をコードするDNAを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換え体ベクターを造成し、後述する方法により、該組換え体ベクターを腫瘍細胞に導入することにより、該腫瘍細胞の増殖を抑制することができる。発現ベクターとしては例えば、pcDNA3.1(インビトロジェン社製)等の発現ベクターがあげられる。該発現ベクターとしては、ウイルスベクターを用いてもよい。

(b) HNF 4 α 受容体のアンタゴニスト

HNF 4 α 受容体のアンタゴニストを腫瘍細胞に作用させることによって、HNF 4 α タンパク質の過剰産生している腫瘍細胞の増殖を抑制することができる。該アンタゴニストは、大腸癌由来の細胞であるHCT116 (ATCC:CCL-247) およびSW480

(ATCC:CCL-228) に被験物質を接触させ、該大腸癌細胞のHNF 4 α DNAの転写の活性化を阻害する物質をスクリーニングすることにより得ることができる。

被験試料としては、合成化合物、天然に存在する蛋白質、人工的に合成された蛋白質、ペプチド、糖質、脂質、これらの修飾体、誘導体を、また哺乳動物(例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、ヒト等)の尿、体液、組織抽出物、細胞培養上清、細胞抽出物を、更に、微生物の発酵生産物、植物その他の生物の抽出物等をあげることができる。

該転写活性化活性の測定は、上記(a)に記載の方法に従って行うことができる。

上記の方法により取得される、HNF 4 α 受容体のアンタゴニストは、治療薬として単独で用いることが可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として用いることが望ましい。

該治療薬の投与方法としては、治療に際して最も効果的な方法を使用することが望ましく、経口投与または、口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の

非経口投与による方法を用いることができる。

該治療薬の剤形としては、軟膏剤、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、テープ剤等をあげることができる。

経口投与に適切な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等をあげることができる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造することができる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用い製造することができる。

非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、例えば、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製することができる。

座剤は、例えば、カカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製することができる。

噴霧剤は、上記で取得されたアンタゴニストをそのまま噴霧剤として用いることが可能であるが、受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製した噴霧剤が好ましい。

担体として、具体的には乳糖、グリセリン等を例示することができる。

上記で取得されたアンタゴニスト、および担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤を調製することが可能である。

これらの非経口剤においても、経口剤で添加剤として例示した成分を添加することができる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg}\sim 8\text{mg}/\text{kg}$ である。

(3)ヌクレオチド以外のHNF4 α タンパク質の転写活性化活性を阻害する物質を

有効成分として含有する腫瘍細胞増殖抑制剤

上記(1)のスクリーニングで得られるHNF 4 α タンパク質の発現を阻害する物質がヌクレオチド以外の物質である場合には、該阻害物質を有効成分として含有する腫瘍細胞増殖抑制剤は、上記(2)(b)で得られるHNF 4 α 受容体のアンタゴニストを有効成分として含有する腫瘍細胞増殖抑制剤と同様な方法で得ることができる。

(4) HNF 4 α DNAのアンチセンスヌクレオチドまたは転写を活性化する機能が欠損したHNF 4 α タンパク質をコードするDNAを有効成分として含有する腫瘍細胞増殖抑制剤

上記(1)で得られるアンチセンスヌクレオチドまたは上記(2)(a)で得られる転写を活性化する機能が欠損したHNF 4 α タンパク質をコードするDNAは、腫瘍細胞増殖抑制剤の有効成分として使用することができる。

本発明のアンチセンスヌクレオチドまたは転写を活性化する機能が欠損したHNF 4 α タンパク質をコードするDNAを有効成分として含有する腫瘍細胞増殖抑制剤(以下、本発明の遺伝子治療剤と略す)は、該DNAを上記(1)に示した発現ベクターに組み込んで得られる組換え体DNAおよび遺伝子治療剤に用いる基剤を調合することにより製造することができる〔Nature Genet., 8, 42(1994)〕。

本発明の遺伝子治療剤に用いる基剤としては、通常注射剤に用いる基剤であればどのようなものでもよく、蒸留水、塩化ナトリウム又は塩化ナトリウムと無機塩との混合物等の塩溶液、マンニトール、ラクトース、デキストラン、グルコース等の糖溶液、グリシン、アルギニン等のアミノ酸溶液、有機酸溶液又は塩溶液とグルコース溶液との混合溶液等があげられる。また常法に従い、これらの基剤に浸透圧調整剤、pH調整剤、ゴマ油、ダイズ油等の植物油またはレシチンもしくは非イオン界面活性剤等の界面活性剤等の助剤を用いて、溶液、懸濁液、分散液として注射剤を調製してもよい。これらの注射剤を、粉末化、凍結乾燥等の操作により、用時溶解用製剤として調製することもできる。本発明の遺伝子治療剤は、液体の場合はそのまま、個体の場合は必要により滅菌処理をした上記の基剤に遺伝子治療の直前に溶解して治療に使用することができる。

本発明の遺伝子治療剤を細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターを利用した遺伝子導入方法、あるいは非ウイルス性の遺伝子導入方法〔Gene Ther., 10, 826 (2000)、Gene Ther., 10, 844 (2000)〕等、いずれの方法も適用することができる。

