

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5339291号
(P5339291)

(45) 発行日 平成25年11月13日(2013.11.13)

(24) 登録日 平成25年8月16日(2013.8.16)

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/09 (2006.01)
C 12 Q 1/48 (2006.01)

F 1

C 12 N 15/00 Z N A A
C 12 Q 1/48 Z

請求項の数 4 (全 139 頁)

(21) 出願番号 特願2009-504513 (P2009-504513)
 (86) (22) 出願日 平成19年8月10日 (2007.8.10)
 (65) 公表番号 特表2010-500003 (P2010-500003A)
 (43) 公表日 平成22年1月7日 (2010.1.7)
 (86) 國際出願番号 PCT/JP2007/065992
 (87) 國際公開番号 WO2008/018642
 (87) 國際公開日 平成20年2月14日 (2008.2.14)
 審査請求日 平成22年8月5日 (2010.8.5)
 (31) 優先権主張番号 60/837,428
 (32) 優先日 平成18年8月10日 (2006.8.10)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 60/840,250
 (32) 優先日 平成18年8月25日 (2006.8.25)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 502240113
 オンコセラピー・サイエンス株式会社
 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (74) 代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦
 (74) 代理人 100130845
 弁理士 渡邊 伸一
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】乳癌に関する遺伝子およびポリペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

TOPKのキナーゼ活性を阻害する作用物質のスクリーニング方法であって、

(a) 以下のもの：

(1) SEQ ID NO : 92のアミノ酸配列を含むポリペプチド；
 (2) 1つまたは複数のアミノ酸が付加、置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO : 92のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO : 92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等なリン酸化活性を有する、ポリペプチド；
 (3) SEQ ID NO : 92に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO : 92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等なリン酸化活性を有するポリペプチド；および

(4) SEQ ID NO : 91のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジメントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO : 92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等なリン酸化活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチドを、基質としてのヒストンH3、または少なくともSer10を含むその断片、および作用物質と接触させる段階；

(b) 基質のリン酸化レベルを検出する段階；

(c) 基質のリン酸化レベルを、作用物質の非存在下で検出される基質のリン酸化レベルと比較する段階；ならびに

(d) 基質のリン酸化レベルを低下させた作用物質を、インヒビターとして選択する段階を含む方法。

【請求項 2】

TOPKを発現する細胞のアポトーシスを誘導する作用物質のスクリーニング方法であって、

(a) 以下のもの：

(1) SEQ ID NO : 92のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) 1つまたは複数のアミノ酸が付加、置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO : 92のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO : 92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等なリン酸化活性を有する、ポリペプチド；

(3) SEQ ID NO : 92に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO : 92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等なリン酸化活性を有するポリペプチド；および

(4) SEQ ID NO : 91のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジメントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO : 92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等なリン酸化活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチドを、基質としてのヒストンH3、または少なくともSer10を含むその断片、および作用物質と、基質のリン酸化を可能にする条件下で接触させる段階；

(b) 基質のリン酸化レベルを検出する段階；

(c) 基質のリン酸化レベルを、作用物質の非存在下で検出される基質のリン酸化レベルと比較する段階；ならびに

(d) 基質のリン酸化レベルを低下させた作用物質を、細胞のアポトーシスを誘導する作用物質として選択する段階を含む方法。

【請求項 3】

乳癌細胞のアポトーシスを誘導する作用物質のスクリーニング方法であって、

(a) 以下のもの：

(1) SEQ ID NO : 92のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) 1つまたは複数のアミノ酸が付加、置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO : 92のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO : 92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等なリン酸化活性を有する、ポリペプチド；

(3) SEQ ID NO : 92に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO : 92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等なリン酸化活性を有するポリペプチド；および

(4) SEQ ID NO : 91のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジメントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO : 92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等なリン酸化活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチドを、基質としてのヒストンH3、または少なくともSer10を含むその断片、および作用物質と、基質のリン酸化を可能にする条件下で接触させる段階；

(b) 基質のリン酸化レベルを検出する段階；

(c) 基質のリン酸化レベルを、作用物質の非存在下で検出される基質のリン酸化レベルと比較する段階；ならびに

(d) 基質のリン酸化レベルを低下させた作用物質を、乳癌細胞のアポトーシスを誘導する作用物質として選択する段階を含む方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4】

乳癌を予防または治療するための作用物質のスクリーニング方法であって、

(a) 以下のもの：

(1) SEQ ID NO : 92のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) 1つまたは複数のアミノ酸が付加、置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO : 92のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO : 92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等なリン酸化活性を有する、ポリペプチド；

(3) SEQ ID NO : 92に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO : 92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等なリン酸化活性を有するポリペプチド；および

(4) SEQ ID NO : 91のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジメントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO : 92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等なリン酸化活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチドを、基質としてのヒストンH3、または少なくともSer10を含むその断片、および作用物質と、基質のリン酸化を可能にする条件下で接触させる段階；

(b) 基質のリン酸化レベルを検出する段階；

(c) 基質のリン酸化レベルを、作用物質の非存在下で検出される基質のリン酸化レベルと比較する段階；ならびに

(d) 基質のリン酸化レベルを低下させた作用物質を、乳癌を治療または予防するための作用物質として選択する段階

を含む方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本出願は、内容の全体が参照により本明細書に組み入れられる、2006年8月10日に出願された米国仮特許出願第60/837,428号、2006年8月25日に出願された米国仮特許出願第60/840,250号、および2007年4月30日に出願された米国仮特許出願第60/915,022号の恩典を主張する。

【0002】**発明の分野**

本発明は生物科学の分野に関し、より具体的には癌研究の分野に関する。特に、本発明は、乳癌の増殖機構に関する癌関連遺伝子A7322、F3374、およびPBK / TOPK、ならびにこれらの遺伝子によってコードされるポリペプチドに関する。本発明の遺伝子およびポリペプチドは、例えば、乳癌の予後予測および診断、ならびに、乳癌に対する薬剤を開発するための標的分子として、用いることができる。

【背景技術】**【0003】****発明の背景**

乳癌は遺伝的に不均一な疾患であり、女性で最も一般的な悪性疾患である。全世界で毎年、推定で約80万件の新たな症例が報告してきた (Parkin DM, et al., (1999). CA Cancer J Clin 49:33-64)。現在でも、乳房切除術が医療処置の第一の選択肢である。原発性腫瘍の外科的除去を行っても、診断時点では検出不可能な微小転移のために局所または遠隔部位での再発が起こる可能性がある (Saphner T, et al., (1996). J Clin Oncol, 14, 2738-46)。このような残存細胞または前癌細胞を死滅させることを狙いとして、手術後には通常、アジュバント療法として細胞傷害剤を投与する。従来の化学療法剤による治療は経験に拠ることが多く、主として組織学的な腫瘍要因に基づいている。このため、特異的な機構の理解がない状況では、標的指向性薬剤が乳癌に対する基礎的な治療となりつつある。タモキシフェンおよびアロマターゼ阻害薬はこの種のものを代表する2つ

10

20

30

40

50

であり、転移性乳癌を有する患者にアジュバントまたは化学予防薬として用いる場合に効果的な反応を引き起こすことが証明されている (Fisher B, et al., (1998). J Natl Cancer Inst, 90, 1371-88; Cuzick J (2002). Lancet 360, 817-824)。しかしながら、その欠点は、エストロゲン受容体を発現している患者しか、これらの薬物に対して感受性がないことである。さらに、最近これらの副作用に関する懸念が増加してきている。例えば、閉経後の女性における、長期間タモキシフェン処方による子宮内膜癌およびアロマターゼ療法による骨折である (Coleman RE (2004). Oncology. 18 (5 Suppl 3), 16-20)。

【 0 0 0 4 】

診断および治療の方法の最近の進歩にも関わらず、進行癌の患者の予後は依然として極めて悪い。腫瘍抑制遺伝子および/または癌遺伝子の変化が発癌に関与することが分子的な研究によって明らかになってきたが、その厳密なメカニズムは依然として不明である。10

【 0 0 0 5 】

cDNAマイクロアレイ技術は、正常細胞および悪性細胞における遺伝子発現の包括的なプロファイルを構築し、悪性細胞と対応する正常細胞における遺伝子発現を比較することを可能にした (Okabe et al., Cancer Res 61:2129-37 (2001); Kitahara et al., Cancer Res 61: 3544-9 (2001); Lin et al., Oncogene 21:4120-8 (2002); Hasegawa et al., Cancer Res 62:7012-7 (2002))。このアプローチは、癌細胞の複雑な性質の理解を促進し、発癌機構を解明するのに役立つ。腫瘍において脱制御される遺伝子を同定することによつて、個々の癌のより精密で正確な診断を得ることができ、新規治療標的を開発することができる (Bienz and Clevers, Cell 103:311-20 (2000))。ゲノム全体での観点から腫瘍の基礎となるメカニズムを明らかにするため、そして診断および新規治療薬を開発するための標的分子を発見するために、本発明者らは、遺伝子23,040個のcDNAマイクロアレイを用いて腫瘍細胞の発現プロファイルを解析した (Okabe et al., Cancer Res 61:2129-37 (2001); Kitahara et al., Cancer Res 61:3544-9 (2001); Lin et al., Oncogene 21: 4120-8 (2002); Hasegawa et al., Cancer Res 62:7012-7 (2002))。20

【 0 0 0 6 】

発癌機構を解明するために計画された研究は、抗腫瘍薬剤のための分子標的の同定を既に促進している。例えば、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤(FTI)は、Rasに関連した増殖シグナル伝達経路を阻害するように当初開発され、その活性化は翻訳後ファルネシリ化に依存しており、これまでに動物モデルにおいてRas依存性腫瘍の処置に有効であることが示されている (Sun J, et al., Oncogene. 1998;16:1467-73)。原癌遺伝子受容体HER2/neuに拮抗するための、抗癌剤と、抗HER2モノクローナル抗体であるトラスツズマブとの組み合わせを用いるヒトに対する臨床試験により、乳癌患者の臨床応答および総生存率の改善が得られている (Molina MA, et al., Cancer Res. 2001;61:4744-9)。bcr-abl融合タンパク質を選択的に不活性化するチロシンキナーゼインヒビターST1-571が、慢性骨髄性白血病を治療するために開発されている、ここで、bcr-ablチロシンキナーゼの恒常的な活性化は白血球の形質転換に重要な役割を果たしている。これらの種類の薬剤は、特定の遺伝子産物の発癌活性を抑制するように設計されている (O'Dwyer ME & Druker BJ, Curr Opin Oncol. 2000;12:594-7)。したがって、癌細胞において共通して上方制御される遺伝子産物は、新たな抗癌剤を開発するための潜在的な標的となり得る。30

【 0 0 0 7 】

例えば、遺伝子特異的siRNAを用いる癌療法の新たなアプローチが、臨床試験で試みられてきた (Bumcrot D et al., Nat Chem Biol 2006 Dec, 2(12):711-9)。RNAiは既に、主要技術基盤の中での地位を獲得していると考えられる (Putral LN et al., Drug News Perspect 2006 Jul-Aug, 19(6): 317-24; Frantz S, Nat Rev Drug Discov 2006 Jul, 5(7): 528-9; Dykxhoorn DM et al., Gene Ther 2006 Mar, 13(6):541-52)。それにも関わらず、RNAiを臨床用途に適用できる前には、いくつかの課題に取り組む必要がある。これらの課題には、インビオでのRNAの安定性の欠如 (Hall AH et al., Nucleic Acids Res 2004 Nov 15, 32(20): 5991-6000, Print 2004; Amarzguioui M et al., Nucleic Acids Res 2003 Jan 15, 31(2): 589-95)、薬剤としての毒性 (Frantz S, Nat Rev Drug Discov 2005 Jun, 4(6): 479-87) などがある。40

2006 Jul, 5(7): 528-9)、送達様式、用いるsiRNAまたはshRNAの正確な配列、および細胞タイプの特異性が含まれる。インターフェロン反応を活性化することによる、部分的に相同な遺伝子のサイレンシングまたは普遍的遺伝子抑制の誘導に関連して生じ得る毒性があることは、周知の事実である (Judge AD et al., Nat Biotechnol 2005 Apr, 23(4): 457-62, Epub 2005 Mar 20; Jackson AL & Linsley PS, Trends Genet 2004 Nov, 20(11): 521-4)。したがって、有害な副作用を持たない癌特異的遺伝子を標的とする二本鎖分子が、抗癌剤の開発には必要である。

【 0 0 0 8 】

または、CD8+細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) が、MHCクラスI分子上に提示された腫瘍関連抗原 (TAA) に由来するエピトープペプチドを認識し、腫瘍細胞を溶解することが実証されている。TAAの最初の例としてMAGEファミリーが発見されて以降、他にも多くのTAAが免疫学的アプローチを用いて発見されている (Boon, Int J Cancer 54: 177-80 (1993); Boon and van der Bruggen, J Exp Med 183: 725-9 (1996); van der Bruggen et al., Science 254: 1643-7 (1991); Brichard et al., J Exp Med 178: 489-95 (1993); Kawakami et al., J Exp Med 180: 347-52 (1994))。発見されたTAAの一部は現在、免疫療法の標的として臨床開発の段階にある。現在までに発見されたTAAには、MAGE (van der Bruggen et al., Science 254: 1643-7 (1991))、gp100 (Kawakami et al., J Exp Med 180: 347-52 (1994))、SART (Shichijo et al., J Exp Med 187: 277-88 (1998)) およびNY-ESO-1 (Chen et al., Proc Natl Acad Sci USA 94: 1914-8 (1997)) が含まれる。一方、腫瘍細胞において特異的に過剰発現されることが実証された遺伝子産物は、細胞性免疫応答を誘導する標的として認識されることが示されている。そのような遺伝子産物には、p53 (Umano et al., Brit J Cancer 84: 1052-7 (2001))、HER2/neu (Tanaka et al., Brit J Cancer 84: 94-9 (2001))、CEA (Nukaya et al., Int J Cancer 80: 92-7 (1999)) 等が含まれる。

【 0 0 0 9 】

TAAに関する基礎研究および臨床研究における著しい進歩にも関わらず (Rosenberg et al., Nature Med 4: 321-7 (1998); Mukherji et al., Proc Natl Acad Sci USA 92: 8078-82 (1995); Hu et al., Cancer Res 56: 2479-83 (1996))、乳癌を含む腺癌の治療に利用できるのは、ごく限られた数の候補TAAに過ぎない。癌細胞において大量に発現し、かつ同時に発現が癌細胞に制限されるTAAは、免疫療法の標的の有望な候補になると考えられる。さらに、強力かつ特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導する新しいTAAが同定されることにより、様々な種類の癌を対象としたペプチドワクチン接種戦略の臨床使用に弾みがつくと期待される (Boon and van der Bruggen, J Exp Med 183: 725-9 (1996); van der Bruggen et al., Science 254: 1643-7 (1991); Brichard et al., J Exp Med 178: 489-95 (1993); Kawakami et al., J Exp Med 180: 347-52 (1994); Shichijo et al., J Exp Med 187: 277-88 (1998); Chen et al., Proc Natl Acad Sci USA 94: 1914-8 (1997); Harris, J Natl Cancer Inst 88: 1442-55 (1996); Butterfield et al., Cancer Res 59: 3134-42 (1999); Vissers et al., Cancer Res 59: 5554-9 (1999); van der Burg et al., J Immunol 156: 3308-14 (1996); Tanaka et al., Cancer Res 57: 4465-8 (1997); Fujie et al., Int J Cancer 80: 169-72 (1999); Kikuchi et al., Int J Cancer 81: 459-66 (1999); Oiso et al., Int J Cancer 81: 387-94 (1999))。

【 0 0 1 0 】

ペプチドに刺激された特定の健常ドナー由来の末梢血単核細胞 (PBMC) は、該ペプチドに反応して有意なレベルのIFN- γ を産生するが、 ^{51}Cr 放出アッセイにおいてHLA-A24またはHLA-A0201に限定的な様式で腫瘍細胞に対する細胞傷害性を生じることはほとんどないと、繰り返し報告されている (Kawano et al., Cancer Res 60: 3550-8 (2000); Nishizuka et al., Cancer Res 60: 4830-7 (2000); Tamura et al., Jpn J Cancer Res. 92: 762-7 (2001))。しかし、HLA-A24とHLA-A0201の両方とも、白人集団と同様に日本人において一般的なHLA対立遺伝子である (Date et al., Tissue Antigens 47: 93-101 (1996); Kondo et al., J Immunol 155: 4307-12 (1995); Kubo et al., J Immunol 152: 3913-24

10

20

30

40

50

(1994); Imanishi et al., Proceeding of the eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference Oxford University Press, Oxford, 1065 (1992); Williams et al., *Tissue Antigen* 49: 129 (1997))。このため、これらのHLAによって提示される癌の抗原ペプチドは、日本人および白人集団における癌の治療に特に有用な可能性がある。さらに、インビトロでの低親和性CTLの誘導は通常、高濃度ペプチドの使用に起因することが公知であり、これにより抗原提示細胞(APC)上で高レベルの特異的ペプチド/MHC複合体が生成され、これが、該CTLを効率的に活性化すると考えられる (Alexander-Miller et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4102-7 (1996))。

【 0 0 1 1 】

乳癌発生機構を決定するため、ならびにこれらの腫瘍の治療のための新規診断マーカーおよび/または薬剤標的を同定するために、本発明者らは、27,648種の遺伝子を含むゲノム全域のcDNAマイクロアレイを用いて、乳癌の発生における遺伝子の発現プロファイルを分析した。薬理学な観点からは、発癌シグナルを抑制する方が腫瘍抑制作用の活性化を行うよりも現実的には容易である。このため、本発明者らは、乳癌の発生時に上方制御される遺伝子を探索した。

【 0 0 1 2 】

細胞傷害性薬物は重篤な有害反応を引き起こすことがあるため、十分特徴付けられた作用のメカニズムに基づき新規標的分子をよく検討して選択することで、最小限の副作用のリスクで有効な抗癌剤の開発が促進される。この目標のため、本発明者らは以前に、81の乳癌 (Nishidate T et al., *Int J Oncol* 2004, 25: 797-819) および29の正常ヒト組織 (Saito-Hisaminato A et al., *DNA Res* 2002, 9: 35-45; WO05/028676) の発現プロファイル分析を行い、乳癌細胞で高くかつ普遍的に上方制御される数十個の遺伝子を見いだした。

【 0 0 1 3 】

PBK (PDZ結合キナーゼ) / TOPK (T-LAK細胞起源のプロテインキナーゼ) 遺伝子は、検査した乳癌症例の大多数で有意に過剰発現することが見いだされた遺伝子の一つである (PBK / TOPK 遺伝子は、WO05/028676では「A7870」と呼ばれる)。さらに、本発明者らは、PBK / TOPK 遺伝子の発現を低下するように設計した低分子干渉RNA (siRNA) が、この遺伝子を発現する乳癌細胞で増殖阻害効果を有することを実証した。

【 0 0 1 4 】

PBK / TOPKは、Ser/Thrキナーゼファミリーのメンバーであり、最初は酵母2-ハイブリッドスクリーニングによってDIg1相互作用タンパク質として同定され、C末端にPDZ結合モチーフを持つ有糸分裂キナーゼとして特徴付けられた (Gaudet S et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:5167-72)。PBK / TOPKはまた、p38タンパク質をリン酸化するMAPKK様プロテインキナーゼとして別のグループによっても示された (Abe Y et al., *J Biol Chem* 2000, 275:21525-31)。さらに、酵母2-ハイブリッドスクリーニング分析によって、RafとPBK / TOPKとの可能性のある相互作用が示された (Yuryev A et al., *Genomics* 2003, 81:112-25)。これら2つの知見は、PBK / TOPKがMAPK経路に関与することを示した。

【 0 0 1 5 】

アセチル化、メチル化、およびリン酸化を含むヒストンH3のN末端部分での翻訳後修飾は、これまでに述べられている (Martin C & Zhang Y, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, 6: 838-49; Nowak SJ et al., *Trends Genet* 2004, 214-20; Prigent C & Dimitrov S, *J Cell Sci* 2003, 116:3677-85)。これらの中で、Ser10でのヒストンH3のリン酸化が、細胞有糸分裂における必須の事象である哺乳動物染色体凝集の開始に関与していることが公知である (Prigent C & Dimitrov S, *J Cell Sci* 2003, 116: 3677-85; Van Hooser A et al., *J Cell Sci* 1998, 111:3497-506)。「迅速な產生標識」モデルによると、染色体が分裂する準備ができたという指標として、ヒストンH3のSer10リン酸化は分裂中期で最大レベルに達し、次いでSer10が分裂中期 / 分裂後期の移行に伴い脱リン酸化される (Hans F & Dimitrov S, *Oncogene* 2001, 20:3021-7)。興味深いことに、以前の報告では、オカダ酸 (「OA」) が、プロテインホスファターゼ (PP) の阻害を介してヒストンH3のSer10

10

20

30

40

50

リン酸化を誘導することが示された (Murnion ME et al., J Biol Chem 2001, 276: 2665 6-65; Evers PA et al., Curr Biol 2003, 13:691-7)。例えば、オーロラAは、プロテインホスファターゼ2A (PP2A) によって不活性化されるが、PP2Aの活性を障害するTPX2 (Targeting protein for Xenopus kinesin-like protein 2) タンパク質との結合を介したその自己リン酸化によって再活性化されることが知られている (Evers PA et al., Curr Biol 2003, 13: 691-7)。

【0016】

哺乳動物細胞において有糸分裂への進行は、その後の有糸分裂プロセスを誘導する多くの基質を標的とするCDK1-サイクリンB1の活性化によって誘引される (Nigg EA., Nat Rev Mol Cell Biol 2:21-32 (2001))。これらの基質はまた、CDK1-サイクリンB1複合体によるリン酸化、有糸分裂終了を開始するために活性化されるAPC (分裂後期促進複合体) ユビキチンライゲース (Kraft C et al., EMBO J 22:6598-609 (2003))、および例えば、それぞれ分裂中期-分裂後期移行および細胞質分裂に必要とされる、INCENP (内部中心体タンパク質、Goto H et al., Nat Cell Biol 8:180-7 (2006)) およびPRC1 (protein regulator of cytokinesis 1、Neef R et al., Nat Cell Biol 9:436-44 (2007)) のようにPLK1とのドッキング部位を提供する立体配座タンパク質を介して、細胞有糸分裂の後期のステージにも関与する。さらに、近年の研究により、プロテインホスファターゼ1 (PP1) の活性が、CDK1-サイクリンB1キナーゼが標的とする不活性なリン酸化部位 (Thr320) を有することが報告されたことから、これにより、細胞有糸分裂を促進するためのプロテインキナーゼとホスファターゼとの密接な協同の役割が示される (Kwon YG et al., Proc Natl Acad Sci U S A 94:2168-73 (1997))。PBK / TOPKがThr9でCDK1-サイクリンB1によってリン酸化され得ることが報告されているが、CDK1-サイクリンB1複合体有糸分裂細胞によるPBK / TOPKがどのように活性化されるかも、細胞増殖および癌の進行におけるその機能も、未だ大部分が不明である。

【発明の概要】

【0017】

したがって、本発明の目的は、乳癌細胞の増殖機構に関する新規タンパク質およびこれらのタンパク質をコードする遺伝子、さらにはこれらを産生して乳癌の診断および治療に用いるための方法を提供することである。

【0018】

乳癌で共通して上方制御された転写産物のうち、ヒト遺伝子PBK / TOPK、A7322、およびF3374をそれぞれ同定した。さらに、それらの特異的な低分子干渉RNAのトランスフェクションによるPBK / TOPK、A7322、およびF3374の発現低下は、乳癌細胞の増殖を阻害した。DNAおよび/またはRNA合成のインヒビター、代謝抑制剤、ならびにDNAインターラーカーといった多くの抗癌剤は、癌細胞だけでなく、正常に増殖している細胞に対しても有害である。しかし、PBK / TOPK、A7322、またはF3374の発現を抑制する作用物質は、正常臓器でのこの遺伝子の発現が、例えばA7322については脳、またはF3374については精巣および胸腺、胎盤、および骨髄に限局されているという事実から、他の臓器には有害な影響を及ぼさないと考えられる。

【0019】

したがって、本発明は、PBK / TOPK、F3374、およびA7322 (SEQ ID NO : 79) 遺伝子を含む単離した核酸分子を提供する。これらの核酸分子は、癌の予後予測および診断マーカーの候補であるとともに、診断のための新たな戦略および有効な治療用抗癌剤を開発するための有望な標的候補でもある。さらに、本発明は、これらの遺伝子によってコードされるポリペプチドに加え、その産生および使用も提供する。

【0020】

本発明はまた、PBK / TOPK、F3374、またはA7322タンパク質の少なくとも1つをコードするポリヌクレオチド配列を用いて宿主細胞のトランスフェクションまたは形質転換を行うこと、およびそのポリヌクレオチド配列を発現させることによる、タンパク質の産生方法も提供する。加えて、本発明は、PBK / TOPK、F3374、またはA7322タンパク質の少なくと

10

20

30

40

50

も1つをコードするヌクレオチド配列を含むベクター、およびA7322タンパク質をコードするポリヌクレオチドを保有する宿主細胞も提供する。そのようなベクターおよび宿主細胞を、PBK / TOPK、F3374、およびA7322タンパク質を產生するために用いてもよい。

【 0 0 2 1 】

PBK / TOPK、F3374、またはA7322タンパク質を認識する抗体または非抗体結合タンパク質も、本出願によって提供する。一部には、PBK / TOPK、F3374、またはA7322遺伝子の阻害性ポリヌクレオチド、例えばアンチセンスDNA、リボザイム、およびsiRNA（低分子干渉RNA）も提供する。

【 0 0 2 2 】

本発明は、検体の生物学的な試料中のA7322またはF3374V1遺伝子の発現レベルを決定する段階、およびA7322またはF3374V1遺伝子の発現レベルを正常試料中の発現レベルと比較する段階を含む、乳癌の診断方法をさらに提供する、ここで、試料中のA7322またはF3374V1遺伝子の高い発現レベルは、乳癌の指標となる。

10

【 0 0 2 3 】

さらに、乳癌の治療に有用な化合物をスクリーニングする方法を提供する。本方法は、A7322またはF3374V1ポリペプチドを被験化合物と接触させる段階、およびA7322またはF3374V1ポリペプチドと結合する被験化合物を選択する段階を含む。

【 0 0 2 4 】

本発明はさらに、A7322またはF3374V1ポリペプチドを被験化合物と接触させる段階、およびA7322またはF3374V1ポリペプチドの生物学的活性を抑制する被験化合物を選択する段階を含む、乳癌の治療に有用な化合物のスクリーニング方法も提供する。

20

【 0 0 2 5 】

本出願はまた、乳癌の治療に有用な薬学的組成物も提供する。薬学的組成物は、例えば抗癌剤であってよい。薬学的組成物は、それぞれSEQ ID NO : 34、35、37、38、67、または68に提示および記載されたA7322、F3374V1、またはAURKBポリヌクレオチド配列のアンチセンスS-オリゴヌクレオチドまたはsiRNAの少なくとも一部を含む。

【 0 0 2 6 】

本発明はさらに、本発明によって提供される薬学的組成物を用いて乳癌を治療するための方法を提供する。

【 0 0 2 7 】

30

さらに、本発明は、A7322またはF3374V1ポリペプチドを投与する段階を含む、乳癌の治療または予防のための方法を提供する。このようなA7322またはF3374V1ポリペプチドの投与によって、抗腫瘍免疫を誘導する。したがって、本発明は、A7322またはF3374V1ポリペプチドを投与する段階を含む、抗腫瘍免疫を誘導するための方法、ならびにA7322またはF3374V1ポリペプチドを含む乳癌の治療または予防のための薬学的組成物も提供する。

【 0 0 2 8 】

本発明のこれらおよび他の目的および特徴は、添付の図面および実施例と合わせて以下の詳細な説明を読むことにより、さらに十分明らかとなるであろう。しかし、本発明の前述の概要および以下の詳細な説明はいずれも好ましい態様に関するものであり、本発明または本発明の他の代替の態様を制限するものではないと理解すべきである。

40

【 0 0 2 9 】

本発明はまた、少なくとも一部、インビトロおよびインビボにおいてヒストンH3をSer10にてリン酸化するためのPBK / TOPKの新規のメカニズムの発見に基づく。PBK / TOPKは癌 / 精巣抗原であり、かつそのキナーゼ機能はその発癌活性に関連している可能性が高いことから、このタンパク質も同様に、乳癌治療のための有望な分子標的である。

【 0 0 3 0 】

具体的に、本発明は、乳癌細胞内でアポトーシスを誘導する作用物質用のスクリーニング方法を提供する。基質のリン酸化を可能にする条件下で、PBK / TOPKポリペプチドをPBK / TOPKポリペプチドによってリン酸化される基質および作用物質と接触させること；基質のリン酸化レベルを検出すること；基質のリン酸化レベルと作用物質の不在下で検出した

50

基質のリン酸化レベルとを比較すること；ならびにポリペプチドのリン酸化レベルを低下させる作用物質を選択すること；によって、スクリーニングを行うこともできる。本方法に従って、ヒストンまたは少なくともそのリン酸化部位（例えばヒストンH3のSer10）を含むその断片を、基質として用いることができる。

【0031】

上記の方法によってスクリーニングして同定された作用物質は、乳癌細胞でアポトーシスを誘導する。したがって、スクリーニングされた作用物質は、乳癌を治療または予防するための候補となる。したがって、本発明はまた、H3のSer10のPBK / TOPKリン酸化を阻止または阻害することによって乳癌を治療または予防するための作用物質をスクリーニングする方法を提供する。

10

【0032】

本発明はさらに、PBK / TOPKをCDK1、サイクリンB1、および被験化合物と接触させる段階、ならびにPBK / TOPKポリペプチドのリン酸化レベルを抑制する化合物を選択する段階を含む、乳癌の治療に有用な化合物のスクリーニング方法も提供する。

【0033】

本発明はまた、MEGISNFKTPSKLSEKKK (SEQ ID NO: 98) を含む阻害性ポリペプチドまたはそれをコードするポリヌクレオチドを投与する段階を含む、乳癌の治療および/または予防のための方法に関する。さらに、本発明は、乳癌の治療および/または予防のための薬学的製剤の製造における、本発明のポリペプチドの使用、またはそれをコードするヌクレオチドの使用に関する。

20

【0034】

本発明はさらに、被験化合物をプロテインホスファターゼ1 (PP1) およびPBK/TOPポリペプチドを発現する細胞と接触させる段階、ならびにPBK / TOPKポリペプチドのリン酸化レベルを抑制する被験化合物を選択する段階を含む、乳癌の治療に有用な化合物のスクリーニング方法も提供する。

【0035】

本発明はさらに、PBK / TOPKポリペプチドをp47ポリペプチド、p97ポリペプチド、および被験化合物と接触させる段階、ならびにPBK / TOPKとp47との結合またはp97ポリペプチドのリン酸化レベルを抑制する被験化合物を選択する段階を含む、乳癌の治療に有用な化合物のスクリーニング方法も提供する。

30

【0036】

本発明はさらに、被験化合物をPBK/TOPポリペプチドを発現する細胞と接触させる段階、ならびに細胞間接合部を長い細胞間架橋に変化させるおよび/またはG2/Mの細胞集団を増加させる被験化合物を選択する段階を含む、乳癌の治療に有用な化合物のスクリーニング方法も提供する。

[請求項1001]

以下のものからなる群より選択される、実質的に純粋なポリペプチド：

(a) SEQ ID NO:80のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(b) 1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加された、SEQ ID N 0:80のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:80のアミノ酸配列からなるタンパク質と同等な生物活性を有する、ポリペプチド；ならびに

40

(c) SEQ ID NO:79のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO:80のいずれか1つのアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド。

[請求項1002]

請求項1001記載のポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチド。

[請求項1003]

請求項1002記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

[請求項1004]

50

請求項1002記載のポリヌクレオチドまたは請求項1002記載のポリヌクレオチドを含むベクターを保有する宿主細胞。

[請求項1005]

請求項1001記載のポリペプチドを生成するための方法であって、

(a)請求項1001記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはそのポリヌクレオチドを含むベクターを保有する宿主細胞を培養する段階；

(b)宿主細胞にポリペプチドを発現させる段階；および

(c)発現されたポリペプチドを収集する段階

を含む方法。

[請求項1006]

10

請求項1001記載のポリペプチドと結合する抗体。

[請求項1007]

請求項1002記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖に対して相補的であって、少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチド。

[請求項1008]

請求項1002記載のポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチドまたは低分子干渉RNA。

[請求項1009]

そのセンス鎖がSEQ ID NO:34および35のヌクレオチド配列からなる群より選択される、請求項1008記載の低分子干渉RNA。

20

[請求項1010]

乳癌を診断するための方法であって、

(a)検体生物試料における、SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列をコードする遺伝子の発現レベルを検出する段階；および

(b)発現レベルの上昇を乳癌と関連づける段階

を含む方法。

[請求項1011]

発現レベルが、

(a)SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列をコードするmRNAを検出する段階、

(b)SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列を含むタンパク質を検出する段階、および

30

(c)SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列を含むタンパク質の生物活性を検出する段階からなる群より選択される方法のいずれか1つによって検出される、請求項1010記載の方法。

[請求項1012]

乳癌の治療において有用な化合物用のスクリーニング方法であって、

(a)被験化合物を、以下のもの：

(1)SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2)1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加された、SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列からなるタンパク質と同等な生物活性を有する、ポリペプチド；および

40

(3)SEQ ID NO:79または81のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下ハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチドと接触させる段階；

(b)ポリペプチドと被験化合物との間の結合活性を検出する段階；ならびに

(c)ポリペプチドと結合する被験化合物を選択する段階

を含む方法。

[請求項1013]

乳癌の治療において有用な化合物用のスクリーニング方法であって、

50

(a) 候補化合物を、SEQ ID NO:79または81のスクレオチド配列を含む1つまたは複数のポリスクレオチドを発現する細胞と接触させる段階; および

(b) 被験化合物の非存在下で検出される発現レベルに比してSEQ ID NO:79または81のスクレオチド配列を含む1つまたは複数のポリスクレオチドの発現レベルを低下させる化合物を選択する段階

を含む方法。

[請求項1014]

乳癌の治療において有用な化合物用のスクリーニング方法であって、

(a) 被験化合物を、以下のもの:

(1) SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列を含むポリペプチド;

10

(2) 1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加された、SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列からなるタンパク質と同等な生物活性を有する、ポリペプチド; および

(3) SEQ ID NO:79または81のスクレオチド配列からなるポリスクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリスクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチドと接触させる段階;

(b) 段階(a)のポリペプチドの生物活性を検出する段階;ならびに

(c) 被験化合物の非存在下で検出される生物活性に比してポリペプチドの生物活性を抑制する化合物を選択する段階

20

を含む方法。

[請求項1015]

生物活性が細胞増殖活性である、請求項1014記載の方法。

[請求項1016]

乳癌の治療において有用な化合物用のスクリーニング方法であって、

(a) 候補化合物を、A7322またはF3374V1遺伝子の転写調節領域およびその転写調節領域の制御下で発現されるレポーター遺伝子を含むベクターが導入された細胞と接触させる段階;

(b) 該レポーター遺伝子の発現または活性のレベルを測定する段階; および

30

(c) 被験化合物の非存在下で検出される該レポーター遺伝子の発現または活性のレベルに比して該レポーター遺伝子の発現または活性のレベルを低下させる化合物を選択する段階を含む方法。

[請求項1017]

F3374V1またはその機能的同等物のリン酸化レベルに対するインヒビター用のスクリーニング方法であって、

(a) 以下のもの:

(1) SEQ ID NO:82のアミノ酸配列を含むポリペプチド;

(2) 1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加された、SEQ ID NO:82のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:82のアミノ酸配列からなるタンパク質と同等な生物活性を有する、ポリペプチド; および

40

(3) SEQ ID NO:81のスクレオチド配列からなるポリスクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリスクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO:82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチドを発現する細胞を、被験化合物と接触させる段階;

(b) ポリペプチドのリン酸化レベルを検出する段階;

(c) ポリペプチドのリン酸化レベルを、化合物の非存在下で検出されるポリペプチドのリン酸化レベルと比較する段階;ならびに

50

(d) ポリペプチドのリン酸化レベルを低下させた化合物を、F3374V1のリン酸化レベルに対するインヒビターとして選択する段階
を含む方法。

[請求項1018]

F3374V1またはその機能的同等物のリン酸化レベルに対するインヒビターのスクリーニング方法であって、

(a) 以下のもの：

(1) SEQ ID NO:82のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) 1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加された、SEQ ID NO:82のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:82のアミノ酸配列からなるタンパク質と同等な生物活性を有する、ポリペプチド；および

(3) SEQ ID NO:81のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであつて、SEQ ID NO:82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチド、

またはリン酸化部位を含むその断片を、ポリペプチドのリン酸化を可能にする条件下で被験化合物と接触させる段階；

(b) ポリペプチドまたはその断片のリン酸化レベルを検出する段階；

(c) 基質のリン酸化レベルを、被験化合物の非存在下で検出されるポリペプチドのリン酸化レベルと比較する段階；ならびに

(d) ポリペプチドのリン酸化レベルを低下させた化合物を、F3374V1のリン酸化レベルに対するインヒビターとして選択する段階

を含む方法。

[請求項1019]

乳癌を治療または予防するための化合物用のスクリーニング方法であって、

(a) 以下のもの：

(1) SEQ ID NO:82のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) 1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加された、SEQ ID NO:82のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:82のアミノ酸配列からなるタンパク質と同等な生物活性を有する、ポリペプチド；および

(3) SEQ ID NO:81のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであつて、SEQ ID NO:82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチドを発現する細胞を、被験化合物と接触させる段階；

(b) ポリペプチドのリン酸化レベルを検出する段階；

(c) ポリペプチドのリン酸化レベルを、化合物の非存在下で検出されるポリペプチドのリン酸化レベルと比較する段階；ならびに

(d) ポリペプチドのリン酸化レベルを低下させた化合物を、乳癌を治療または予防するための化合物として選択する段階

を含む方法。

[請求項1020]

乳癌を予防または治療するための作用物質のスクリーニング方法であって、

(a) 以下のもの：

(1) SEQ ID NO:82のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) 1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加された、SEQ ID NO:82のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:82のアミノ酸配列からなるタンパク質と同等な生物活性を有する、ポリペプチド；および

10

20

30

40

50

(3) SEQ ID NO:81のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO:82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチド、