ウイルスベクターによる遺伝子導入方法としては、例えばレトロウイルス、アデノ

ウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス等のDNAウイルス、またはRNAウイルスに、HNF 4 α DNAのアンチセンス鎖またはHNF 4 α 変異タンパク質をコードするDNA等の本発明に用いられるDNAを組み込んで導入する方法があげられる。このうち、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルスを用いた方法が、特に好ましい。

非ウイルス性の遺伝子導入方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与方法（DNAワクチン法）、リボソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等があげられ、特にDNAワクチン法、リボソーム法が好ましい。

本発明の遺伝子治療剤を実際に医薬として作用させるには、DNAを直接体内に導入する *in vivo* 法、およびヒトからある種の細胞を取り出し体外でDNAを該細胞に導入し、その細胞を体内に戻す *ex vivo* 法がある〔*Semin Oncol.*, 25, 661 (1998)、*Int. J. Hematol.*, 71, 203 (2000)〕が、*in vivo* 法が好ましく用いられる。

本発明の遺伝子治療剤を *in vivo* 法により投与する場合は、疾患、症状等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等に投与することができる。*in vivo* 法により投与する場合は、一般的には注射剤等とされ、必要に応じて慣用の担体を加えてもよい。また、リボソームまたは膜融合リボソーム（センダイウイルス（HVJ）ーリボソーム等）の形態にした場合は、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリボソーム製剤とすることができる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 8 \text{mg}/\text{kg}$ である。

（5）腫瘍細胞増殖抑制活性の測定方法

本発明の腫瘍細胞増殖抑制剤について、腫瘍細胞増殖抑制活性の測定は、以下の方法で行う。

まず、本発明の腫瘍細胞増殖抑制剤を、上記（1）で得られるHNF 4 α タンパク質を産生している細胞または既存のHNF 4 α タンパク質を産生している細胞に作用させる。

本発明の腫瘍細胞増殖抑制剤を該細胞に作用させる方法としては、該腫瘍細胞増殖抑制剤が遺伝子治療剤である場合は該遺伝子治療剤を該細胞に導入する方法を、該腫瘍細胞増殖抑制剤が遺伝子治療剤以外である場合は、該腫瘍細胞増殖抑制剤を細胞に

接触させる方法を、それぞれ用いることができる。

次に、該細胞を培地で培養し、生細胞数を測定する。生細胞数はミトコンドリア内に存在する脱水素酵素活性を指標にする。該脱水素酵素活性は、テトラゾリウム塩であるXTT (Sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis-(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) を代謝して水溶性のフォルマザン色素を形成する。この酵素反応は生細胞においてのみ行われることから、色素の吸光度を測定することで生細胞の定量を行うことができる。

作用させる細胞としては、例えば大腸癌由来の細胞であるHCT116 (ATCC:CCL-247) およびSW480 (ATCC:CCL-228) があげられる。細胞へのDNAの導入法としては、例えばリポフェクション法 [Science., 260, 1510 (1993)、J. Biol. Chem., 266, 18162 (1991)] があげられる。

以上の測定方法により、作製した腫瘍細胞増殖抑制剤の中から、腫瘍細胞の細胞株に対してすぐれた増殖抑制作用を示すものを容易に選択することができる。

(6) 本発明の腫瘍細胞増殖抑制剤を用いた腫瘍細胞増殖抑制方法

本発明の腫瘍細胞増殖抑制剤は、上記(2)または(4)に示す投与量および投与方法により投与することで、腫瘍細胞の増殖を抑制することができる。

図面の簡単な説明

第1図 1図は、各種ヒト癌細胞株でのHNF4 α タンパク質をコードするmRNAの発現パターンを示す図である。大腸癌細胞株4種 (LS180、WiDr、SW480、HCT116) および肝癌細胞株HepG2において、HNF4 α タンパク質をコードするmRNAの発現することが示されている。

第2図 2図は、HNF4 α DNAのアンチセンスRNAを発現させるためのプラスミド構築を示す図である。ベクターは、pcDNA3.1(+)を用いた。

第3図 3図Aは、HNF4 α DNAのアンチセンス鎖の発現による大腸癌細胞株HCT116およびSW480の増殖抑制を示す図である。該アンチセンス鎖の発現量に依存して細胞増殖が抑制されることが示されている。第3図Bは、HNF4 α タンパク質をコードするmRNAの発現量が該アンチセンスRNAの発現によって減少することを示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下の参考例および実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1 種々の癌由来の培養細胞株でのHNF4 α DNAの発現

(1) 種々の癌由来の培養細胞株の培養とmRNAおよび単鎖DNAの調製

ヒト大腸癌由来のLS180細胞株、WiDr細胞株、SW480細胞株、ヒト肝癌由来のHepG2細胞株、ヒト腎癌由来のACHN細胞株、ヒト乳癌由来のT47D細胞株、ヒト胃癌由来のAZ521細胞株、MKN74細胞株、ヒト膵臓癌由来のBXPc-3細胞株、PANC-1細胞株、ヒト皮膚癌由来のSKMEL-26細胞株、ヒト前立腺癌由来のDU145細胞株、LNCaP細胞株およびヒト子宮頸癌由来のHeLaS3細胞株を10%牛胎児血清（JRHバイオサイエンス社製）を含む最少必須培地（日本水産社製）中で、直径100mmの培養皿にコンフルエントの状態近くになるまで培養した。同様に、ヒト大腸癌由来のHCT116細胞株は10%牛胎児血清（JRHバイオサイエンス社製）を含むマッコイ改変培地（ギブコ社製）中で培養した。

培養後、培地を除去し、リン酸緩衝液生理食塩水（以下PBSと略称する）で洗浄した。得られた細胞から、市販のRNイーザープラントミニキット（キアゲン社製）を用いて全RNAを回収し、それぞれ約100 μ gの全RNAを得た。

市販の単鎖DNA合成キット（ギブコ社製）を用いて、以下の方法により、全RNAから単鎖DNAを取得した。まず、上記で得られた全RNAを5 μ g含む滅菌水11 μ lにオリゴdTプライマー1 μ lを加えて混合した後、70 $^{\circ}$ Cにて10分間加熱した。該混合液に該キットに添付の反応緩衝液を最終反応量20 μ lとなるように添加した。さらに逆転写酵素を加え、42 $^{\circ}$ Cにて1時間加温してmRNAのみ逆転写反応を行い、単鎖DNAを取得した。

(2) PCR法による発現の検出（第1図）

得られた単鎖DNAを鋳型に、PCR法によりHNF4 α DNAの増幅を行った。なお、内部標準としてアクチン遺伝子を用い、該遺伝子の増幅も同時に行った。該PCRにおいて、HNF4 α DNAのみを増幅することのできるオリゴヌクレオチドDNA（配列番号1および2）、およびアクチン遺伝子のみを増幅することのできるオリゴヌクレオチドDNA（配列番号3および4）を市販のDNA合成機（パーセプティブバイオシステム社製）により合成した。これらのオリゴヌクレオチドDNAをプライマーとして、HNF4 α DNAおよびアクチン遺伝子断片の増幅を以下の方法で行った。

上記で得られた単鎖DNA溶液を50倍に希釈したもの2 μ lにプライマーを各4pmol加えて混合した。該混合液に最終反応量が20 μ lになるように、ExTaqキット（宝酒造）

に添付の10×PCR反応緩衝液およびdNTP溶液を適量加え、94℃で5分間静置した。静置後、0.1μlのポリメラーゼを加え、94℃-1分間、52℃-1分間、72℃-1分30秒間を1サイクルとして、HNF4αDNAの増幅には28サイクル、アクチン遺伝子の増幅には18サイクル行った。

PCR反応産物を2%アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイド染色を行った。UVランプ下で確認したところ、ヒト大腸癌由来のLS180細胞株、WiDr細胞株、SW480細胞株、HCT116細胞株において、HNF4αDNAの増幅DNA断片が確認された。該遺伝子の発現量は、既に発現が報告されているヒト肝癌由来のHepG2細胞株と同程度であった。その他の癌細胞株では該遺伝子の発現が検出されないことから、HNF4αタンパク質をコードするRNAの発現は大腸由来の癌細胞に特異的であることが明らかとなった。

実施例2 HNF4αDNAのアンチセンス鎖の発現による大腸癌細胞株の増殖抑制

(1) HNF4αDNAのアンチセンス鎖発現ベクターの造成 (第2図)

上記実施例1(2)の操作でHCT116細胞株より得られた単鎖DNAを鋳型として以下の方法で、HNF4αDNAの翻訳可能領域部をPCR法にて増幅して、クローニングを行った。

配列番号5および6に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドDNAをDNA合成機(パーセプティブバイオシステム社製)により合成した。これらのオリゴヌクレオチドDNA各10pmolをHCT116細胞株より得られた単鎖DNA5μlに加えて混合した。得られた混合液に、最終反応量50μlになるようにLA-PCRキット(宝酒造社製)添付の10×PCR反応緩衝液およびdNTP溶液を添加し、94℃で5分間静置した。さらにポリメラーゼを加え、94℃-1分間、50℃-1分間、72℃-3分間を1サイクルとして、25サイクル繰り返した。

該反応により増幅したHNF4αDNA断片を、アガロース電気泳動法により分離し、精製した。得られたHNF4αDNA断片はプライマー末端に制限酵素HindIII、BamHI(宝酒造)切断部位を有している。該DNA断片をこれらの制限酵素で処理し粘着末端とした。一方、市販の培養細胞発現用プラスミドpcDNA3.1(+)(インビトロジェン社製)をHindIII、BamHIで切断した。該切断プラスミド断片と該DNA断片とを市販のライゲーションキット(宝酒造)を用いて連結し、HNF4αDNAのアンチセンス鎖(配列番号7)を発現可能なプラスミドを作成した。

(2) 大腸癌細胞株の増殖抑制活性の検出 (第3図)