またはリン酸化部位を含むその断片を、ポリペプチドのリン酸化を可能にする条件下で被験化合物と接触させる段階；

(b) ポリペプチドまたはその断片のリン酸化レベルを検出する段階；

(c) 基質のリン酸化レベルを、被験化合物の非存在下で検出されるポリペプチドのリン酸化レベルと比較する段階；ならびに

(d) ポリペプチドのリン酸化レベルを低下させた化合物を、乳癌を治療または予防するための化合物として選択する段階

を含む方法。

[請求項1021]

乳癌を治療するための組成物であって、有効成分として、以下のもの：

(a) SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(b) 1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加された、SEQ ID N 0:80または82のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列からなるタンパク質と同等な生物活性を有する、ポリペプチド；および

(c) SEQ ID NO:79または81のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチドまたは低分子干渉RNAの薬学的有効量、ならびに薬学的に許容される担体を含む、組成物。

[請求項1022]

低分子干渉RNAが、SEQ ID NO:34、35、37、38、67、および68からなる群より選択されるヌクレオチド配列に対応するリボヌクレオチド配列を標的配列として含む、請求項1021記載の組成物。

[請求項1023]

低分子干渉RNAが、一般式

5' - [A] - [B] - [A'] - 3'

を有し、式中、[A]がSEQ ID NO:34、35、37、38、67、または68のヌクレオチド配列に対応するリボヌクレオチド配列であり、[B]が3~23ヌクレオチドからなるリボヌクレオチド配列であり、かつ[A']が[A]に対して相補的なリボヌクレオチド配列である、請求項1022記載の組成物。

[請求項1024]

乳癌を治療するための組成物であって、有効成分として、以下のもの：

(a) SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(b) 1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加された、SEQ ID N 0:80または82のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列からなるタンパク質と同等な生物活性を有する、ポリペプチド；および

(c) SEQ ID NO:79または81のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチドに対する抗体の薬学的有効量、ならびに薬学的に許容される担体を含む、組成物。

[請求項1025]

乳癌を治療するための組成物であって、有効成分として、SEQ ID NO:82のアミノ酸配列からなるポリペプチドのリン酸化を阻害する化合物の薬学的有効量、および薬学的に許容される担体を含む、組成物。

[請求項1026]

乳癌を治療するための方法であって、以下のもの：

(a) SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(b) 1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加された、SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列からなるタンパク質と同等な生物活性を有する、ポリペプチド；および

(c) SEQ ID NO:79または81のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジメントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチドまたは低分子干渉RNAの薬学的有効量を投与する段階を含む、方法。

[請求項1027]

低分子干渉RNAが、SEQ ID NO:34、35、37、38、67、および68からなる群より選択されるヌクレオチド配列に対応するリボヌクレオチド配列を標的配列として含む、請求項1026記載の方法。

[請求項1028]

低分子干渉RNAが一般式

5' - [A] - [B] - [A'] - 3'

を有し、式中、[A]がSEQ ID NO:34、35、37、38、67、または68のヌクレオチド配列に対応するリボヌクレオチド配列であり、[B]が3~23ヌクレオチドからなるリボヌクレオチド配列であり、かつ[A']が[A]に対して相補的なリボヌクレオチド配列である、請求項1027記載の方法。

[請求項1029]

乳癌を治療するための方法であって、以下のもの：

(a) SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(b) 1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加された、SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列からなるタンパク質と同等な生物活性を有する、ポリペプチド；および

(c) SEQ ID NO:79または81のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジメントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチドに対する抗体の薬学的有効量を投与する段階を含む、方法。

[請求項1030]

乳癌を治療するための方法であって、SEQ ID NO:82のアミノ酸配列からなるポリペプチドのリン酸化を阻害する化合物の薬学的有効量を投与する段階を含む、方法。

[請求項1031]

乳癌を治療または予防するための方法であって、以下の(a)~(c)からなる群より選択されるポリペプチド、またはそのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの薬学的有効量を投与する段階を含む、方法：

(a) SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはその断片；

(b) 1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加された、SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列からなるタンパク質と同等な生物活性を有する、ポリペプチド、またはその断片；

10

20

40

50

(c) SEQ ID NO:79または81のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド、またはその断片。

[請求項1032]

乳癌に対する抗腫瘍免疫を誘導するための方法であって、以下の(a)～(c)からなる群より選択されるポリペプチドを抗原提示細胞と接触させる段階、またはそのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくはそのようなポリヌクレオチドを含むベクターを抗原提示細胞に導入する段階を含む、方法：

(a) SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはその断片； 10

(b) 1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加された、SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列からなるタンパク質と同等な生物活性を有する、ポリペプチド、またはその断片；

(c) SEQ ID NO:79または81のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド、またはその断片。

[請求項1033]

対象に対して抗原提示細胞を投与する段階をさらに含む、請求項1032記載の抗腫瘍免疫を誘導するための方法。

20

[請求項1034]

乳癌を治療または予防するための薬学的組成物であって、有効成分として、以下の(a)～(c)からなる群より選択されるポリペプチド、または該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの薬学的有効量、および薬学的に許容される担体を含む、組成物：

(a) SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはその断片；

(b) 1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加された、SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列からなるタンパク質と同等な生物活性を有する、ポリペプチド、またはその断片；

(c) SEQ ID NO:79または81のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO:80または82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド、またはその断片。

30

[請求項1035]

ポリヌクレオチドが発現ベクター中に組み入れられている、請求項1034記載の薬学的組成物。

[請求項1036]

センス鎖およびアンチセンス鎖を含む二本鎖分子であって、センス鎖がSEQ ID NO:34、35、37、38、67、または68からなる群より選択される標的配列に対応するリボヌクレオチド配列を含み、アンチセンス鎖が該センス鎖に対して相補的なリボヌクレオチド配列を含み、該センス鎖および該アンチセンス鎖が互いにハイブリダイズして該二本鎖分子を形成し、A7322、F3374V1、またはAURKB遺伝子を発現する細胞に導入された場合に該遺伝子の発現を阻害する、二本鎖分子。

40

[請求項1037]

約100ヌクレオチド長未満のオリゴヌクレオチドである、請求項1036記載の二本鎖分子。

[請求項1038]

約75ヌクレオチド長未満のオリゴヌクレオチドである、請求項1037記載の二本鎖分子。

[請求項1039]

約50ヌクレオチド長未満のオリゴヌクレオチドである、請求項1038記載の二本鎖分子。

[請求項1040]

約25ヌクレオチド長未満のオリゴヌクレオチドである、請求項1039記載の二本鎖分子。

50

[請求項1041]

標的配列が、SEQ ID NO:79または81のヌクレオチド配列由来の約19～約25個の連続したヌクレオチドを含む、請求項1036記載の二本鎖分子。

[請求項1042]

一本鎖リボヌクレオチド配列を介して連結しているセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む単一のリボヌクレオチド転写産物である、請求項1041記載の二本鎖分子。

[請求項1043]

請求項1036記載の二本鎖分子をコードするベクター。

[請求項1044]

二次構造を有する転写産物をコードし、かつセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む、請求項1043記載のベクター。

10

[請求項1045]

転写産物がさらに、センス鎖とアンチセンス鎖を連結させる一本鎖リボヌクレオチド配列を含む、請求項1043記載のベクター。

[請求項1046]

センス鎖核酸およびアンチセンス鎖核酸の組み合わせを含むポリヌクレオチドを発現するベクターであって、該センス鎖核酸がSEQ ID NO:34、35、37、38、67、または68のヌクレオチド配列を含み、該アンチセンス鎖核酸がセンス鎖に対して相補的な配列からなる、ベクター。

20

[請求項1047]

ポリヌクレオチドが一般式

5'-[A]-[B]-[A']-3'

を有し、式中、[A]がSEQ ID NO:34、35、37、38、67、または68のヌクレオチド配列であり、[B]が3～23ヌクレオチドからなるヌクレオチド配列であり、かつ[A']が[A]に対して相補的なヌクレオチド配列である、請求項1046記載のベクター。

[請求項1048]

F3374V1とAURKBとの結合に対するインヒビター用のスクリーニング方法であって、

(a)AURKBポリペプチドまたはその機能的同等物を、被験化合物の存在下で、F3374V1ポリペプチドまたはその機能的同等物と接触させる段階；

(b)段階(a)のポリペプチド間の結合を検出する段階；および

30

(c)AURKBポリペプチドとF3374V1ポリペプチドとの間の結合を阻害する被験化合物を選択する段階

を含む方法。

[請求項1049]

乳癌を治療または予防するための化合物用のスクリーニング方法であって、

(a)AURKBポリペプチドまたはその機能的同等物を、被験化合物の存在下で、F3374V1ポリペプチドまたはその機能的同等物と接触させる段階；

(b)段階(a)のポリペプチド間の結合を検出する段階；および

(c)AURKBポリペプチドとF3374V1ポリペプチドとの間の結合を阻害する被験化合物を選択する段階

40

を含む方法。

[請求項1050]

F3374V1ポリペプチドの機能的同等物がAURKB結合ドメインのアミノ酸配列を含む、請求項1048または1049記載の方法。

[請求項1051]

F3374V1ポリペプチドの機能的同等物がSEQ ID NO:82のC末端領域(591～730アミノ酸)(SEQ ID NO:122)のアミノ酸配列を含む、請求項1050記載の方法。

[請求項1052]

AURKBポリペプチドの機能的同等物がF3374V1結合ドメインのアミノ酸配列を含む、請求項1048または1049記載の方法。

50

[請求項1053]

乳癌を治療または予防するための化合物用のスクリーニングのためのキットであって、以下の構成要素を含むキット:

- (a)AURKBポリペプチドまたはその機能的同等物、および
- (b)F3374V1ポリペプチドまたはその機能的同等物。

[請求項1054]

AURKBを介したF3374V1のリン酸化に対するインヒビター用のスクリーニング方法であつて、

(a)F3374V1およびAURKBを、被験化合物の存在下で、AURKBによるF3374V1のリン酸化に適した条件下でインキュベートする段階であつて、F3374V1が以下のものからなる群より選択されるポリペプチドである段階:

- (1)SEQ ID NO:82(F3374V1)のアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- (2)ポリペプチドがSEQ ID NO:82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO:82のアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- (3)ポリペプチドがSEQ ID NO:82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、SEQ ID NO:81のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；
- (b)F3374V1のリン酸化レベルを検出する段階；
- (c)F3374V1のリン酸化レベルを対照レベルと比較する段階；および
- (d)被験化合物の非存在下で検出される対照レベルに比してF3374V1のリン酸化レベルを低下させる化合物を選択する段階

を含む方法。

[請求項1055]

乳癌を治療または予防するための化合物用のスクリーニング方法であつて、

(a)F3374V1およびAURKBを、被験化合物の存在下で、AURKBによるF3374V1のリン酸化に適した条件下でインキュベートする段階であつて、F3374V1が以下のものからなる群より選択されるポリペプチドである段階:

- (1)SEQ ID NO:82(F3374V1)のアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- (2)ポリペプチドがSEQ ID NO:82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO:82のアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- (3)ポリペプチドがSEQ ID NO:82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、SEQ ID NO:81のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；
- (b)F3374V1のリン酸化レベルを検出する段階；
- (c)F3374V1のリン酸化レベルを対照レベルと比較する段階；および
- (d)対照レベルに比してF3374V1のリン酸化レベルを低下させる化合物を選択する段階

を含む方法。

[請求項1056]

F3374V1のリン酸化レベルが、SEQ ID NO:82のC末端領域(591～730アミノ酸)(SEQ ID NO:122)で、またはそのポリペプチドの相同な位置で検出される、請求項1054または1055記載の方法。

[請求項1057]

乳癌を治療または予防するための化合物用のスクリーニングのためのキットであつて、以下の構成要素を含むキット:

- (a)以下のものからなる群より選択されるポリペプチド：

- (1)SEQ ID NO:82(F3374V1)のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

10

20

30

40

50

(2) ポリペプチドがSEQ ID NO:82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO:82のアミノ酸配列を含むポリペプチド; および

(3) ポリペプチドがSEQ ID NO:82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、SEQ ID NO:81のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド;

(b) 以下のものからなる群より選択されるポリペプチド:

(1) SEQ ID NO:88(AURKB)のアミノ酸配列を含むポリペプチド;

(2) ポリペプチドがSEQ ID NO:88のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO:88のアミノ酸配列を含むポリペプチド; および

(3) ポリペプチドがSEQ ID NO:88のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、SEQ ID NO:87のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド;

(c) F3374V1のリン酸化レベルを検出するための試薬。

[請求項1058]

乳癌を治療または予防するための化合物用のスクリーニングのためのキットであって、以下の構成要素を含むキット:

(a) 以下のものからなる群より選択されるポリペプチドを発現する細胞:

(1) SEQ ID NO:82(F3374V1)のアミノ酸配列を含むポリペプチド;

(2) ポリペプチドがSEQ ID NO:82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO:82のアミノ酸配列を含むポリペプチド;

(3) ポリペプチドがSEQ ID NO:82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、SEQ ID NO:81のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド; および

(b) F3374V1のリン酸化レベルを検出するための試薬。

[請求項1059]

細胞がさらに、以下のものからなる群より選択されるポリペプチドを発現する、請求項1058記載のキット:

(a) SEQ ID NO:87(AURKB)のアミノ酸配列を含むポリペプチド;

(b) ポリペプチドがSEQ ID NO:88のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO:88のアミノ酸配列を含むポリペプチド; および

(c) ポリペプチドがSEQ ID NO:88のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、SEQ ID NO:87のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド。

[請求項1060]

細胞が乳癌細胞である、請求項1058記載のキット。

[請求項1061]

F3374V1のリン酸化レベルを検出するための試薬が、SEQ ID NO:82のC末端領域(591～730アミノ酸)(SEQ ID NO:122)でのリン酸化を認識する抗体である、請求項1057または1058記載のキット。

[請求項1062]

SEQ ID NO:82のC末端領域(437～730アミノ酸)(SEQ ID NO:93)でのリン酸化を認識する抗体。

10

20

30

40

50

[請求項1063]

対象における乳癌を治療または予防するための方法であって、以下からなる群より選択される少なくともいずれか1つの機能を有するインヒビターを投与する段階を含む、方法：

(a)F3374V1とAURKBとの間の結合を阻害する；

(b)AURKBによるF3374V1のリン酸化を阻害する；ならびに

(c)A7322、F3374V1、およびAURKBからなる群より選択されるいずれか1つの遺伝子の発現を阻害する。

[請求項1064]

乳癌を治療または予防するための組成物であって、以下からなる群より選択される少なくともいずれか1つの機能を有するインヒビターの薬学的有効量を含む、組成物：

10

(a)F3374V1とAURKBとの間の結合を阻害する；

(b)AURKBによるF3374V1のリン酸化を阻害する；ならびに

(c)A7322、F3374V1、およびAURKBからなる群より選択されるいずれか1つの遺伝子の発現を阻害する。

[請求項1065]

TOPKを発現する細胞のアポトーシスを誘導する作用物質用のスクリーニング方法であつて、

(a)以下のもの：

(1)SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2)1つまたは複数のアミノ酸が付加、置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有する、ポリペプチド；

20

(3)SEQ ID NO:92に対して少なくとも約80%の相同性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；および

(4)SEQ ID NO:91のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであつて、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチドを発現する細胞を、作用物質と接触させる段階；

(b)ポリペプチドのキナーゼ活性を検出する段階；

30

(c)ポリペプチドのキナーゼ活性を、作用物質の非存在下で検出されるポリペプチドのキナーゼ活性と比較する段階；ならびに

(d)ポリペプチドのキナーゼ活性を低下させた作用物質を、乳癌細胞のアポトーシスを誘導する作用物質として選択する段階

を含む方法。

[請求項1066]

乳癌細胞のアポトーシスを誘導する作用物質用のスクリーニング方法であつて、

(a)以下のもの：

(1)SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2)1つまたは複数のアミノ酸が付加、置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有する、ポリペプチド；

40

(3)SEQ ID NO:92に対して少なくとも約80%の相同性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；および

(4)SEQ ID NO:91のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであつて、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチドを発現する細胞を、作用物質と接触させる段階；

(b)ポリペプチドのリン酸化レベルを検出する段階；

50

(c) ポリペプチドのリン酸化レベルを、作用物質の非存在下で検出されるポリペプチドのリン酸化レベルと比較する段階;ならびに

(d) ポリペプチドのリン酸化レベルを低下させた作用物質を、乳癌細胞のアポトーシスを誘導する作用物質として選択する段階
を含む方法。

[請求項1067]

TOPKを発現する細胞のアポトーシスを誘導する作用物質のスクリーニング方法であって

(a) 以下のもの:

(1) SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含むポリペプチド;

10

(2) 1つまたは複数のアミノ酸が付加、置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有する、ポリペプチド;

(3) SEQ ID NO:92に対して少なくとも約80%の相同性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド;および

(4) SEQ ID NO:91のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであつて、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチドを、ポリペプチドによってリン酸化される基質および作用物質と、基質のリン酸化を可能にする条件下で接触させる段階;

20

(b) 基質のリン酸化レベルを検出する段階;

(c) 基質のリン酸化レベルを、作用物質の非存在下で検出されるポリペプチドのリン酸化レベルと比較する段階;ならびに

(d) 基質のリン酸化レベルを低下させた作用物質を、細胞のアポトーシスを誘導する作用物質として選択する段階
を含む方法。

[請求項1068]

乳癌細胞のアポトーシスを誘導する作用物質のスクリーニング方法であって、

(a) 以下のもの:

30

(1) SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含むポリペプチド;

(2) 1つまたは複数のアミノ酸が付加、置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有する、ポリペプチド;

(3) SEQ ID NO:92に対して少なくとも約80%の相同性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド;および

(4) SEQ ID NO:91のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであつて、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド

40

からなる群より選択されるポリペプチドを、ポリペプチドによってリン酸化される基質および作用物質と、基質のリン酸化を可能にする条件下で接触させる段階;

(b) 基質のリン酸化レベルを検出する段階;

(c) 基質のリン酸化レベルを、作用物質の非存在下で検出される基質のリン酸化レベルと比較する段階;ならびに

(d) 基質のリン酸化レベルを低下させた作用物質を、乳癌細胞のアポトーシスを誘導する作用物質として選択する段階
を含む方法。

[請求項1069]

基質がヒストン、または少なくともそのリン酸化部位を含むその断片である、請求項106

50

7または1068記載の方法。

[請求項1070]

リン酸化部位がヒストンH3のSer10である、請求項1069記載の方法。

[請求項1071]

TOPKのキナーゼ活性を阻害する作用物質のスクリーニング方法であって、

(a)以下のもの:

(1)SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含むポリペプチド;

(2)1つまたは複数のアミノ酸が付加、置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有する、ポリペプチド;

(3)SEQ ID NO:92に対して少なくとも約80%の相同性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド;および

(4)SEQ ID NO:91のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチドを、基質としてのヒストンH3、または少なくともそのリン酸化部位を含むその断片と接触させる段階;

(b)基質のリン酸化レベルを検出する段階;

(c)基質のリン酸化レベルを、作用物質の非存在下で検出される基質のリン酸化レベルと比較する段階;ならびに

(d)基質のリン酸化レベルを低下させた作用物質を、インヒビターとして選択する段階を含む方法。

[請求項1072]

リン酸化部位がヒストンH3のSer10である、請求項1071記載の方法。

[請求項1073]

乳癌を予防または治療するための作用物質のスクリーニング方法であって、

(a)以下のもの:

(1)SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含むポリペプチド;

(2)1つまたは複数のアミノ酸が付加、置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有する、ポリペプチド;

(3)SEQ ID NO:92に対して少なくとも約80%の相同性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド;および

(4)SEQ ID NO:91のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチドを発現する細胞を、作用物質と接触させる段階;

(b)ポリペプチドのリン酸化レベルを検出する段階;

(c)ポリペプチドのリン酸化レベルを、作用物質の非存在下で検出されるポリペプチドのリン酸化レベルと比較する段階;ならびに

(d)ポリペプチドのリン酸化レベルを低下させた作用物質を、乳癌を治療または予防するための作用物質として選択する段階を含む方法。

[請求項1074]

乳癌を予防または治療するための作用物質のスクリーニング方法であって、

(a)以下のもの:

(1)SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含むポリペプチド;

(2)1つまたは複数のアミノ酸が付加、置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO:92の

10

20

30

40

50

アミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有する、ポリペプチド；

(3) SEQ ID NO:92に対して少なくとも約80%の相同性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；および

(4) SEQ ID NO:91のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドヒストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチドを、ポリペプチドによってリン酸化される基質および作用物質と、基質のリン酸化を可能にする条件下で接触させる段階；

10

(b) 基質のリン酸化レベルを検出する段階；

(c) 基質のリン酸化レベルを、作用物質の非存在下で検出される基質のリン酸化レベルと比較する段階；ならびに

(d) 基質のリン酸化レベルを低下させた作用物質を、乳癌を治療または予防するための作用物質として選択する段階
を含む方法。

[請求項1075]

基質がヒストン、または少なくともそのリン酸化部位を含むその断片である、請求項1074記載の方法。

[請求項1076]

20

リン酸化部位がヒストンH3のSer10である、請求項1075記載の方法。

[請求項1077]

乳癌を治療または予防するための化合物用のスクリーニング方法であって、

(a) A7322を、被験化合物の存在下で、PHB2/REAまたはその機能的同等物と接触させる段階であって、A7322が以下のものからなる群より選択されるポリペプチドである段階：

(1) SEQ ID NO:80(A7322)のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) ポリペプチドがSEQ ID NO:80のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO:80のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(3) ポリペプチドがSEQ ID NO:80のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、SEQ ID NO:79のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドヒストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；

30

(b) 段階(a)のポリペプチド間の結合を検出する段階；および

(c) A7322ポリペプチドとPHB2/REAポリペプチドとの間の結合を阻害する被験化合物を選択する段階

を含む方法。

[請求項1078]

PHB2/REAの細胞局在を指標とする、A7322とPHB2/REAとの間の結合のインヒビター用のスクリーニング方法であって、

40

(a) 候補化合物を、A7322およびPHB2/REAタンパク質を発現する細胞と接触させる段階であって、A7322が以下のものからなる群より選択されるポリペプチドである段階：

(1) SEQ ID NO:80(A7322)のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) ポリペプチドがSEQ ID NO:80のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO:80のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(3) ポリペプチドがSEQ ID NO:80のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、SEQ ID NO:79のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドヒストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；

50

(b) PHB2/REAタンパク質の細胞内局在を検出する段階; および
 (c) 被験化合物の非存在下で検出されるPHB2/REAタンパク質のレベルに比して核内のPHB2/REAタンパク質のレベルを低下させる化合物を選択する段階
 を含む方法。

[請求項1079]

ER の転写活性を指標とする、A7322とPHB2/REAとの間の結合のインヒビター用のスクリーニング方法であって、

(a) 候補化合物を、A7322およびPHB2/REAを発現し、かつエストロゲン応答性転写調節領域および該転写調節領域の制御下で発現されるレポーター遺伝子を含むベクターが導入された細胞と、E2処理下で接触させる段階;

10

(b) 該レポーター遺伝子の発現または活性のレベルを測定する段階; ならびに

(c) 被験化合物の非存在下で検出される該レポーター遺伝子の発現または活性のレベルに比して該レポーター遺伝子の発現または活性のレベルを低下させる化合物を選択する段階を含む方法。

[請求項1080]

A7322ポリペプチドとPHB2/REAポリペプチドとの結合を阻害する化合物の薬学的有効量を投与する段階を含む、乳癌を治療するための方法であって、A7322が以下のものからなる群より選択されるポリペプチドである、方法:

(a) SEQ ID NO:80(A7322)のアミノ酸配列を含むポリペプチド;

(b) ポリペプチドがSEQ ID NO:80のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO:80のアミノ酸配列を含むポリペプチド;

20

(c) ポリペプチドがSEQ ID NO:80のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、SEQ ID NO:79のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド。

[請求項1081]

PHB2/REAタンパク質の核移行を阻害する化合物の薬学的有効量を投与する段階を含む、乳癌を治療するための方法であって、A7322が以下のものからなる群より選択されるポリペプチドである、方法:

30

(a) SEQ ID NO:80(A7322)のアミノ酸配列を含むポリペプチド;

(b) ポリペプチドがSEQ ID NO:80のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO:80のアミノ酸配列を含むポリペプチド; および

(c) ポリペプチドがSEQ ID NO:80のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、SEQ ID NO:79のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド。

[請求項1082]

TOPKのリン酸化レベルを阻害するための作用物質用のスクリーニング方法であって、

40

(a) 以下のもの:

(1) SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含むポリペプチド;

(2) 1つまたは複数のアミノ酸が付加、置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有する、ポリペプチド;

(3) SEQ ID NO:92に対して少なくとも約80%の相同性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド; および

(4) SEQ ID NO:91のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペ

50

プチド

からなる群より選択されるポリペプチドを、CDK1(SEQ ID NO:95)、サイクリンB1(SEQ ID NO:97)、および作用物質と、リン酸化を可能にする条件下で接触させる段階；

(b)(a)に記載したタンパク質のトレオニン9残基でのリン酸化レベルを検出する段階；

(c)タンパク質におけるトレオニン9残基のリン酸化レベルを、作用物質の非存在下で検出されるタンパク質におけるトレオニン9残基のリン酸化レベルと比較する段階；ならびに

(d)SEQ ID NO:92のアミノ酸配列におけるトレオニン9残基のリン酸化レベルを低下させた作用物質を、インヒビターのための作用物質として選択する段階を含む方法。

[請求項1083]

10

乳癌を予防または治療するための作用物質用のスクリーニング方法であって、

(a)以下のもの：

(1)SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2)1つまたは複数のアミノ酸が付加、置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有する、ポリペプチド；

(3)SEQ ID NO:92に対して少なくとも約80%の相同性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；および

(4)SEQ ID NO:91のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチドを、CDK1(SEQ ID NO:95)、サイクリンB1(SEQ ID NO:97)、および作用物質と、リン酸化を可能にする条件下で接触させる段階；

(b)(a)に記載したタンパク質のトレオニン9残基でのリン酸化レベルを検出する段階；

(c)タンパク質におけるトレオニン9残基のリン酸化レベルを、作用物質の非存在下で検出されるタンパク質におけるトレオニン9残基のリン酸化レベルと比較する段階；ならびに

(d)SEQ ID NO:92のアミノ酸配列におけるトレオニン9残基のリン酸化レベルを低下させた作用物質を、乳癌を治療または予防するための作用物質として選択する段階を含む方法。

[請求項1084]

30

SEQ ID NO:92からなるペプチドの生物機能を阻害する、SEQ ID NO:98を含むポリペプチド、または該ポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドのアミノ酸配列。

[請求項1085]

生物機能が細胞増殖活性である、請求項1084記載のポリペプチド。

[請求項1086]

8～50残基からなる、請求項1084記載のポリペプチド。

[請求項1087]

細胞膜透過性物質によって修飾されている、請求項1084記載のポリペプチド。

[請求項1088]

40

以下の一般式を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO:92からなるペプチドの生物機能を阻害する、請求項1084記載のポリペプチド：

[R]-[D]

式中、[R]が細胞膜透過性物質を表し、かつ[D]がSEQ ID NO:98を含む断片配列のアミノ酸配列または該断片配列を含むポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドのアミノ酸配列を表し、[R]および[D]が直接的またはリンカーによって間接的に連結している。

[請求項1089]

リンカーがアミノ酸配列Gを有する、請求項1088記載のポリペプチド。

[請求項1090]

細胞膜透過性物質が以下のものからなる群より選択されるいずれか1つである、請求項10

50

88記載のポリペプチド:ポリ-アルギニン;Tat/RKKRRQRRR/SEQ ID NO:100;ペネトラチン/RQIKIWFQNRRMKWKK/SEQ ID NO:101;ブフォリンII(Buforin II)/TRSSRAGLQFPVGRVHRLRK/SEQ ID NO:102;トランスポータン(Transportan)/GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL/SEQ ID NO:103;MAP(両親媒性ペプチドモデル)/KLALKLALKALKALKALA/SEQ ID NO:104;K-FGF/AAVALLPAVLALLAP/SEQ ID NO:105;Ku70/VPMLK/SEQ ID NO:106;プリオン/MANLGWLLALFVTMWTDVGLCKKRKP/SEQ ID NO:107;

10

pVEC/LIILRRRIRKQAHHSK/SEQ ID NO:108;Pep-1/KETWWETWWTEWSQPKKRKV/SEQ ID NO:109;SynB1/RGGRLSYSRRRFSTSTGR/SEQ ID NO:110;Pep-7/SDLWEMMMVSLACQY/SEQ ID NO:111;HN-1/TSPLNIHNGQKL/SEQ ID NO:112; およびKu70/PMLKE/SEQ ID NO:114.[請求項1091]ポリ-アルギニンがArg 11(SEQ ID NO:113)である、請求項1090記載のポリペプチド。[請求項1092]アミノ酸配列SEQ ID NO:99を含む、請求項1091記載のポリペプチド。

20

[請求項1093]SEQ ID NO:98を含むポリペプチド、該ポリペプチドと機能的に同等なポリペプチド、またはそれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを有効成分として含む、乳癌の治療および予防のいずれかまたは両方のための作用物質であって、ポリペプチドがSEQ ID NO:92からなるペプチドの生物機能を阻害する、作用物質。[請求項1094]生物機能が細胞増殖活性である、請求項1093記載の作用物質。[請求項1095]ポリペプチドが8~50残基からなる、請求項1093記載の作用物質。

30

[請求項1096]有効成分がポリペプチドであり、該ポリペプチドが細胞膜透過性物質によって修飾されている、請求項1093記載の作用物質。[請求項1097]ポリペプチドが以下の一般式を有し、ポリペプチドがSEQ ID NO:2からなるペプチドの生物機能を阻害する、請求項1096記載の作用物質:[R]-[D]式中、[R]が細胞膜透過性物質を表し、かつ[D]がSEQ ID NO:98を含む断片配列のアミノ酸配列または該ポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを表し、[R]および[D]が直接的またはリンカーによって間接的に連結している。[請求項1098]

40

リンカーがアミノ酸配列Gを有する、請求項1097記載の作用物質。[請求項1099]細胞膜透過性物質が以下のものからなる群より選択されるいずれか1つである、請求項1098記載のポリペプチド:ポリ-アルギニン;Tat/RKKRRQRRR/SEQ ID NO:100;ペネトラチン/RQIKIWFQNRRMKWKK/SEQ ID NO:101;ブフォリンII/TRSSRAGLQFPVGRVHRLRK/SEQ ID NO:102;トランスポータン/GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL/SEQ ID NO:103;MAP(両親媒性ペプチドモデル)/KLALKLALKALKALKALA/SEQ ID NO:104;

50

K-FGF/AAVALLPAVLLALLAP/SEQ ID NO:105;
Ku70/VPMLK/SEQ ID NO:106;
プリオン/MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP/SEQ ID NO:107;
pVEC/LIILRIRRKQAHHSK/SEQ ID NO:108;
Pep-1/KETWWETWWTEWSQPKKRKV/SEQ ID NO:109;
SynB1/RGGRLSYSRRRFSTSTGR/SEQ ID NO:110;
Pep-7/SDLWEMMMVSLACQY/SEQ ID NO:111;
HN-1/TSPLN1HNGQKL/SEQ ID NO:112; および
Ku70/PMLKE/SEQ ID NO:114。

[請求項1100]

10

ポリ-アルギニンがArg 11(SEQ ID NO:113)である、請求項199記載の作用物質。

[請求項1101]

ポリペプチドがアミノ酸配列SEQ ID NO:99を含む、請求項1100記載の作用物質。

[請求項1102]

SEQ ID NO:98を含むポリペプチド、該ポリペプチドと機能的に同等なポリペプチド、またはこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを投与する段階を含む、乳癌の治療および予防のいずれかまたは両方のための方法であって、ポリペプチドがSEQ ID NO:92からなるペプチドの生物機能を阻害する、方法。

[請求項1103]

20

乳癌の治療および予防のいずれかまたは両方のための薬学的組成物の製造における、SEQ ID NO:98を含むポリペプチド、該ポリペプチドと機能的に同等なポリペプチド、またはそれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用であって、ポリペプチドがSEQ ID NO:92からなるペプチドの生物機能を阻害する、使用。

[請求項1104]

SEQ ID NO:98を含むポリペプチド、または該ポリペプチドと機能的に同等なポリペプチド、および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物であって、ポリペプチドがSEQ ID NO:92からなるペプチドの生物機能を阻害する、組成物。

[請求項1105]

30

乳癌を予防または治療するための作用物質用のスクリーニング方法であって、

(a)候補作用物質を、プロテインホスファターゼ1 (SEQ ID NO:116)と、以下のもの:

(1)SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2)1つまたは複数のアミノ酸が付加、置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有する、ポリペプチド；

(3)SEQ ID NO:92に対して少なくとも約80%の相同性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；および

(4)SEQ ID NO:91のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド

40

からなる群より選択されるポリペプチドを発現する細胞と接触させる段階；

(b)(a)に記載したタンパク質のリン酸化レベルを検出する段階；

(c)タンパク質のリン酸化レベルを、作用物質の非存在下で検出されるタンパク質のリン酸化レベルと比較する段階；ならびに

(d)タンパク質のリン酸化レベルを低下させた作用物質を、乳癌を治療または予防するための作用物質として選択する段階を含む方法。

[請求項1106]

50

乳癌を予防または治療するための作用物質用のスクリーニング方法であって、

(a)以下のもの：

(1) SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含むポリペプチド；
(2) 1つまたは複数のアミノ酸が付加、置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有する、ポリペプチド；
(3) SEQ ID NO:92に対して少なくとも約80%の相同性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；および
(4) SEQ ID NO:91のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであつて、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド

10

からなる群より選択されるポリペプチドを、p47(SEQ ID NO:118)、p97(SEQ ID NO:120)、および作用物質と接触させる段階；

(b) ポリペプチド間の結合またはp97(SEQ ID NO:120)のリン酸化を検出する段階；ならびに

(c) ポリペプチド間の結合またはp97のリン酸化を阻害する被験化合物を選択する段階を含む方法。

[請求項1107]

乳癌を予防または治療するための作用物質用のスクリーニング方法であつて、

(a) 候補作用物質を、PBK/TOPKを発現する細胞と接触させる段階；

(b) 細胞構造および/または細胞周期上のG2/M集団を観察する段階；ならびに

20

(c) 細胞間結合を長い細胞間架橋へ変化させる、および/または細胞のG2/M集団を増加させる化合物を選択する段階を含む方法。

[請求項1108]

ホスファターゼ1 を介したTOPKの脱リン酸化を増強するための作用物質用のスクリーニング方法であつて、

(a) 候補作用物質を、プロテインホスファターゼ1 (SEQ ID NO:116)と、以下のもの：

(1) SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) 1つまたは複数のアミノ酸が付加、置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有する、ポリペプチド；

30

(3) SEQ ID NO:92に対して少なくとも約80%の相同性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；および

(4) SEQ ID NO:91のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであつて、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチドを発現する細胞と接触させる段階；

(b) (a)に記載したタンパク質のリン酸化レベルを検出する段階；

(c) タンパク質のリン酸化レベルを、作用物質の非存在下で検出されるタンパク質のリン酸化レベルと比較する段階；ならびに

40

(d) タンパク質のリン酸化レベルを低下させた作用物質を、乳癌を治療または予防するための作用物質として選択する段階。

[請求項1109]

TOPKを介したp97リン酸化を阻害するための作用物質用のスクリーニング方法であつて、

(a) 以下のもの：

(1) SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) 1つまたは複数のアミノ酸が付加、置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有する、ポリペプチド；

50

(3) SEQ ID NO:92に対して少なくとも約80%の相同性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド;および

(4) SEQ ID NO:91のスクレオチド配列からなるポリスクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリスクレオチドによってコードされるポリペプチドであつて、SEQ ID NO:92のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチドを、p47(SEQ ID NO:118)、p97(SEQ ID NO:120)および作用物質と接触させる段階;

(b) ポリペプチド間の結合またはp97(SEQ ID NO:120)のリン酸化を検出する段階;ならびに

(c) ポリペプチド間の結合またはp97のリン酸化を阻害する被験化合物を選択する段階を含む方法。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】乳癌組織および正常組織におけるA7322およびF3374の発現。(A)半定量的RT-PCRによる、12例の乳癌患者(3T、31T、149T、175T、431T、453T、491T、554T、571T、709T、772T、および781T)由来の腫瘍細胞におけるA7322の発現、乳癌症例(16、102、247、252、302、473、478、502、552、646、769、および779)由来の腫瘍細胞におけるF3374の発現、ならびに乳癌症例(#4、5、13、86、110、214、327、411、623、624、631、および869)由来の腫瘍細胞におけるPBK/TOPKの発現。(B)半定量的RT-PCRによる、9種の乳癌細胞株(HBC4、HBC5、HBL100、HCC1937、MCF7、MDA-MB-231、SKBR3、T47D、YMB1)ならびに正常ヒト組織(乳腺、肺、心臓、肝臓、腎臓、および脳)におけるF3374の発現。(C)多数のヒト組織を用いたA7322、F3374、およびPBK/TOPKのノーザンプロット分析。MTN膜には、1；心臓、2；脳、3；胎盤、4；肺、5；肝臓、6；骨格筋、7；腎臓、8；脾臓、9；脾臓、10；胸腺、11；前立腺、12；精巣、13；卵巣、14；小腸、15；結腸、16；末梢血白血球、17；胃、18；甲状腺、19；脊髄、20；リンパ節、21；気管、22；副腎、および23；骨髄由来のヒト正常組織が含まれた。(D)22種の乳癌細胞株(HBC4、HBC5、HBL100、HCC1937、MCF7、MDA-MB-231、MDA-MB-435S、SKBR3、T47D、YMB1、BSY-1、BT-549、HCC1935、MDA-MB-157、BT-20、MDA-MB-453、ZR75-1、BT474、HCC1143、HCC1500、HCC1599、OCUB-F)ならびに正常ヒト組織(乳腺、肺、心臓、肝臓、腎臓、および脳)を用いたA7322、乳癌細胞株ならびに乳房、肺、心臓、肝臓、腎臓、および骨髄を含む正常ヒト組織を用いたF3374、ならびに乳癌細胞株(HBC4、HBC5、HBL100、HCC1937、NCF-7、MDA-MB-231MDA-MB-435S、SKBR3、T47D、およびYBB-1)および正常ヒト組織(乳腺、肺、心臓、肝臓、腎臓、および骨髄)を用いたPBK/TOPKのノーザンプロット分析。(E)F3374V1のゲノム構造。(F)半定量的RT-PCRによる、乳癌細胞株および正常組織におけるF3374V1の発現パターン。(G)ウエスタンプロット分析による、BT-549細胞における外因性A7322タンパク質の発現。

【図2】乳癌細胞株および組織切片における内在性A7322の発現。(A)抗A7322ポリクローナル抗体を用いたウエスタンプロット分析による、SK-BR-3乳癌細胞における内在性A7322タンパク質の発現。(B)SK-BR-3乳癌細胞における内在性A7322タンパク質の細胞内局在。アフィニティー精製した抗A7322ポリクローナル抗体(緑色)と核を識別するためのDAPI(青色)とを用いて免疫細胞化学染色を行った。内在性A7322は細胞質中の局在を示した。(C)～(E)アフィニティー精製した抗A7322ポリクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色分析を行った。(C)乳頭腺管癌(試料番号240および241)、(D)充実腺管癌(試料番号238、242、および290)、および(E)正常乳房組織(試料番号453)において、癌細胞は細胞質で強く染色された。(F)正常ヒト組織(心臓、肺、および肝臓)におけるA7322の免疫組織化学染色。心臓、肺、および肝臓におけるA7322タンパク質の発現はほとんど検出されなかった。

【図3】免疫細胞化学および免疫組織化学分析。(A)抗F3374抗体を用いたウエスタンプロット分析による、乳癌細胞株およびHMECにおける内在性F3374タンパク質の発現。(B)

10

20

30

40

50

完全長F3374タンパク質を用いて外因性に発現させた場合の ホスファターゼ実験。 (C) リン酸化領域の決定のため、F3374欠失構築物の代表的な模式図。 (D) F3374欠失構築物 (-1、 -2、 および -3) をそれぞれ外因性に発現させた場合の ホスファターゼ実験。 (E) 細胞周期の過程での乳癌細胞における内在性PRC1タンパク質の細胞内局在。アフィニティー精製した抗F3374ポリクローナル抗体（赤色）と核を識別するためのDAPI（青色）とを用いてHBC5細胞を免疫細胞化学的に染色した（材料および方法の項を参照）。白の矢印は終期細胞の中央体におけるF3374の局在を示している。 (F) 乳癌および正常乳房組織の切片の免疫組織化学染色の結果。内在性F3374タンパク質を、抗F3374抗体の使用により染色した。正常乳房組織 (10441N) からは発現がほとんど検出されなかつたが、癌細胞は、乳頭腺管癌 (10005Tおよび00317T)、硬癌 (10069Tおよび10571T) および充実腺管癌 (10164Tおよび10185T) を含む、調べた癌組織のすべてで強く染色された。代表的な図は、原倍率200倍での顕微鏡観察によるものである。正常ヒト組織切片（心臓、肺、腎臓、肝臓、および精巣）におけるF3374の免疫組織化学染色の代表的画像。内在性F3374タンパク質は抗F3374抗体によって染色された。原倍率50倍。

【図4】乳癌細胞株および組織切片におけるPBK / TOPKタンパク質の発現。 (A) 抗PBK / TOPKモノクローナル抗体を用いたウエスタンプロット分析による、乳癌細胞株およびHECにおける内在性PBK / TOPKタンパク質の発現。 (B) 抗PBK / TOPKモノクローナル抗体（赤色）と核を識別するためのDAPI（青色）とによって免疫細胞化学的に染色した、乳癌細胞株T47D、BT-20、およびHBC5における内在性PBK / TOPKタンパク質の細胞内局在。内在性PBK / TOPKタンパク質は細胞質中で染色された。 (C) 乳癌 (1~3) および正常乳房 (4) 組織切片の免疫組織化学染色。内在性PBK / TOPKタンパク質は抗PBK / TOPKモノクローナル抗体により染色された。タンパク質の発現は正常乳房組織 (4) ではほとんど検出されなかつたが、癌細胞の細胞質は、乳管癌 (1)、乳頭腺管癌 (2)、および硬癌 (3) を含む、調べた癌組織のすべてで強く染色した。パネルは代表的な顕微鏡写真を表しており、原倍率は左；100倍および右；200倍である。 (D) 正常ヒト組織におけるPBK / TOPKタンパク質の発現パターン。心臓 (1)、肺 (2)、肝臓 (3)、腎臓 (4)、および精巣 (5) の組織を、抗PBK / TOPKモノクローナル抗体を用いて検討した。その結果として、発現されたPBK / TOPKタンパク質は、4種の重要臓器 (1~4) ではほとんど検出されなかつたが、精巣では、精細管の外層 (5) に限局して高度に染色された。これらの免疫組織化学染色の結果は、MTNの結果（図1C）とよく相關した。パネルは代表的な顕微鏡写真を示しており、原倍率は左；100倍および右；200倍である。

【図5】乳癌細胞におけるA7322の発現を低下させるように設計された低分子干渉RNA (siRNA) の増殖阻害効果。 (A) 乳癌細胞株BT-549細胞における内在性A7322の発現の抑制を示している半定量的RT-PCR。 2MGを内部対照として用いた。 (B) BT-549細胞におけるA7322のノックダウンによるコロニー数の減少を示しているMTTアッセイ。 (C) BT-549細胞におけるA7322のノックダウンによるコロニー数の減少を示しているコロニー形成アッセイ。 (D) BT-549細胞における内在性A7322の発現の抑制を示している半定量的RT-PCR。 A7322の発現を低下させないように設計されたsiRNA-ミスマッチのノックダウン効果。 (E) BT-549細胞におけるA7322のノックダウンによるコロニー数の減少を示しているMTTアッセイ。 (F) BT-549細胞におけるA7322のノックダウンによるコロニー数の減少を示しているコロニー形成アッセイ。 (G) 半定量的RT-PCRによる、乳癌細胞株BT-474細胞におけるA7322の発現を低下させないように設計されたsiRNA-ミスマッチのノックダウン効果。 (H) BT-474細胞における、A7322-ミスマッチ性siRNA (mis-#3；元はsi-#3から設計) によるコロニー数の減少を示しているMTTアッセイ。 (I) BT-474乳癌細胞における内在性A7322の発現の抑制によるアポトーシス細胞（サブG1細胞率によって表される）の集団の増加を示しているFACS分析。合計10,000個の細胞を、ネオマイシン選択から2日後のモックをトランسفェクトしたBT-474細胞およびsi-#3をトランسفェクトしたBT-474細胞から同様に算定した。

【図6】乳癌細胞におけるF3374の発現を低下させるように設計された低分子干渉RNA (siRNA) の増殖阻害効果。 (A) 乳癌細胞株T47D細胞における内在性F3374の発現の抑制を示す。

している半定量的RT-PCR。2MGを内部対照として用いた。(B) BT-549細胞におけるF3374のノックダウンによるコロニー数の減少を示しているコロニー形成アッセイ。(C) T47D細胞におけるF3374のノックダウンによるコロニー数の減少を示しているMTTアッセイ。(D) 乳癌細胞株HBC4におけるF3374特異的siRNA(si#1およびsi#4)による内在性F3374の発現の抑制を示している半定量的RT-PCR。2MGを添加対照として利用した。(E) HBC4細胞におけるF3374のノックダウンによるコロニー数の減少を示しているコロニー形成アッセイ。(F) HBC4細胞におけるF3374のノックダウンによるコロニー数の減少を示しているMTTアッセイ(si#1およびsi#4; それぞれp<0.001; 独立t検定)。(G) siRNAによる内在性F3374発現の停止がウエスタンプロット分析により確認された。-アクチンを添加対照として利用した。(H) 顕微鏡検査による、siF3374をトランスフェクトしたHBC4細胞の形態学的变化。siEGFPを対照siRNAとして用いた。矢印は2つの分離中の細胞を示している(右パネル)。

【図7】乳癌細胞株に対するPBK / TOPK-siRNAの増殖阻害効果。(A)～(B)半定量的RT-PCRの結果は、ネオマイシン選択から11日後のPBK / TOPK発現停止を示している。GAPDHを内部対照として利用した。11日目の細胞生存度を評価するためにMTTアッセイを行い、標準化した結果を、モックの結果を1.0とした上でグラフ化した。コロニー形成アッセイは選択から3週後に行った(「材料および方法」の項を参照)。2つのsiRNA構築物(si-#2および#3)は、T47D(A)およびBT-20(B)のいずれの細胞株においても内部PBK / TOPK発現に対するノックダウン効果を示し、細胞増殖を阻害した。モックを陰性対照として用いた。(C)～(D)モック対照(C)とsi-#3で誘導したT47D細胞(D)との間の表現型の違いを、ネオマイシン選択から2週後に顕微鏡観察によって調べた。PBK / TOPKが除去された細胞に関しては不規則な外観が観察された;長く伸びた中央体、消失および無秩序化した細胞質分裂(D)。(E)内部PBK / TOPK発現のサイレンシングを確かめたウエスタンプロット法の結果を示している。(F)モック対照をトランスフェクトした細胞よりもsi-#3で誘導したT47D細胞の方が、アポトーシス細胞(サブG1細胞率によって表される)の集団が多いことを示したFACSの結果を表している。モックをトランスフェクトしたT47D細胞およびsi-#3をトランスフェクトしたT47D細胞から合計10,000個の細胞を同様に算定した。

【図8】A7322の相互作用タンパク質としてのPHB2 / REAの同定。(A)免疫沈降したタンパク質を含むSDS-PAGEゲルの銀染色。BT-549細胞にモック(モックレーン)またはFLAGタグ付加A7322(A7322-FLAGレーン)をトランスフェクトした。A7322レーンに出現した差異を示すバンドを質量分析に供し、33kDa付近に認められたバンドの1つをPHB2 / REAとして同定した。右のパネルは免疫沈降した試料のウエスタンプロット分析を示している。FLAGタグ付加A7322の発現が、抗FLAG M2モノクローナル抗体を用いることによって検出された。(B)乳癌臨床試料(4T、13T、86T、138T、327T、341T、411T、631T、818T、および846T)と乳腺とにおけるPHB2 / REAおよびA7322転写産物に関する半定量的RT-PCRの結果。2-MGを内部対照として利用した。乳癌細胞株(HBC4、HBC5、HBL100、HCC1937、MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435S、SK-BR-3、T-47D、YMB-1、BSY-1、BT-549、HCC1935、MDA-MB-157、BT-20、MDA-MB-453、ZR-75-1、BT474、HCC1143、HCC1500、HCC1599、OCUB-F)、HMEC、および乳腺におけるPHB2 / REAおよびA7322転写産物に関する半定量的RT-PCRの結果。2-MGを内部対照として利用した。(C)A7322とPHB2 / REAタンパク質との相互作用。COS-7細胞に対して、FLAGタグ付加モック、FLAGタグ付加A7322、HAタグ付加モックおよびHAタグ付加PHB2 / REAの組み合わせをトランスフェクトし、抗FLAG M2アガロースと免疫沈降させて、抗HA高親和性(3F10)ラットモノクローナル抗体とのイムノプロットを行った。FLAGタグ付加A7322およびHAタグ付加PHB2 / REAをトランスフェクトした第4レーンは、これら2つのタンパク質の直接結合を示した。右のパネルは、抗HAアガロース結合物との免疫沈降および抗FLAG M2モノクローナル抗体とのイムノプロットによるA7322とPHB2 / REAタンパク質との相互作用の確認を示している。FLAGタグ付加A7322およびHAタグ付加PHB2 / REAをトランスフェクトした第4レーンは、これら2つのタンパク質の直接結合を示している。(D)乳癌細胞におけるPHB2 / REAの内在性発現。抗PHB2 / REAポリクローナル抗体(緑色)と核を識別するためのDAPI(青色)とを用いて、SK-BR-3乳癌細胞において免疫細胞化学

染色を行った。内在性PHB2 / REAは主に細胞質中での局在を示したが、一部の細胞は核内での局在も示した（矢印）。

【図9】A7322はER タンパク質との直接結合を示さない。（A）A7322とER タンパク質との相互作用がないことの確認。COS-7細胞に対して、HAタグ付加モック（モック-HA）、HAタグ付加A7322（A7322-HA）、FLAGタグ付加モック（モック-FLAG）およびFLAGタグ付加ER（ER -FLAG）の組み合わせをトランスフェクトし、抗FLAG M2アガロースと免疫沈降させて、抗HA高親和性（3F10）ラットモノクローナル抗体とのイムノプロットを行った。A7322-HAおよびER -FLAGをトランスフェクトした第4レーンは、これら2つのタンパク質の直接結合を示さなかった。右のパネルは、抗HAアガロース結合物との免疫沈降および抗FLAG M2モノクローナル抗体とのイムノプロットによるA7322とER タンパク質との相互作用の確認を示している。A7322-HAおよびER -FLAGをトランスフェクトした第4レーンは、これら2つのタンパク質の直接結合を示さなかった。（B）エストラジオール処理下でのA7322およびER の細胞内局在。MCF-7（ER+）細胞にA7322-HA（緑色）およびER -FLAG（赤色）を24時間トランスフェクトして、DMSO（-E2；左パネル）または1 μM E2（+E2；右パネル）でさらに24時間処理した。A7322はE2の下では細胞質中に保たれた。同じ実験をSK-BR-3（ER-）細胞を用いて行った。（C）E2の下でA7322の移動がないことを示している。10

【図10】A7322によるPHB2 / REAの核移行の阻害。（A）A7322の存在下でのPHB2 / REAの細胞内局在。MCF-7（ER+）細胞に対して、HAタグ付加PHB2 / REA（緑色）、FLAGタグ付加ER（赤色）、およびFLAGタグ付加モック（-A7322；左パネル）、またはFLAGタグ付加A7322（赤色）（+A7322；右パネル）を24時間トランスフェクトして、1 μMのE2でさらに24時間処理した。左パネル中の矢印は、A7322の非存在下でのPHB2 / REAの核移行を示しており、一方、右パネルに示すように、A7322の存在下ではPHB2 / REAは細胞質中に保たれた。（B）同じ実験をSK-BR-3（ER-）細胞を用いて行ったところ、A7322の存在によるPHB2 / REAの核移行の阻害が示された。（C）siRNAオリゴヌクレオチドを用いたA732、ER 、およびPHB2のタンパク質レベルでの発現の阻害。si-EGFPを対照siRNAとして用いた。ACTBをウエスタンプロット分析用の添加対照として利用した。（D）A7322の非存在下での内在性PHB2 / REAの細胞内局在。MCF-7（ER+）細胞をsi-A7322で、または対照としてのsi-EGFPで処理した。siRNA処理から24時間後に、細胞をE2で48時間処理し、続いて免疫細胞化学染色により分析した。20

【図11】内在性PHB2 / REAの核移行の阻害によるER転写活性の増強。（A）MCF-7細胞およびSK-BR-3細胞における外来のA7322タンパク質および内在性PHB2 / REAタンパク質の発現。（B）ER の転写活性を決定するためのSEAPアッセイ。MCF-7（ER+）細胞またはSK-BR-3（ER-）細胞に対して、FLAGタグ付加A7322（FLAG-A7322）構築物とエストロゲン応答性レポーター遺伝子（pERE-TA-SEAP）構築物、またはモック対照とpERE-TA-SEAPレポーター構築物をそれぞれ同時にトランスフェクトした。（C）A7322によるPHB2 / REAの核移行の阻害の概要を示している。A7322の非存在下では（-A7322）、PHB2 / REAはER とともに核に移行して、エストラジオールをリガンドとするER の転写活性を抑制する（左パネル）。これに対して、A7322の存在下では（+A7322）、PHB2 / REAは細胞質中のA7322と結合して、PHB2 / REAの核移行を阻害し、ER の転写活性を増強するように促す（右パネル）。30

【図12】F3374の細胞周期依存的な発現。（A）FACS分析は、同調から0～12時間後まで3時間毎に収集したT47D細胞の集団を示している。（B）T47D細胞における有糸分裂中のF3374のウエスタンプロット分析。特筆すべきことに、細胞周期停止からの解除後0～3時間（G1 / S期）に、F3374の発現は最も高く、細胞周期停止からの解除後9～12時間（G2 / M期）の間に、そのリン酸化は顕著になった。40

【図13】F3374タンパク質の発現はAURKBによって調節された。（A）C末端のF3374タンパク質（591～730アミノ酸）の推定アミノ酸配列。オーロラキナーゼの推定される3つのコンセンサスリン酸化部位（[R/K]X[T/S]および[R/K]X[T/S][I/L/V]）を下線によって示した。（B）11種の乳癌細胞株（BT-20、BT549、HBC4、HBC5、HCC1937、MCF-7、MDA-MB-231、SK-BR-3、T47D、およびYMB-1）、ヒト乳腺上皮細胞株（HMEC）および正常乳腺におけるF3374およびAURKB転写産物に関する半定量的RT-PCR実験。FDFT1を定量対照として用い50

た。(C) F3374およびAURKBタンパク質の免疫共沈降。HAタグ付加F3374およびFlagタグ付加AURKBタンパク質をトランスフェクトしたHEK293T細胞からの細胞溶解物を、マウス抗Flagまたは正常マウスIgGのいずれかと免疫沈降させた。免疫沈降物を、マウス抗HA抗体を用いてイムノプロットした。W.C.L.は全細胞溶解物を表す。(D)インビトロキナーゼアッセイを、F3374の精製C末端組換えタンパク質(36kDa、ヒスチジンタグを含む)を用いて行った。F3374組換えタンパク質を、ARUKBを含む反応混合物に添加した(本文参照)。矢印はリン酸化F3374を表す。(E) AURKB特異的siRNA処理によるAURKBの内在性発現の除去は、F3374タンパク質の総量およびリン酸化の低下を招いた。-アクチンをタンパク質量の対照として利用した。(F) T47D細胞を、アフィニティー精製した抗F3374およびAURKBポリクローナル抗体(緑色)と核を識別するためのDAPI(青色)とを用いて免疫細胞化学的に染色した(材料および方法の項を参照)。矢印は、T47D細胞における細胞質分裂中のAURKBおよびF3374タンパク質をそれぞれ表す。

【図14】有糸分裂中のPBK / TOPKタンパク質のリン酸化。(A)同調から0~15時間後まで3時間毎に収集した細胞の集団を示すFACS分析の結果を表している。(B) PBK / TOPK発現を調べたウエスタンプロット法の結果を表している。特筆すべきことに、細胞周期の解除の6~12時間後、(A)に示すようにG2 / M期に相当する時に、PBK / TOPKはリン酸化および上方制御される。(C)細胞周期の解除の12時間後の代表的な免疫細胞化学染色。内在性PBK / TOPKの強い染色が、分裂前期または分裂中期の時点で凝縮染色体付近に検出された(矢印により表示)。(D)有糸分裂中のPBK / TOPKのリン酸化の結果を表している。0.3ug / mLのノコダゾールによる6、12、および18時間の処理により、リン酸化PBK / TOPKの時間依存的な強度の増加が認められた(左パネル)。細胞溶解物をさらに、1Uのホスファターゼとともに/伴わずに30で2時間インキュベートしたところ、矢印によって示した緩徐移動性のバンドがリン酸化PBK / TOPKタンパク質であることが明らかになった(右パネル)。(E) G2 / M期にある細胞(矢印)の割合がノコダゾールによる処理から6~18時間後に上昇したことを示すFACS分析の結果を表している。

【図15】PBK / TOPKタンパク質はインビトロおよびインビボでSer10-ヒストンH3をリン酸化する。(A) PBK / TOPKの精製組換えタンパク質(40kDa、ヒスチジンタグを含む)を用いて行ったインビトロキナーゼアッセイの結果を表している。PBK / TOPKに加えて、ヒストン混合物またはヒストンH3を基質として添加した。リン酸化ヒストンH3、およびPBK / TOPKの自己リン酸化は、それぞれ矢印および星印(*)によって表されている。(B) T47D細胞に対して野生型およびキナーゼデッド(dead)変異体(K64-65A)をトランスフェクトし、その後100nMオカダ酸(OA)による処理を6時間行った。OA処理は、両方のPBK / TOPKタンパク質のリン酸化を引き起こしたが(矢印)、Ser10特異的抗体のリン酸化によって検出されるようにH3のリン酸化を誘導したのは野生型タンパク質のみであった。(C)トランスフェクションおよび2週間にわたるネオマイシン選択後に、siRNA(si-#3)により、T47D細胞におけるPBK / TOPKの内部発現が停止を受けたことを示している。その結果、ヒストンH3のSer10でのリン酸化の低下により、PBK / TOPK除去が達成された。-アクチンおよびH3全体についても添加対照として検討した。(D) PBK / TOPKおよびヒストンH3の免疫細胞化学染色分析の結果を表している。この結果により、乳癌細胞株T47DおよびHBC5において、PBK / TOPK(赤色)が、有糸分裂細胞(分裂前期)の凝縮染色体(青色)上のリン酸化ヒストンH3とSer10(緑色)で合わさることが示された。(E) T47D細胞の分裂中期におけるPBK / TOPKおよびリン酸化ヒストンH3のセリン10での細胞内局在を示している。(F) PBK / TOPK発現およびヒストンH3リン酸化が、分裂後期細胞では減少したことを示している(白抜き矢印)。ブロック矢印は間期の細胞を表している。

【図16】有糸分裂細胞におけるCDK1-サイクリンB1によるPBK / TOPKタンパク質のリン酸化。(A)乳癌細胞株T47D細胞の有糸分裂細胞における内在性PBK / TOPK、CDK1、およびサイクリンB1の核移行。矢印は有糸分裂細胞におけるPBK / TOPK(上パネル)、CDK1(中央パネル)、およびサイクリンB1(下パネル)の核移行を表している。(B) PBK / TOPKはインビトロでCDK1-サイクリンB1によって直接的にリン酸化された。野生型-PBK / TOPK(WT)組換えタンパク質は、CDK1-サイクリンB1組換えタンパク質によってリン酸化されたが

10

20

30

40

50

、Thr9-PBK / TOPKでのアラニン置換変異体（T9A）はリン酸化されなかった。（C）CDK1-サイクリンB1によるPBK / TOPKのThr9でのリン酸化の、pp1-18ペプチドによる阻害。CDK1-サイクリンB1により誘導されるTOPKのリン酸化に対するペプチドブロッキングの有効性をインビトロキナーゼアッセイによって調べた。TOPKの組換えタンパク質およびCDK1-サイクリンB1を、透過性ペプチドをそれぞれ0、5、10、および20 μMの濃度で添加した上でインキュベートした。SDS-PAGEおよびオートラジオグラフィーの後に、リン酸化したタンパク質を観察した。（D）pp1-18ペプチド処理は、PBK / TOPKを発現するT47Dの細胞増殖を用量依存的に有意に抑制した（P=0.0096スチューデントt検定）。これに対して、pp1-18ペプチドはPBK / TOPK陰性HMEC細胞の増殖には影響を及ぼさなかった。生細胞の数をMTTアッセイによって測定した。（E）pp1-18ペプチド処理による、T47D細胞の細胞周期に対する効果。T47D細胞をノコダゾール（0.3 μg / mL）で処理し、その後pp1-18ペプチド（10 μM）を添加してさらに18時間または24時間おいて収集し、続いて抗PBK / TOPK抗体を用いるウエスタンプロット分析およびFACS分析を行った。（F）顕微鏡検査による、50 μMのpp1-18ペプチドで処理したT47D細胞の形態学的变化。矢印は、細胞質分裂中の、pp1-18ペプチドで処理した細胞の長い細胞間架橋を示している。

【図17】有糸分裂細胞においてPP1によって調節されるPBK / TOPKタンパク質の自己リン酸化またはPBK / TOPKのリン酸化、およびCDK1によるPBK / TOPKの活性化またはPP1の不活性化。（A）PBK / TOPKは有糸分裂細胞においてリン酸化された。T47D細胞をノコダゾールで18時間処理し、FACS分析およびホスファターゼアッセイを行った。（B）有糸分裂細胞におけるPBK / TOPKの自己リン酸化。T47D細胞に対して、野生型TOPK（WT）、Thr9でのアラニン置換変異体（T9A）、キナーゼデッド変異体（KD）、および二重変異体（T9A / KD）をそれぞれトランスフェクトして、抗HAモノクローナル抗体を用いるウエスタンプロット分析を行った。WTおよびT9Aはリン酸化されたが、KDおよびT9A / KDはリン酸化されなかった。（C）PBK / TOPKのリン酸化が、オカダ酸（OA）処理によって誘導された。T47D細胞を100 nMのオカダ酸（OA）で処理し、処理から1、3、および9時間後に細胞を収集した。リン酸化バンドがOAによる処理から9時間後に出現し、これはPPアーゼアッセイによって立証された。（D）PBK / TOPKとPP1との相互作用。COS-7細胞に対して、GSTを融合させたPP1（GST-PP1）およびHAタグ付加PBK / TOPK（HA-PBK / TOPK）を同時にトランスフェクトした上で、平衡化したグルタチオンセファロース4Bビーズを用いてプルダウンするか、または抗HAモノクローナル抗体を用いて免疫沈降させ、その後に抗GST抗体またはHAモノクローナル抗体を用いるウエスタンプロット分析を行った。（E）TOPKは有糸分裂細胞においてPP1処理ならびにPPアーゼ処理によって脱リン酸化された。（F）T47D細胞をノコダゾールで16時間処理し、次いで25 nMのCDK1インヒビターと一緒に0~4時間インキュベートした後に収集してFACS分析を行った。（G）CDK1インヒビター処理後の様々な時点（0、0.5、1、2、および4時間）での各細胞周期の集団（%）をグラフ化した。（H）等量の全タンパク質を、抗TOPKモノクローナル抗体、抗ホスホ-PP1（Thr320）ポリクローナル抗体、抗全PP1ポリクローナル抗体、抗ホスホ-Rb（Ser807 / 811）ポリクローナル抗体、および抗全Rbモノクローナル抗体をそれぞれ用いてイムノプロットした。

【図18】siRNAによるPBK / TOPKの除去は有糸分裂不全およびG1停止をもたらした。（A）si-TOPK-#3によるタンパク質レベルでのPBK / TOPK発現のノックダウンに関するウエスタンプロット分析。si-TOPK-#3で処理したT47D細胞では、siEGFPで処理した細胞に比してPBK / TOPK発現が劇的に抑制された。-アクチンをウエスタンプロット分析の対照として利用した。（B）si-TOPK-#3またはsiEGFPによるトランスフェクションから2日後に細胞形態を位相差顕微鏡検査によって観察した（上のパネル）。si-TOPK-#3またはsiEGFPによるトランスフェクションから2日後の免疫細胞化学染色によっても細胞形態を調べた（下のパネル）。細胞の形状を明確にするために、アクチン構造をAlexa Fluor 594ファロイジンで染色し、核をDAPIで対比染色した。（C）T47D細胞にsi-TOPK-#3またはsiEGFPをトランスフェクトした。トランスフェクションから2日後に、細胞を0.3 μg / mLのノコダゾールで処理し、さらに24時間インキュベートした。細胞形態および細胞周期を、それぞれ位

相差顕微鏡検査およびFACS分析によって調べた。(D) T47D細胞に対照としてのsi-EGFPをトランスフェクトし、細胞有糸分裂の持続時間をタイムラプス顕微鏡検査によって測定した。(E) T47D細胞にTOPK-#3をトランスフェクトし、細胞有糸分裂の持続時間をタイムラプス顕微鏡検査によって測定した。(F) T47D細胞に野生型(WT)またはキナーゼデッド型のHAタグ付加TOPK-発現ベクターをトランスフェクトし、続いてそれぞれsi-EGFPまたはsi-TOPK-#3をトランスフェクトした。各siRNAのトランスフェクションから48時間後に、本発明者らは免疫細胞化学染色を行った。外因性に発現されたTOPKタンパク質を、抗HAモノクローナル抗体を用いて免疫染色した。アクチン構造を希釈Alexa Fluor 594ファロイジンで染色し、核をDAPIで対比染色した。

【図19】PBK / TOPKはインビトロおよびインビボでp97 / VCPタンパク質をリン酸化する。
。(A) PBK / TOPKとp47タンパク質との相互作用。COS-7細胞にHAタグ付加PBK / TOPK(HA-PBK / TOPK)構築物をトランスフェクトし、次いで溶解緩衝液で溶解した。続いて、細胞溶解物をGSTタグ付加p47(GST-p47)組換えタンパク質と混合し、続いてGSTビーズを用いてプルダウンした。抗HA抗体を用いた沈降物のイムノプロット法により、GST-p47がHA-PBK / TOPKと共に沈したことが示された。(B) ノコダゾール処理下または非処理下のT47D細胞における外因性に発現されたP47と内在性PBK-TOPKとの共局在。(C) 乳癌細胞株におけるp97およびPBK / TOPKタンパク質の発現パターン。等量の全タンパク質を乳癌細胞株(BT-5 49、HBC5、HCC1937、MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435S、T47D、およびZR75-1)およびHBL 100、およびヒト哺乳動物上皮細胞株(HMEC)から調製した。SDS-PAGEおよび膜転写の後に、抗TOPKモノクローナル抗体または抗p97ポリクローナル抗体を用いてタンパク質をイムノプロットした。-アクチンをウエスタンプロット分析の対照として利用した。(D) co-IP実験によるPBK / TOPKとp97タンパク質との相互作用。本発明者らはHA-PBK / TOPKおよびmycタグ付加p97(myc-p97)構築物をCOS7細胞に同時にトランスフェクトし、続いてHAタグ抗体と免疫共沈降させた。HA-PBK / TOPKはmyc-p97と直接的には相互作用しなかった。(E) PBK / TOPKはアダプターとしてのp47タンパク質を介してp47 / p97複合体と結合する。COS-7細胞に対してGST融合p47、mycタグ付加p97、またはHAタグ付加TOPK構築物による三重トランスフェクションを行った。そのようなタンパク質間の複合体を抗GST抗体または抗mycモノクローナル抗体を用いて免疫沈降させ、続いて抗HAまたは抗mycモノクローナル抗体のそれによるウエスタンプロット法を行った。溶解緩衝液による5回の洗浄およびSDS-PAGEの後に、タンパク質間のそのような相互作用を上述の通りに調べた。(F) p97に関するインビトロキナーゼアッセイ。免疫沈降したp97タンパク質を組換えTOPKタンパク質と一緒に30度30分間インキュベートした。(G) T47D細胞に、si-EGFPおよびsi-p97のsiRNA二重鎖を各100pmolトランスフェクトした。(H) siRNAによるトランスフェクションから2日後に、細胞形態を位相差顕微鏡検査によって観察した。

【発明を実施するための形態】

【0038】

好みしい態様の詳細な説明

概説

癌に関係する発癌機構の解明、および新規抗癌剤を開発するための可能性のある標的の同定を目的とした取り組みとして、精製した乳癌細胞の集団における遺伝子発現パターンの大規模解析を、27,648種の遺伝子に相当するcDNAマイクロアレイを用いて行った。より具体的には、乳細胞癌の治療のための新規分子標的を単離するために、cDNAマイクロアレイおよびレーザービームマイクロダイセクションの組み合わせを用いて、81例の乳房腫瘍のゲノム全域の正確な発現プロファイルを調べた。

【0039】

上方制御される遺伝子のうち、本発明者は、その発現が乳癌検体の大多数で上方制御されたA7322に焦点を当てた。その後の半定量的RT-PCRおよびノーザンプロットにより、A7322は臨床的乳癌検体および乳癌細胞株で上方制御されるが、脳以外の正常臓器では発現されないことを確認した。NCBIデータベースで組み合わせたA7322のcDNA配列は、ノーザンプロット分析による約15 kbの転写産物よりも短かったことから、本発明者らは、エクソ

10

20

30

40

50

ンコネクションおよび5' RACE実験を行い、A7322 mRNAの全長を得た。最終的に、2,177アミノ酸タンパク質をコードする6,534ヌクレオチドのオープンリーディングフレーム (SEQ ID NO : 79の172～6702) を含む14,763ヌクレオチドのcDNA配列 (GenBankアクセッション番号 ; AB252196) を得た。SMART (simple modular architecture research tool) プログラムにより、予測したA7322タンパク質が、ゴルジを介する適切なタンパク質輸送に必要とされるコドン586と798の間のSec7ドメインを含むことが明らかとなった。

【 0 0 4 0 】

さらに、本発明者は、A7322相互作用タンパク質としてPHB2/REA (GenBankアクセッション番号NM_007273) を同定した。A7322およびPHB2/REAは乳癌細胞の細胞質に同時局在する。PHB2/REAタンパク質の核移行の阻害を介したER の再活性化により、乳癌発生機構においてA7322は機能する。10

【 0 0 4 1 】

上方制御された遺伝子のうち、本発明者らは、4,221ヌクレオチドを含むF3374V1の全長cDNA配列 (GenBankアクセッション番号 ; NM_016448) (730アミノ酸ポリペプチドをコードする2,193ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを有する) の同定にも焦点を当てた。F3374V1遺伝子は15のエクソンを有する。RT-PCRにより、F3374V1 (1,296 bp) は、正常ヒト組織と比較して乳癌細胞で優性に過剰発現していることが示された。その後の半定量的RT-PCRおよびノーザンプロット分析により、精巣、胸腺、胎盤、および骨髄を除く正常ヒト組織と比較して、12例の乳癌検体のうち10例、および試験した乳癌細胞株のすべてで、F3374が過剰発現されたことを確認した。抗F3374ポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色分析により、乳癌細胞内で細胞周期依存性局在を示す内在性F3374を検出した。20

【 0 0 4 2 】

低分子干渉RNA (siRNA) による乳癌細胞の処置が、A7322およびF3374の発現を効果的に阻害し、かつA7322について乳癌細胞株BT-549およびBT-474、またはF3374について細胞株T47DおよびHBC4の細胞/腫瘍成長を抑制することから、これらの遺伝子が細胞の成長増殖に重要な役割を果たすことが示された。これらの所見は、A7322およびF3374の過剰発現が乳癌発生に関与し、かつ乳癌患者に対する特異的治療のための有望な方法を提供するという結論と一致する。

【 0 0 4 3 】

さらに、本発明者は、F3374タンパク質と有糸分裂キナーゼオーロB (AURKB)との相互作用およびAURKBによるそのリン酸化を見いだした。乳癌細胞内でのsiRNAによる有糸分裂キナーゼAURKB発現の枯渇が、F3374タンパク質のリン酸化を減少させ、かつF3374タンパク質の安定性を低減することを実証した。30

【 0 0 4 4 】

したがって、乳癌細胞で有意に過剰発現した遺伝子A7322およびF3374を単離した。半定量的RT-PCRおよびノーザンプロット分析により、A7322およびF3374の発現パターンが乳癌細胞で特異的に過剰発現されたことを確認した。A7322およびF3374の両方のESTが、膀胱癌および非小細胞肺癌で上方制御されたことが、以前報告された。しかしながら、これらの遺伝子と乳癌の関係は、以前は不明であった。さらに、本発明は、これらの遺伝子の全長ヌクレオチド配列を初めて提供する。40

【 0 0 4 5 】

本発明者らは、cDNAマイクロアレイ技術を用いて乳癌では過剰発現するが、精巣および胸腺以外の正常ヒト組織では発現しないことを検出した遺伝子のうち、PBK / TOPK遺伝子に焦点を当てた。免疫組織化学分析はまた、ノーザンプロット分析の結果と一致して高レベルの内在性PBK / TOPK発現を支持した。さらに、siRNA技術による内在性PBK / TOPK発現のノックダウンの結果、乳癌細胞株の増殖が抑制され (図5Aおよび5B) 、これは乳癌細胞内でのPBK / TOPK遺伝子の発癌における役割を実証した。

【 0 0 4 6 】

今まで報告してきた精巣におけるPBK / TOPKの重要な役割に加え、本発明者らによるM50

期でのその細胞内転座の知見は、癌細胞における有糸分裂時のその決定的な機能を示した。さらに、特異的siRNAによるPBK / TOPK発現のノックダウンがサイトカインの機能障害を引き起こし、その後癌細胞のアポトーシスを導くことが実証された（図5C～F）。これらの結果は、PBK / TOPKが細胞分裂および細胞質分裂において重要な役割を果たすという結論と一致する。PBK / TOPKのsiRNA効果についての顕微鏡およびFACS観察結果は、細胞質分裂の完了に必要なアネキシン11での結果（アネキシン11のノックダウンの結果、細胞質橋が細くなり、サブG1期で細胞集団を増加した）と非常に類似していることは注目すべきことである（Tomas A et al., J Cell Biol 2004, 165: 813-22）。

【 0 0 4 7 】

PBK / TOPKがキナーゼドメインを含むことから、本発明者らは、それぞれエストロゲン受容体および細胞有糸分裂シグナルとのその関係を調査するために、OA（オカダ酸）、PM A（ホルボール12-ミリスチン酸13アセテート）、エストラジオール、およびノコダゾールを含む数種の刺激物で細胞を処理した（データ示さず）。これらの刺激物のうち、分裂間期の細胞での有糸分裂様プロセスと、染色体凝集と、Cdc2非依存性様式での有糸分裂への進行とを引き起こすセリン/トレオニンタンパク質ホスファターゼの特異的インヒビターであるOA（Ajiro K et al., J Biol Chem 1996, 271: 13197-201; Gowdy PM et al., J Cell Sci 1998, 111: 3401-10）が、PBK / TOPKのリン酸化を引き起こすことを見いだした。

【 0 0 4 8 】

乳癌細胞株で共通して上方制御されたPBK / TOPKがp38（Abe Y et al., J Biol Chem 2000, 275:21525-31）およびp42/ERK2の上流キナーゼであるという予測とは対照的に、インビトロキナーゼアッセイは、これらのタンパク質のリン酸化を示さなかった（データ示さず）。その代わりに、本発明における最初の報告として、ヒストンH3の高い選択的リン酸化が、PBK / TOPKによって観察された。興味深いことに、ヒストンH3のN末端（Ser10）でのリン酸化は、このリン酸化段階が初期有糸分裂事象であり、OA処理後の染色体凝集を伴うことを示した（Ajiro K et al., J Biol Chem 1996, 271: 13197-201）。

【 0 0 4 9 】

さらに、乳癌細胞を用いた免疫染色実験により、有糸分裂時、特に分裂前期および分裂中期に細胞内の染色体周辺でのPBK / TOPKの細胞内局在が明らかになったため（図8C）、インビボでそれがセリン10でヒストンH3をリン酸化するかどうか判定するためにPBK / TOPKを調べた。OAで刺激したまたは刺激しない野生型とキナーゼデッド（K64-65A変異体：SEQ ID NO: 92におけるリシン64および65がアラニン変異体に変更）PBK / TOPKタンパク質との比較は、PBK / TOPKがヒストンH3のセリン10をリン酸化し（図9B）、内在性PBK / TOPKタンパク質が、有糸分裂細胞内でリン酸化されたヒストンH3と十分融合する（図9D）ことを実証した。