上記で作成したプラスミドを大腸癌由来の細胞株HCT116およびSW480に導入した。得られた細胞を、上記実施例1(1)で示した培地で、6穴プレート(住友ベークライト)にて培養した。1穴あたり 5×10^4 個の細胞になる様に播種し、一晚培養した。上記(1)で作成したアンチセンス鎖発現プラスミドおよびpcDNA3.1プラスミドの混合比率を、それぞれ5:0、4:1、3:2、2:3、1:4、0:5となるように混合した後、リポフェクション法により該DNA混合物を $3 \mu\text{g}$ ずつ培養細胞に導入した。該DNA混合物を導入した細胞を3日間培養した後、以下の方法で生細胞数を測定した。

細胞増殖測定キット(XTT)添付のXTT標識試薬と電子カップリング試薬を50:1の比率で混合した後、該混合液を培地の半分量、培養皿に添加し適当な3時間培養した。呈色した培養液の吸光度を480nmの波長にて測定した。その結果、アンチセンス鎖発現プラスミド量に比例して細胞増殖が抑制されていることを確認した(第3図A)。また、アンチセンス鎖の発現が、各細胞株でのHNF4 α タンパク質をコードするmRNAの発現に及ぼす影響を調べた。

pcDNA3.1プラスミドもしくはアンチセンス鎖発現プラスミド $3 \mu\text{g}$ をHCT116およびSW480細胞に導入し、24時間後細胞よりRNAを回収し上記で示したPCR法により検出したところ、HNF4 α タンパク質をコードするmRNAの発現量はアンチセンス鎖を発現した細胞で低下していることを確認した(第3図B)。

産業上の利用可能性

本発明により、核内受容体HNF4 α タンパク質またはその変異体をコードするDNAを有効成分として含有する新規な抗腫瘍遺伝子治療剤が提供される。また、HNF4 α DNAの発現抑制剤もしくはHNF4 α タンパク質機能阻害剤を有効成分とする抗腫瘍剤が提供される。とりわけ本発明の抗腫瘍遺伝子治療剤および抗腫瘍剤は大腸癌由来の細胞において効果を発揮するものであるため、HNF4 α タンパク質を過剰産生した大腸癌に対する治療剤として有用である。

配列表フリーテキスト

配列番号1ー人工配列の説明：合成DNA

配列番号2ー人工配列の説明：合成DNA

配列番号3ー人工配列の説明：合成DNA

配列番号4ー人工配列の説明：合成DNA

配列番号5ー人工配列の説明：合成DNA

配列番号6ー人工配列の説明：合成DNA

請求の範囲

1. HNF 4 α タンパク質の過剰産生により増殖する腫瘍細胞の増殖を抑制する活性を有する物質を有効成分として含有する腫瘍細胞増殖抑制剤。
2. HNF 4 α タンパク質の過剰産生により増殖する腫瘍細胞の増殖を抑制する活性を有する物質が、HNF 4 α タンパク質の発現を阻害する物質である、請求項 1 記載の腫瘍細胞増殖抑制剤。
3. HNF 4 α タンパク質の発現を阻害する物質が、HNF 4 α タンパク質の発現を阻害するヌクレオチドである、請求項 2 記載の腫瘍細胞増殖抑制剤。
4. HNF 4 α タンパク質をコードするDNAの発現を阻害するヌクレオチドが、HNF 4 α タンパク質をコードするDNAのアンチセンスヌクレオチドである、請求項 3 記載の腫瘍細胞増殖抑制剤。
5. アンチセンスヌクレオチドが、5～60塩基のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドである、請求項 4 記載の腫瘍細胞増殖抑制剤。
6. アンチセンスヌクレオチドが、配列番号 7 で表される塩基配列を有するDNAである、請求項 4 記載の腫瘍細胞増殖抑制剤。
7. アンチセンスヌクレオチドが、配列番号 7 で表される塩基配列の相補配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつHNF 4 α タンパク質の発現を阻害するヌクレオチドである、請求項 4 記載の腫瘍細胞増殖抑制剤。
8. 配列番号 7 で表される塩基配列を有するDNA。
9. 配列番号 7 で表される塩基配列の相補配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつHNF 4 α タンパク質の発現を阻害するDNA。
10. 請求項 8 または 9 記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。
11. 請求項 10 記載の組換え体DNAを有効成分として含有する、請求項 1 記載の腫瘍細胞増殖抑制剤。
12. HNF 4 α タンパク質の過剰産生により増殖する腫瘍細胞の増殖を抑制する活性を有する物質が、HNF 4 α タンパク質による転写の活性化を阻害する物質である、請求項 1 記載の腫瘍細胞増殖抑制剤。
13. HNF 4 α タンパク質による転写の活性化を阻害する物質が、転写を活性化する機能が欠損したHNF 4 α タンパク質である、請求項 12 記載の腫瘍細胞増殖抑制剤。

14. 転写を活性化する機能が欠損したHNF 4 α タンパク質が、HNF 4 α タンパク質のリガンド結合部位が一部またはすべてを欠失したHNF 4 α タンパク質である、請求項13記載の腫瘍細胞増殖抑制剤。

15. 転写を活性化する機能が欠損したHNF 4 α タンパク質が、HNF 4 α タンパク質の転写促進部位またはDNA結合部位のみを有するHNF 4 α タンパク質である、請求項13記載の腫瘍細胞増殖抑制剤。

16. 転写を活性化する機能が欠損したHNF 4 α タンパク質をコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを有効成分として含有する、請求項1記載の腫瘍細胞増殖抑制剤。

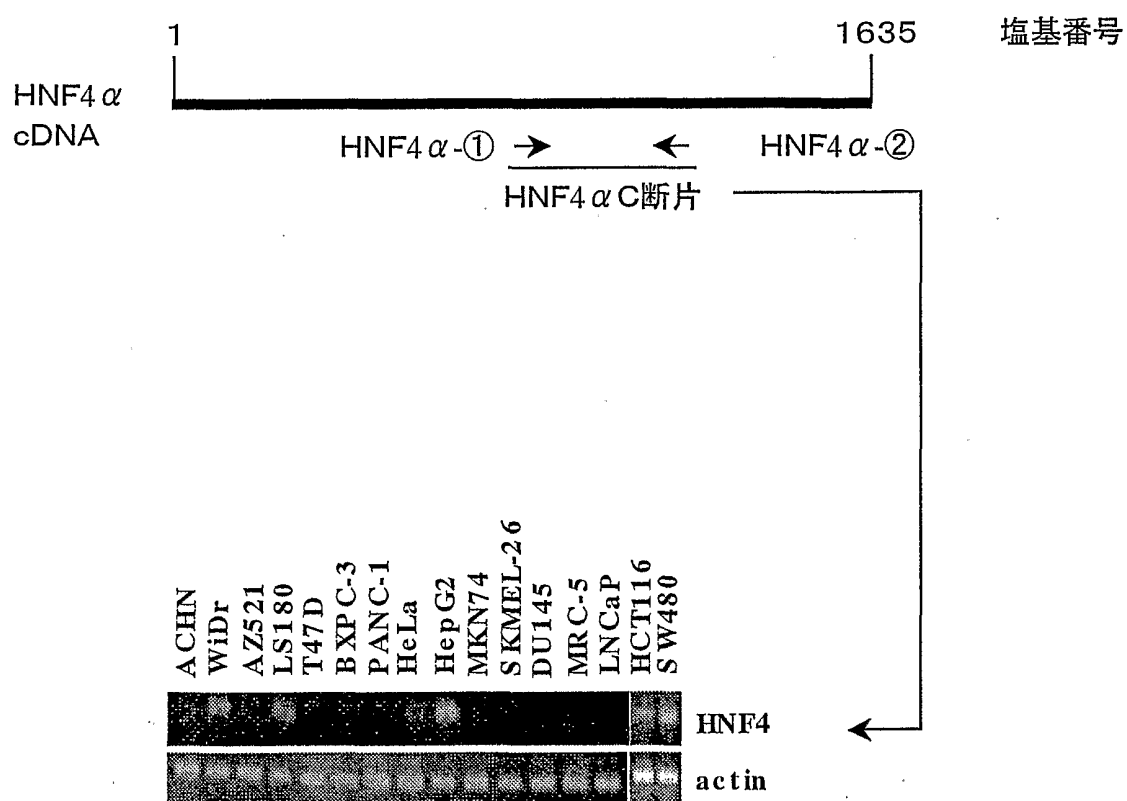
17. 組換え体DNAに用いられるベクターがウイルスベクターである、請求項11または16記載の腫瘍細胞増殖抑制剤。