【 0 0 5 0 】

細胞周期依存性のヒストンH3のSer10リン酸化は、特に有糸分裂の初期段階でPBK / TOPK発現レベルおよび局在と相關する（図9DおよびE）。したがって、その重要な役割が乳癌細胞で同定されているPak1と同様に、PBK / TOPK-ヒストンH3経路は、有糸分裂事象を促進し、したがって癌細胞増殖を亢進する（Li F et al., EMBO Rep 2002, 3:767-73）。しかしながら、PBK / TOPKがsiRNAによってノックダウンされている細胞の形態変化は、細胞質分裂に関与する他の基質の存在を示した（図5）。

【 0 0 5 1 】

本発明は、PBK / TOPKが乳癌で過剰発現し、そのキナーゼ活性が乳癌細胞増殖を含む哺乳動物発癌現象において重要な役割を果たすという知見に、一部基づく。さらに、癌 / 精巣抗原としてPBK / TOPK発現パターンは、癌ワクチンによる免疫療法および/またはPBK / TOPK特異的キナーゼ機能の阻害を介してPBK / TOPKが乳癌治療のための有望な分子標的となることを実証する。したがって、PBK / TOPKキナーゼ活性を指標として使用することで、抗癌剤の開発のための戦略を提供する。

【 0 0 5 2 】

10

20

30

40

50

定義

本明細書で用いる「一つの（a）」、「一つの（an）」、および「その（the）」という用語は、特に明記しない限り、「少なくとも一つの」を意味する。

【0053】

乳癌（「BC」）で差次的に発現される遺伝子は、本明細書で「BC遺伝子」、「BC核酸」、または「BCポリヌクレオチド」と総称され、コードされる対応するポリペプチドは「BCポリペプチド」または「BCタンパク質」と呼ばれる。BC遺伝子は、A7332、F3374V1、PHB2/REA、およびPBK/TOPK遺伝子からなる群より選択される。

【0054】

特記する場合を除き、本明細書で用いるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されているのと同じ意味を有する。矛盾が生じる場合は、定義を含め本明細書を優先する。

【0055】

ヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、および宿主細胞

本発明は、SEQ ID NO: 79に記載するポリヌクレオチド配列を含むヒト遺伝子A7322、ならびにその変性体および変異体を、それらがSEQ ID NO: 80に示すアミノ酸配列を含むA7322タンパク質またはその機能的同等物をコードする範囲で含む。A7322と機能的に同等なポリペプチドの例には、例えば、ヒトA7322タンパク質に対応する他の生物の相同タンパク質、およびヒトA7322タンパク質の変異体が含まれる。

【0056】

本発明は、SEQ ID NO: 81に記載するポリヌクレオチド配列を含む新規ヒト遺伝子F3374V1、ならびにその変性体および変異体を、それらがSEQ ID NO: 82に示すアミノ酸配列を含むF3374V1タンパク質またはその機能的同等物をコードする範囲で含む。F3374V1と機能的に同等なポリペプチドの例には、例えば、ヒトF3374V1タンパク質に対応する他の生物の相同タンパク質、およびヒトF3374V1タンパク質の変異体が含まれる。しかしながら、これらの変異体は、リン酸化領域、例えばF3374V1の591アミノ酸～730アミノ酸を保持するが、これらに制限されない。

【0057】

ヒトPHB2/REA遺伝子のヌクレオチド配列はSEQ ID NO: 89に示され、またGenBankアクセシション番号NM_007273.3としても利用可能である。ヒトPHB2/REA遺伝子をコードするアミノ酸配列はSEQ ID NO: 90に示され、またGenBankアクセシション番号NP_009204としても利用可能である。本発明では、PHB2/REA遺伝子によってコードされるポリペプチドは、「PHB2/REA」と称され、しばしば「PHB2/REAポリペプチド」または「PHB2/REAタンパク質」と称される。

【0058】

ヒトAURKB遺伝子のヌクレオチド配列はSEQ ID NO: 87に示され、またGenBankアクセシション番号NM_004217としても利用可能である。ヒトAURKB遺伝子をコードするアミノ酸配列はSEQ ID NO: 88に示す。本発明では、AURKB遺伝子によってコードされるポリペプチドは、「AURKB」と称され、しばしば「AURKBポリペプチド」または「AURKBタンパク質」と称される。

【0059】

ヒトPBK/TOPK遺伝子のヌクレオチド配列はSEQ ID NO: 91に示され、またGenBankアクセシション番号AF237709としても利用可能である。本明細書において、「PBK/TOPK遺伝子」という語句は、ヒトPBK/TOPK遺伝子、ならびに非ヒト靈長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、およびウシを含むがこれらに限定されない他の動物の遺伝子を包含し、対立遺伝子変異、およびPBK/TOPK遺伝子に対応して他の動物で見いだされる遺伝子を含む。ヒトPBK/TOPK遺伝子をコードするアミノ酸配列はSEQ ID NO: 92に示され、またGenBankアクセシション番号AAF71521.1としても利用可能である。本発明では、PBK/TOPK遺伝子によってコードされるポリペプチドは、「PBK/TOPK」と称され、しばしば「PBK/TOPKポリペプチド」または「PBK/TOPKタンパク質」と称される。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 0 】

ヒトCDK1遺伝子のヌクレオチド配列はSEQ ID NO : 94に示され、またGenBankアクセシション番号NM_001786としても利用可能である。本明細書において、「CDK1遺伝子」という語句は、ヒトCDK1遺伝子、ならびに非ヒト靈長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、およびウシを含むがこれらに限定されない他の動物の遺伝子を包含し、対立遺伝子変異、およびCDK1遺伝子に対応して他の動物で見いだされる遺伝子を含む。ヒトCDK1遺伝子をコードするアミノ酸配列はSEQ ID NO : 95に示され、CDK1遺伝子によってコードされるポリペプチドは「CDK1」と称され、しばしば「CDK1ポリペプチド」または「CDK1タンパク質」と称される。

【 0 0 6 1 】

ヒトサイクリンB1遺伝子のヌクレオチド配列はSEQ ID NO : 96に示され、またGenBankアクセシション番号NM_031966としても利用可能である。本明細書において、「サイクリンB遺伝子」という語句は、ヒトサイクリンB1遺伝子、ならびに非ヒト靈長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、およびウシを含むがこれらに限定されない他の動物の遺伝子を包含し、対立遺伝子変異、およびサイクリンB1遺伝子に対応して他の動物で見いだされる遺伝子を含む。ヒトサイクリンB1遺伝子をコードするアミノ酸配列はSEQ ID NO : 97に示す。本発明では、サイクリンB1遺伝子によってコードされるポリペプチドは、「サイクリンB1」と称され、しばしば「サイクリンB1ポリペプチド」または「サイクリンB1タンパク質」と称される。

【 0 0 6 2 】

ヒトプロテインホスファターゼ1- (PP1) 遺伝子のヌクレオチド配列はSEQ ID NO : 115に示され、またGenBankアクセシション番号NM_002708としても利用可能である。本明細書において、「PP1 遺伝子」という語句は、ヒトPP1 遺伝子、ならびに非ヒト靈長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、およびウシを含むがこれらに限定されない他の動物の遺伝子を包含し、対立遺伝子変異、およびPP1 遺伝子に対応して他の動物で見いだされる遺伝子を含む。ヒトPP1 遺伝子をコードするアミノ酸配列はSEQ ID NO : 116に示す。本発明では、PP1 遺伝子によってコードされるポリペプチドは、「PP1」と称され、しばしば「PP1 ポリペプチド」または「PP1 タンパク質」と称される。

【 0 0 6 3 】

ヒトp47遺伝子のヌクレオチド配列はSEQ ID NO : 117に示され、またGenBankアクセシション番号NM_016143としても利用可能である。本明細書において、「p47遺伝子」という語句は、ヒトp47遺伝子、ならびに非ヒト靈長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、およびウシを含むがこれらに限定されない他の動物の遺伝子を包含し、対立遺伝子変異、およびp47遺伝子に対応して他の動物で見いだされる遺伝子を含む。ヒトp47遺伝子をコードするアミノ酸配列はSEQ ID NO : 118に示す。本発明では、p47遺伝子によってコードされるポリペプチドは、「p47」と称され、しばしば「p47ポリペプチド」または「p47タンパク質」と称される。

【 0 0 6 4 】

ヒトp97遺伝子のヌクレオチド配列はSEQ ID NO : 119に示され、またGenBankアクセシション番号NM_007126としても利用可能である。本明細書において、「p97遺伝子」という語句は、ヒトp97遺伝子、ならびに非ヒト靈長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、およびウシを含むがこれらに限定されない他の動物の遺伝子を包含し、対立遺伝子変異、およびp97遺伝子に対応して他の動物で見いだされる遺伝子を含む。ヒトp97遺伝子をコードするアミノ酸配列はSEQ ID NO : 120に示す。本発明では、p97遺伝子によってコードされるポリペプチドは、「p97」と称され、しばしば「p97ポリペプチド」または「p97タンパク質」と称される。

【 0 0 6 5 】

所定のタンパク質と機能的に同等なポリペプチドを作製するための方法は当業者に周知であり、これにはタンパク質に変異を導入する既知の方法が含まれる。例えば、当業者は、これらのタンパク質のいずれかにアミノ酸配列に部位特異的突然変異誘発法によって適

10

20

30

40

50

切な変異を導入することによって、ヒトBCタンパク質またはAURKBと機能的に同等なポリペプチドを作製することができる (Hashimoto-Gotoh et al., Gene 152:271-5 (1995); Zoller and Smith, Methods Enzymol 100: 468-500 (1983); Kramer et al., Nucleic Acids Res. 12:9441-9456 (1984); Kramer and Fritz, Methods Enzymol 154: 350-67 (1987); Kunkel, Proc Natl Acad Sci USA 82: 488-92 (1985); Kunkel, Methods Enzymol 204: 125-139 (1991))。アミノ酸の変異は天然の状態で生じる場合もある。得られる変異ポリペプチドがヒトBCタンパク質またはAURKBと機能的に同等であるという条件で、本発明のポリペプチドは、1つまたは複数のアミノ酸が変異したヒトBCタンパク質またはAURKBのアミノ酸配列を有するタンパク質を含む。このような変異体において変異が導入されるアミノ酸の数は、一般に10アミノ酸またはそれ未満、好ましくは6アミノ酸またはそれ未満、より好ましくは3アミノ酸またはそれ未満である。

【0066】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために、本明細書で互換的に用いられる。これら用語は、天然アミノ酸ポリマー、修飾残基を含むもの、および非天然アミノ酸ポリマーに加え、1つまたは複数のアミノ酸残基が対応する天然アミノ酸の人工的な化学的模倣体であるアミノ酸ポリマーにも適用される。

【0067】

「アミノ酸」という用語は、天然および合成アミノ酸、ならびに天然アミノ酸と同様に機能するアミノ酸アナログおよびアミノ酸模倣体を指す。天然アミノ酸とは、遺伝コードによってコードされるもの、ならびに例えば、ヒドロキシプロリン、-カルボキシグルタメート、および0-ホスホセリンで後に修飾されるアミノ酸である。アミノ酸アナログとは、天然アミノ酸と同じ基本化学構造、例えば、水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基に結合された炭素、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを有する化合物を指す。このようなアナログは修飾されたR基（例えばノルロイシン）または修飾されたペプチド骨格を有してもよいが、天然アミノ酸と同じ基本化学構造を保持する。アミノ酸模倣体とは、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが天然アミノ酸と同様に機能する化学的な化合物を指す。

【0068】

アミノ酸は本明細書では、一般的に知られる3文字表記で表すこともあり、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission推奨の1文字表記で表すこともある。同様に、ヌクレオチドは、それらの一般に是認されている1文字コードにより指示されてもよい。

【0069】

「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、および「核酸」という用語は、他で特に示さない限り、本明細書では互換的に用い、それらの一般に是認されている1文字コードにより指示されるアミノ酸と同様である。これらの用語は、1つまたは複数の核酸がエステル結合によって連結している核酸（ヌクレオチド）ポリマーに適用する。ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、または核酸は、DNA、RNA、またはそれらの組み合わせから構成され得る。

【0070】

本明細書で用いる場合、「二本鎖分子」という用語は、例えば低分子干渉RNA (siRNA；例えば二本鎖リボ核酸 (dsRNA) または短いヘアピンRNA (shRNA)) および低分子干渉DNA / RNA (siD/R-NA ; 例えばDNAおよびRNAの二本鎖キメラ (dsD/R-NA) またはDNAおよびRNAの短いヘアピンキメラ (shD/R-NA)) を含む標的遺伝子の発現を阻害する核酸分子を指す。

【0071】

本発明において、「機能的に同等な」という用語は、対象ポリペプチドが、BCタンパク質のように細胞増殖を促進するとともに、癌細胞に発癌活性を付与する活性を有することを意味する。このような活性を測定するためのアッセイ法は当技術分野において周知であ

10

20

30

40

50

る。例えば、対象ポリペプチドが細胞増殖活性を有するか否かは、対象ポリペプチドをコードするDNAをそれぞれのポリペプチドを発現する細胞に導入し、細胞の増殖の促進またはコロニー形成活性の上昇を検出することによって判定することができる。このような細胞には、例えばCOS7細胞およびNIH3T3細胞が含まれる。

【 0 0 7 2 】

本発明のある態様において、Sec7ドメインは、A7332ポリペプチドの生物活性を維持するよう、A7332と機能的に同等に保存されている。A7332ポリペプチドのSec7ドメインは、SEQ ID NO : 79のヌクレオチド配列のコドン586と798によってコードされるSEQ ID NO : 80のアミノ酸配列の139位 (Ala) から209位 (Val) に相当する。本発明では、A7332またはF3374V1ポリペプチドの生物活性には、細胞増殖活性が含まれる。したがって、本発明の機能的同等物は、細胞増殖活性を有する。10

【 0 0 7 3 】

本発明のある態様において、機能的同等物はまた、A7322ポリペプチドに含まれる。本明細書において、タンパク質の「機能的同等物」とは、生物活性を有する、特にPHB2/REAへの結合活性を有し、かつPHB2/REAタンパク質の核移行の活性を有するポリペプチドである。すなわち、A7322タンパク質のPHB2/REA結合ドメインを保持している任意のポリペプチドを、本発明におけるそのような機能的同等物として用いてもよい。そのような機能的同等物には、A7322タンパク質の天然のアミノ酸配列に1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、または挿入されているものが含まれる。20

【 0 0 7 4 】

または、機能的同等物はまた、PHB2/REAポリペプチドに含まれる。本明細書において、タンパク質の「機能的同等物」とは、生物活性、特にそのタンパク質と同等なA7322への結合活性を有するポリペプチドである。すなわち、PHB2/REAタンパク質のA7322結合ドメインを保持している任意のポリペプチドを、本発明におけるそのような機能的同等物として用いてもよい。そのような機能的同等物には、PHB2/REAタンパク質の天然のアミノ酸配列に1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、または挿入されているものが含まれる。20

【 0 0 7 5 】

本発明の好ましい態様において、機能的同等物はまた、F3374V1ポリペプチドに含まれる。本明細書において、タンパク質の「機能的同等物」とは、生物活性を有する、特にAU RKBへの結合活性を有し、AURKBによってリン酸化されるポリペプチドである。すなわち、F3374V1タンパク質の結合ドメインおよびリン酸化部位を保持している任意のポリペプチドを、本発明におけるそのような機能的同等物として用いてもよい。そのような機能的同等物には、F3374V1タンパク質の天然のアミノ酸配列に1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、または挿入されているものが含まれる。30

【 0 0 7 6 】

または、機能的同等物はまた、AURKBポリペプチドに含まれる。本明細書において、タンパク質の「機能的同等物」とは、生物活性、特にそのタンパク質と同等なF3374V1に対して結合およびリン酸化活性を有するポリペプチドである。すなわち、AURKBタンパク質のF3374V1に対する結合およびリン酸化活性を保持している任意のポリペプチドを、本発明におけるそのような機能的同等物として用いてもよい。そのような機能的同等物には、AURKBタンパク質の天然のアミノ酸配列に1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、または挿入されているものが含まれる。40

【 0 0 7 7 】

本発明の好ましい態様において、機能的同等物はまた、PBK / TOPKポリペプチドに含まれる。本明細書において、タンパク質の「機能的同等物」とは、生物活性、特にそのタンパク質と同等のリン酸化活性を有するポリペプチドである。すなわち、PBK / TOPKタンパク質のリン酸化活性を保持している任意のポリペプチドを、本発明におけるそのような機能的同等物として用いてもよい。そのような機能的同等物には、PBK / TOPKタンパク質の天然のアミノ酸配列に1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、または挿入されて50

いるものが含まれる。

【0078】

変異タンパク質、または、ある特定のアミノ酸配列のアミノ酸残基の1つもしくは複数の置換、欠失、挿入、および/もしくは付加によって改変されたアミノ酸配列を有するタンパク質である改変タンパク質は、元の生物活性を保持していることが知られている (Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 81: 5662-6 (1984); Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 10:6487-500 (1982); Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 79: 6409-13 (1982))。

【0079】

変異されるアミノ酸残基は、好ましくはアミノ酸側鎖の特性が保存されるような別のアミノ酸へと変異される（保存的アミノ酸置換として知られる過程）。アミノ酸側鎖の特性の例としては、疎水性アミノ酸 (A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸 (R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、および以下の官能基または特徴を共通して有する側鎖などが挙げられる：脂肪族側鎖 (G、A、V、L、I、P)；ヒドロキシル基を含む側鎖 (S、T、Y)；硫黄原子を含む側鎖 (C、M)；カルボン酸およびアミドを含む側鎖 (D、N、E、Q)；塩基を含む側鎖 (R、K、H)；ならびに芳香族基を含む側鎖 (H、F、Y、W)。括弧内の文字が、アミノ酸の1文字コードを意味することに注意されたい。

【0080】

機能的に類似したアミノ酸を提供する保存的置換表は、当技術分野において周知である。そのような保存的に改変された変異体は、本発明の多型変異体、種間ホモログ、および対立遺伝子を除外するわけではなく、これらに補足されるものである。例えば以下の8群はそれぞれ、お互いについて保存的置換であるアミノ酸を含む：

- (1) アラニン (A)、グリシン (G)；
- (2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；
- (3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；
- (4) アルギニン (R)、リシン (K)；
- (5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；
- (6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)；
- (7) セリン (S)、トレオニン (T)；および
- (8) システイン (C)、メチオニン (M) (例えばCreighton, Proteins (1984) 参照)。

【0081】

そのような保存的に改変されたポリペプチドは、本発明のBCタンパク質およびAURKBタンパク質に含まれる。しかしながら、本発明はそれらに限定されず、BCタンパク質およびAURKBタンパク質は、それらがBCタンパク質およびAURKBタンパク質のリン酸化活性を保持する限り、非保存的改変を含む。このような改変タンパク質内の変異が導入されるアミノ酸の数は、一般に10アミノ酸またはそれ未満、好ましくは6アミノ酸またはそれ未満、より好ましくは3アミノ酸またはそれ未満である。

【0082】

ヒトBCタンパク質またはAURKBタンパク質のアミノ酸配列に1つまたは複数のアミノ酸残基が付加されたポリペプチドの一例は、ヒトBCタンパク質またはAURKBタンパク質を含む融合タンパク質である。融合タンパク質とは、ヒトBCタンパク質またはAURKBタンパク質と他のペプチドまたはタンパク質との融合物であり、これは本発明に含まれる。融合タンパク質は、本発明のヒトBCタンパク質またはAURKBタンパク質をコードするDNAを別のペプチドまたはタンパク質をコードするDNAとフレームが合致するように連結させ、この融合DNAを発現ベクターに挿入して、それを宿主において発現させることなどによる、当業者に周知の技法によって作製できる。本発明のタンパク質に融合させるペプチドまたはタンパク質に関する制限はない。

【0083】

本発明のタンパク質と融合させるペプチドとして用いられ得る既知のペプチドには、例えば、FLAG (Hopp et al., Biotechnology 6: 1204-10 (1988))、6個のHis (ヒスチジン

10

20

30

40

50

) 残基を含む6xHis、10xHis、インフルエンザ凝集素(HA)、ヒトc-myc断片、VSP-GP断片、p18HIV断片、T7タグ、HSVタグ、Eタグ、SV40T抗原断片、Ickタグ、-チューブリン断片、Bタグ、プロテインC断片などが含まれる。本発明のタンパク質に融合可能なタンパク質の例には、GST(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)、インフルエンザ凝集素(HA)、免疫グロブリンの定常領域、-ガラクトシダーゼ、MBP(マルトース結合タンパク質)などが含まれる。

【0084】

融合タンパク質は、上に考察したような融合ペプチドまたはタンパク質をコードする市販のDNAと本発明のポリペプチドをコードするDNAとを融合させ、作製された融合DNAを発現させることによって、作製できる。

10

【0085】

機能的に同等なポリペプチドを単離するための当技術分野で公知の代替的な方法は、例えば、ハイブリダイゼーション技術を用いる方法である(Sambrook et al., Molecular Cloning 2nd ed. 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989))。当業者は、ヒトBCタンパク質またはAURKBタンパク質をコードするDNA配列(すなわち、SEQ ID NO: 80、82、90、92、または88)の全体または一部に対して高い相同意を有するDNAを容易に単離して、単離されたDNAからヒトBCタンパク質またはAURKBタンパク質と機能的に同等なポリペプチドを単離することができる。本発明のポリペプチドには、ヒトBCタンパク質またはAURKBタンパク質をコードするDNA配列の全体または一部とハイブリダイズするDNAによってコードされ、かつヒトBCタンパク質またはAURKBタンパク質と機能的に同等なポリペプチドが含まれる。これらのポリペプチドは、ヒトに由来するタンパク質に対応する哺乳動物ホモログ(例えばサル、ラット、ウサギ、およびウシの遺伝子にコードされるポリペプチド)を含む。例えば、ヒトA7322タンパク質をコードするDNAに対して高い相同意を有するcDNAを動物から単離する際には、精巣または乳癌細胞株由來の組織を用いることが特に好みしい。または、ヒトF3374V1タンパク質をコードするDNAに対して高い相同意を有するcDNAを動物から単離する際には、乳癌細胞株由來の組織を用いることが特に好みしい。

20

【0086】

ヒトBCタンパク質またはAURKBタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを単離するためのハイブリダイゼーションの条件は、当業者であれば通常の方法で選択することができる。「ストリンジェントな(ハイブリダイゼーション)条件」という語句は、核酸分子が、典型的には核酸の複合体混合物中にあるその標的配列とはハイブリダイズするが、他の配列とは検出し得る程度にはハイブリダイズしないと考えられる条件を指す。ストリンジェントな条件は配列依存的であり、別の環境下では異なると考えられる。配列が長くなればなるほど、より高い温度で特異的にハイブリダイズする。核酸のハイブリダイゼーションに関する広範な手引きは、Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, 「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays」(1993)において見いだされる。一般に、ストリンジェントな条件は、規定のイオン強度pHでの特定の配列についての熱融解温度(T_m)よりも約5~10 低くなるように選択される。 T_m は、標的に相補的なプローブの50%が平衡状態で標的配列にハイブリダイズする(規定のイオン強度、pH、および核酸濃度における)温度である(T_m において標的配列が過剰に存在するので、プローブの50%が平衡状態に占められる)。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドのような不安定化剤の添加によって達成してもよい。選択的または特異的なハイブリダイゼーションに関して、陽性シグナルとは、バックグラウンドの少なくとも2倍、好みしくはバックグラウンドハイブリダイゼーションの10倍である。

30

【0087】

例えばハイブリダイゼーションは、「Rapid-hyb緩衝液」(Amersham LIFE SCIENCE)を用いて68℃で30分間またはそれ以上プレハイブリダイゼーションを行い、標識プローブを添加し、その後、68℃で1時間またはそれ以上加温することにより、実施され得る。以下の洗浄段階は、例えば低ストリンジェントな条件で行うことができる。低ストリンジェン

40

50

シー条件は、例えば42、 $2 \times$ SSC、0.1% SDS、または好ましくは50、 $2 \times$ SSC、0.1% SDSである。より好ましくは、高ストリンジエンシー条件を用いる。高ストリンジエンシー条件の一例には、 $2 \times$ SSC、0.01% SDS中、室温で20分間の洗浄を3回、続いて、 $1 \times$ SSC、0.1% SDS中、37度で20分間の洗浄を3回、および、 $1 \times$ SSC、0.1% SDS中、50度で20分間の洗浄を2回が含まれる。しかし、温度および塩濃度などのいくつかの要因がハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響を及ぼすと考えられ、当業者は必要なストリンジエンシーを得るためにこれらの要因を適切に選択することができる。

【0088】

ハイブリダイゼーションの代わりに、遺伝子増幅法、例えばポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法を利用して、ヒトBCタンパク質またはAURKBタンパク質と機能的に同等なポリペプチドをコードするDNAを、該タンパク質をコードするDNAの配列情報 (SEQ ID NO: 79、81、89、91、または87)に基づいて合成したプライマーを用いて単離することもできる。10

【0089】

以上のハイブリダイゼーション法または遺伝子増幅法によって単離したDNAによってコードされる、ヒトBCタンパク質またはAURKBタンパク質と機能的に同等なポリペプチドは、通常、ヒトBCタンパク質またはAURKBタンパク質のアミノ酸配列に対して高い相同性を有する。「高い相同性」または「高い配列同一性」とは、40%またはそれ以上、好ましくは60%またはそれ以上、より好ましくは80%またはそれ以上、さらにより好ましくは95%またはそれ以上の相同性(配列同一性)を互換的に指す。ポリペプチドの相同性は、「Willbur and Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 80: 726-30 (1983)」中のアルゴリズムに従って決定することができる。配列同一性の割合を決定するのに適したアルゴリズムのさらなる例を、本明細書に記載する。20

【0090】

本発明のポリペプチドは、その生成のために用いる細胞もしくは宿主または用いる精製方法に応じて、アミノ酸配列、分子量、等電点、糖鎖の有無、または形態に関して差異があつてもよい。言うまでもなく、本発明のヒトBCタンパク質またはAURKBタンパク質のポリペプチドと同等な機能を有する限り、それは本発明の範囲に含まれる。

【0091】

本発明はまた、BCタンパク質またはAURKBタンパク質の部分ペプチドの使用も含む。部分ペプチドは、BCまたはAURKBのタンパク質に特異的なアミノ酸配列を有し、かつ約400アミノ酸未満、通常は約200アミノ酸未満、およびしばしば約100アミノ酸未満であり、かつ少なくとも約7アミノ酸、好ましくは約8アミノ酸またはそれ以上、およびより好ましくは約9アミノ酸またはそれ以上からなる。本発明の部分ペプチドは、遺伝子操作により、既知のペプチド合成方法により、または本発明のポリペプチドを適切なペプチダーゼで消化することにより、作製可能である。ペプチド合成のために、例えば固相合成法または液相合成法を使用することができる。30

【0092】

本発明のスクリーニングに用いる部分ペプチドは、少なくともA7322タンパク質のPHB2/REA結合部位または核移行活性の活性中心を適切に含む。そのような部分ペプチドはまた、A7322タンパク質の「機能的同等物」という語句によって包含される。40

【0093】

本発明のスクリーニングに用いる部分ペプチドは、少なくともPHB2/REAタンパク質のA7322結合部位を適切に含む。そのような部分ペプチドはまた、PHB2/REAタンパク質の「機能的同等物」という語句によって包含される。

【0094】

本発明のスクリーニングに用いる部分ペプチドは、少なくともF3374V1タンパク質 (SEQ ID NO: 88の591アミノ酸～730アミノ酸) のAURKB結合部位またはAURKBタンパク質によるリン酸化部位を適切に含む。そのような部分ペプチドはまた、F3374V1タンパク質の「機能的同等物」という語句によって包含される。

【0095】

10

20

30

40

50

本発明のスクリーニングに用いる部分ペプチドは、少なくともF3374V1タンパク質への結合部位またはAURKBタンパク質の触媒ドメインを適切に含む。そのような部分ペプチドはまた、PBK / TOPKタンパク質の「機能的同等物」という語句によって包含される。

【 0 0 9 6 】

指標としてPBK / TOPKのキナーゼ活性レベルを使用する本発明のスクリーニングに用いる部分ペプチドは、少なくともキナーゼドメイン (SEQ ID NO : 92の32アミノ酸～318アミノ酸) を適切に含み、特にPBK / TOPKタンパク質の触媒部位 (SEQ ID NO : 92のLys64およびLys65) を保存する。そのような部分ペプチドはまた、PBK / TOPKタンパク質の「機能的同等物」という語句によって包含される。さらに、指標としてPBK / TOPKのリン酸化レベルを使用する本発明のスクリーニングに用いる部分ペプチドは、少なくともPBK / TOPKタンパク質のリン酸化部位 (SEQ ID NO : 92のThr9) を適切に含む。そのような部分ペプチドはまた、PBK / TOPKタンパク質の「機能的同等物」という語句によって包含される。
10

【 0 0 9 7 】

そのような部分ペプチドは、遺伝子操作、ペプチド合成の公知の方法、または天然のBCタンパク質を適切なペプチダーゼで消化することにより、作製することができる。ペプチド合成のために、例えば固相合成法または液相合成法を使用することができる。合成のために採用できる従来のペプチド合成方法は以下を含む：

- (1) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966 ;
- (2) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976 ;
- (3) Peptide Synthesis (in Japanese), Maruzen Co., 1975 ;
- (4) Basics and Experiment of Peptide Synthesis (in Japanese), Maruzen Co., 1985 ;
- (5) Development of Pharmaceuticals (second volume) (in Japanese), Vol. 14 (peptide synthesis), Hirokawa, 1991 ;
- (6) WO99/67288 ; および
- (7) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, 「Solid Phase Peptide Synthesis」, Academic Press, New York, 1980, 100-118.

【 0 0 9 8 】

ポリペプチドまたはその断片は、ポリペプチドおよび断片が、例えば基質をリン酸化するまたはキナーゼによってリン酸化されるという生物活性に対するその本来の能力を保持する限り、他の物質にさらに連結してもよい。使用可能な物質は、以下を含む：ペプチド、脂質、糖および糖鎖、アセチル基、天然および合成ポリマーなど。これらの種類の改変を行い、さらなる機能を付加するか、またはポリペプチドおよび断片を安定化してもよい。
30

【 0 0 9 9 】

本発明のポリペプチドは、当業者に周知の方法により、組換えタンパク質として調製することもでき、または天然タンパク質として調製することもできる。「組換え」という用語は、例えば細胞、または核酸、タンパク質、もしくはベクターなどへの言及と共に用いられる場合、細胞、核酸、タンパク質、もしくはベクターが、異種核酸もしくはタンパク質の導入または元来の核酸もしくはタンパク質の変化によって改変されていること、あるいは細胞がそのように改変された細胞に由来することを示す。したがって例えば、組換え細胞は、元来の形態の（非組換え）細胞では見られない遺伝子を発現するか、または元來の遺伝子を異常に発現する、より少なく発現する、または全く発現しない。
40

【 0 1 0 0 】

本明細書における「組換え核酸」という用語は、一般に核酸の操作によって、例えばポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼを用いて、最初からインビトロで形成された、天然では通常見られない形態にある核酸を意味する。この様式で、異なる配列の機能的な連結を達成する。このように、通常は繋がっていないDNA分子を連結してインビトロで形成した線状形態の単離核酸または発現ベクターは両方とも、本発明の目的のための組換え型とみなされる。組換え核酸を作製して宿主細胞または生物体に再び導入すると、これは非組
50

換え的に、すなわちインビトロ操作ではなく宿主細胞のインビオ細胞機構を用いて、複製する；しかし、このような核酸は組換え的に産生されると、続いて非組換え的に複製されるが、なお本発明の目的のための組換え型とみなされることが理解される。

【0101】

同様に、「組換えタンパク質」とは、組換え技術を用いて、すなわち上記のように組換え核酸の発現を介して作製するタンパク質である。したがって、本発明のポリペプチドをコードするDNA（例えば、SEQ ID NO：79、81、89、91、または87のヌクレオチド配列を含むDNA）を適切な発現ベクターに挿入し；該ベクターを適切な宿主細胞に導入し；抽出物を入手し；その後、抽出物をクロマトグラフィー、例えばイオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲルfiltration、もしくは本発明のタンパク質に対する抗体を固定したカラムを用いるアフィニティーコロマトグラフィーに供することにより、または複数の上述のカラムを組み合わせることによりポリペプチドを精製することによって、組換えタンパク質を調製することができる。10

【0102】

同様に、グルタチオン-S-トランスフェラーゼタンパク質との融合タンパク質として、または多数のヒスチジンを付加した組換えタンパク質として、本発明のポリペプチドを宿主細胞（例えば、動物細胞および大腸菌）内で発現させる場合には、発現した組換えタンパク質をグルタチオンカラムまたはニッケルカラムを用いて精製することができる。または、本発明のポリペプチドをc-myc、多数のヒスチジン、またはFLAGで標識したタンパク質として発現させる場合には、それぞれc-myc、His、またはFLAGに対する抗体を用いてそれを検出および精製することができる。20

【0103】

融合タンパク質を精製した後に、必要に応じてトロンビンまたは第Xa因子で切断することにより、目的のポリペプチド以外の領域を除外することも可能である。

【0104】

当業者に公知の方法によって、例えば、後述のBCタンパク質と結合する抗体を結合させたアフィニティーカラムを、本発明のポリペプチドを発現する組織または細胞の抽出物に接触させることによって、天然のタンパク質を単離することができる。抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。

【0105】

さらに本発明は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも提供する。本発明のポリヌクレオチドは、上述の本発明のポリペプチドのインビオまたはインビトロにおける産生のために用いることができる。本発明のポリペプチドをコードする限りは、mRNA、RNA、cDNA、ゲノムDNA、化学合成ポリヌクレオチドを含む本発明のポリヌクレオチドのいかなる形態も、用いることができる。得られるDNAが本発明のポリペプチドをコードする限り、本発明のポリヌクレオチドには、所定のヌクレオチド配列を含むDNAおよびその縮重配列が含まれる。30

【0106】

本発明のポリヌクレオチドは、当業者に周知の方法によって調製することができる。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドを発現する細胞由来のcDNAライブラリから、本発明のDNA（例えば、SEQ ID NO：79、81、89、91、または87）の部分配列をプローブとして用いたハイブリダイゼーションを行うことによって調製できる。cDNAライブラリは、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, 第三版, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)に記載された方法によって調製でき、または、市販のcDNAライブラリを用いてもよい。またcDNAライブラリは、本発明のポリペプチドを発現する細胞からRNAを抽出し、本発明のDNA（例えば、SEQ ID NO：79、81、89、91、または87）の配列に基づいてオリゴDNAを合成し、オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、その後本発明のタンパク質をコードするcDNAを増幅することによって調製することもできる。40

【0107】

50

さらに、得られたcDNAのヌクレオチドの配列決定を行うことにより、cDNAにコードされる翻訳領域を慣行的に決定し、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列を容易に得ることができる。その上、得られたcDNAまたはその一部をプローブとして用いてゲノムDNAライブライアリをスクリーニングすることにより、ゲノムDNAを単離することができる。

【0108】

より具体的には、まず、本発明の対象ポリペプチドが発現される細胞、組織、または臓器（例えば、A7322に対して脳または乳癌細胞株；F3374V1に対して精巣または乳癌細胞株；PHB2/REAに対して乳癌細胞株；およびPBK / TOPKに対して精巣または乳癌細胞株）からmRNAが調製され得る。mRNAの単離には既知の方法を用いることができる；例えば、全RNAは、グアニン超遠心（Chirgwin et al., Biochemistry 18:5294-9 (1979)）またはAGPC法（Chomczynski and Sacchi, Anal Biochem 162:156-9 (1987)）によって調製され得る。さらに、mRNAをmRNA精製キット（Pharmacia）などを用いて全RNAから精製しても、または代替としてmRNAをQuickPrep mRNA精製キット（Pharmacia）によって直接精製してもよい。

【0109】

得られたmRNAを用いて、逆転写酵素によってcDNAを合成する。cDNAは、AMV逆転写酵素第一鎖cDNA合成キット（Seikagaku Kogyo）などの市販のキットを用いて合成され得る。または、本明細書に記載のプライマー等、5'-Ampli FINDER RACEキット（Clontech）、およびポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いる5'-RACE法（Frohman et al., Proc Natl Acad Sci USA 85: 8998-9002 (1988); Belyavsky et al., Nucleic Acids Res. 17: 2919-32 (1989)）に従って、cDNAの合成および増幅を行うことができる。

【0110】

所望のDNA断片をPCR産物から調製し、ベクターDNAにライゲーションする。このような組換えベクターを用いて大腸菌などを形質転換し、選択されたコロニーから、所望の組換えベクターを調製する。所望のDNAのヌクレオチド配列は、ジデオキシヌクレオチド鎖停止法などの従来の方法で確認することができる。

【0111】

発現用に使用する宿主におけるコドン使用頻度を考慮に入れることにより、本発明のポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を、より効率的に発現されるように設計することができる（Grantham et al., Nucleic Acids Res. 9: 43-74 (1981)）。さらに、本発明のポリヌクレオチドの配列を、市販のキットまたは従来の方法によって改変することができる。例えば、制限酵素による消化、合成オリゴヌクレオチドもしくは適切なポリヌクレオチド断片の挿入、リンカーの付加、または開始コドン（ATG）および/もしくは終止コドン（TAA、TGAまたはTAG）の挿入によって配列を改変することができる。

【0112】

特に好ましい態様において、本発明のポリヌクレオチドは、SEQ ID NO : 79、81、89、91、または87のヌクレオチド配列を含むDNAを包含する。

【0113】

さらに、本発明は、SEQ ID NO : 79、81、89、91、または87のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ上記の本発明のBCタンパク質またはAURKBタンパク質と機能的に同等なポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドを提供する。上記で考察したように、当業者であれば、ストリンジェントな条件を選択することができる。例えば低ストリンジェンシー条件を使用することができる。より好ましくは、高ストリンジェンシー条件を使用する。これらの条件は上述通りある。上述のハイブリダイズDNAは、好ましくはcDNAまたは染色体DNAである。

【0114】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドが内部に挿入されたベクターも提供する。本発明のベクターは、本発明のポリヌクレオチド、特にDNAを宿主細胞中で維持させて、本発明のポリペプチドを発現させるために有用である。

【0115】

10

20

30

40

50

大腸菌を宿主細胞として選択し、ベクターを大腸菌（例えば、JM109、DH5[®]、HB101、またはXL1Blue）の内部で大量に増幅および産生させる場合には、ベクターは、大腸菌内で増幅されるための「ori」、および、形質転換された大腸菌を選択するためのマーカー遺伝子（例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコールなどの薬物によって選択される薬物耐性遺伝子）を有する必要がある。例えばM13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどを使用することができる。さらに、上記のベクター同様、pGEM-T、pDIRECT、およびpT7も、cDNAのサブクローニングおよび抽出のために用いることができる。本発明のタンパク質を作製するためにベクターを使用する場合は、発現ベクターが特に有用である。