18. HNF 4 α タンパク質による転写の活性化を阻害する物質が、HNF 4 α 受容体のアンタゴニストである、請求項12記載の腫瘍細胞増殖抑制剤。

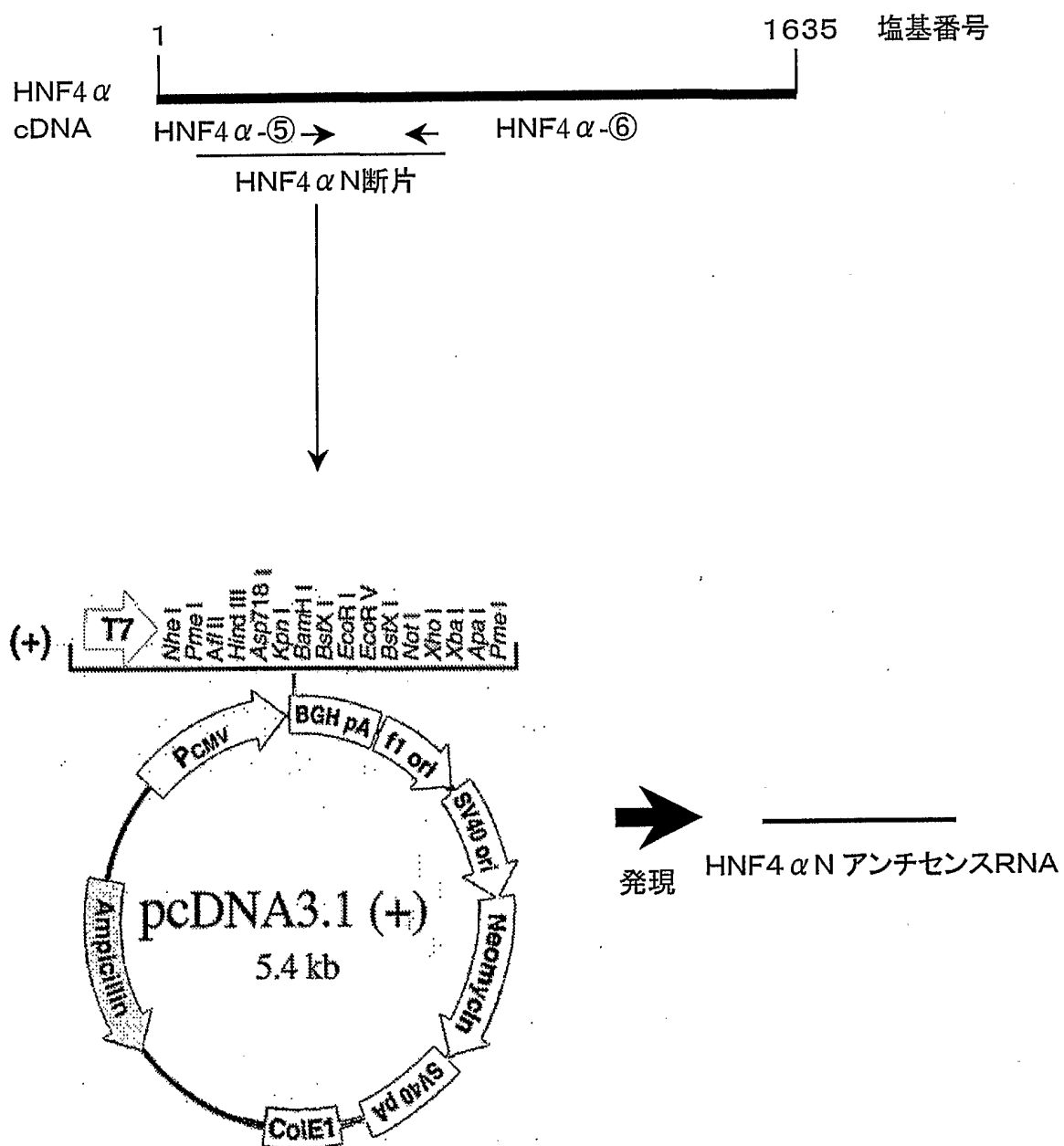
19. 腫瘍細胞増殖抑制剤が、大腸癌細胞の増殖抑制剤である、請求項1～7、11～18いずれか1項に記載の腫瘍細胞増殖抑制剤。