【0116】

10

例えば大腸菌内で発現させる発現ベクターは、大腸菌内で増幅するための上記の特徴を有する必要がある。JM109、DH5[®]、HB101、またはXL1Blueなどの大腸菌を宿主細胞として用いる場合には、ベクターは、大腸菌内で所望の遺伝子を効率的に発現し得るプロモーター、例えば、lacZプロモーター（Ward et al., Nature 341: 544-6 (1989); FASEB J 6: 2422-7 (1992)）、araBプロモーター（Better et al., Science 240: 1041-3 (1988)）、またはT7プロモーターなどを有する必要がある。この点に関して、例えばpGEX-5X-1（Pharmacia）、「QIAexpressシステム」（Qiagen）、pEGFP、およびpET（この場合、宿主は好ましくはT7 RNAポリメラーゼを発現するBL21）を上記ベクターの代わりに使用することができる。さらにベクターは、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列を含んでもよい。大腸菌の周辺質へのポリペプチド分泌を指令するシグナル配列の一例は、peIBシグナル配列（Lei et al., J Bacteriol. 169: 4379-83 (1987)）である。ベクターを標的宿主細胞に導入する手段には、例えば、塩化カルシウム法やエレクトロポレーション法が含まれる。

【0117】

20

大腸菌以外に、例えば、哺乳動物細胞由来の発現ベクター（例えば、pcDNA3（Invitrogen）およびpEGF-BOS（Mizushima S, Nucleic Acids Res 18(17): 5322 (1990)）、pEF、pCDM8）、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば、「Bac-to-BACバキュロウイルス発現系」（GIBCO BRL）、pBacPAK8）、植物由来の発現ベクター（例えば、pMH1、pMH2）、動物ウイルス由来の発現ベクター（例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw）、レトロウイルス由来の発現ベクター（例えば、pZIPneo）、酵母由来の発現ベクター（例えば、「Pichia発現キット」（Invitrogen）、pNV11、SP-Q01）、および枯草菌（Bacillus subtilis）由来の発現ベクター（例えば、pPL608、pKTH50）を、本発明のポリペプチドの产生のために用いることもできる。

【0118】

30

ベクターをCHO細胞、COS細胞またはNIH3T3細胞などの動物細胞内で発現させるためには、ベクターは、例えば、SV40プロモーター（Mulligan et al., Nature 277: 108-14 (1979)）、MMLV-LTRプロモーター、EF1[®] プロモーター（Mizushima et al., Nucleic Acids Res 18: 5322 (1990)）、CMVプロモーターなどの、そのような細胞における発現のために必要なプロモーター、および好ましくは、形質転換体を選択するためのマーカー遺伝子（例えば、薬物（例えば、ネオマイシン、G418）によって選択される薬物耐性遺伝子）を有する必要がある。これらの特徴を備えた既知のベクターの例には、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、およびpOP13が含まれる。

【0119】

40

さらに、本方法を、遺伝子を安定的に発現させるため、およびそれと同時に、細胞内の遺伝子のコピー数を増幅するために用いることができる。例えば、相補的DHFR遺伝子を含むベクター（例えば、pCHOI）を、核酸合成経路が欠失したCHO細胞に導入し、次に、メトトレキサート（MTX）によって増幅することができる。さらに、遺伝子を一過性発現させる場合は、SV40の複製起点を含むベクター（pcDなど）により、染色体上にSV40 T抗原発現遺伝子を含むCOS細胞を形質転換する方法を使用することができる。

【0120】

以上のようにして得られた本発明のポリペプチドを、宿主細胞の内部または外部（培地

50

など)から単離して、実質的に純粋で均一なポリペプチドとして精製することができる。所与のポリペプチドに関する、本明細書で用いる「実質的に純粋」という用語は、ポリペプチドが他の生物学的高分子を実質的に含まないことを意味する。実質的に純粋なポリペプチドは、乾燥重量で少なくとも75% (例えば少なくとも80%、85%、95%、または99%) 純粋である。純度は、任意の適切な標準的方法、例えばカラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはHPLC解析により、測定することができる。ポリペプチドの単離および精製のための方法は、いずれの特定の方法にも限定されず、実際には、任意の標準的な方法を用いることができる。

【0121】

例えれば、カラムクロマトグラフィー、濾過、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動、透析、および再結晶化を適切に選択し、組み合わせて、ポリペプチドの単離および精製を行ってもよい。

10

【0122】

クロマトグラフィーの例には、例えれば、アフィニティーコロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィーなどが含まれる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed. Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。これらのクロマトグラフィーは、HPLCやFPLCなどの液体クロマトグラフィーによって実施することができる。したがって、本発明は、上述の方法によって調製された高純度のポリペプチドを提供する。

20

【0123】

本発明の文脈において、「配列同一性のパーセンテージ」は、2つの最適に整列された配列を比較ウインドウ全体で比較することにより決定され、このとき比較ウインドウ中のポリヌクレオチド配列部分は、2つの配列の最適なアラインメントについて、付加または欠失を含まない参照配列 (例えれば本発明のポリペプチド) と比較して付加または欠失 (すなわちギャップ) を含んでもよい。同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列に存在する位置の数を測定し、一致した位置の数を得て、一致した位置の数を比較のウインドウにおける位置の総数で割り、その結果に100を掛けて、配列同一性のパーセンテージを得ることにより、パーセンテージを算出する。

30

【0124】

2つまたはそれ以上の核酸またはポリペプチド配列の文脈において、「同一」またはパーセント「同一性」という用語は、同じ配列である2つまたはそれ以上の配列または部分配列を指す。2つの配列が、下記の配列比較アルゴリズムの1つを用いてまたはマニュアルアラインメントと目視検査によって測定された比較ウインドウまたは指定領域にわたって最大一致するように比較整列された際に、同じアミノ酸残基またはヌクレオチドを特定のパーセンテージで有する (すなわち、特定領域にわたって、または特定されていない場合は全配列にわたって、60%同一性、任意で65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%同一性) 場合、2つの配列は「実質的に同一」である。任意で、同一性は長さが少なくとも約50ヌクレオチドである領域全体、またはより好ましくは長さが100~500または1000ヌクレオチド以上である領域全体、またはアミノ酸または核酸配列の全長にわたって存在する。

40

【0125】

配列比較については、典型的には1つの配列を参照配列とし、それに対して試験配列を比較する。配列比較アルゴリズムを用いる場合、試験配列および参照配列は、コンピュータへ入力され、必要な場合には部分配列座標が指定され、配列アルゴリズムプログラムパラメータが指定される。デフォルトプログラムパラメータが使用可能である、または代替パラメータが指定可能である。配列比較アルゴリズムは、その後、プログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する試験配列についてのパーセント配列同一性を算出する。

【0126】

本明細書で用いる場合、「比較ウインドウ」は、20から600まで、通常約50~約200、より通常では約100~約150からなる群より選択される連続した位置の数のいずれか1つのセ

50

グメントへの参照を含み、2つの配列が最適に整列された後、連続した位置の同じ数の参考配列と配列が比較され得る。比較のための配列のアラインメント方法は、当技術分野で周知である。比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-9の局所的相同性アルゴリズムにより、Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443-53の相同性アラインメントアルゴリズムにより、Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444-8の類似性検索方法により、コンピュータ化されたこれらのアルゴリズムの実施 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIにおけるGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA) により、またはマニュアルアラインメントおよび目視検査(例えば、Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1995別冊) を参照)により行うことができる。

【0127】

パーセント配列同一性および配列類似性を決定するために適したアルゴリズムの2つの例は、BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムであり、Altschul et al. (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-402およびAltschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10にそれぞれに記載されている。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationを通じて公的に利用可能である。このアルゴリズムは、データベース配列内の同じ長さのワードと整列させた場合に一定の正の数の閾値スコアTに一致するかまたは満たすかのいずれかである、問い合わせ配列における長さWの短いワードを同定することにより、高スコア配列ペア(HSP)をまず同定する工程を必要とする。Tは、近傍ワードスコア閾値と呼ばれる(Altschul et al.、前記)。これらの初期隣接ワードヒットは、それらを含むより長いHSPを見いだすための検索を開始するための種として役立つ。ワードヒットは、累積アラインメントスコアが増加できる限り、各配列に沿って両方向に延長される。ヌクレオチド配列に関して、累積スコアは、パラメータM(適合残基のペアに対する報酬スコア；常に>0)およびN(不適合残基に対するペナルティスコア；常に<0)を用いて算出される。アミノ酸配列に関しては、スコアリングマトリックスを用いて累積スコアを算出する。累積アラインメントスコアが、その最大達成値から量Xだけ下降した場合に、1つまたは複数の負のスコアリング残基アラインメントの蓄積により累積スコアが0以下になった場合に、または、いずれかの配列の末端に達した場合に、各方向へのワードヒットの伸張が停止する。BLASTアルゴリズムパラメータであるW、T、およびXは、アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列用)はデフォルトとして、ワード長(W)11、期待値(E)10、M=5、N=-4、および両鎖の比較を用いる。アミノ酸配列について、BLASTPプログラムは、デフォルトとして、ワード長3、期待値(E)10、およびBLOSUM62スコア行列(Henikoff and Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915参照)アラインメント(B)50、期待値(E)10、M=5、N=-4、および両鎖の比較を用いる。

【0128】

BLASTアルゴリズムは、2つの配列間の類似性の統計学的解析を実行する(例えば、Karl in and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-7を参照されたい)。BLASTアルゴリズムにより提供される類似性の1つの尺度は最小合計確率(P(N))であり、これは、2つのヌクレオチド配列間またはアミノ酸配列間の適合が偶然に起こる確率の指標を提供するものである。例えば、参照核酸と試験核酸の比較における最小合計確率が約0.2未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは約0.001未満である場合に、この核酸は参照配列と類似しているとみなされる。

【0129】

本発明のポリペプチドを、精製の前または後に適切なタンパク質修飾酵素で処理することにより、任意で、改変するまたは部分的に欠失させることができる。有用なタンパク質修飾酵素には、トリプシン、キモトリプシン、リシリエンドペプチダーゼ、タンパク質キナーゼ、グルコシダーゼなどが非制限的に含まれる。

【0130】

10

20

30

40

50

抗体および非抗体結合タンパク質

本発明はまた、本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体および非抗体結合タンパク質を提供する。本発明の抗体および非抗体結合タンパク質は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を含む任意の形態で用いることができ、これにはウサギなどの動物を本発明のポリペプチドで免疫することによって得られる抗血清、すべてのクラスのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、ヒト抗体、ならびに遺伝子組換えによって作製されたヒト化抗体が含まれる。

【0131】

抗体または非抗体結合タンパク質の文脈における「特異的に～に結合する」または「～に特異的に結合する」または「結合した(attached)」または「結合している(attaching)」という用語は、細胞もしくは組織中または細胞もしくは組織上で発現されるA7322、F3374、またはPBK / TOPKへの結合に対して別の作用物質またはリガンドと結合または競合する標的エピトープ（例えばA7322、F3374、またはPBK / TOPK）との、全体または部分における、作用物質またはリガンドの優先的な結合を指す。もちろん、抗体と非標的エピトープとの間にある程度の非特異的相互作用が生じる場合があることは認識される。それでも、標的エピトープの特異的な認識を介して、特異的結合を識別することができる。典型的には、特異的結合の結果、送達される分子と標的エピトープを有する実体（例えばアッセイウェルまたは細胞）との間に、結合抗体と標的エピトープを欠く実体（例えばアッセイウェルまたは細胞）との間よりも強固な結合が得られる。特異的結合は典型的には、標的エピトープ（すなわちREG4）を有する細胞または組織に対する結合物質またはリガンドの量（単位時間当たり）において、標的エピトープを欠く細胞または組織と比較して、少なくとも約2倍のバックグラウンドからの増加、好ましくは約10倍の増加より多く、より好ましくは約100倍の増加より多いこととなる。2つの実体間の特異的結合は通常、少なくとも 10^6 M^{-1} の親和性を意味する。 10^8 M^{-1} またはそれを超える親和性が好ましい。核酸およびタンパク質作用物質およびリガンドに関して、特異的結合を決定することができる。核酸作用物質についての特異的結合は、ノーザンプロット、ゲルシフトアッセイ、およびインサイチュハイブリダイゼーションを含むがそれらに限定されない当技術分野で公知の任意のアッセイ法を用いて決定することができる。タンパク質作用物質についての特異的結合は、ゲル電気泳動、ウエスタンプロット、ELISA、フローサイトメトリー、および免疫組織化学を含むがそれらに限定されない当技術分野で公知の任意の結合アッセイ法を用いて決定することができる。

【0132】

抗体

本明細書で用いる「抗体」という用語は、天然抗体および非天然抗体を包含し、例えば、単鎖抗体、キメラ、二重特異性、およびヒト化抗体、ならびにそれらの抗原結合断片（例えば、Fab'、F(ab')2、Fab、Fv、およびrIgG）を含む。Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) も参照されたい。例えば、Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New York (1998) も参照されたい。このような非天然抗体は固相ペプチド合成を用いて構築することができ、組換え的に產生することも、または例えば、参照として本明細書に組み入れられるHuse et al., Science 246:1 40 275-81 (1989) に記載されているように、可変重鎖と可変軽鎖とからなるコンビナトリアルライブラリをスクリーニングすることによって得ることもできる。例えば、キメラ、ヒト化、CDRグラフト、一本鎖、および二重特異性抗体を作製するこれらおよびその他の方法は、当業者に周知である（それぞれ参照により本明細書に組み入れられる、Winter and Harris, Immunol. Today 14:243-6 (1993); Ward et al., Nature 341:544-6 (1989); Harlow and Lane, Antibodies, 511-52, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York, 1988; Hilyard et al., Protein Engineering: A practical approach (IRL Press 1992); Borrebaeck, Antibody Engineering, 2d ed. (Oxford University Press 1995)）。

【0133】

10

20

30

40

50

「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方を含む。この用語はまた、キメラ抗体（例えばヒト化マウス抗体）およびヘテロ結合抗体（例えば二重特異性抗体）などの遺伝的に操作された形態を含む。この用語はまた、組換え単鎖Fv断片（scFv）も指す。抗体という用語はまた、二価または二重特異性分子、二機能性抗体（diabody）、三機能性抗体（triabody）、および四機能性抗体（tetrabody）を含む。二価または二重特異性分子は、例えば以下に記載される：Kostelny et al. (1992) J Immunol 148:1547-53; Pack and Pluckthun (1992) Biochemistry 31:1579-84; Holliger et al. (1993) Proc Natl Acad Sci U S A. 90:6444-8; Gruber et al. (1994) J Immunol 153:368-74; Zhu et al. (1997) Protein Sci 6:781-8; Hu et al. (1997) Cancer Res. 56:3055-61; Adams et al. (1993) Cancer Res. 53:4026; and McCartney, et al. (1995) Protein Eng. 8:301-14。 10

【0134】

典型的には、抗体は重鎖および軽鎖を有する。重鎖および軽鎖はそれぞれ定常領域および可変領域（これら領域は「ドメイン」としても知られる）を含む。軽鎖および重鎖可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」とも呼ばれる、3つの超可変領域によって中断される4つの「フレームワーク」領域を含む。フレームワーク領域およびCDRの範囲は規定されている。異なる軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は種内で比較的保存されている。抗体のフレームワーク領域、すなわち構成軽鎖と重鎖のフレームワーク領域を合わせたものは、CDRを3次元空間に位置付け、整列させる。

【0135】

CDRは主として抗原エピトープへの結合を担っている。各鎖のCDRは、典型的にはN末端から順に番号がつけられてCDR1、CDR2、およびCDR3と呼ばれ、また典型的には、その特定のCDRが位置する鎖によって同定される。したがって、VH CDR3はそれが見いだされる抗体の重鎖の可変ドメインに位置し、VL CDR1はそれが見いだされる抗体の軽鎖の可変ドメインのCDR1である。 20

【0136】

抗体を得るために抗原として用いられる本発明のポリペプチドは、任意の動物種に由来し得るが、好ましくはヒト、マウス、またはラットなどの哺乳動物に、より好ましくはヒトに由来する。ヒト由来のポリペプチドは、本明細書に開示されるヌクレオチドまたはアミノ酸配列から入手できる。 30

【0137】

本発明によれば、免疫化抗原として用いるポリペプチドは、完全タンパク質でもよく、またはタンパク質の部分ペプチドでもよい。部分ペプチドは、例えば、本発明のポリペプチドのアミノ（N）末端断片またはカルボキシ（C）末端断片を含み得る。

【0138】

本発明のポリペプチドまたはその断片をコードする遺伝子を既知の発現ベクターに挿入してもよく、これはその後、本明細書に記載の宿主細胞の形質転換に用いられる。所望のポリペプチドまたはその断片を、任意の標準的な方法によって宿主細胞の外部または内部から回収することができ、続いて、抗原として用いることができる。または、ポリペプチドを発現する細胞全体もしくはその溶解物、または化学合成したポリペプチドを、抗原として用いてもよい。 40

【0139】

任意の哺乳動物を抗原で免疫化することができるが、細胞融合に用いる親細胞との適合性を考慮に入れることが好ましい。一般に、齧歯目（Rodentia）、ウサギ目（Lagomorpha）、または霊長目（Primate）の動物が用いられる。齧歯類の動物には、例えば、マウス、ラット、およびハムスターが含まれる。ウサギ目の動物には、例えばウサギが含まれる。霊長目の動物には、例えば、カニクイザル（*Macaca fascicularis*）、アカゲザル、マントヒビ（*sacred baboon*）およびチンパンジーなどの狭鼻猿類（*Catarrhini*）（旧世界サル）のサルが含まれる。

【0140】

10

20

30

40

50

動物を抗原で免疫化する方法は当技術分野で公知である。例えば、抗原の腹腔内注射または皮下注射は、哺乳類を免疫化する標準的な方法である。具体的には、抗原は適量のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）や生理食塩水などで希釈および懸濁することができる。必要に応じて、抗原懸濁液をフロイント完全アジュバントなどの適切な量の標準的アジュバントと混合し、乳濁液を作製して、その後哺乳動物に対して投与してもよい。好ましくは、これに続いて、適量のフロイント不完全アジュバントと混合した抗原を、4～21日毎に複数回投与する。適切な担体を免疫化に使用することもできる。上記のように免疫化を行った後に、所望の抗体の量の増加を標準的な方法で血清を調べる。

【0141】

血清中の所望の抗体の増加を検討した免疫化哺乳動物から血液を採取し、従来の任意の方法によって血液から血清を分離することによって、本発明のポリペプチドに対するポリクローナル抗体を調製することができる。ポリクローナル抗体には、ポリクローナル抗体を含む血清、および血清から単離したポリクローナル抗体を含む画分が含まれる。本発明のポリペプチドのみを認識する画分から、例えば、本発明のポリペプチドを結合させたアフィニティーカラムを用いて、この画分をプロテインAカラムまたはプロテインGカラムを用いてさらに精製することによって、免疫グロブリンGまたはMを調製することができる。

10

【0142】

モノクローナル抗体を調製するため、抗原で免疫化した哺乳動物から免疫細胞を回収し、上述のように血清中の所望の抗体レベルの上昇を調べ、細胞融合に供する。細胞融合に使用する免疫細胞は、好ましくは脾臓から得られる。上記の免疫細胞と融合される他の好ましい親細胞には、例えば哺乳動物の骨髄腫細胞、およびより好ましくは、薬物によって融合細胞を選択するための特性を獲得した骨髄腫細胞などが含まれる。

20

【0143】

上記の免疫細胞および骨髄腫細胞は、公知の方法、例えばMilsteinらの方法に従って融合させることができる（Galfre and Milstein, Methods Enzymol 73: 3-46 (1981)）。

【0144】

細胞融合によって得られたハイブリドーマは、HAT培地（ヒポキサンチン、アミノブテリン、およびチミジンを含む培地）などの標準的な選択培地中で培養することによって選択され得る。細胞培養は通常、HAT培地中で、所望のハイブリドーマを除く他のすべての細胞（融合していない細胞）を死滅させるのに十分な期間である数日から数週間、継続される。次に、標準的な限界希釈を行い、所望の抗体を產生するハイブリドーマ細胞のスクリーニングおよびクローニングを行う。

30

【0145】

ハイブリドーマ調製用に非ヒト動物を抗原で免疫化する上記の方法に加えて、EBウイルスに感染したリンパ球などのヒトリンパ球を、ポリペプチド、ポリペプチド発現細胞、またはそれらの溶解物によりインビトロで免疫することもできる。続いて、免疫化リンパ球を、無限に分裂できるU266などのヒト由来の骨髄腫細胞と融合させ、ポリペプチドと結合可能な所望のヒト抗体を产生するハイブリドーマを得ることができる（特開昭63-17688号）。

【0146】

40

続いて、得られたハイブリドーマをマウスの腹腔に移植して、腹水を取り出す。得られたモノクローナル抗体は、例えば、硫安沈殿、プロテインAもしくはプロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、または本発明のポリペプチドを結合させたアフィニティーカラムによって精製できる。本発明の抗体は、本発明のポリペプチドの精製および検出のためだけでなく、本発明のポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストの候補としても用いることができる。さらに、この抗体を、本発明のポリペプチドと関連する疾患に対する抗体療法に適用することもできる。得られた抗体をヒトの身体に投与する場合（抗体療法）は、免疫原性を低下させるためにヒト抗体またはヒト化抗体が好ましい。

【0147】

例えば、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物は、ポリペプ

50

チド、ポリペプチド発現細胞、またはそれらの溶解物から選択される抗原で免疫化され得る。その後、抗体産生細胞を動物から回収し、骨髄腫細胞と融合させてハイブリドーマを入手し、そこからポリペプチドに対するヒト抗体を調製することができる（国際公開公報第92-03918号、国際公開公報第94-02602号、国際公開公報第94-25585号、国際公開公報第96-33735号、および国際公開公報第96-34096号を参照のこと）。

【0148】

または、免疫化されたリンパ球などの、抗体を產生する免疫細胞を、癌遺伝子によって不死化して、モノクローナル抗体の調製に使用することができる。

【0149】

このようにして得られるモノクローナル抗体は、遺伝子操作技術を用いて組換えにより調製することもできる（例えば、MacMillan Publishers LTD（英国）より刊行されたBorrebaeck and Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies (1990)を参照）。組換え抗体を調製するために、例えば、抗体をコードするDNAを、抗体を產生するハイブリドーマまたは免疫化リンパ球などの免疫細胞からクローニングし、適切なベクターに挿入して、宿主細胞に導入することができる。本発明は、上述のように調製された組換え抗体も提供する。

10

【0150】

さらに、本発明の抗体は、本発明のポリペプチドの1つまたは複数と結合する限り、抗体の断片または修飾抗体であってもよい。例えば、抗体断片は、Fab、F(ab')2、Fv、または、H鎖およびL鎖由来のFv断片が適當なリンカーによって連結されている一本鎖Fv (scFv) 20)であってもよい (Huston et al., Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83 (1988))。より具体的には、抗体断片は、抗体をパパインやペプシンなどの酵素で処理することにより作製することができる。または、抗体断片をコードする遺伝子を構築して、発現ベクターに挿入し、適切な宿主細胞において発現させてもよい（例えば、Co et al., J Immunol 152: 2968-76 (1994); Better and Horwitz, Methods Enzymol 178: 476-96 (1989); Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol 178: 497-515 (1989); Lamoyi, Methods Enzymol 151: 652-63 (1986); Rousseaux et al., Methods Enzymol 121: 663-9 (1986); Bird and Walker, Trends Biotechnol 9: 132-7 (1991)を参照されたい）。

20

【0151】

「VH」への言及は抗体の免疫グロブリン重鎖の可変領域を指し、Fv、scFv、またはFab の重鎖を含む。「VL」への言及は免疫グロブリン軽鎖の可変領域を指し、Fv、scFv、dsFv 30 、またはFabの軽鎖を含む。

30

【0152】

「単鎖Fv」または「scFv」という表現は、通常の2鎖抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメインが連結して1つの鎖を形成した抗体を指す。典型的にはリンカーペプチドが2つの鎖の間に挿入されており、適正なフォールディングと活性な結合部位の形成とを可能にする。

【0153】

「キメラ抗体」は、(a)異なるもしくは変更された、クラス、エフェクター機能、および/もしくは種の定常領域、またはキメラ抗体に新しい特性を付与する全く異なる分子、例えば、酵素、毒素、ホルモン、成長因子、薬物などに、抗原結合部位（可変領域）が結合するように、定常領域またはその一部分が変更された、置き換えられた、または交換された；あるいは(b)可変領域またはその一部分が、異なるまたは変更された抗原特異性を有する可変領域に変更された、置き換えられた、または交換された、免疫グロブリン分子である。

40

【0154】

「ヒト化抗体」は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含む免疫グロブリン分子である。ヒト化抗体には、所望の特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、またはウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）の相補性決定領域（CDR）に由来する残基でヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）のCDR由来の残基が置き換えられているヒト免疫グロブリンが含まれる。一部の例において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク

50

残基は、対応する非ヒト残基で置き換えられる。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体にも、導入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見られない残基を含む場合がある。一般に、ヒト化抗体は少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含み、これらCDR領域のすべてまたは実質的にすべては非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、フレームワーク(FR)領域のすべてまたは実質的にすべてはヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体は最適にはまた、免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンのものの少なくとも一部分を含む(Jones et al., Nature 321:522-5 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-7 (1988); and Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-6 (1992))。

【0155】

10

ヒト化は本質的に、Winterと共同研究者 の方法 (Jones et al., Nature 321:522-5 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-7 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:15 34-6 (1988)) に従って、齧歯類のCDRまたはCDR配列でヒト抗体の対応配列を置換することによって行うことができる。したがって、このようなヒト化抗体は、実質的にヒト可変ドメインの全長より短い領域が、非ヒト種由来の対応する配列によって置き換えられたキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。

【0156】

20

「エピトープ」および「抗原決定基」という用語は、抗体が結合する抗原上の部位を指す。連続アミノ酸から、またはタンパク質の三次フォールディングによって近接して並べられた非連続アミノ酸から、エピトープを形成することができる。連続アミノ酸から形成されたエピトープは典型的に、変性溶媒にさらされても保持され、三次フォールディングによって形成されたエピトープは典型的に、変性溶媒処置で失われる。エピトープは典型的に、独自の空間的コンホーメーション中に少なくとも3、より一般的には少なくとも5または8~10個のアミノ酸を含む。エピトープの空間的コンホーメーションを決定する方法には、例えばx線結晶解析および2次元核磁気共鳴が含まれる。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996)を参照されたい。

【0157】

30

抗体は、ポリエチレン glycole (PEG)などの様々な分子との接合によって修飾することができる。本発明は、このような修飾抗体を提供する。修飾抗体は、抗体を化学的に修飾することにより得られる。このような修飾法は当技術分野で常套的なものである。

【0158】

または、本発明の抗体を、非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域とのキメラ抗体として、または、非ヒト抗体由来の相補性決定領域(CDR)、ヒト抗体由来のフレームワーク領域(FR)および定常領域を含むヒト化抗体として入手することもできる。このような抗体は、公知の技術を用いることによって調製可能である。

【0159】

40

ヒトフレームワーク領域および定常領域に加えて、ヒト可変領域を含む完全ヒト抗体もまた用いることができる。このような抗体は、当技術分野で公知の様々な技術を用いて作製することができる。例えば、インビトロ法は、バクテリオファージ上に提示されたヒト抗体断片の組換えライブラリの使用を含む(例えば、Hoogenboom & Winter, J Mol Biol 1991, 227:381)。同様に、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を、内在性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されたトランスジェニック動物、例えばマウスに導入することによって、ヒト抗体を作製することができる。このアプローチは例えば、米国特許第6,150,584号、同第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,661,016号に記載されている。

【0160】

50

非抗体結合タンパク質

本発明はまた、本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗原結合タンパク質または非抗体結合タンパク質(例えばリガンド)を含む。以下により詳細に考察するように、非抗

体リガンドには、アドネクチン (adnectin)、アビマー (avimer)、一本鎖ポリペプチド結合分子、および抗体様結合ペプチド模倣体を含む非免疫グロブリンタンパク質骨格を用いる抗体模倣体が含まれる。

【0161】

抗体と同様の様式で標的を標的化しそれに結合する他の化合物が開発されてきた。これらの「抗体模倣体」のあるものは、抗体の可変領域のための代替タンパク質フレームワークとして、非免疫グロブリンタンパク質骨格を使用する。

【0162】

例えばLadner et al. (米国特許第5,260,203号)は、凝集しているが分子的には離れている抗体の軽鎖および重鎖可変領域と同様の結合特異性を持つ一本鎖ポリペプチド結合分子を記載している。一本鎖結合分子は、ペプチドリンクによって接続されている抗体の重鎖および軽鎖可変領域両方の抗原結合部位を含み、2つのペプチド抗体の構造と同様の構造に折り畳まれる。一本鎖結合分子は、従来の抗体に対して、より小さなサイズ、より高い安定性を含むいくつかの利点を示し、より容易に改変される。

10

【0163】

Ku et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92(14):6552-6556 (1995))は、チトクロームb562に基づく抗体の代替物を開示する。Ku et al. (1995)は、チトクロームb562のループの2つがランダム化されウシ血清アルブミンに対する結合について選択されたライプラリを作製した。個々の変異体は、抗BSA抗と同様にBSAに選択的に結合することが見いだされた。

20

【0164】

Lipovsek et al. (米国特許第6,818,418号および第7,115,396号)は、フィプロネクチンまたはフィプロネクチン様タンパク質骨格および少なくとも1つの可変ループを特徴とする抗体模倣体を開示する。アドネクチンとして公知のこれらのフィプロネクチンに基づく抗体模倣体は、標的とする任意のリガンドに対する高い親和性および特異性を含む天然または改変抗体の多くの同じ特徴を示す。新規のまたは改善された結合タンパク質を進化させる任意の技術を、これらの抗体模倣体と共に用いることができる。

【0165】

これらのフィプロネクチンに基づく抗体模倣体の構造は、IgG重鎖の可変領域の構造と類似している。したがって、これらの模倣体は、本来の性質と同様の抗原結合特性および天然抗体のものと同様の親和性を示す。さらに、これらのフィプロネクチンに基づく抗体模倣体は、抗体および抗体断片に対して一定の利点を示す。例えば、これらの抗体模倣体は、天然の折り畳み安定性についてジスルフィド結合に依らない、したがって、通常抗体が壊れるような条件下で安定である。さらに、これらのフィプロネクチンに基づく抗体模倣体の構造が、IgG重鎖の構造と類似していることから、インビボでの抗体の親和性成熟プロセスと類似のループのランダム化およびシャッフリングのプロセスを、インビトロで用いることができる。

30

【0166】

Beste et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96(5):1898-1903 (1999))は、リポカリシン骨格に基づく抗体模倣体を開示する (Anticalin (登録商標))。リポカリシンは、タンパク質の末端に4つの超可変ループを有する バレルから構成される。Beste (1999)は、ループをランダム変異誘発に供し、例えばフルオレセインとの結合について選択した。3つのバリエントが、フルオレセインとの特異的結合を示し、1つのバリエントが抗フルオレセイン抗体と同様の結合を示した。さらなる分析により、ランダム化された位置のすべてが可変であることが明らかとなり、これによりAnticalin (登録商標)が抗体の代替物として用いるのに適していることが示された。

40

【0167】

Anticalins (登録商標)は、典型的に160~180残基の小さい一本鎖ペプチドであり、低い生産コスト、保存時の高い安定性、および低い免疫反応を含む、抗体に対するいくつかの利点を提供する。

50

【 0 1 6 8 】

Hamilton et al. (米国特許第5,770,380号)は、結合部位として用いる多数の可変ペプチドループに結合しているカリックスアレーンの強固な非ペプチド有機骨格を用いる合成抗体模倣体を開示する。ペプチドループはすべて、互いに対してカリックスアレーンから幾何的に同じ側から突出している。この幾何的なコンホメーションのため、ループのすべてが結合に利用可能であり、リガンドへの結合親和性を増加させる。しかしながら、他の抗体模倣体と比較すると、カリックスアレーンに基づく抗体模倣体は、ペプチドから独占的に構成されず、したがって、プロテアーゼ酵素による攻撃に対して脆弱性が低い。骨格が、ペプチド、DNA、またはRNAのいずれからも純粋に構成されないことは、この抗体模倣体が、極端な環境条件でも比較的安定であり、長い寿命を有することを意味している。さらに、カリックスアレーンに基づく抗体模倣体が比較的小さいことから、免疫原性反応を生じる可能性が低い。

10

【 0 1 6 9 】

Murali et al. (Cell. Mol. Biol. 49(2):209-216 (2003))は、抗体の代替物としても有用であり得る「抗体様結合ペプチド模倣体」(ABiP)と呼ぶより小さなペプチド模倣体へと、抗体を低減する方法論を考察する。

【 0 1 7 0 】

Silverman et al. (Nat. Biotechnol. (2005), 23: 1556-1561)は、「アビマー」と呼ばれる複数のドメインを含む一本鎖ポリペプチドである融合タンパク質を開示する。インビトロエクソンシャッフリングおよびファージディスプレイによってヒト細胞外受容体ドメインから開発されたアビマーは、様々な標的分子に対するそれらの親和性および特異性において抗体とある程度類似した結合タンパク質のクラスである。得られたマルチドメインタンパク質は、単一エピトープ結合タンパク質と比較して、改善された親和性(いくつかの場合、ナノモル以下)および特異性を示すことができる複数の独立した結合ドメインを含むことができる。アビマーの構築および使用の方法に関するさらなる詳細は、例えば米国特許出願第20040175756号、第20050048512号、第20050053973号、第 20050089932号、および第20050221384号に開示されている。

20

【 0 1 7 1 】

非免疫グロブリンタンパク質フレームワークに加え、抗体特性はまた、RNA分子および非天然オリゴマー(例えば、プロテアーゼインヒビター、ベンゾジアゼピン、プリン誘導体、および ターン模倣体)(すべて本発明での使用に適している)を含む化合物中で模倣する。

30

【 0 1 7 2 】

上述のように得られた抗体および非抗体結合タンパク質を、均一になるまで精製することができる。例えば、抗体の分離および精製は、一般的なタンパク質に対して用いられる分離法および精製法に従って実施することができる。例えば、アフィニティークロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィー、濾過、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動など(Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))(しかし、これらには限定されない)を適切に選択し組み合わせて用いることにより、抗体を分離および単離することができる。プロテインAカラムおよびプロテインGカラムをアフィニティーカラムとして使用することができる。用いられるプロテインAカラムの例には、例えば、Hyper D、POROSおよびSepharose F.F. (Pharmacia)が含まれる。

40

【 0 1 7 3 】

クロマトグラフィーの例には、アフィニティークロマトグラフィー以外に、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィーなどが含まれる(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。クロマトグラフィーの手順は、HPLCおよびFPLCなどの液相クロマトグラフィーによって行うことができる。

50

【 0 1 7 4 】

本発明の抗体の抗原結合活性を測定するために、例えば、吸光度アッセイ法、酵素結合免疫吸着アッセイ法（ELISA）、酵素免疫アッセイ法（EIA）、放射免疫アッセイ法（RIA）、および/または免疫蛍光アッセイ法を用いてもよい。ELISAの場合には、本発明の抗体または非抗体結合タンパク質をプレート上に固定化し、本発明のポリペプチドをプレートに加えた後に、抗体産生細胞の培養上清または精製抗体などの所望の抗体を含む試料を加える。次に、アルカリホスファターゼなどの酵素で標識された、一次抗体を認識する二次抗体を加え、プレートをインキュベートする。続いて洗浄後に、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質をプレートに添加し、吸光度を測定して、試料の抗原結合活性を評価する。C末端断片またはN末端断片などのポリペプチドの断片を、抗体の結合活性を評価するための抗原として用いてもよい。本発明により、BIAcore（Pharmacia）を用いて、抗体の活性を評価することができる。

10

【 0 1 7 5 】

上述の方法は、本発明のポリペプチドを含むと想定される試料に本発明の抗体または非抗体結合タンパク質を曝露し、該抗体および該ポリペプチドによって形成された免疫複合体を検出または測定することにより、本発明のポリペプチドの検出または測定を可能にする。

【 0 1 7 6 】

本発明によるポリペプチドの検出または測定の方法はポリペプチドを特異的に検出または測定することが可能であるため、本方法は、ポリペプチドが用いられる種々の実験において有用である可能性がある。

20

【 0 1 7 7 】**アンチセンスオリゴヌクレオチド**

上記のように本発明はまた、ヒトA7322またはF3374V1タンパク質をコードするポリヌクレオチド（SEQ ID NO：79または81）またはその相補鎖とハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドも提供する。例えば、SEQ ID NO：79（A7322）の1～384位から選択される連続するヌクレオチド配列に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドが好ましい。一般に、開始コドンを含むヌクレオチド配列が、有効なアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計するのに好ましい。A7332の開始コドン（172～174）は、SEQ ID NO：79（A7322）の1～384位内に位置する。本発明のポリヌクレオチドは、好ましくは、本発明のポリペプチドをコードするDNAと特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドである。

30

【 0 1 7 8 】

本明細書で用いる「特異的にハイブリダイズする」という用語は、通常のハイブリダイゼーション条件下で、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、他のタンパク質をコードするDNAとの交差ハイブリダイゼーションが有意に生じないことを意味する。このようなポリヌクレオチドには、本発明のポリペプチドをコードするDNAまたはその相補鎖と特異的にハイブリダイズする、プローブ、プライマー、ヌクレオチド、およびヌクレオチド誘導体（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびリボザイム）が含まれる。さらに、このようなポリヌクレオチドはDNAチップの調製に使用できる。

40

【 0 1 7 9 】

本明細書で用いる「アンチセンスオリゴヌクレオチド」という用語は、DNAまたはmRNAの特定領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドが完全に相補的であるものを意味するだけでなく、DNAまたはmRNAおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドがSEQ ID NO：79または81のヌクレオチド配列と特異的にハイブリダイズできる限り、1つまたは複数のヌクレオチドのミスマッチを有するものも意味する。

【 0 1 8 0 】

このようなポリヌクレオチドは、「連続する少なくとも15のヌクレオチド配列領域」中に、少なくとも70%またはそれ以上、好ましくは80%またはそれ以上、より好ましくは90

50

%またはそれ以上、さらにより好ましくは95%またはそれ以上の相同意を有するものとして含まれる。本明細書に記載されたアルゴリズムを用いて相同意を決定することができる。このようなポリヌクレオチドは、以下の実施例の項で述べるように、本発明のポリペプチドをコードするDNAの単離もしくは検出のためのプローブとして、または増幅用のプライマーとして有用である。

【0181】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの誘導体または修飾産物を、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドとして使用することができる。このような修飾産物の例には、メチルホスホネート型またはエチルホスホネート型、ホスホロチオエート修飾、およびホスホロアミデート修飾などの低アルキルホスホネート修飾が含まれる。

10

【0182】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、ポリペプチドをコードするDNAまたはmRNAと結合し、その転写または翻訳を阻害して、mRNAの分解を促進し、本発明のポリペプチドの発現を阻害することにより、本発明のポリペプチドを產生する細胞に対して作用し、それによってポリペプチドの機能が阻害される。

【0183】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、この誘導体に対して不活性である適切な基材と混合することにより、塗布剤またはパップ剤などの外用剤に使用することができる。

【0184】

20

また必要に応じて、このような誘導体を、賦形剤、等張剤、可溶化剤、安定剤、保存剤、鎮痛剤などを添加することにより、錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻薬、および凍結乾燥剤に製剤化することができる。これらは以下の通常の方法で調製することができる。

【0185】

アンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を、患部に直接塗布するか、または血管内に注射することにより、患部に到達するように患者に投与してもよい。アンチセンスを含む溶媒を使用することで、持続性および膜透過性を高めることもできる。その例には、リポソーム、ポリ-L-リジン、脂質、コレステロール、リポフェクチン、またはそれらの誘導体が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0186】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の用量を、患者の状態にしたがって適切に調整し、所望の量で使用することができる。例えば0.1 mg/kg ~ 100 mg/kg、好ましくは0.1 mg/kg ~ 50 mg/kgの用量範囲で投与することができる。

【0187】

siRNA

「siRNA」という用語は、標的mRNAの翻訳を妨げる2本鎖RNA分子を意味する。siRNAを細胞内に導入するためには、RNAを転写するための錆型としてDNAが用いられる技法を含む標準的な技法が用いられる。本発明のsiRNAは、ヒトA7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAU RKBタンパク質をコードするポリヌクレオチド (SEQ ID NO : 79、81、92、または88) のセンス核酸配列およびアンチセンス核酸配列を含む。siRNAは、単一の転写産物 (二本鎖RNA) が、標的遺伝子由来のセンス配列と相補的アンチセンス配列の両方 (例えばヘアピン) を有するように構築される。siRNAは、dsRNAまたはshRNAのいずれかであってよい。

40

【0188】

本明細書で使用する「dsRNA」という用語は、互いに相補的な配列を含み、相補的配列を介して互いにアニーリングして二本鎖RNA分子を形成している2つのRNA分子の構築物を指す。二つの鎖のヌクレオチド配列は、標的遺伝子配列の配列をコードするタンパク質から選択される「センス」または「アンチセンス」RNAだけでなく、標的遺伝子の非コード領域から選択されるヌクレオチド配列を有するRNA分子も含んでよい。

【0189】

50

本明細書で使用する「shRNA」という用語は、互いに相補的な第一領域と第二領域（すなわちセンス鎖とアンチセンス鎖）を含み、ステムループ構造を有するsiRNAを指す。領域の相補性と配向性の程度は、領域間で塩基が対を形成するのに十分であり、第一領域と第二領域はループ領域によって連結され、ループはループ領域内のヌクレオチド（またはヌクレオチドアナログ）間の塩基対形成の欠如をもたらす。shRNAのループ領域とは、センス鎖とアンチセンス鎖の間に介在する一本鎖領域であり、「介在性一本鎖」と称されることもある。

【0190】

本明細書で用いる場合、「siD/R-NA」という用語は、RNAとDNAの両方で構成され、RNAおよびDNAのハイブリッドおよびキメラを含み、標的mRNAの翻訳を阻止する、二本鎖ポリヌクレオチド分子を指す。本明細書において、ハイブリッドは、DNAで構成されたポリヌクレオチドおよびRNAで構成されたポリヌクレオチドが互いにハイブリダイズして二本鎖分子を形成している分子を指す。一方キメラは、二本鎖分子を構成する鎖の一方または両方がRNAおよびDNAを含み得ることを示す。siD/R-NAを細胞に導入する標準的な技術が用いられる。siD/R-NAは、CXセンス核酸配列（「センス鎖」としても称される）、CXアンチセンス核酸配列（「アンチセンス鎖」としても称される）、または両方を含む。siD/R-NAは、単一の転写産物が、標的遺伝子に由来するセンス核酸配列と相補的なアンチセンス核酸配列の両方を有するように構築されてもよい（例えば、ヘアピン）。siD/R-NAは、dsD/R-NAまたはshD/R-NAのいずれかであってもよい。

【0191】

本明細書で使用する「dsD/R-NA」という用語は、互いに相補的な配列を含み、相補的配列を介して互いにアニーリングして二本鎖ポリヌクレオチド分子を形成している2つの分子の構築物を指す。二つの鎖のヌクレオチド配列は、標的遺伝子配列の配列をコードするタンパク質から選択される「センス」または「アンチセンス」ポリヌクレオチドだけでなく、標的遺伝子の非コード領域から選択されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドも含んでよい。dsD/R-NAを構成する2つの分子の一方または両方が、RNAとDNAの両方から構成される（キメラ分子）か、またはそうでなければ、分子の一方が、RNAで構成され、他方がDNAで構成される（ハイブリッド二本鎖）。

【0192】

本明細書で使用する「shD/R-NA」という用語は、互いに相補的な第一領域と第二領域（すなわちセンス鎖とアンチセンス鎖）を含み、ステムループ構造を有するsiD/R-NAを指す。領域の相補性と配向性の程度は、領域間で塩基が対を形成するのに十分であり、第一領域と第二領域はループ領域によって連結され、ループはループ領域内のヌクレオチド（またはヌクレオチドアナログ）間の塩基対形成の欠如をもたらす。shD/R-NAのループ領域とは、センス鎖とアンチセンス鎖の間に介在する一本鎖領域であり、「介在性一本鎖」と称されることもある。

【0193】

A7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKBのsiRNAは、A7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKB遺伝子配列の単一の標的に向けられる。または、siRNAは、A7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKB遺伝子配列の複数の標的に向けられる。例えば、組成物には、A7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKBの2、3、4、もしくは5、またはそれ以上の標的配列に向けられるA7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKBのsiRNAが含まれる。A7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKB標的配列とは、A7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKB遺伝子の一部と同一であるヌクレオチド配列を意味する。

【0194】

標的配列は、ヒトA7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKB遺伝子の5'非翻訳(UT)領域、オープンリーディングフレーム(ORF)、または3'非翻訳領域を含んでもよい。標的mRNAにハイブリダイズするA7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKBのsiRNAは、通常一本鎖であるmRNA転写産物と会合し、それによって翻訳、ひいてはタンパク質の発現を干渉することにより、A7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKB遺伝子によってコードされるA7

10

20

30

40

50

322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKBポリペプチド産物の產生を減少または阻害する。したがって、本発明のsiRNA分子は、A7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKB遺伝子に由来するmRNAまたはcDNAにストリングエントな条件下で特異的にハイブリダイズする能力によって定義することができる。

【 0 1 9 5 】

標的細胞におけるA7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKBに対応する転写産物へのsiRNAの結合によって、細胞によるタンパク質產生の減少が起こる。オリゴヌクレオチドの長さは少なくとも10ヌクレオチドであり、天然に存在する転写産物と同じ長さであってもよい。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、100、75、50、25ヌクレオチド長未満である。より好ましくは、オリゴヌクレオチドは19～25ヌクレオチド長である。癌細胞の増殖を阻害するA7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKBのsiRNAオリゴヌクレオチドの例には、A7322に対してSEQ ID NO : 34もしくは35、F3374V1に対してSEQ ID NO : 37、38、もしくは67、PBK / TOPKに対してSEQ ID NO : 39もしくは40、またはAURKBに対してSEQ ID NO : 68を含む標的配列が含まれる。

【 0 1 9 6 】

さらに、siRNAの阻害活性を増大させるために、標的配列のアンチセンス鎖の3'末端にヌクレオチド「u」を付加することができる。付加される「u」の数は、少なくとも2個、一般に2～10個、好ましくは2～5個である。付加された「u」は、siRNAのアンチセンス鎖の3'末端で一本鎖を形成する。

【 0 1 9 7 】

A7322、F3374V1、TBP/TOPK、またはAURKBのsiRNAは、mRNA転写産物と結合可能な形態で、細胞に直接導入してもよい。これらの態様において、本発明のsiRNA分子は典型的には、アンチセンス分子に関して上述したように修飾される。その他の修飾も可能であり、例えば、コレステロールと結合させたsiRNAは、改良された薬理学的特性を示す (Song et al. Nature Med. 9:347-51 (2003))。または、A7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKBのsiRNAをコードするDNAをベクター内に含めてもよい。

【 0 1 9 8 】

ベクターは、例えば、A7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKB標的配列を、A7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKB配列に隣接する機能的に連結された調節配列を有する発現ベクター中に、(DNA分子の転写により)両鎖の発現が可能になるような様式でクローニングすることによって作製される (Lee, N.S. et al., (2002) Nature Biotechnology 20 :500-5)。A7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKBのmRNAに対するアンチセンスであるRNA分子を第1のプロモーター(例えば、クローニングされたDNAの3'側にあるプロモーター配列)によって転写させ、A7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKBのmRNAに対するセンス鎖であるRNA分子を第2のプロモーター(例えば、クローニングされたDNAの5'側にあるプロモーター配列)によって転写させる。センス鎖およびアンチセンス鎖をインビボでハイブリダイズさせて、A7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKB遺伝子のサイレンシングのためのsiRNA構築物を生成する。あるいは、2つの構築物を利用してsiRNA構築物のセンス鎖およびアンチセンス鎖を作製してもよい。クローニングされたA7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKBは、二次構造(例えば、ヘアピン)を有する構築物をコードすることができる。この場合、1つの転写産物が、標的遺伝子からのセンス配列と相補的なアンチセンス配列の両方を有する。

【 0 1 9 9 】

さらに、ヘアピンループ構造を形成するために、任意のヌクレオチド配列からなるループ配列をセンス配列とアンチセンス配列の間に配置することができる。したがって、本発明は、一般式5'-[A]-[B]-[A']-3'(式中、[A]はSEQ ID NO : 34、35、37、38、39、40、67、または68のヌクレオチドの配列に対応するリボヌクレオチド配列であり、[B]は3～23ヌクレオチドからなるリボヌクレオチド配列であり、[A']は[A]の相補的配列からなるリボヌクレオチド配列である)を有するsiRNAも提供する。ループ配列は、好ましくは、3～23ヌクレオチド長を有する任意の配列からなってよい。ループ配列は、例えば、以下の配

列からなる群より選択することができる（ワールドワイドウェブ上のambion.com/techlib/tb/tb_506.html）。本発明のsiRNAにおいて、siRNAの阻害活性を増大させるために、[A']の3'末端にヌクレオチド「u」を付加することができる。付加される「u」の数は少なくとも2個であり、一般的に2~10個であり、好ましくは2~5個である。さらに、23ヌクレオチドからなるループ配列もまた、活性siRNAを提供する(Jacque JM, et al., Nature 418: 435-8 (2002))：

CCC、CCACC、またはCCACACC : Jacque JM et al., Nature, Vol. 418: 435-8 (2002)
;
UUCG : Lee, NS. et al., Nature Biotechnology 20 : 500-5; Fruscoloni P., et al.
. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(4): 1639-44 (2003) ; および 10
UUCAAGAGA : Dykxhoorn DM et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology 4: 457
-67 (2003)。

【 0 2 0 0 】

本発明のヘアピン構造を有する好ましいsiRNAの例を、以下に示す。以下の構造では、ループ配列を、CCC、UUCG、CCACC、およびUUCAAGAGAからなる群より選択することができる。好ましいループ配列はUUCAAGAGA (DNAでは「ttcaagaga」) である。

aagaaagcaucgcagucucag-[B]-cugagacugcgaugcuuu (SEQ ID NO : 34の標的配列に対して)
)

aagaugcguucucugccacac-[B]-guguggcagagaacgcaucuu (SEQ ID NO : 35の標的配列に対して)
)

gaucaugucuccgagaaaa-[B]-uuuucucggagacaugauc (SEQ ID NO : 37の標的配列に対して)

ggaaggccauagaauugcuc-[B]-gagcaauucuauggcuucc (SEQ ID NO : 38の標的配列に対して)

cuggaugaaucauaccaga-[B]-ucugguaugauucauccag (SEQ ID NO : 39の標的配列に対して)

guguggcuugcguaaauaa-[B]-uuauuuacgcaagccacac (SEQ ID NO : 40の標的配列に対して)

acuccuacguucucuauua-[B]-uaauagagaacguaggagu (SEQ ID NO : 67の標的配列に対して)

aaggugauggagaauagcagu-[B]-acugcuauucuccaucaccuu (SEQ ID NO : 68の標的配列に対して)
)

【 0 2 0 1 】

A7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKB配列に隣接する調節配列は、それらの発現を独立して調節できるように、または時間的もしくは空間的に調節できるように、同一であるかまたは異なる。例えば核内低分子RNA (snRNA) U6またはヒトH1 RNAプロモーター由来のRNAポリメラーゼIII転写単位を含むベクターにA7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKB遺伝子鑄型をクローニングすることによって、siRNAが細胞内で転写される。ベクターを細胞内に導入するために、トランスフェクション促進剤を使用することができる。FuGENE6 (Roche Diagnostics)、リポフェクトアミン2000 (Invitrogen)、Oligofectamine (Invitrogen)、およびNucleofector (Wako pure Chemical) がトランスフェクション促進剤として有用である。 30

【 0 2 0 2 】

siRNAのヌクレオチド配列は、ワールドワイドウェブ上のambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.htmlにあるAmbionウェブサイトから入手可能なsiRNA設計用コンピュータプログラムを用いて設計することができる。siRNAのヌクレオチド配列は、以下のプロトコールを元にコンピュータプログラムによって選択される。 40

【 0 2 0 3 】

siRNA標的部位の選択：

- 対象となる転写物のAUG開始コドンから始めて、AAジヌクレオチド配列を求めて下流にスキヤンする。潜在的なsiRNA標的部位として、個々のAAおよび3'側に隣接する19ヌクレオチドの出現を記録する。Tuschlら、Genes Dev 13(24): 3191-7 (1999) は、5'および3'非翻訳領域 (UTR) および開始コドン近傍 (75塩基以内) の領域が、調節タンパク質結合部位においてより豊富である可能性があることから、これらに対してsiRNAを設計することを推奨していない。UTR結合タンパク質および/または翻訳開始複合体は、siRNAエン

10

20

30

40

50

ドヌクレアーゼ複合体の結合を妨げる可能性がある。

2. 潜在的な標的部位をヒトゲノムデータベースと比較し、他のコード配列に対して有意な相同性を持ついかなる標的配列も検討対象から除く。相同性検索は、BLAST (Altschul SF, et al., J Mol Biol. 1990;215:403-10; Altschul SF, et al., Nucleic Acids Res. 1997;25:3389-402) を用いて実行することができるが、これは、ワールドワイドウェブ上のncbi.nlm.nih.gov/BLAST/にあるNCBIサーバにおいて見いだされる。

3. 合成に適した標的配列を選択する。Ambionでは、好ましくは、評価する遺伝子の長さに沿っていくつかの標的配列を選択することができる。

【0204】

オリゴヌクレオチドおよびA7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKBのmRNAの様々な部分に相補的なオリゴヌクレオチドを、標準的な方法に従い、腫瘍細胞内でのA7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKBの産生を減少させる能力についてインピトロで試験した（例えば、乳癌細胞株として、A7322に対してBT-549およびBT-474、F3374に対してD47TおよびHBC4、PBK / TOPKに対してT47DおよびBT-20を用いる）。候補組成物の非存在下で培養した細胞と比較して、候補siRNA組成物を接触させた細胞内でのA7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKB遺伝子産生の減少は、A7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKB特異的抗体を用いて、または他の検出法で検出することができる。インピトロの細胞ベースアッセイ法または無細胞アッセイ法でA7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKBの産生を減少させる配列は、引き続き細胞増殖に対する阻害作用に関して試験することができる。悪性新生物を有する動物におけるA7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKB産生の減少および腫瘍細胞増殖の低下を確かめるために、インピトロ細胞ベースアッセイにおいて細胞増殖を阻害する配列をラットまたはマウスにおいてインピボで試験する。

10

20

30

【0205】

同様に、標的配列の核酸配列、例えば、SEQ ID NO : 34、35、37、38、38、39、67、または68のヌクレオチドを含む二本鎖分子も、本発明に含まれる。本発明において、二本鎖分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含む、ここで、センス鎖はSEQ ID NO : 34、35、37、38、38、39、67、または68に対応するリボヌクレオチド配列を含み、アンチセンス鎖は該センス鎖に相補的なリボヌクレオチド配列を含み、該センス鎖および該アンチセンス鎖は互いにハイブリダイズして該二本鎖分子を形成し、かつ、該二本鎖分子はA7322、F3374V1、またはAURKB遺伝子を発現する細胞に導入されると該遺伝子の発現を阻害する。

30

【0206】

本発明において、単離された核酸がRNAまたはその誘導体である場合、ヌクレオチド配列内の塩基「t」は「u」に置換されなければならない。本明細書において使用される「相補的な」という用語は、核酸分子のヌクレオチド単位間のワトソン-クリック型またはフーゲスティーン型の塩基対形成を指し、「結合」という用語は、2つのポリペプチド間もしくは化合物間、または会合したポリペプチド間もしくは化合物間、またはそれらの組み合わせの間の物理的または化学的な相互作用を意味する。ポリヌクレオチドが、改変されたヌクレオチドおよび/または非ホスホジエステル架橋を含む場合、これらのポリヌクレオチドは、同じ様式で互いに結合する場合もある。

40

【0207】

相補的な核酸配列は、適切な条件下でハイブリダイズして、ミスマッチをほとんどまたは全く含まない安定な二重鎖を形成する。さらに、本発明の単離されたヌクレオチドのセンス鎖およびアンチセンス鎖は、ハイブリダイゼーションによって二本鎖ヌクレオチドまたはヘアピンループ構造を形成することができる。好ましい態様において、このような二重鎖は10マッチあたり1以下のミスマッチを含む。特に好ましい態様において、二重鎖の鎖が完全に相補的な場合、このような二重鎖はミスマッチを含まない。

【0208】

例えば、核酸分子は、500ヌクレオチド長未満、100ヌクレオチド長未満、200ヌクレオチド長未満、または75ヌクレオチド長未満である。また、本明細書に記載の核酸の1つまたは複数を含むベクター、およびベクターを含む細胞も、本発明に含まれる。本発明の单

50

離された核酸は、A7322もしくはF3374V1に対するsiRNAまたは該siRNAをコードするDNAに関して有用である。核酸がsiRNAまたはそのコードDNAのために用いられる場合、センス鎖は、好ましくは19ヌクレオチドより長く、より好ましくは21ヌクレオチドより長い。

【 0 2 0 9 】

本発明の二本鎖分子は、1つまたは複数の修飾ヌクレオチドおよび／または非ホスホジエステル性結合を含んでもよい。当技術分野で周知の化学修飾は、二本鎖分子の安定性、利用能、および／または細胞取り込みを高めることができる。当業者は、本分子に組み入れることのできる他のタイプの化学修飾も承知しているであろう (WO03/070744号；WO2005/045037号)。1つの態様において、修飾は、分解に対する抵抗性の改善または取り込みの改善を与えるために用いることができる。このような修飾の例には、ホスホロチオエート結合、2'-O-メチルリボヌクレオチド(特に二本鎖分子のセンス鎖上)、2'-デオキシフルオロリボヌクレオチド、2'-デオキシリボヌクレオチド、「ユニバーサル塩基(universal base)」ヌクレオチド、5'-C-メチルヌクレオチド、および逆方向デオキシ脱塩基残基組み入れ (inverted deoxyabasic residue incorporation) (US20060122137号) が含まれる。

【 0 2 1 0 】

もう1つの態様において、修飾は、二本鎖分子の安定性を向上させるため、またはそのターゲティング効率を高めるために用いることができる。修飾には、二本鎖分子の2つの相補鎖間の化学的架橋、二本鎖分子の1つの鎖の3'または5'末端の化学修飾、糖修飾、核酸塩基修飾および／または骨格修飾、2-フルオロ修飾されたリボヌクレオチドおよび2'-デオキシリボヌクレオチド (WO2004/029212号) が含まれる。もう1つの態様において、修飾は、標的mRNA中および／または相補的二本鎖分子鎖中の相補的ヌクレオチドに対する親和性を高めるかまたは低下させるために用いることができる (WO2005/044976号)。例えば、修飾されていないピリミジンヌクレオチドを2-チオ、5-アルキニル、5-メチル、または5-プロピニルピリミジンによって置換することができる。加えて、修飾されていないプリンを7-デザ (deza)、7-アルキル、または7-アルケニルプリンによって置換することができる。もう1つの態様において、二本鎖分子が3'突出を有する二本鎖分子である場合には、3'末端ヌクレオチド突出性ヌクレオチドをデオキシリボヌクレオチドによって置き換えることができる (Elbashir SM et al., Genes Dev 2001 Jan 15, 15(2): 188-200)。より詳細については、US20060234970号などの公開文書から入手することができる。本発明はこれらの例には限定されず、結果として得られる分子が標的遺伝子の発現を阻害する能力を保持している限り、任意の公知の化学修飾を本発明の二本鎖分子に対して用いることができる。

【 0 2 1 1 】

さらに、本発明の二本鎖分子は、DNAおよびRNAの両方、例えばdsD/R-NAまたはshD/R-NAを含んでもよい。具体的には、DNA鎖とRNA鎖とのハイブリッド型ポリヌクレオチドまたはDNA-RNAキメラ型ポリヌクレオチドは安定性の増大を示す。DNAとRNAの混合、すなわちDNA鎖(ポリヌクレオチド)およびRNA鎖(ポリヌクレオチド)からなるハイブリッド型二本鎖分子、一本鎖(ポリヌクレオチド)のいずれかまたは両方にDNAおよびRNA両方を含むキメラ型二本鎖分子などを、二本鎖分子の安定性を向上させるために形成させることもできる。DNA鎖とRNA鎖とのハイブリッドは、標的遺伝子を発現する細胞に導入された場合にその遺伝子の発現を阻害する活性を有する限り、センス鎖がDNAであってアンチセンス鎖がRNAであることのいずれかまたはその反対であるハイブリッドであってよい。好ましくは、センス鎖ポリヌクレオチドはDNAであり、アンチセンス鎖ポリヌクレオチドはRNAである。また、キメラ型二本鎖分子も、標的遺伝子を発現する細胞に導入された場合にその遺伝子の発現を阻害する活性を有する限り、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方がDNAおよびRNAで構成されるもの、またはセンス鎖およびアンチセンス鎖の一方がDNAおよびRNAで構成されるもののいずれかであってよい。

【 0 2 1 2 】

二本鎖分子の安定性を向上させるためには、分子はできるだけ多くのDNAを含むことが

10

20

30

40

50

好ましいが、一方、標的遺伝子の発現の阻害を誘導するためには、分子は発現の十分な阻害を誘導する範囲内でRNAであることが求められる。キメラ型二本鎖分子の好ましい一例としては、二本鎖分子の上流部分領域（すなわち、センス鎖またはアンチセンス鎖の内部の標的配列またはその相補配列に隣接する領域）はRNAである。好ましくは、上流部分領域とは、センス鎖の5'側（5'末端）およびアンチセンス鎖の3'側（3'末端）のことを表す。すなわち、好ましい態様において、アンチセンス鎖の3'末端に隣接する領域、またはセンス鎖の5'末端に隣接する領域およびアンチセンス鎖の3'末端に隣接する領域の両方は、RNAからなる。例えば、本発明のキメラ型またはハイブリッド型の二本鎖分子は、以下の組み合わせを含む。

センス鎖 : 5' - [DNA] - 3'

3' - (RNA) - [DNA] - 5' : アンチセンス鎖、

センス鎖 : 5' - (RNA) - [DNA] - 3'

3' - (RNA) - [DNA] - 5' : アンチセンス鎖、および

センス鎖 : 5' - (RNA) - [DNA] - 3'

3' - (RNA) - 5' : アンチセンス鎖。

【 0 2 1 3 】

上流部分領域は、好ましくは、二本鎖分子のセンス鎖またはアンチセンス鎖の内部の標的配列またはそれに対する相補配列の末端から数えて9~13ヌクレオチドからなるドメインである。さらに、上記キメラ型二本鎖分子の好ましい例には、鎖の長さが19~21ヌクレオチドであって、ポリヌクレオチドの少なくとも上流半分の領域（センス鎖では5'側領域、アンチセンス鎖では3'側領域）がRNAであり、残りの半分がDNAであるものが含まれる。このようなキメラ型二本鎖分子において、標的遺伝子の発現を阻害する効果は、アンチセンス鎖全体がRNAである場合にはるかに高くなる（US20050004064号）。

【 0 2 1 4 】

本発明において、二本鎖分子が、短鎖ヘアピンRNA（shRNA）、ならびにDNAおよびRNAからなる短鎖ヘアピン（shD / R-NA）といったヘアピンを形成してもよい。shRNAまたはshD / R-NAは、RNA干渉を介した遺伝子発現のサイレンシングのために用いることが可能な、堅固なヘアピントーンを生じるRNAまたはRNAとDNAの混合物の配列である。shRNAまたはshD / R-NAは、一つの一本鎖上にセンス標的配列およびアンチセンス標的配列を含み、これらの配列はループ配列によって隔たれている。一般に、ヘアピン構造は細胞機構によって切断されてdsRNAまたはdsD / R-NAとなり、それが続いてRNA誘導サイレンシング複合体（RISC）と結合する。この複合体は、dsRNAまたはdsD / R-NAの標的配列に合致するmRNAと結合してそれを切断する。

【 0 2 1 5 】

乳癌の診断

本発明の阻害性ポリヌクレオチド（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNA）は、本発明のポリペプチドの発現を阻害し、そのため本発明のポリペプチドの生物活性を抑制するために有用である。また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAを含む発現インヒビターは、本発明のポリペプチドの生物活性を阻害するためにも有用である。このため、1つまたは複数の本発明の阻害性ポリヌクレオチド（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNA）を含む組成物は、乳癌の治療において有用である。さらに、本発明は、本発明のポリペプチドの発現レベルを予後予測用および/または診断用マーカーとして用いて乳癌の予後予測、診断、検出、または検査を得るための方法も提供する。

【 0 2 1 6 】

本発明の診断方法は以下の段階を含む：

(a) 本発明のA7322遺伝子またはF3374V1遺伝子の発現レベルを検出する段階；および

(b) A7322および/またはF3374V1の発現（例えば、転写および/または翻訳）レベルの上昇を、乳癌の診断または予後予測と相關づける段階。

【 0 2 1 7 】

10

20

30

40

50

特定の検体におけるA7322遺伝子またはF3374V1遺伝子の発現レベルは、A7322遺伝子またはF3374V1遺伝子に対応するmRNAまたはそれによってコードされるタンパク質を定量することによって評価することができる。mRNAのための定量方法は当業者に公知である。例えば、A7322遺伝子またはF3374V1遺伝子に対応するmRNAのレベルは、ノーザンプロット法またはRT-PCR（例えば、定量的またはリアルタイムPCRを使用する）によって評価することができる。A7322遺伝子またはF3374V1遺伝子の完全長ヌクレオチド配列はSEQ ID NO:79または81に示されているため、当業者は皆、A7322遺伝子またはF3374V1遺伝子を定量するためのプローブまたはプライマーのヌクレオチド配列を設計することができる。

【0218】

また、A7322遺伝子またはF3374V1遺伝子の発現レベルを、その遺伝子によってコードされるタンパク質の活性または量に基づいて分析することもできる。A7322タンパク質またはF3374V1タンパク質の量を決定するための方法を以下に示す。例えば、イムノアッセイ法は、生物材料中のタンパク質の決定のために有用である。タンパク質またはその活性の決定のためには任意の生物材料を用いることができる。例えば、血清マーカーによってコードされるタンパク質の評価のためには血液試料を分析するとよい。一方、A7322遺伝子またはF3374V1遺伝子によってコードされるタンパク質の活性の決定のためには、分析しようとする各タンパク質の活性に従って、適した方法を選択することができる。

10

【0219】

A7322遺伝子またはF3374V1遺伝子の発現レベルをその翻訳産物に基づいて検出するためのもう1つの方法として、A7322タンパク質またはF3374V1タンパク質に対する抗体を用いる免疫組織化学分析を介して染色の強度を観察することもできる。すなわち、強い染色の観察所見は、A7322タンパク質またはF3374V1タンパク質の存在量の増加を示すと同時に、A7322遺伝子またはF3374V1遺伝子の高い発現レベルも示す。乳癌組織は好ましくは、免疫組織化学分析のための被験材料として用いることができる。

20

【0220】

本発明の方法によれば、検体（被験試料）におけるA7322遺伝子またはF3374V1遺伝子の発現レベルを評価して、正常試料におけるものと比較する。この比較によって標的遺伝子の発現レベルが正常試料の発現レベルよりも高いことが示されれば、その対象は乳癌に罹患していると判断される。正常試料および対象からの検体におけるA7322遺伝子またはF3374V1遺伝子の発現レベルを同時に決定してもよい。あるいは、発現レベルの正常範囲を、対照群から以前に収集した検体を分析することによって得られた結果に基づく統計学的方法によって決定することができる。対象の試料から得られた結果を正常範囲と比較する；その結果が正常範囲に収まらなければ、対象は乳癌に罹患していると判断される。また、検体（被験試料）におけるA7322遺伝子またはF3374V1遺伝子の発現レベルを、1つまたは複数の乳癌試料における発現レベルと比較することもできる。乳癌試料は、乳癌の種々の病期を代表するものであってよい。上記比較によって標的遺伝子の発現レベルが乳癌試料の発現レベルとほぼ等しいことが示されれば、対象は乳癌に罹患していると判断される。また、種々の病期にある乳癌試料との比較により、被験試料における疾患の進展度に関する予後予測および／または診断も可能になる。

30

【0221】

本発明によれば、対象の病状を診察するための中間的な結果を得ることができる。このような中間的な結果を付加的な情報と組み合わせて、医師、看護師、または他の従事者が、対象が本疾患に罹患していることを診断するのを補助することができる。あるいは、本発明を、対象由来の組織中の癌性細胞を検出し、対象が本疾患に罹患していることを診断するための有用な情報を医師に提供するために用いることもできる。

40

【0222】

本発明では、乳癌を診断するための診断薬も提供される。本発明の診断薬は、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドと結合する化合物を含む。好ましくは、本発明のポリヌクレオチドとハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、または本発明のポリペプチドと結合する抗体もしくは非抗体性結合タンパク質を、当該化合物として用いることができ

50

る。

【0223】

例えば、A7322遺伝子またはF337V14遺伝子のスクレオチド配列から選択される少なくとも15個の連続したスクレオチド塩基、またはその相補物を含むオリゴスクレオチドを、本発明の好ましい診断薬として用いることができる。このようなオリゴスクレオチドは、A7322遺伝子またはF3374V1遺伝子の単離または検出のためのプローブとして有用である。あるいは、A7322遺伝子またはF3374V1遺伝子によってコードされるポリペプチドを特異的に認識する抗体または非抗体性結合タンパク質も、本発明の診断薬として有用である。

【0224】

乳癌の治療のモニタリング

10

A7322遺伝子またはF3374V1遺伝子の発現レベルは、乳癌の治療の経過をモニターすることも可能にする。この方法では、乳癌に対する治療を受けていた対象から被験細胞集団を得る。必要に応じて、被験細胞集団を、対象から、治療前、治療中、および／または治療後の様々な時点で入手する。続いて、細胞集団におけるA7322遺伝子またはF3374V1遺伝子のうち1つまたは複数の発現を決定し、乳癌の状態が判明している細胞を含む参照細胞集団と比較する。本発明の文脈において、参照細胞は関心の対象の治療を受けているべきではない。

【0225】

参照細胞集団が乳癌細胞を含まない場合には、被験細胞集団および参照細胞集団におけるA7322遺伝子またはF3374V1遺伝子のうち1つまたは複数の発現に類似性があることにより、関心対象の治療が有効であることが示される。しかしながら、被験集団および正常対照参照細胞集団においてこれらの遺伝子の発現に差があることは、臨床成績（clinical outcome）または予後があまり好ましくないことを示す。同様に、参照細胞集団が乳癌細胞を含む場合には、被験細胞集団および参照細胞集団における本発明の遺伝子の1つまたは複数の発現間に差があることは、関心対象の治療が有効であることを示すが、被験集団および参照細胞集団における上記遺伝子の発現に類似性があることは、臨床成績または予後があまり好ましくないことを示す。

20

【0226】

さらに、治療後に入手した対象由来の生物試料において決定された本発明の遺伝子の発現レベル（すなわち、治療後レベル）を、治療開始前に入手した対象由来の生物試料において決定されたA7322遺伝子またはF3374V1遺伝子のうち1つまたは複数の発現レベル（すなわち、治療前レベル）と比較することもできる。治療後試料における発現レベルの低下によって関心対象の治療が有効であることが示され、一方、治療後試料における発現レベルが上昇するかまたは維持されていることにより、臨床成績または予後があまり好ましくないことが示される。

30

【0227】

本明細書で用いる場合、「有効な」という用語は、治療が、対象における、病的に上方制御された遺伝子の発現低下、病的に下方制御された遺伝子の発現増大、または乳癌（例えば乳管癌）のサイズ、波及度もしくは転移能の低下をもたらすことを示している。関心対象の治療が予防的に適用される場合、「有効な」という用語は、治療が乳房腫瘍の形成を遅延もしくは予防すること、または臨床的な乳癌の症状を遅延、予防もしくは軽減することを意味する。乳房腫瘍の評価は、標準的な臨床的プロトコールを用いて行うことができる。

40

【0228】

さらに、有効性を、乳癌の診断または治療のための任意の公知の方法に関連して判定することもできる。例えば、乳癌を、症候性異常、例えば、体重減少、腹痛、背部痛、食欲不振、恶心、嘔吐および全身倦怠感、脱力、ならびに黄疸を特定することによって診断することができる。

【0229】

スクリーニング方法

50

(1) スクリーニング用の被験化合物

本発明の文脈において、本スクリーニング方法を通じて同定される作用物質は、任意の化合物、または複数の化合物を含む組成物であってよい。さらに、本発明のスクリーニング方法に従って細胞またはタンパク質に対して曝露される被験作用物質は、単一の化合物または化合物の組み合わせであってよい。化合物の組み合わせを本方法において用いる場合には、化合物を逐次的に接触させることも同時に接触させることもできる。

【0230】

任意の被験作用物質、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、微生物を発酵させた産物、海洋生物からの抽出物、植物抽出物、精製または粗タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成低分子化合物（アンチセンスRNA、siRNA、リボザイムなどの核酸構築物を含む）および天然化合物を、本発明のスクリーニング方法に用いることができる。また、本発明の被験作用物質を、

10

（1）生物学的ライプラリ、

（2）空間的にアドレス指定が可能な（spatially addressable）並列型の固相または液相ライプラリ、

（3）デコンボルーションを要する合成ライプラリ法、

（4）「1ビーズ1化合物（one-bead one-compound）」ライプラリ法、および

（5）アフィニティクロマトグラフィーによる選択を用いる合成ライプラリ法、
を含む、当技術分野で公知のコンビナトリアルライプラリの方法における数多くのアプローチのいずれかを用いて入手することもできる。

20

【0231】

アフィニティクロマトグラフィーによる選択を用いる生物学的ライプラリ法はペプチドライプラリに限定されるが、他の4つのアプローチはペプチド、非ペプチド性オリゴマー、または小分子化合物ライプラリに対して適用してもよい（Lam, Anticancer Drug Des 1997, 12: 145-67）。分子ライプラリの合成法の例は当技術分野において見い出すことができる（DeWitt et al., Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90: 6909-13; Erb et al., Proc Natl Acad Sci USA 1994, 91: 11422-6; Zuckermann et al., J Med Chem 37: 2678-85, 1994; Cho et al., Science 1993, 261: 1303-5; Carell et al., Angew Chem Int Ed Engl 1994, 33: 2059; Carell et al., Angew Chem Int Ed Engl 1994, 33: 2061; Gallop et al., J Med Chem 1994, 37: 1233-51）。化合物のライプラリは、溶液中にある状態（Houghten, Bio / Techniques 1992, 13: 412-21参照）、またはビーズ（Lam, Nature 1991, 354: 82-4）、チップ（Fodor, Nature 1993, 364: 555-6）、細菌（米国特許第5,223,409号）、胞子（米国特許第5,571,698号；第5,403,484号；および第5,223,409号）、プラスミド（Cull et al., Proc Natl Acad Sci USA 1992, 89: 1865-9）もしくはファージ（Scott and Smith, Science 1990, 249: 386-90; Devlin, Science 1990, 249: 404-6; Cwirla et al., Proc Natl Acad Sci USA 1990, 87: 6378-82; Felici, J Mol Biol 1991, 222: 301-10；米国特許出願2002-103360号）の上にある状態で存在し得る。

30

【0232】

本スクリーニング方法のいずれかによってスクリーニングされた化合物の構造の一部が付加、欠失、および／または置換によって変換された化合物は、本発明のスクリーニング方法によって得られる作用物質に含まれる。

40

【0233】

さらに、スクリーニングされた被験作用物質がタンパク質である場合、そのタンパク質をコードするDNAを得るために、タンパク質の全アミノ酸配列を決定して、そのタンパク質をコードする核酸配列を推定することもでき、または得られたタンパク質の部分的なアミノ酸配列を分析して、その配列に基づいてオリゴDNAをプローブとして調製し、そのプローブを用いてcDNAライプラリをスクリーニングすることで、タンパク質をコードするDNAを得ることもできる。得られたDNAは、癌を治療または予防するための候補である被験作用物質の調製において役に立つ。

【0234】

50

本明細書に記載したスクリーニングにおいて有用な被験作用物質は、BCタンパク質、またはパートナーに対して結合する活性もしくは基質をリン酸するかインビボでキナーゼによってリン酸化される活性を欠く部分的BCペプチドと特異的に結合する抗体または非抗体性結合タンパク質であってもよい。このような部分的タンパク質または抗体は、本明細書に記載した方法により調製することができ（「ヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、および宿主細胞」または「抗体」の項を参照）、BCタンパク質のリン酸化、またはタンパク質（例えば、A7322、F3374、またはPBK / TOPK）とその結合パートナーとの結合を阻止するそれらの能力に関して試験することができる。