20. 請求項1～7、11～19いずれか1項に記載の腫瘍細胞増殖抑制剤を腫瘍細胞に作用させることを特徴とする腫瘍細胞増殖抑制方法。

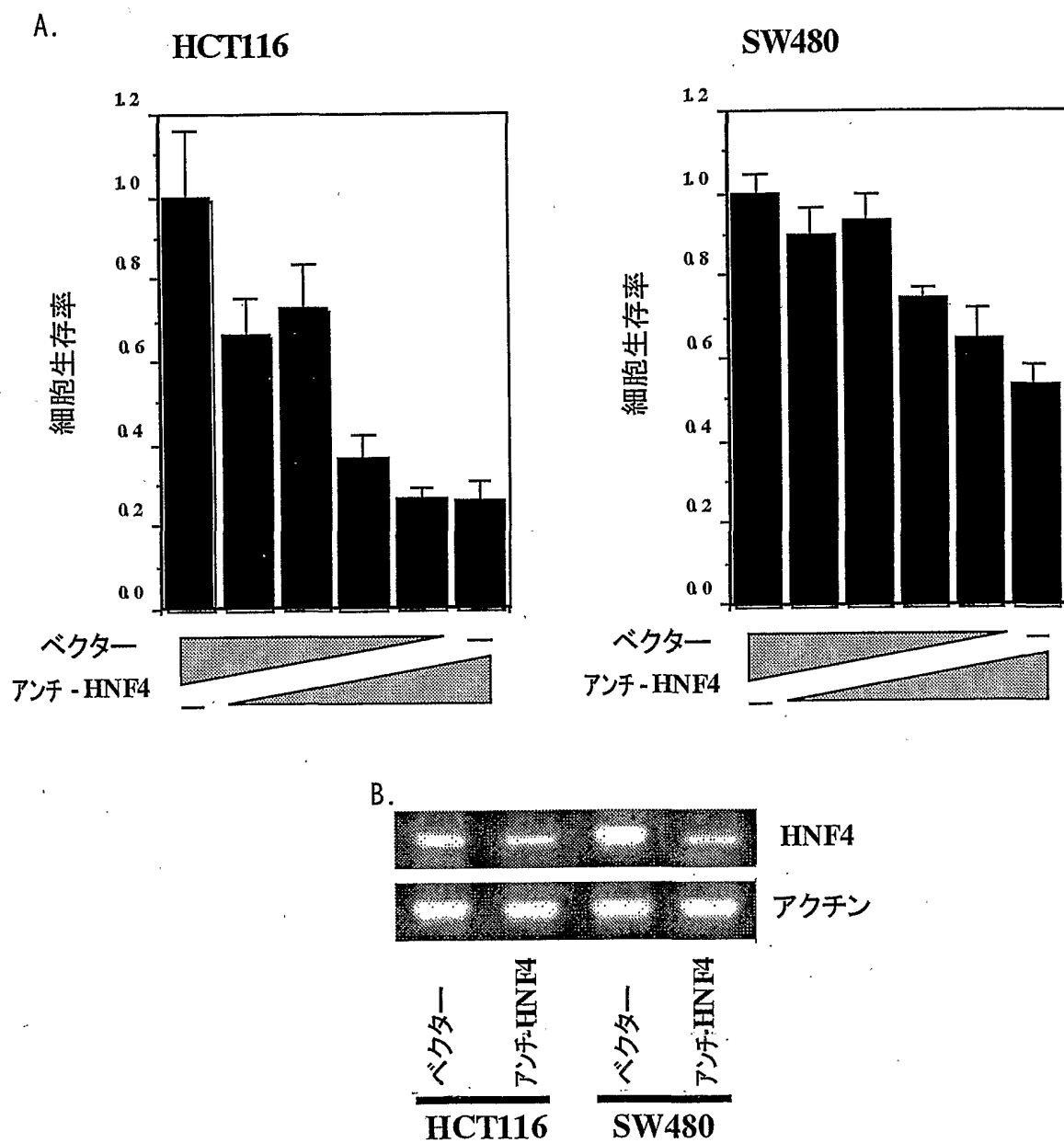
第1図



第2図



第3図



SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Agent for inhibiting tumor cell-proliferation

<130> 1341

<140>

<150> JP2000-285371

<151> 2000-09-20

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 1

tgccaagat tgacaacctg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 2

cggcttgcta gataacttcc

20

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 3

gatatcgccg cgctcgctgt cgac

24

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 4

caggaaggaa ggctggaaga gtgc

24

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 5

ctcggatcct gaacaccatg gatctcttgg 30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 6

ctcaagctta tggacatggc cgactacagt 30

<210> 7

<211> 691

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

tgaacaccat ggatctcttg gtggctccga gcagcaggtg ctcgccagca tgggctctga 60
gcagggccac ctggtcgtec agggggagct cgcagaaagc tgggatgtac ttggcccact 120
caacgagaac cagcagctgc tccttcattg actcacacac atctgcgatg ctggcaatct 180
tcttcgcccg aatgtcgccg ttgatcccg agacggggga ggtgatctgt cgggacagga 240

cctccgcctg caggagcgca ttgatggagg gcaggctgct gtcctcatag cttgaccttc 300
gagtgetgat ccggteccgc tcattctgga cggcttcctt cttcatgcca gcccggaagc 360
atttcttgag cctgcagtag cggcactggg tectcttgtc cttgtccacc acgcactgcc 420
ggctaaatct gcaggagtac atgtggttct tccgcacgct cctccggaag aagcccttgc 480
agccgtcaca gctcgaggca ccgtagtggt tgcccgtggc ccggtecccg cagatggcac 540
acagggcgct gacacccagg ctgttgggcg cgttgagggt ggtgccttct gatggggacg 600
tgtcattgcc catcgtaac acctgcacat tctcaaattc cagggtggtg taggctgggt 660
ccagtgcage actgtagteg gccatgtcca t 691

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08139

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K45/00, 31/711, 35/76, A61P35/00, C12N15/11

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)

Int.Cl.⁷ A61K45/00, 31/711, 35/76, A61P35/00, C12N15/11

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2001
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2001	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2001

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

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), REGISTRY (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
XY	WO 99/00116 A2 (Yissum Research Development Company of the Hebrew University of Jerusalem), 07 January, 1999 (07.01.99), Full text; especially, page 3, line 7 to page 4, line 30 & US 6303653 B1	2-19
XY	WO 98/23780 A1 (Joslin Diabetes Center, Inc.), 04 June, 1998 (04.06.1998), Full text; especially, Sequence No.1 (Family: none)	8-10
Y	GALSON, Deborah L. et al., "The orphan receptor hepatic nuclear factor 4 functions as a transcriptional activator for tissue-specific and hypoxia-specific erythropoietin geneexpression and is antagonized by EAR3/COUP-TF1", Molecular and Cellular Biology, (1995), Vol.15, No.4, pages 2135 to 2144	12-17



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 document but published on or after the international filing date

"L"

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

"O"

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

"P"

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

"T"

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

"X"

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

"Y"

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

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 December, 2001 (13.12.01)

Date of mailing of the international search report

25 December, 2001 (25.12.01)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08139

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SEL, Saadettin et al., "Human renal cell carcinogenesis is accompanied by a coordinate loss of the tissue specific transcription factors HNF4 α and HNF1 α ", Cancer Letters, (1996), Vol.101, No.2, pages 205 to 210	2-19
A	VARGA, E. V. et al., "Decrease of HNF4 α mRNA level correlates with rapid progression of HCC", Molecular and Cell Biology, (1999), Vol.30, Suppl.1, page 209	2-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08139

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.: 20
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 20 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☒ Claims Nos.: 1
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

(See extra sheet.)
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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

It is recognized that the invention as set forth in claim 2 of the present case relates to a tumor cell proliferation inhibitor containing as the active ingredient a substance inhibiting the expression of the HNF4 α protein.