【0235】

(2) 一般的なスクリーニング方法

10

BCタンパク質と結合する化合物のスクリーニングのためには、免疫沈降において、これらの抗体または非抗体性結合タンパク質を、適切な界面活性剤を用いて調製した細胞溶解物に添加することによって免疫複合体を形成させる。この免疫複合体は、ポリペプチド、そのポリペプチドに対する結合親和性を有するポリペプチド、および抗体または非抗体性結合タンパク質からなる。また、免疫沈降を、上記のエピトープに対する抗体を用いることに加えて、ポリペプチドに対する抗体を用いて行うこともでき、これらの抗体は上記の通りに調製することができる（「抗体」の項を参照）。

【0236】

抗体がマウスのIgG抗体の場合は、免疫複合体を、例えばプロテインAセファロースまたはプロテインGセファロースによって沈殿させることができる。本発明のポリペプチドをGSTなどのエピトープとの融合タンパク質として調製する場合には、これらのエピトープと特異的に結合する基質、例えばグルタチオン-セファロース4Bを用いて、ポリペプチドに対する抗体を用いる時と同じ様式で免疫複合体を形成することができる。

20

【0237】

免疫沈降は、例えば、文献中に記載された方法に倣ってまたは従って行うことができる（Harlow and Lane, Antibodies, 511-52, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York (1988)）。

【0238】

SDS-PAGEは一般に、免疫沈降タンパク質の解析用に使用され、適切な濃度のゲルを用いて、結合状態のタンパク質を、該タンパク質の分子量によって解析することができる。ポリペプチドに結合しているタンパク質は、クーマシー染色または銀染色などの一般的な染色法では検出が難しいため、放射性同位元素である³⁵S-メチオニンまたは³⁵S-システインを含む培地中で細胞を培養し、細胞中のタンパク質を標識して、該タンパク質を検出することにより、タンパク質の検出感度を改善することができる。タンパク質の分子量が明らかであれば、標的タンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲルから直接精製することが可能であり、その配列を決定することができる。

30

【0239】

ポリペプチドを用いる、BCポリペプチドと結合するタンパク質用のスクリーニングのための方法としては、例えば、ウエスト-ウエスタンプロット分析（Skolnik et al., Cell 65: 83-90 (1991)）を用いることができる。具体的には、BCポリペプチドと結合するタンパク質は、細胞、組織、臓器（「ヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、および宿主細胞」の項を参照）、またはBCポリペプチドと結合するタンパク質を発現すると予想される培養細胞からファージベクター（例えば、ZAP）を用いてcDNAライブラリを調製し、タンパク質をLB-アガロース上で発現させ、発現されたタンパク質をフィルター上に固定し、精製および標識されたBCポリペプチドを上記のフィルターと反応させて、BCポリペプチドと結合したタンパク質を発現するブラークを標識に従って検出することによって得ることができる。BCポリペプチドは、ビオチンとアビシンとの結合を利用することによって、またはBCポリペプチドと特異的に結合する抗体、もしくはBCポリペプチドと融合させたペプチドもしくはポリペプチド（例えば、GST）を利用することによって標識することができる。放射性同位体または蛍光などを用いる方法を用いることもできる。

40

50

【 0 2 4 0 】

「標識」および「検出可能な標識」という用語は、本明細書において、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的な手段によって検出可能な任意の組成物を指して用いられる。このような標識には、標識ストレプトアビジン結合物を用いる染色のためのビオチン、磁気ビーズ（例えば、DYNABEADS（商標））、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質など）、放射性標識（例えば、³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³²P）、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、およびELISAに一般に用いられる他の酵素）、ならびにコロイド金または着色ガラスもしくはプラスチック（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）製のビーズなどの比色定量用標識が含まれる。このような標識の使用を教示している特許には、米国特許第3,817,837号；第3,850,752号；第3,939,350号；第3,996,345号；第4,275,149号；および第4,366,241号が含まれる。このような標識を検出する手段は当業者に周知である。したがって、例えば、放射性標識は写真フィルムまたはシンチレーション検出器を用いて検出することができ、蛍光マーカーは放射光を検出するための光検出器を用いて検出することができる。酵素標識は典型的には、酵素に基質を与えて、基質に対する酵素の作用によって生成される反応産物を検出することによって検出され、比色定量標識は、着色された標識を単に可視化することによって検出される。10

【 0 2 4 1 】

または、本発明のスクリーニング法の別の態様において、細胞を利用する2-ハイブリッド系を用いることもできる（「MATCHMAKER 2-ハイブリッド系」「哺乳動物MATCHMAKER 2-ハイブリッドアッセイキット」「MATCHMAKER 1-ハイブリッド系」（Clontech）；「HybriZAP 2-ハイブリッドベクター系」（Stratagene）；参考文献 “Dalton and Treisman, Cell 68: 597-612 (1992)”，“Fields and Sternblitz, Trends Genet 10: 286-92 (1994)”）。20

【 0 2 4 2 】

2-ハイブリッド系では、本発明のポリペプチドをSRF結合領域またはGAL4結合領域と融合させて、酵母細胞で発現させる。発現した場合にライプラリがVP16またはGAL4転写活性化領域と融合するように、本発明のポリペプチドと結合するタンパク質を発現すると予想される細胞から、cDNAライプラリを調製する。続いてcDNAライプラリを上記の酵母細胞に導入し、検出された陽性クローニングから、ライプラリ由来のcDNAを単離する（本発明のポリペプチドと結合するタンパク質を酵母細胞で発現させる場合には、この2つの結合によってレポーター遺伝子が活性化され、陽性クローニングが検出可能になる）。cDNAにコードされるタンパク質は、上記のように単離されたcDNAを大腸菌に導入し、該タンパク質を発現させることで調製できる。30

【 0 2 4 3 】

レポーター遺伝子としては、HIS3遺伝子のほかに、例えば、Ade2遺伝子、lacZ遺伝子、CAT遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子などを用いることができる。

【 0 2 4 4 】

BCポリペプチドと結合する化合物は、アフィニティクロマトグラフィーを用いてスクリーニングすることもできる。例えば、BCポリペプチドをアフィニティカラムの担体上に固定化でき、次に、BCポリペプチドと結合できるタンパク質を含む被験化合物をカラムに適用する。本明細書における被験化合物には例えば、細胞抽出物や細胞溶解物などがある。被験化合物を添加後に、カラムを洗浄し、BCポリペプチドと結合した化合物を調製することができる。40

【 0 2 4 5 】

被験化合物がタンパク質の場合は、得られたタンパク質のアミノ酸配列を解析し、該配列を元にオリゴDNAを合成し、その後、オリゴDNAをプローブとして用いてcDNAライプラリをスクリーニングして、該タンパク質をコードするDNAを得る。

【 0 2 4 6 】

表面プラズモン共鳴現象を利用するバイオセンサーを、本発明における結合状態の化合物を検出または定量する手段として使用することができる。このようなバイオセンサーを用いると、標識を行うことなく、ごく微量のポリペプチドのみを用いて、BCポリペプチドと被験化合物との相互作用を表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムで観察することができる（例えば、BIAcore、Pharmacia）。このため、BIAcoreなどのバイオセンサーを用いて、BCポリペプチドと被験化合物との結合を評価することが可能である。

【0247】

BCタンパク質（例えば、A7322、F3374、またはPBK / TOPK）とその結合パートナーとの間の結合を阻害する化合物のためのスクリーニング方法としては、当業者に周知の多くの方法を用いることができる。例えば、スクリーニングを細胞系などのインビトロアッセイ系として行うことができる。より詳細には、まず、BCタンパク質またはその結合パートナーのいずれかを支持体に対して結合させ、それに対して、もう一方のタンパク質を被験化合物とともに添加する。次に、この混合物をインキュベートし、洗浄した上で、支持体と結合したもう一方のタンパク質を検出および／または測定する。

10

【0248】

本発明の文脈において、2つのタンパク質間の「結合の阻害」とは、タンパク質間の結合を少なくとも減少させることを指す。したがって、場合によっては、被験作用物質の存在下における試料中の結合対のパーセンテージは、適切な（例えば、被験化合物で処理されていない、または非癌試料もしくは癌試料由来の）対照と比較して、減少していると考えられる。結合しているタンパク質の量の減少は、対照試料中の結合した対よりも、例えば、90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、25%未満、10%未満、5%未満、1%未満、またはそれ未満（例えば、0%）であってよい。

20

【0249】

タンパク質を結合させるために用い得る支持体の例には、例えば、アガロース、セルロース、およびデキストランなどの不溶性多糖類；ならびにポリアクリルアミド、ポリスチレン、およびシリコンなどの合成樹脂が含まれ、以上の材料から作製された市販のビーズおよびプレート（例えば、マルチウェルプレート、バイオセンサーチップ等）を用いることが好ましい。ビーズを用いる場合には、それらをカラムに充填してもよい。あるいは、磁気ビーズの使用も当技術分野で公知であり、これはビーズに結合したタンパク質を磁気によって容易に単離することを可能にする。

30

【0250】

支持体に対するタンパク質の結合は、例えば化学的結合および物理的吸着などの規定の方法に従って行ってもよい。あるいは、タンパク質を特異的に認識する抗体を介してタンパク質を支持体に結合させててもよい。さらに、タンパク質の支持体に対する結合を、アビジンおよびビオチンを用いて行わせることもできる。

【0251】

タンパク質だけでなくそのタンパク質と結合する化合物（アゴニストおよびアンタゴニストを含む）も単離するための、固定化されたポリペプチドを合成化合物または天然物質バンクまたはランダムファージペプチドディスプレイライブラリに曝露させた場合に結合する分子のためのスクリーニング方法、およびコンビナトリアルケミストリー技術に基づくハイスクループットを用いるスクリーニング方法（Wrighton et al., Science 273: 458-63 (1996) ; Verdine, Nature 384: 11-3 (1996) ）は、当業者に周知である。

40

【0252】

さらに、ポリペプチドまたはその機能的同等物のリン酸化レベルは、当技術分野で公知の任意の方法に従って検出することができる。例えば、被験化合物を、ポリペプチドを発現する細胞と接触させ、その細胞をポリペプチドのリン酸化を可能にするのに十分な時間にわたってインキュベートし、続いて、リン酸化ポリペプチドの量を検出することができる。あるいは、インビトロで被験化合物をポリペプチドと接触させ、ポリペプチドを、ポリペプチドのリン酸化を可能にする条件下でインキュベートし、続いて、リン酸化ポリペプチドの量を検出することができる（「(17) インビトロおよびインビボでのキナーゼア

50

ッセイ」の項を参照)。

【0253】

本発明において、リン酸化に適した条件は、リン酸供与体、例えばATPの存在下での、基質および酵素タンパク質のインキュベーションによって提供され得る。リン酸化に適した条件にはまた、ポリペプチドを発現する細胞の培養における条件も含まれる。例えば、細胞は、BCポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを保有する形質転換細胞である(「ヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、および宿主細胞」の項を参照)。インキュベーションの後に、基質のリン酸化レベルを、例えばリン酸化基質を認識する抗体を用いて、またはATPリン酸供与体によって転移した標識 リン酸を検出することによって検出することができる。リン酸化基質の検出の前に、基質を他の要素、または形質転換細胞の細胞溶解物から分離してもよい。例えば、基質の分離のためにゲル電気泳動を用いてもよい。あるいは、基質に対する抗体を有する担体と接触させることによって基質を捕捉することができる。
10

【0254】

リン酸化タンパク質の検出のためには、SDS-PAGEまたは免疫沈降を用いることができる。さらに、リン酸化残基または転移した標識リン酸を認識する抗体を、リン酸化タンパク質レベルを検出するために用いることもできる。リン酸化ポリペプチドを認識する抗体を用いる任意の免疫学的手法を検出のために用いることができる。リン酸化ポリペプチドを認識する抗体を用いるELISAまたはイムノプロット法を、本発明のために用いることができる。標識されたリン酸供与体を用いる場合には、標識を追跡することを介して、基質のリン酸化レベルを検出することができる。例えば、放射性標識したATP(例えば³²P-ATP)をリン酸供与体として用いることができ、この際、分離された基質の放射能は基質のリン酸化レベルと相関する。あるいは、リン酸化されていない基質の中からリン酸化基質を特異的に認識する抗体を、リン酸化基質の検出のために用いることができる。
20

【0255】

被験化合物と接触させたリン酸化BCポリペプチドの検出量が、被験化合物と接触させずに検出された量と比べて減少しているならば、被験化合物はBCタンパク質のポリペプチドリン酸化を阻害すると判断され、それ故に乳癌抑制能力を有すると判断される。本明細書において、リン酸化レベルは、被験作用物質と接触させていない細胞で検出されるリン酸化レベルと比較して、それが例えば10%、25%、もしくは50%の減少、または少なくとも0.1倍、少なくとも0.2倍、少なくとも1倍、少なくとも2倍、少なくとも5倍、もしくは少なくとも10倍もしくはそれ以上の減少であれば、「減少している」と判断され得る。統計解析のためには、例えば、スチューデントのt検定、Mann-WhitneyのU検定、またはANOVAを用いることができる。
30

【0256】

さらに、ポリペプチドまたはその機能的同等物の発現レベルを、当技術分野で公知の任意の方法に従って検出することもできる。例えば、レポーターアッセイを用いることができる。適したレポーター遺伝子および宿主細胞は当技術分野で周知である。スクリーニングのために必要なレポーター構築物は、BC遺伝子またはその下流遺伝子の転写調節領域を用いることによって調製することができる。遺伝子の転写調節領域が当業者にとって公知である場合には、レポーター構築物を、以前の配列情報を用いることによって調製することができる。転写調節領域が未同定のままである場合には、転写調節領域を含むヌクレオチドセグメントを、遺伝子のヌクレオチド配列情報に基づいてゲノムライブラリから単離することができる。本明細書において、遺伝子の転写調節領域とは、開始コドンから少なくとも500bp上流、好ましくは1000bp、より好ましくは5000または10000bp上流までの領域のことである。転写調節領域を含むヌクレオチドセグメントは、ゲノムライブラリから単離することもでき、またはPCRを用いて増やすこともできる。転写調節領域を同定するための方法およびアッセイプロトコールも周知である(Molecular Cloning third edition chapter 17, 2001, Cold Springs Harbor Laboratory Press)。
40

【0257】

様々なロースループットおよびハイスループットの酵素アッセイ方式が当技術分野で公知であり、BCポリペプチドのリン酸化レベルの検出または測定のために容易に適合化させることができる。ハイスループットアッセイのためには、基質を固体支持体上に便宜上固定化することができる。反応の後に、上記の方法により、固体支持体上にあるリン酸化基質を検出することができる。あるいは、接触段階を溶液中で行って、その後に基質を固体支持体上に固定化し、リン酸化基質を検出することができる。このようなアッセイを容易にするために、固体支持体をストレプトアビシンでコーティングし、基質をビオチンで標識するか、または固体支持体を基質に対する抗体でコーティングすることができる。当業者は、スクリーニングの所望のスループット能力に応じて、適したアッセイ方式を決定することができる。

10

【0258】

本発明のアッセイはまた、ハイスループットスクリーニングを容易にする自動化手順のためにも適している。複数の周知のロボティックシステムが溶液相化学 (solution phase chemistry) のために開発されている。これらのシステムには、Takeda Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) によって開発された自動化合成装置のような自動化ワークステーション、および、化学者によって行われる手作業での合成操作を模したロボットアームを利用する多くのロボティックシステムなどが含まれる (Zymate II, Zymark Corporation, Hopkinton, Mass. ; Orca, Hewlett Packard, Palo Alto, Calif.)。上記デバイスの任意のものが、本発明とともに用いるのに適している。これらのデバイスの性質、および、それらが本明細書で考察したように動作し得るようにする、これらのデバイスに対する変更の実施 (あれば) は、関連技術分野の当業者には明らかであると考えられる。加えて、数多くのコンピナトリアルライブラリがそれ自体でも市販されている (例えば、ComGenex, Princeton, N.J., Asinex, Moscow, RU, Tripos, Inc., St. Louis, MO, ChemStar, Ltd, Moscow, RU, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MD等を参照)。

20

【0259】

(3) A7322またはF3374に対する結合活性を指標として用いるスクリーニング

本発明はさらに、本発明のポリペプチドを用いる乳癌の治療において有用な化合物とのためのスクリーニング方法も提供する。本発明はさらに、本発明のタンパク質に対する結合能力を有する化合物とのためのスクリーニング方法も提供する。このようなスクリーニング方法の1つの態様は、以下の段階を含む：

30

(a) 被験化合物を、以下のもの：

(1) SEQ ID NO : 80または82のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) 1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および / または付加された、SEQ ID NO : 80または82のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO : 80または82のアミノ酸配列からなるタンパク質と同等な生物活性を有する、ポリペプチド；

(3) SEQ ID NO : 80または82のアミノ酸配列を含むポリペプチドと少なくとも90%、93%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO : 80または82のアミノ酸配列のポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド；ならびに

40

(4) SEQ ID NO : 79または81のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリングエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO : 80または82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド

からなる群より選択されるポリペプチドと接触させる段階；

(b) ポリペプチドと被験化合物との間の結合活性を検出する段階；ならびに

(c) ポリペプチドと結合する被験化合物を選択する段階。

【0260】

スクリーニングのために用いられるポリペプチドは、組換えポリペプチド、または天然の源に由来するタンパク質、またはそれらの部分ペプチドであってよい。前述した任意の

50

被験化合物をスクリーニングのために用いることができる。

【0261】

例えば、A7322ポリペプチドまたはF3374V1ポリペプチド（またはそれらの機能的同等物、「スクレオチド、ポリペプチド、ベクター、および宿主細胞」の項を参照）を用いる、ポリペプチドと結合するタンパク質のためのスクリーニングの方法としては、当業者に周知である多くの方法を用いることができる。このようなスクリーニングは、例えば、免疫沈降、ウエスト-ウエスタンプロット分析（Skolnik et al., Cell 65: 83-90 (1991)）、細胞を利用する2-ハイブリッドシステム（「MATCHMAKER Two-Hybrid system」、「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」、「MATCHMAKER one-Hybrid system」（Clontech）；「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」（Stratagene）；参考文献「Dalton and Treisman, Cell 68: 597-612 (1992)」、「Fields and Sternglanz, Trends Genet 10: 286-92 (1994)」）、アフィニティークロマトグラフィー、および表面プラズモン共鳴現象を利用するバイオセンサーを用いて行うことができる（「(2)一般的なスクリーニング方法」の項を参照）。

【0262】

前述した任意の被験化合物を用いることができる（「(1)スクリーニング用の被験化合物」の項を参照）。

【0263】

(4) A7322またはF3374の発現レベルを指標として用いるスクリーニング

または、本発明のスクリーニング方法は、以下の段階を含んでもよい：

20

(a) 候補化合物を、A7322遺伝子またはF3374V1遺伝子の転写調節領域とその転写調節領域の制御下で発現されるレポーター遺伝子とを含むベクターが導入された細胞と接触させる段階；

(b) 前記レポーター遺伝子の発現または活性のレベルを測定する段階；および

(c) 被験化合物の非存在下で検出される前記レポーター遺伝子の発現または活性のレベルに比して前記レポーター遺伝子の発現または活性のレベルを低下させる化合物を選択する段階。

【0264】

適切なレポーター遺伝子および宿主細胞は当技術分野で周知である。スクリーニングに必要なレポーター構築物は、上述した方法によって調製することができる（「(2)一般的なスクリーニング方法」の項を参照）。

30

【0265】

このスクリーニングによって単離された化合物は、A7322ポリペプチドまたはF3374V1ポリペプチドの活性を阻害する薬剤の候補である、これは言い換えると、乳癌を治療または予防するために有用である。A7322ポリペプチドまたはF3374V1ポリペプチドと結合する活性を有する本スクリーニング方法によって得られた化合物の構造の一部が付加、欠失、および／または置換によって変換された化合物は、本発明のスクリーニング方法によって得られる化合物に含まれる。

【0266】

1つのさらなる態様において、本発明は、乳癌の治療における標的となる候補化合物のスクリーニングのための方法を提供する。以上に詳細に考察したように、A7322タンパク質またはF3374V1タンパク質の発現レベルを制御することにより、乳癌の発生および進行を制御することができる。したがって、A7322またはF3374V1の発現レベルおよび活性を指標として用いるスクリーニングにより、乳癌の治療における標的となる候補化合物を同定することができる。本発明の文脈において、そのようなスクリーニングは、例えば、以下の段階を含んでもよい：

40

(a) 候補化合物を、A7322タンパク質またはF3374V1タンパク質を発現する細胞と接触させる段階、および

(b) 被験化合物の非存在下で検出される発現レベルに比してA7322またはF3374V1の発現レベルを低下させる化合物を選択する段階。

50

【0267】

A7322タンパク質またはF3374V1タンパク質のうち少なくとも1つを発現する細胞には、例えば、乳癌から樹立された細胞株が含まれる；そのような細胞は、本発明の上記のスクリーニングに用いることができる。発現レベルは、当業者に周知の方法によって評価することができる。スクリーニングの方法において、A7322またはF3374V1のうち少なくとも1つの発現レベルを低下させる化合物を、候補化合物として選択することができる。

【0268】

本発明の乳癌の治療において有用な化合物のスクリーニングのための方法のもう1つの態様において、本方法は、本発明のポリペプチドの生物活性を指標として利用する。A732タンパク質またはF3374V1タンパク質が細胞増殖を促進する活性を有することから、本発明のこれらのタンパク質のうち1つの活性を阻害する化合物を、この活性を指標として用いてスクリーニングすることができる。10

【0269】

任意のポリペプチドを、それらがA7322タンパク質またはF3374V1タンパク質の生物活性（例えば、それぞれPHB2 / REAまたはAURKBと結合して、細胞増殖を促進する）を含む限り、スクリーニングのために用いることができる。そのような生物活性には、ヒトA7322タンパク質またはF3374V1タンパク質の細胞増殖活性が含まれる。例えば、ヒトA7322タンパク質またはF3374V1タンパク質を用いることができ、これらのタンパク質と機能的に同等なポリペプチドを用いることもできる。そのようなポリペプチドは、細胞によって内在的に発現されてもよく、または外因性に発現されてもよい。20

【0270】

(5) A7322およびPHB2 / REAの結合を指標として用いるスクリーニング

本発明において、A7322タンパク質がPHB / REAタンパク質と相互作用して、PHB2 / REAタンパク質の核移行を阻害することが確かめられた（図10A）。加えて、A7322タンパク質の存在下でのER の再活性化の抑制（図11AとB）も確かめられた。PHB2 / REAは、エストロゲン受容体（ER）の選択的な共同調節因子であることが知られており、エストラジオールをリガンドとするEr の転写活性を抑制する。それ故に、本発明者らは、A7322が、ER とPHB2 / REAとの相互作用の阻害を通じて、ER の転写活性を活性化することを明らかにした（図11C）。したがって、A7322タンパク質とPHB2 / REAとの間の結合を阻害する化合物は、そのようなA7322タンパク質とPHB2 / REAとの結合、PHB2 / REAの細胞局在、またはER の転写活性を指標として用いてスクリーニングすることができる。このため、本発明はまた、そのようなA7322タンパク質とPHB2 / REAとの結合、PHB2 / REAの細胞局在、またはER の転写活性を用いてスクリーニングすることができる、A7322タンパク質とPHB2 / REAとの間の結合を阻害するための化合物をスクリーニングするための方法も提供する。30

さらに、本発明はまた、乳癌を治療または予防するための化合物のスクリーニングのための方法も提供する。本方法は、乳癌の治療または予防に用いる可能性のある作用物質のスクリーニングに特に適している。より具体的には、本方法は以下の段階を含む：

(a) A7322ポリペプチドまたはその機能的同等物を、被験化合物の存在下で、PHB2 / REAポリペプチドまたはその機能的同等物と接触させる段階；

(b) 段階(a)のポリペプチド間の結合を検出する段階；および40

(c) A7322ポリペプチドとPHB2 / REAポリペプチドとの間の結合を阻害する被験化合物を選択する段階。

【0271】

本発明の文脈において、A7322ポリペプチドまたはPHB2 / REAポリペプチドの機能的同等物とは、それぞれA7322ポリペプチド（SEQ ID NO : 79）またはPHB2 / REAポリペプチド（SEQ ID NO : 90）と同等な生物活性を有するポリペプチドのことである（「ヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、および宿主細胞」の項を参照）。

【0272】

A7322とPHB2 / REAとの結合を阻害する化合物に関するスクリーニングの方法としては、当業者に周知である多くの方法を用いることができる。50

【0273】

スクリーニングのために用いられるポリペプチドは、組換えポリペプチド、または天然の供給源に由来するタンパク質、またはそれらの部分ペプチドであってよい。前述した任意の被験化合物をスクリーニングのために用いることができる。

【0274】

例えば、A7322ポリペプチドまたはPHB2 / REAポリペプチド（またはそれらの機能的同等物、「ヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、および宿主細胞」の項を参照）を用いる、ポリペプチドと結合するタンパク質用のスクリーニング方法としては、当業者に周知である多くの方法を用いることができる。そのようなスクリーニングは、例えば、免疫沈降、ウエスト-ウエスタンプロット分析（Skolnik et al., Cell 65: 83-90 (1991)）、細胞を利用する2-ハイブリッドシステム（「MATCHMAKER Two-Hybrid system」、「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」、「MATCHMAKER one-Hybrid system」（Clontech）；「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」（Stratagene）；参考文献「Dalton and Treisman, Cell 68: 597-612 (1992)」、「Fields and Sternglanz, Trends Genet 10: 286-92 (1994)」）、アフィニティクロマトグラフィー、および表面プラズモン共鳴現象を利用するバイオセンサーを用いて行うことができる（「(2)一般的なスクリーニング方法」の項を参照）。

【0275】

前述した任意の被験化合物を用いてもよい（「(1)スクリーニング用の被験化合物」の項を参照）。

【0276】

さらに、本発明は、PHB2 / REAの細胞局在を指標として用いる、A7322とPHB2 / REAとの相互作用を阻害する化合物に関する方法も提供する。より具体的には、本方法は以下の段階を含む：

(a) 候補化合物を、A7322タンパク質およびPHB2 / REAタンパク質を発現する細胞と接触させる段階；

(b) PHB2 / REAタンパク質の細胞内局在を検出する段階；および

(c) 被験化合物の非存在下で検出される前記タンパク質のレベルに比して核内のPHB2 / REAタンパク質のレベルを低下させる化合物を選択する段階。

【0277】

ある態様において、この方法はさらに、候補化合物とA7322もしくはPHB2 / REAとの結合を検出する段階、またはA7322とPHB2 / REAとの結合のレベルを検出する段階を含む。A7322タンパク質およびPHB2 / REAタンパク質を発現する細胞には、例えば、乳癌から樹立された細胞株が含まれ、そのような細胞は、細胞がこれらの2つの遺伝子を発現する限り、本発明の上記のスクリーニングのために用いることができる。または、細胞に対して、A7322およびPHB2 / REAの発現ベクターの両方または一方を、これらの2つの遺伝子を発現するようにトランスフェクトすることもできる。PHB2 / REAタンパク質の細胞内局在は、抗PHB2 / REA抗体を用いる免疫細胞化学染色（「(8)免疫細胞化学染色」の項を参照）、分画法とウエスタンプロット法または同位体もしくは蛍光によるPHB2 / REAタンパク質の標識との組み合わせによって検出することができる（「ヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、および宿主細胞」の項を参照）。

【0278】

もう1つの態様において、本発明は、ER の転写活性を指標として用いる、A7322とPHB2 / REAとの相互作用を阻害する化合物に関する方法も提供する。より具体的には、本方法は以下の段階を含む：

(a) 候補化合物を、A7322タンパク質、PHB2 / REAタンパク質、およびER タンパク質を発現し、かつエストロゲン応答性転写調節領域とその転写調節領域の制御下で発現されるレポーター遺伝子とを含むベクターが導入された細胞と、E2処理下で接触させる段階；

(b) 前記レポーター遺伝子の発現または活性のレベルを測定する段階；ならびに

(c) 被験化合物の非存在下で検出される前記レポーター遺伝子の発現または活性のレ

10

20

30

40

50

ベルに比して前記レポーター遺伝子の発現または活性のレベルを低下させる化合物を選択する段階。

【0279】

A7322タンパク質、PHB2 / REAタンパク質、およびER タンパク質を発現する細胞には、例えば、乳癌から樹立された細胞株が含まれ、そのような細胞は、細胞がこれらの3つの遺伝子を発現する限り、本発明の上記のスクリーニングのために用いることができる。または、細胞に対して、A7322、PHB2 / REA、およびER の発現ベクターのそれぞれまたはいずれかを、これらの3つの遺伝子を発現するようにトランスフェクトしてもよい。適したレポーター遺伝子および宿主細胞は当技術分野で周知である。スクリーニングに必要なレポーター構築物は、以上および以下に記載の方法によって調製することができる（「(2)一般的なスクリーニング方法」および「(19)エストロゲン応答性エレメント(ERE)レポーター遺伝子アッセイ」の項を参照）。

【0280】

(6) F3374V1のリン酸化レベルを指標として用いるスクリーニング

さらに、本発明において、F3374V1タンパク質はC末端領域(591~730アミノ酸)でリン酸化によって修飾されることが確かめられた。したがって、F3374V1タンパク質のリン酸化を阻害する化合物を、そのような修飾を指標として用いてスクリーニングすることができる。このため、本発明はまた、F3374V1タンパク質のリン酸化を阻害する化合物のスクリーニングのための方法も提供する。さらに、本発明はまた、乳癌を治療または予防するための化合物をスクリーニングする方法も提供する。本方法は、乳癌の治療または予防に用いる可能性のある作用物質のスクリーニングに特に適している。より具体的には、本方法は以下の段階を含む：

(a) 以下のもの：

(1) SEQ ID NO:82のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) 1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加された、SEQ ID NO:82のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO:82のアミノ酸配列からなるタンパク質と同等な生物活性を有する、ポリペプチド；

(3) SEQ ID NO:82のアミノ酸配列を含むポリペプチドに対して少なくとも90%、93%、95%、96%、97%、98%、または99%配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO:82のアミノ酸配列のポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド；

(4) SEQ ID NO:81のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件下ハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO:82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド；

からなる群より選択されるポリペプチドを発現する細胞を、被験化合物と接触させる段階；

(b) ポリペプチドのリン酸化レベルを検出する段階；

(c) ポリペプチドのリン酸化レベルを、化合物の非存在下で検出されるポリペプチドのリン酸化レベルと比較する段階；ならびに

(d) ポリペプチドのリン酸化レベルを低下させた化合物を、ポリペプチドのリン酸化のインヒビター、または乳癌を治療もしくは予防するための化合物として選択する段階。

【0281】

本明細書では、F3374V1ポリペプチドまたはその機能的同等物を発現する限り、任意の細胞を用いることができる（「ヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、および宿主細胞」の項を参照）。本スクリーニングに用いられる細胞は、F3374V1ポリペプチドを天然に発現する細胞であってよく、これには例えば、乳癌および精巣由来する細胞、ならびにそれらから樹立された細胞株が含まれる。HBC4、HBC5、HBL100、HCC1937、MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435S、SKBR3、T47D、およびYMB1といった乳癌の細胞株を用いることができる。

【0282】

10

20

30

40

50

または、スクリーニングに用いられる細胞は、F3374V1ポリペプチドを天然には発現せず、F3374V1ポリペプチドまたはF3374V1の機能的同等物を発現するベクターによってトランسفェクトされた細胞であってもよい。そのような組換え細胞は、上述したような公知の遺伝子工学の方法（例えば、Morrison DA., J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.) 1983, 101: 347-62）によって得ることができる（「ヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、および宿主細胞」の項を参照）。

【0283】

前述した被験化合物の任意のものを、本スクリーニングに用いてもよい。しかし、細胞内に浸透可能な化合物を選択することが好ましい。または、被験化合物がポリペプチドである場合には、被験作用物質をコードするヌクレオチド配列を含むベクターを細胞にトランسفェクトして被験作用物質を細胞内で発現させることによって、本スクリーニングにおける細胞と被験作用物質とを接触させることもできる。10

【0284】

もう1つの態様において、F3374V1ポリペプチドまたはその機能的同等物のリン酸化に適した条件をインビトロで提供することができる。このスクリーニング方法は以下の段階を含む：

- (a) 被験化合物を、本発明のポリペプチドまたはその断片（例えばC末端領域（591～730アミノ酸））と接触させる段階；20
- (b) 段階(a)のポリペプチドのリン酸化を検出する段階；および
- (c) 被験化合物の非存在下で検出される生物活性に比してポリペプチドのリン酸化を抑制する化合物を選択する段階。

【0285】

本発明において、上述したように、F3374V1タンパク質の生物活性は好ましくはリン酸化活性である。当業者はリン酸化レベルを上述したように評価することができる（「(2)一般的なスクリーニング方法」の項を参照）。

【0286】

したがって、これらの態様において、本発明は、F3374V1のリン酸化を阻害する、または乳癌を予防もしくは治療するための作用物質をスクリーニングする方法を提供し、本方法は以下の段階を含む：30

- (a) 以下のもの：
 - (1) SEQ ID NO: 82のアミノ酸配列を含むポリペプチド；
 - (2) 1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加された、SEQ ID NO: 82のアミノ酸配列を含みかつSEQ ID NO: 82のアミノ酸配列からなるタンパク質と同等な生物活性を有する、ポリペプチド；
 - (3) SEQ ID NO: 82のアミノ酸配列を含むポリペプチドに対して少なくとも90%、93%、95%、96%、97%、98%、または99%配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO: 82のアミノ酸配列のポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド；
 - (4) SEQ ID NO: 81のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件下ハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、SEQ ID NO: 82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド；またはリン酸化部位を含むその断片、からなる群より選択されるポリペプチドを、ポリペプチドのリン酸化を可能にする条件下で被験化合物と接触させる段階；40
- (b) ポリペプチドまたはその断片のリン酸化レベルを検出する段階；
- (c) 基質のリン酸化レベルを、被験化合物の非存在下で検出されるポリペプチドのリン酸化レベルと比較する段階；ならびに
- (d) ポリペプチドのリン酸化レベルを低下させた化合物を、ポリペプチドのリン酸化を阻害する、または乳癌を治療もしくは予防するための化合物として選択する段階。

【0287】

50

これらの態様において、F3374V1ポリペプチドのリン酸化を可能にする条件は、そのポリペプチドを、F3374V1ポリペプチドのリン酸化に適したキナーゼとATPと一緒にインキュベートすることによって与えられる。ある態様において、F3374V1ポリペプチドをAURKBポリペプチドとさらに接触させる。さらに、好ましい態様において、F3374V1ポリペプチドのリン酸化を増強する物質をスクリーニングの反応混合物に添加することもできる。ポリペプチドのリン酸化が物質の添加によって増強されれば、リン酸化レベルをより高い感度で決定することができる。

【 0 2 8 8 】

F3374V1ポリペプチドまたはその機能的同等物のリン酸化レベルは、当技術分野で公知の任意の方法に従って検出することができる（「(2)一般的なスクリーニング方法」の項を参照）。

10

【 0 2 8 9 】

さらに、本発明者らは、乳癌細胞においてF3374V1がAURKBと相互作用することを明らかにした（図13）。したがって、両ポリペプチドの相互作用は発癌または細胞増殖、特に乳癌の細胞増殖において決定的な役割を果たすと考えられる。それ故に、F3374V1ポリペプチドとAURKBポリペプチドとの相互作用またはその反対の相互作用を阻害する、乳癌の治療または予防において有用な化合物をスクリーニングすることが意図される。したがって、本発明は、F3374V1ポリペプチドとAURKBポリペプチドとの相互作用を阻害するための化合物用のスクリーニング方法を提供する。さらに、本発明は、乳癌を治療または予防するための化合物用のスクリーニング方法も提供する。本方法は以下の段階を含む：

20

(a) AURKBポリペプチドまたはその機能的同等物を、被験化合物の存在下で、F3374V1ポリペプチドまたはその機能的同等物と接触させる段階；

(b) 段階(a)のポリペプチド間の結合を検出する段階；および

(c) AURKBポリペプチドとF3374V1ポリペプチドとの間の結合を阻害する被験化合物を選択する段階。

【 0 2 9 0 】

本発明の明細書において、F3374V1ポリペプチドまたはAURKBポリペプチドの機能的同等物とは、それぞれF3374V1ポリペプチド（SEQ ID NO：82）またはAURKBポリペプチド（SEQ ID NO：88）と同等な生物活性を有するポリペプチドのことである（「ヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、および宿主細胞」の項を参照）。

30

【 0 2 9 1 】

AURKBによるF3374V1のリン酸化を阻害する化合物用のスクリーニング方法としては、当業者に周知である多くの方法を用いることができる。例えば、スクリーニングを、細胞系などのインビトロアッセイ系として行うことができる。

【 0 2 9 2 】

本発明はまた、AURKBがF3374V1に対するキナーゼ活性を有するという知見にも基づいている。例えば、AURKBによるF3374V1のリン酸化部位は、F3374タンパク質のC末端部分（591～730アミノ酸）（SEQ ID NO：122）に位置する。これらの知見は、AURKBによるF3374V1のリン酸化が腫瘍細胞増殖において重要な役割を果たすこと、およびAURKBによるF3374V1のリン酸化の阻害が抗癌薬の開発のための有望な標的となることを示唆する。その目的のために、本発明の1つの局面は、AURKBを介したF3374V1のリン酸化を調節する被験化合物を同定することを伴う。したがって、本発明は、AURKBを介したF3374V1のリン酸化を阻害するための化合物用のスクリーニング方法を提供する。さらに、本発明は、乳癌を治療または予防するための化合物用のスクリーニング方法も提供する。本方法は以下の段階を含む：

40

(a) F3374V1およびAURKBを、被験化合物の存在下で、AURKBによるF3374V1のリン酸化に適した条件下でインキュベートする段階であって、F3374V1が以下のものからなる群より選択されるポリペプチドである、段階：

(1) SEQ ID NO：82（F3374V1）のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) ポリペプチドがSEQ ID NO：82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生

50

物活性を有するという条件で、1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO : 82のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(3) SEQ ID NO : 82のアミノ酸配列を含むポリペプチドに対して少なくとも90%、93%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO : 82のアミノ酸配列のポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド；

(4) ポリペプチドがSEQ ID NO : 82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、SEQ ID NO : 81のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；

(b) F3374V1のリン酸化レベルを検出する段階；

10

(c) F3374V1のリン酸化レベルを対照レベルと比較する段階；および

(d) 被験化合物の非存在下で検出される対照レベルに比してF3374V1のリン酸化レベルを低下させる化合物を選択する段階。

【0293】

本明細書において、AURKBを介したF3374V1のリン酸化を阻害すため、または乳癌を治療および／もしくは予防するための化合物用のスクリーニング方法は、C末端F3374タンパク質(591～730アミノ酸)(SEQ ID NO : 122)またはポリペプチドの相同な位置でのF3374V1のリン酸化レベルの検出を含む。

【0294】

本発明のもう1つの局面において、AURKBを介したF3374V1のリン酸化を阻害するため、または乳癌を治療または予防するための化合物用のスクリーニングのためのキットも提供する。本キットは以下の構成要素を含む：

20

(a) 以下のものからなる群より選択されるポリペプチド：

(1) SEQ ID NO : 82(F3374V1)のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) ポリペプチドがSEQ ID NO : 82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO : 82のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(3) SEQ ID NO : 82のアミノ酸配列を含むポリペプチドに対して少なくとも90%、93%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO : 82のアミノ酸配列のポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド；および

30

(4) ポリペプチドがSEQ ID NO : 82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、SEQ ID NO : 81のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；

(b) 以下のものからなる群より選択されるポリペプチド：

(1) SEQ ID NO : 88(AURKB)のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) ポリペプチドがSEQ ID NO : 88のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO : 88のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

40

(3) SEQ ID NO : 88のアミノ酸配列を含むポリペプチドに対して少なくとも90%、93%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO : 88のアミノ酸配列のポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド；および

(4) ポリペプチドがSEQ ID NO : 88のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、SEQ ID NO : 87のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；ならびに

(c) F3374V1のリン酸化レベルを検出するための試薬。

【0295】

50

さらに、本発明はまた、乳癌を治療または予防するための化合物用のスクリーニングのためのキットも提供する。本キットは以下の構成要素を含む：

(a) 以下のものからなる群より選択されるポリペプチドを発現する細胞：

(1) SEQ ID NO : 82 (F3374V1) のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) ポリペプチドがSEQ ID NO : 82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO : 82のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(3) SEQ ID NO : 82のアミノ酸配列を含むポリペプチドに対して少なくとも90%、93%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO : 82のアミノ酸配列のポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド；
および

(4) ポリペプチドがSEQ ID NO : 82のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、SEQ ID NO : 81のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；ならびに

(b) F3374V1のリン酸化レベルを検出するための試薬。

【0296】

さらに、AURKBを介したF3374V1のリン酸を阻害するため、または乳癌を治療もしくは予防するための化合物をスクリーニングするためのキットは、以下のものからなる群より選択されるポリペプチドをさらに発現する細胞を含む：

(a) SEQ ID NO : 88 (AURKB) のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(b) ポリペプチドがSEQ ID NO : 88のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、または挿入された、SEQ ID NO : 88のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(c) SEQ ID NO : 88のアミノ酸配列を含むポリペプチドに対して少なくとも90%、93%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO : 88のアミノ酸配列のポリペプチドと同等な生物活性を有するポリペプチド；
および

(d) ポリペプチドがSEQ ID NO : 88のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物活性を有するという条件で、SEQ ID NO : 87のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド。

【0297】

もう1つの局面において、キット中に用いられる細胞は乳癌細胞である。

【0298】

本発明において、キットがさらにリン酸供与体を含んでもよい。本発明のキットはまた、リン酸化されたC末端F3374タンパク質（591～730アミノ酸）(SEQ ID NO : 122)を認識する抗体を、リン酸化F3374V1を検出するための試薬として含んでもよい。その結果として、本発明はまた、乳癌を治療または予防するための化合物用のスクリーニングのためのキットを提供し、本キットでは、F3374V1のリン酸化レベルを検出するための試薬は、C末端F3374タンパク質（591～730アミノ酸）(SEQ ID NO : 122)でのリン酸化を認識する抗体である。対象タンパク質がリン酸化のための標的であるか否かは、本発明に従って決定することができる。例えば、F3374V1に対するキナーゼ活性は、ポリペプチドをF3374V1のリン酸化に適した条件下でインキュベートして、リン酸化F3374V1レベルを検出することによって決定することができる。例えば、AURKBによるF3374V1のリン酸化部位は、C末端F3374タンパク質（591～730アミノ酸）(SEQ ID NO : 122)である。

【0299】

本発明において、AURKBによるF3374V1のリン酸化に適した条件は、リン酸供与体、例えばATPの存在下での、F3374V1およびAURKBのインキュベーションによって与えられる。AURKBによるF3374V1のリン酸化に適した条件はまた、そのポリペプチドを発現する細胞の培

10

20

30

40

50

養における条件でもあった（「(2)一般的なスクリーニング方法」の項を参照）。

【0300】

所与のタンパク質と機能的に同等なポリペプチドを調製するための方法は当業者に周知であり、これには上述したようなタンパク質に変異を導入するための公知の方法が含まれる（「ヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、および宿主細胞」の項を参照）。

【0301】

いくつかの好ましい態様において、F3374V1ポリペプチドの機能的同等物には、AURKB結合ドメインに対応するアミノ酸配列、例えばSEQ ID NO: 122のアミノ酸配列が含まれ得る。同様に、AURKBポリペプチドの機能的同等物には、F3374V1結合ドメインに対応するアミノ酸配列が含まれ得る。

10

【0302】

上述したように、F3374V1とAURKBとの間の結合の阻害は、細胞増殖の抑制を招く。さらに、AURKBによるF3374V1のリン酸化の阻害も細胞増殖の抑制を招く。したがって、この結合またはリン酸化を阻害する化合物は、乳癌を治療または予防するための医用薬剤として役立つ可能性がある。本発明のスクリーニング方法のために用いられるF3374V1ポリペプチドおよびAURKBポリペプチドは、それが完全長タンパク質の結合活性またはリン酸化活性を保持している限り、組換えポリペプチドもしくは天然に由来するタンパク質であってもよく、またはそれらの部分ペプチドであってもよい。結合能力またはリン酸化活性を保持しているそのような部分ペプチドは、本明細書において「機能的同等物」と称される。スクリーニング方法において用いられるF3374V1ポリペプチドおよびAURKBポリペプチドは、例え、精製ポリペプチド、可溶性タンパク質、担体と結合した形態、または他のポリペプチドと融合した融合タンパク質であり得る。

20

【0303】

F3374V1とAURKBとの間の結合を阻害する化合物用のスクリーニング方法としては、当業者に周知である多くの方法を用いることができる。タンパク質間の結合は好ましくは緩衝液中で行われ、その例には、リン酸緩衝液およびトリス緩衝液が非限定的に含まれる。しかし、選択される緩衝液はタンパク質間の結合を阻害してはならない。前述した検出方法の任意のものを本スクリーニングのために用いてもよい（「(2)一般的なスクリーニング方法」の項を参照）。その上、前述した被験化合物の任意のものを本スクリーニングのために用いてもよい（「(1)スクリーニング用の被験化合物」の項を参照）。

30

【0304】

本発明のスクリーニング方法によって単離された化合物は、例え、乳癌などの細胞増殖性疾患に原因のある疾患を治療または予防するための、F3374V1またはAURKBの活性を阻害する薬物の候補となる。本発明のスクリーニング方法によって得られる化合物の構造の一部が付加、欠失、および／または置換によって変換された化合物は、本発明のスクリーニング方法によって得られる化合物に含まれる。過剰発現される遺伝子、すなわちF3374V1遺伝子およびAURKB遺伝子の発現を抑制するのに有効な化合物は、臨床的有益性があると考えられ、動物モデルまたは被験対象において癌細胞の増殖を低下または防止する能力に関してさらに試験することができる。

40

【0305】

本発明はまた、F3374V1ポリペプチドまたはAURKBポリペプチドと結合してそれらの相互作用を阻害するタンパク質用のスクリーニングも含み得る。その目的のために、当業者に周知である多くの方法を用いることができる。そのようなスクリーニングは、例え、当技術分野で周知の方法を用いる免疫沈降アッセイによって行うことができる。本発明のタンパク質は、上述した標準的な手順を用いて組換え的に生成することができる（「(2)一般的なスクリーニング方法」の項を参照）。F3374V1ポリペプチドまたはAURKBポリペプチドと結合する化合物を、上述したアフィニティークロマトグラフィーを用いてスクリーニングすることもできる（「(1)スクリーニング用の被験化合物」の項を参照）。

【0306】

(7) PBK / TOPKのリン酸化レベルを指標として用いるスクリーニング

50

本発明は、乳癌細胞におけるアポトーシスまたは細胞周期停止を誘導する作用物質用のスクリーニング方法を提供する。TOPKを発現する細胞、例えば乳癌細胞のアポトーシスまたは細胞周期停止を誘導する作用物質は、乳癌を治療または予防するために有用であると予想される。このため、本発明はまた、乳癌を治療または予防するための作用物質のスクリーニングのための方法も提供する。本方法は、浸潤性乳管癌（「IDC」）の治療または予防に用いる可能性のある作用物質のスクリーニングに特に適している。

【0307】

より具体的には、本方法は以下の段階を含む：

- (a) PBK / TOPKポリペプチドまたはその機能的同等物を発現する細胞を作用物質と接触させる段階；
- (b) PBK / TOPKポリペプチドのリン酸化レベルを検出する段階；
- (c) ポリペプチドのリン酸化レベルを、作用物質の非存在下で検出されるポリペプチドのリン酸化レベルと比較する段階；および
- (d) ポリペプチドのリン酸化レベルを低下させた作用物質を、TOPKを発現する細胞、例えば乳癌細胞のアポトーシスもしくは細胞周期停止を誘導する作用物質として、または乳癌を治療もしくは予防するための作用物質として選択する段階。

【0308】

もう1つの態様において、本方法は以下の段階を含む：

- (a) PP1 ポリペプチドおよびPBK / TOPKポリペプチドまたはそれらの機能的同等物を発現する細胞を作用物質と接触させる段階；
- (b) PBK / TOPKポリペプチドのリン酸化レベルを検出する段階；
- (c) ポリペプチドのリン酸化レベルを、作用物質の非存在下で検出されるポリペプチドのリン酸化レベルと比較する段階；および
- (d) ポリペプチドのリン酸化レベルを低下させた作用物質を、乳癌細胞のアポトーシスもしくは細胞周期停止を誘導する作用物質として、または、TOPKを発現する細胞、例えば乳癌を治療もしくは予防するための作用物質として選択する段階。

【0309】

本明細書において、PBK / TOPKポリペプチドまたはその機能的同等物を発現する限り、任意の細胞を用いることができる。本スクリーニングに用いられる細胞は、PBK / TOPKポリペプチドを天然に発現する細胞であってよく、これには例えば、乳癌（例えば、IDC）、胸腺、および精巣に由来する細胞、ならびにそれらから樹立された細胞株が含まれる。HBC4、HBC5、HBL100、HCC1937、MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435S、SKBR3、T47D、およびYMB1といった乳癌の細胞株を用いることができる。

【0310】

または、スクリーニングに用いられる細胞は、PBK / TOPKポリペプチドもPP1 も天然には発現せず、PBK-TOPKポリペプチドもしくはPBK / TOPKの機能的同等物を発現するベクターまたはPP1 を発現するベクターをトランスフェクトされた細胞であってもよい。そのような組換え細胞は、上述したような公知の遺伝子工学の方法（例えば、Morrison DA., J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.) 1983, 101: 347-62）によって得ることができる（「ヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、および宿主細胞」の項を参照）。

【0311】

前述した被験作用物質の任意のものを、本スクリーニングのために用いてもよい（「(1)スクリーニング用の被験化合物」の項を参照）。しかし、細胞内に浸透可能な作用物質を選択することが好ましい。または、被験作用物質がポリペプチドである場合には被験作用物質をコードするヌクレオチド配列を含むベクターを細胞にトランスフェクトして被験作用物質を細胞内で発現させることによって、本スクリーニングにおける細胞と被験作用物質とを接触させることもできる。

【0312】

本発明において、PBK / TOPKポリペプチドのリン酸化を増強する物質をスクリーニング

10

20

30

40

50

の反応混合物に添加することもできる。ポリペプチドのリン酸化が物質の添加によって増強されれば、リン酸化レベルをより高い感度で決定することができる。

【0313】

PBK / TOPKポリペプチドまたはその機能的同等物のリン酸化レベルは、当技術分野で公知の任意の方法によって検出してもよい（「(2)一般的なスクリーニング方法」の項を参照）。

【0314】

または、PBK / TOPKポリペプチドまたはその機能的同等物のリン酸化レベルを、細胞の細胞周期を検出することによって検出してもよい。具体的には、細胞の細胞周期は、FACSなどを含む当技術分野で公知の従来の方法を用いることによって決定することができる。
10 ポリペプチドのリン酸化レベルを決定するために細胞の細胞周期を検出する場合には、細胞と被験作用物質との接触の後に、正常細胞がG2 / M期を通過するまで、十分な時間、例えば12時間またはそれ以上にわたって、細胞をインキュベートすることが好ましい。この手順によれば、細胞周期がG2 / M期に捕捉されていることが検出された場合に、被験作用物質は乳癌細胞のアポトーシスを誘導する能力を有すると判定することができる。

【0315】

もう1つの態様において、本方法は以下の段階を含む：

(a) CDK1、サイクリンB1、およびPBK / TOPKポリペプチドまたはそれらの機能的同等物を、そのポリペプチドによってリン酸化される基質および作用物質と、基質のリン酸化を可能にする条件下で接触させる段階；
20

(b) PBK / TOPKポリペプチドのリン酸化レベルを検出する段階；

(c) PBK / TOPKポリペプチドのリン酸化レベルを、作用物質の非存在下で検出されるリン酸化レベルと比較する段階；ならびに

(d) PBK / TOPKポリペプチドのリン酸化レベルを低下させた作用物質を、乳癌細胞のアポトーシスを誘導する作用物質として、またはPBK / TOPKポリペプチドのリン酸化を阻害するため、または乳癌を治療もしくは予防するための作用物質として選択する段階。

【0316】

本明細書において、スクリーニングに用いられるCDK1、サイクリンB1、およびPBK / TOPKポリペプチドまたはそれらの機能的同等物は、当業者に周知の方法によって、組換えタンパク質または天然タンパク質として調製することができる。ポリペプチドは、上述したように、ポリペプチドを生成するための任意の公知の遺伝子工学の方法（例えば、Morris on J Bacteriology 1977, 132: 349-51 ; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.) 1983, 101: 347-62）を適合させて得てもよい（「ヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、および宿主細胞」の項を参照）。
30

【0317】

さらに、PBK / TOPKタンパク質に対するキナーゼ活性を保持している限り、CDK1およびサイクリンB1のタンパク質複合体を本発明に用いることもできる。そのような部分ペプチドは、遺伝子工学により、ペプチド合成の公知の方法により、または天然のCDK1およびサイクリンB1タンパク質を適切なペプチダーゼで消化することにより、生成することができる（「ヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、および宿主細胞」の項を参照）。
40

【0318】

CDK1およびサイクリンB1のタンパク質複合体と接触させるPBK / TOPKポリペプチドまたはその機能的同等物は、例えば、精製ポリペプチド、可溶性タンパク質、または他のポリペプチドと融合した融合タンパク質であってよい。

【0319】

これらの態様において、CDK1およびサイクリンB1ポリペプチドのキナーゼ活性を有することを可能にする条件は、CDK1およびサイクリンB1ポリペプチドを、PBK / TOPKポリペプチドをリン酸化するためのPBK / TOPKポリペプチドとATPと一緒にインキュベートすることによって与えることができる。さらに、本発明において、PBK / TOPKポリペプチドのリン酸化を増強する物質をスクリーニングの反応混合物に添加することもできる。PBK / TOPK
50

ポリペプチドのリン酸化が物質の添加によって増強されれば、PBK / TOPKポリペプチドのリン酸化レベルをより高い感度で決定することができる。

【0320】

CDK1、サイクリンB1、およびPBK / TOPKポリペプチドまたはそれらの機能的同等物と被験作用物質との接触は、インビボまたはインビトロのいずれで行ってもよい。インビトロでのスクリーニングは緩衝液中で行うことができ、その例には、緩衝液がPBK / TOPKポリペプチドまたはその機能的同等物のリン酸化を阻害しない限り、リン酸緩衝液およびトリス緩衝液があるが、それらには限定されない。

【0321】

本発明の1つの局面によれば、本スクリーニング方法に必要な構成要素を、乳癌細胞のアポトーシスもしくは細胞周期停止を誘導する作用物質、または乳癌を治療もしくは予防するための作用物質のスクリーニングのためのキットとして提供することができる。本キットは、例えば、PBK / TOPKポリペプチドもしくはその機能的同等物、またはPBK / TOPKポリペプチドおよび／もしくはPP1 もしくはその機能的同等物、またはPBK / TOPK、CDK1、およびサイクリンB1のポリペプチドもしくはそれらの機能的同等物を発現する細胞を含み得る。さらに、本キットは、対照試薬（陽性および／または陰性）、検出可能な標識、細胞培養地または緩衝液、スクリーニングに必要な容器、本方法を実施するための説明書（例えば、書面、テープ、VCR、CD-ROM、その他）なども含み得る。構成要素および試薬を別々の容器にパッケージ化してもよい。

【0322】

(8) 基質に対するPBK / TOPKのキナーゼ活性を指標として用いるスクリーニング

本発明のもう1つの局面によれば、乳癌細胞のアポトーシスを誘導する、または乳癌（例えば、IDC）を治療もしくは予防するために用いることができる作用物質は、PBK / TOPK基質のリン酸化レベルを指標として用いてスクリーニングされる。具体的には、本方法は以下の段階を含む：

(a) PBK / TOPKポリペプチドまたはその機能的同等物を、そのポリペプチドによってリン酸化される基質および作用物質と、基質のリン酸化を可能にする条件下で接触させる段階；

(b) 基質のリン酸化レベルを検出する段階；

(c) 基質のリン酸化レベルを、作用物質の非存在下で検出される基質のリン酸化レベルと比較する段階；および

(d) 基質のリン酸化レベルを低下させた作用物質を、PBK / TOPKポリペプチドのキナーゼ活性を阻害し、乳癌細胞のアポトーシスを誘導する作用物質として、または乳癌を治療もしくは予防するための作用物質として選択する段階。

【0323】

ある態様において、基質はヒストンH3ポリペプチドである。スクリーニングに用いられるPBK / TOPKポリペプチドまたはその機能的同等物は、当業者に周知の方法によって、組換えタンパク質または天然タンパク質として調製することができる。ポリペプチドは、上述したように、ポリペプチドを生成するための任意の公知の遺伝子工学の方法（例えば、Morrison J Bacteriology 1977, 132: 349-51 ; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.) 1983, 101: 347-62）を適合させて得てもよい（「ヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、および宿主細胞」の項を参照）。

【0324】

さらに、タンパク質のキナーゼ活性を保持している限り、PBK / TOPKタンパク質の部分ペプチドを本発明に用いることもできる。そのような部分ペプチドは、遺伝子工学により、ペプチド合成の公知の方法により、または天然のPBK / TOPKタンパク質を適切なペプチダーゼで消化することにより、生成することができる（「ヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、および宿主細胞」の項を参照）。

【0325】

被験作用物質および基質と接触させるPBK / TOPKポリペプチドまたはその機能的同等物

10

20

30

40

50

は、例えば、精製ポリペプチド、可溶性タンパク質、または他のポリペプチドと融合した融合タンパク質であってよい。

【0326】

基質は、リン基を受容し得る任意の化合物、例えばタンパク質、核酸（RNAまたはDNA）、または小分子である。例えば、基質は、ヒストン、またはリン酸化部位を含むヒストンの断片であってよい。ヒストンH3のSer10はPBK / TOPKタンパク質によってリン酸化され得ることが確かめられている。このため、ヒストンH3、またはSer10を含むその断片は、基質として有用である。

【0327】

PBK / TOPKポリペプチドと同様に、本スクリーニングのためのヒストンH3は、組換えタンパク質または天然タンパク質として調製することができる。さらに、PBK / TOPKポリペプチドと同様に、ヒストンH3を、結果として生じる融合タンパク質がPBK / TOPKポリペプチドによってリン酸化され得る限り、融合タンパク質として調製することもできる。ヒストンH3のヌクレオチド配列は当技術分野で周知である。さらに、ヒストンH3は市販されてもいる（例えば、Roche社の製品）。

10

【0328】

これらの態様において、ヒストンH3ポリペプチドのリン酸化を可能にする条件は、ヒストンH3ポリペプチドを、ヒストンH3ポリペプチドをリン酸化するためのPBK / TOPKポリペプチドとATPと一緒にインキュベートすることによって与えることができる。さらに、本発明において、PBK / TOPKポリペプチドのキナーゼ活性を増強する物質をスクリーニングの反応混合物に添加することもできる。基質のリン酸化が物質の添加によって増強されれば、基質のリン酸化レベルをより高い感度で決定することができる。

20

【0329】

PBK / TOPKポリペプチドまたはその機能的同等物、その基質、および被験作用物質の接触は、インビボまたはインビトロのいずれで行ってもよい。インビトロでのスクリーニングは緩衝液中で行うことができ、その例には、緩衝液がPBK / TOPKポリペプチドまたはその機能的同等物による基質のリン酸化を阻害しない限り、リン酸緩衝液およびトリス緩衝液があるが、それらには限定されない。

【0330】

本発明において、基質のリン酸化レベルは、当技術分野で公知の方法によって決定することができる（「（2）一般的なスクリーニング方法」の項を参照）。

30

【0331】

(9) PBK / TOPKとp47との結合またはp97のリン酸化を指標として用いるスクリーニング

本発明において、PBK / TOPKタンパク質が、アダプターとしてのp47タンパク質を通じてp97タンパク質と相互作用して、細胞分裂を阻害することが確かめられた。したがって、PBK / TOPKタンパク質とp47タンパク質との間の結合、またはp97のリン酸化を阻害する化合物を、そのようなPBK / TOPKタンパク質とp47タンパク質との結合またはp97のリン酸化レベルを指標として用いてスクリーニングすることができる。このため、本発明はまた、PBKとp47との間の結合を阻害する、またはp97のリン酸化レベルを低下させる化合物のスクリーニングのための方法も提供する。さらに、本発明はまた、乳癌を治療または予防するための化合物のスクリーニングのための方法も提供する。本方法は、乳癌を治療または予防するために用いる可能性のある作用物質のスクリーニングに特に適している。より具体的には、本方法は以下の段階を含む：

40

(a) PBK / TOPKポリペプチドまたはその機能的同等物を、被験化合物の存在下で、p47ポリペプチドまたはその機能的同等物およびp97ポリペプチドまたはその機能的同等物と接触させる段階；

(b) PBK / TOPKポリペプチドとp47ポリペプチドとの間の結合、またはp97のリン酸化レベルを検出する段階；および

(c) PBK / TOPKポリペプチドとp47ポリペプチドとの間の結合を阻害する、またはp97のリン酸化を低下させる被験化合物を選択する段階。

50

【 0 3 3 2 】

本発明の文脈において、PBK / TOPKまたはp47またはp97ポリペプチドの機能的同等物とは、それぞれPBK / TOPK (SEQ ID NO : 92) またはp47 (SEQ ID NO : 118) またはp97 (SEQ ID NO : 120) と同等な生物活性を有するポリペプチドのことである（「ヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、および宿主細胞」の項を参照）。

【 0 3 3 3 】

PBK / TOPKポリペプチドとp47ポリペプチドとの結合を阻害する化合物用のスクリーニング方法としては、当業者に周知である多くの方法を用いることができる。

【 0 3 3 4 】

スクリーニングのために用いられるポリペプチドは、組換えポリペプチド、または天然の供給源に由来するタンパク質、またはそれらの部分ペプチドであってよい。前述した任意の被験化合物をスクリーニングのために用いてもよい。10

【 0 3 3 5 】

例えば、PBK / TOPKポリペプチドおよびp47ポリペプチド（またはそれらの機能的同等物、「ヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、および宿主細胞」の項を参照）を用いる、ポリペプチドと結合するタンパク質用のスクリーニング方法としては、当業者に周知である多くの方法を用いることができる。そのようなスクリーニングは、例えば、免疫沈降、ウエスト-ウエスタンプロット分析 (Skolnik et al., Cell 65: 83-90 (1991)) 、細胞を利用する2-ハイブリッドシステム（「MATCHMAKER Two-Hybrid system」、「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」、「MATCHMAKER one-Hybrid system」(Clontech) ; 「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」(Stratagene) ; 参考文献「 Dalton and Treisman, Cell 68: 597-612 (1992) 」, 「 Fields and Sternglanz, Trends Genet 10: 286-92 (1994) 」）、アフィニティークロマトグラフィー、および表面プラズモン共鳴現象を利用するバイオセンサーを用いて行うことができる（「(2)一般的なスクリーニング方法」の項を参照）。20

【 0 3 3 6 】

前述した任意の被験化合物を用いてもよい（「(1)スクリーニング用の被験化合物」の項を参照）。

【 0 3 3 7 】

さらに、本発明において、本スクリーニング方法は、p97ペプチドのリン酸化を検出することを可能にする。したがって、p97ポリペプチドのリン酸化を可能にする条件は、p97ポリペプチドをリン酸化するためのPBK / TOPKポリペプチドおよびp47ポリペプチド、ならびにATPとともにp97ポリペプチドをインキュベートすることによって提示される。さらに、本発明において、PBK / TOPKポリペプチドのキナーゼ活性またはp97ポリペプチドのリン酸化を増強する物質をスクリーニングの反応混合物に添加することもできる。p97のリン酸化が物質の添加によって増強されれば、p97のリン酸化レベルをより高い感度で決定することができる。30

【 0 3 3 8 】

PBK / TOPKポリペプチドまたはその機能的同等物、p97またはその機能的同等物、および被験作用物質の接触は、インビオまたはインビトロのいずれで行ってもよい。インビトロでのスクリーニングは緩衝液中で行うことができ、その例には、緩衝液がPBK / TOPKポリペプチドまたはその機能的同等物による基質のリン酸化を阻害しない限り、リン酸緩衝液およびトリス緩衝液があるが、それらには限定されない。40

【 0 3 3 9 】

本発明において、基質のリン酸化レベルは当技術分野で公知の方法によって決定することができる（「(2)一般的なスクリーニング方法」の項を参照）。

【 0 3 4 0 】

(10) PBK / TOPK発現細胞の細胞周期構成およびG2 / M集団を指標として用いるスクリーニング

本発明は、乳癌細胞における細胞周期停止を誘導する作用物質用のスクリーニング方法50

を提供する。乳癌細胞の細胞周期停止を誘導する作用物質は、乳癌を治療または予防するために有用であると予想される。このため、本発明はまた、乳癌を治療または予防するための作用物質のスクリーニングのための方法を提供する。本方法は、浸潤性乳管癌（「IDC」）の治療または予防に用いる可能性のある作用物質のスクリーニングに特に適している。

【0341】

より具体的には、本方法は以下の段階を含む：

- (a) 候補作用物質を、PBK / TOPKポリペプチドまたはその機能的同等物を発現する細胞と接触させる段階；
- (b) 細胞構造および／または細胞周期上のG2 / M集団を観察する段階；ならびに 10
- (c) 細胞間結合を長い細胞間架橋へ変化させる、および／または細胞のG2 / M集団を増加させる化合物を選択する段階。

【0342】

本明細書において、PBK / TOPKポリペプチドまたはその機能的同等物を発現する限り、任意の細胞を用いることができる。本スクリーニングに用いられる細胞は、PBK / TOPKポリペプチドを天然に発現する細胞であってよく、これには例えば、乳癌（例えば、IDC）、胸腺、および精巣に由来する細胞、ならびにそれらから樹立された細胞株が含まれる。HBC4、HBC5、HBL100、HCC1937、MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435S、SKBR3、T47D、およびYMB1といった乳癌の細胞株を用いることができる。

【0343】

または、スクリーニングに用いられる細胞は、PBK / TOPKポリペプチドもPP1 も天然には発現せず、PBK-TOPKポリペプチドもしくはPBK / TOPKの機能的同等物を発現するベクター、またはPP1 を発現するベクターをトランスフェクトされた細胞であってもよい。そのような組換え細胞は、上述したような公知の遺伝子工学の方法（例えば、Morrison DA., J Bacteriology 1977, 132: 349-51 ; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.) 1983, 101: 347-62）によって得ることができる（「ヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、および宿主細胞」の項を参照）。

【0344】

前述した被験作用物質の任意のものを、本スクリーニングのために用いることができる（「(1)スクリーニング用の被験化合物」の項を参照）。しかし、細胞内に浸透可能な作用物質を選択することが好ましい。または、被験作用物質がポリペプチドである場合には、被験作用物質をコードするヌクレオチド配列を含むベクターを細胞にトランスフェクトして被験作用物質を細胞内で発現させることによって、本スクリーニングにおける細胞と被験作用物質とを接触させることもできる。

【0345】

本発明において、細胞の可視化をする物質、例えばDAPI、抗細胞膜タンパク質抗体を、スクリーニングの反応混合物に添加することもできる。細胞構造は、被験作用物質と接触させてから2日後の位相差顕微鏡検査またはタイムラップス顕微鏡検査によって観察することができる。

【0346】

細胞の細胞周期は、FACSなどを含む、当技術分野で公知の従来の方法を用いることによって決定することができる。細胞の細胞周期が検出された場合は、細胞と被験作用物質との接触の後に、正常細胞がG2 / M期を通過するまで、十分な時間、例えば12時間またはそれ以上にわたって、細胞をインキュベートすることが好ましい。この手順によれば、細胞周期がG2 / M期に捕捉されていることが検出された場合に、被験作用物質は乳癌細胞の増殖を阻害する能力を有すると判定することができる。

【0347】

本発明の1つの局面によれば、本スクリーニング方法に必要な構成要素を、乳癌細胞のアポトーシスもしくは細胞周期停止を誘導する作用物質、または乳癌を治療もしくは予防するための作用物質のスクリーニングのためのキットとして提供することができる。本キ 50

ットは、例えば、A7322もしくはF3374V1もしくはPBK / TOPKおよび／もしくはPP1 ポリペプチドまたはその機能的同等物、またはA7322もしくはAURKBもしくはF3374V1もしくはPHB2 / REAもしくはER もしくはPBK / TOPKもしくはヒストンH3もしくはCDK1もしくはサイクリンB1もしくはp47もしくはp97ポリペプチドまたはその機能的同等物を発現する細胞を含み得る。さらに、本キットは、対照試薬（陽性および／または陰性）、検出可能な標識、細胞培養培地、スクリーニングに必要な容器、本方法を実施するための説明書（例えば、書面、テープ、VCR、CD-ROM、その他）なども含み得る。構成要素および試薬を別々の容器にパッケージ化してもよい。

【 0 3 4 8 】

本発明のスクリーニング方法によって単離された化合物は、例えば、乳癌などの細胞増殖性疾患に原因のある疾患を治療または予防するための、A7322、F3374V1、PBK / TOPK、またはAURKBの発現または活性を阻害する薬物の候補である。 10

【 0 3 4 9 】

このスクリーニングによって単離される化合物は、本発明のポリペプチドのアンタゴニストの候補である。同様に、「アンタゴニスト」という用語は、本発明のポリペプチドとの結合によって該ポリペプチドの機能を阻害する分子を指す。さらに、このスクリーニングによって単離された化合物は、本発明のポリペプチドと分子（DNAおよびタンパク質を含む）とのインビボ相互作用を阻害する化合物の候補でもある。

【 0 3 5 0 】

本方法において検出しようとする生物活性が細胞増殖である場合には、実施例の項に記載したように、例えば、本発明のポリペプチドを発現する細胞を調製し、細胞を被験化合物の存在下で培養して、コロニー形成活性を測定することのほか、細胞増殖の速度を決定することや、細胞周期などを測定することにより、生物活性を検出することができる。 20

【 0 3 5 1 】

別に定義する場合を除き、本明細書で用いるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者が一般に理解しているものと同じ意味を有する。矛盾が生じた場合には、定義を含め、本明細書が優先するものとする。

【 0 3 5 2 】

単離された化合物および薬学的組成物

上記のスクリーニングによって単離された化合物は、本発明のBCポリペプチドの活性を阻害し、乳癌の治療において役に立つ薬物の候補である。より詳細には、BCタンパク質の生物活性を指標として用いる場合には、本方法によってスクリーニングされる化合物は、乳癌の治療のための薬物の候補となる。例えば、本発明は、乳癌を治療または予防するための組成物を提供し、本組成物は、以下からなる群より選択される少なくとも1つの機能を有するインヒビターの薬学的有効量を含む： 30

(a) A7322とPHB2 / REAとの間、F3374V1とAURKBとの間、またはPBK / TOPKとヒストンH3との間の結合を阻害する；

(b) AURKBによるF3374V1のリン酸化、またはPBK / TOPKによるヒストンH3のリン酸化を阻害する；

(c) A7322またはF3374からなる群より選択される遺伝子の発現を阻害する；および 40

(d) PHB2 / REAタンパク質の核移行を阻害する。

【 0 3 5 3 】

化合物の「薬学的有効量」とは、個体における癌を治療および／または軽減するのに十分な量のことである。薬学的有効量の一例は、動物に投与する場合、A7322またはF3374V1の発現または生物活性を低下させるのに必要な量が含まれる。低下は、例えば、発現の少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、75%、80%、90%、95%、99%、または100%の変化であってよい。

【 0 3 5 4 】

また、BC遺伝子およびAURKBからなる群より選択されるいづれか1つの遺伝子の発現を阻害する (c) そのような有効成分は、上記のように、その遺伝子に対する阻害性オリゴヌ 50

クレオチド（例えば、アンチセンス-オリゴヌクレオチド、siRNA、もしくはリボザイム）、またはアンチセンス-オリゴヌクレオチド、siRNA、もしくはリボザイムの、発現ベクターなどの派生物でもあり得る（「アンチセンスオリゴヌクレオチド」、「siRNA」の項を参照）。または、AURKBによるF3374V1のリン酸化を阻害する（b）有効成分は、例えば、F3374V1またはPBK / TOPKのドミナントネガティブ変異体でもあってよい。さらに、F3374V1のアンタゴニストを、F3374V1とAURKBとの間の結合を阻害する有効成分として用いることもでき、またはPBK / TOPKのアンタゴニストを、PBK / TOPKとヒストンH3との間の結合を阻害する（a）有効成分として用いることもできる。または、そのような有効成分を、上記のようなスクリーニング方法によって選択することもできる（「スクリーニング方法」の項を参照）。

10

【0355】

さらに、BCタンパク質のうち1つの活性を阻害する化合物の構造の一部が付加、欠失、および／または置換によって変換された化合物は、本発明のスクリーニング方法によって得られる化合物に含まれる。

【0356】

本発明のいずれかの方法によって単離された作用物質は、乳癌を治療または予防するために、ヒトおよび他の哺乳動物（例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、ヒヒ、およびチンパンジーなど）に対して、医用薬剤として投与することもでき、または薬学的（治療用もしくは予防用）組成物の製造のために用いることもできる。本方法を通じてスクリーニングされた作用物質によって治療または予防されるであろう好ましい癌には、浸潤性乳管癌（IDC）などが含まれる。

20

【0357】

単離された作用物質は、直接投与することもでき、または公知の薬剤調製法を用いて剤形へと製剤化することもできる。薬学的製剤には、経口、直腸、鼻腔内、局所的（口腔内および舌下を含む）、腔内、もしくは非経口（筋肉内、皮下、および静脈内を含む）投与、または吸入もしくは吹入による投与に適したものが含まれ得る。例えば、必要に応じて、薬剤を、糖衣錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、およびマイクロカプセルとして経口投与することもでき、または、水もしくは他の任意の薬学的に許容される液体との滅菌溶液もしくは懸濁液である注射剤の形態として非経口的に投与することもできる。例えば、このような薬剤は、薬学的に許容される担体または媒体、具体的には滅菌水、生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、溶媒剤、保存剤、結合剤などと共に、一般に容認された薬剤使用に必要な単位用量剤形で混合することができる。これらの調製物における有効成分の量によって、表記の範囲内の適切な投与量を得ることができる。

30

【0358】

「薬学的に許容される担体」という語句は、薬物のための希釈剤または溶媒剤として使用する不活性な物質を指す。

【0359】

錠剤およびカプセル剤と混合可能な添加物の例は、結合剤（ゼラチン、コーンスター、トライカントガム、およびアラビアゴムなど）；賦形剤（結晶性セルロースなど）；膨張剤（コーンスター、ゼラチン、およびアルギン酸など）；潤滑剤（ステアリン酸マグネシウムなど）；甘味剤（ショ糖、乳糖、またはサッカリン）；香味剤（ペパーミント、アカモノ油、およびチェリーなど）である。単位投与剤形がカプセルの場合、液状担体（オイルなど）も上記成分中にさらに含めることができる。注射用の滅菌成分を、通常の薬剤使用にしたがって、注射用蒸留水などの溶媒剤を用いて製剤化することができる。

40

【0360】

生理食塩水、グルコース、および、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、および塩化ナトリウムなどのアジュバントを含む他の等張液を、注射用水溶液として使用することができる。これらは、アルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール（例えばプロピレングリコールやポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例えば

50

ポリソルベート80(商標)やHCO-50などとの適切な可溶化剤とともに使用することができる。

【0361】

ゴマ油またはダイズ油は、油性溶液として使用することができ、可溶化剤として安息香酸ベンジルまたはベンジルアルコールとともに使用することができ、かつ、緩衝液(リン酸緩衝液および酢酸ナトリウム緩衝液など)；鎮痛薬(塩酸プロカインなど)；安定剤(ベンジルアルコール、フェノールなど)；ならびに抗酸化剤を用いて製剤化することができる。調製した注射液は適切なアンプルに充填することができる。

【0362】

経口投与に適した薬学的製剤は、それぞれが活性成分の規定量を含むカプセル剤、カシエ剤、もしくは錠剤のような別個の単位として；粉剤もしくは顆粒剤として；または溶液、懸濁液、もしくは乳剤として、都合よく提供してもよい。活性成分は、ボーラス舐剤またはペーストとして、および純粋な形態、すなわち担体なしで提供してもよい。経口投与用の錠剤およびカプセル剤は、結合剤、充填剤、潤滑剤、崩壊剤、または湿潤剤のような通常の賦形剤を含んでもよい。錠剤は、任意で1つもしくは複数の製剤成分を用いて、圧縮または成形により作製することができる。圧縮錠は、粉剤または顆粒剤のような流動状の活性成分を、任意で結合剤、潤滑剤、不