The inventions as set forth in claims 8 to 10 of the present case relate to a specific DNA having the base sequence represented by SEQ ID NO:7 and recombinant DNAs obtained by inserting the same into vectors. The invention of the DNA *per se* differs in problem to be solved from the inventions aiming at providing a medicinal use as the active ingredient of a group of substances having a specific function which are not restricted to the use of the DNA according to claim 2.

Such being the case, the inventions as set forth in claims 8 to 10 and the drug of the invention as set forth in claim 2 are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08139

Continuation of Box No. I-2 of continuation of first sheet (1)

The invention as set forth in claim 1 relates to "tumor cell proliferation inhibitors containing a substance inhibiting the proliferation of tumor cells which proliferate due to the excessive production of a nuclear receptor HNF4 α protein as the active ingredient". However, it is self-evident that in case where the substance employed as the active ingredient has "an activity of inhibiting the proliferation of tumor cells which proliferate due to the excessive production of a nuclear receptor HNF4 α protein", then the use as "tumor cell proliferation inhibitors" can be achieved. That is to say, no active ingredient for providing the medicinal use as "tumor cell proliferation inhibitors" is specified in this claim.

Such being the case, claim 1 fails to satisfy the definite requirements to such an extent as enabling meaningful international search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ A61K45/00, 31/711, 35/76, A61P35/00, C12N15/11		
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 (IPC))		
Int. Cl ⁷ A61K45/00, 31/711, 35/76, A61P35/00, C12N15/11		
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 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2001年 日本国登録実用新案公報 1994-2001年 日本国実用新案登録公報 1996-2001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)		
CAPLUS (STN) BIOSIS (STN) REGISTRY (STN) EMBASE (STN) MEDLINE (STN) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
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
XY	WO 99/00116 A2 (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM) 7.1月.1999 (07.01.99) 全文、特に第3頁第7行-第4頁第30行 & US 6303653 B1	2-19
XY	WO 98/23780 A1 (JOSLIN DIABETES CENTER, INC.) 4.6月.1998 (04.06.98) 全文、特に配列1 (ファミリーなし)	8-10
☒ 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	13.12.01	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 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) 森井 隆信 電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 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
Y	GALSON, Deborah L. et al, The orphan receptor hepatic nuclear factor 4 functions as a transcriptional activator for tissue-specific and hypoxia-specific erythropoietin gene expression and is antagonized by EAR3/COUP-TF1, MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 1995, Vol.15, No.4, pp2135-2144	12-17
A	SEL, Saadettin et al, Human renal cell carcinogenesis is accompanied by a coordinate loss of the tissue specific transcription factors HNF4 α and HNF1 α , Cancer Letters, 1996, Vol.101, No.2, pp205-210	2-19
A	VARGA, E. V. et al, Decrease of HNF4 α mRNA level correlates with rapid progression of HCC, Molecular and Cell Biology, 1999, Vol.30, Suppl.1, p209	2-19

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 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。

1. ☒ 請求の範囲 20 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲20は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☒ 請求の範囲 1 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
特別ページ参照
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT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。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

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この国際調査機関は認めた。

本願の請求の範囲2に係る発明は、HNF4 α タンパク質の発現を阻害する物質を有効成分として含有する腫瘍細胞増殖抑制剤であると認められる。

そして、本願の請求の範囲8-10に係る発明は、配列番号7で表される塩基配列を有する特定のDNAとそれをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAであると認められる。

当該DNA自体の発明と、請求の範囲2に係る、このDNAの使用に限定されないある特定の機能を有する一群の物質についてこれを有効成分として医薬用途を提供せんとするものとは課題が異なる。

したがって、請求の範囲8-10に係る発明は、請求の範囲2に係る発明である医薬と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には該当しない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

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なかった。

請求の範囲1に係る発明は、「HNF4 α タンパク質の過剰生産により増殖する腫瘍細胞の増殖を抑制する活性を有する物質を有効成分として含有する腫瘍細胞増殖抑制剤」であるが、有効成分として採用する物質が「HNF4 α タンパク質の過剰生産により増殖する腫瘍細胞の増殖を抑制する活性」を有していれば、「腫瘍細胞増殖抑制剤」という用途が達成されるのは自明であり、してみると当該請求の範囲は、何ら「腫瘍細胞増殖抑制剤」という医薬用途を提供するための有効成分を特定する記載にはなっていない。

したがって、請求の範囲1の記載は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない。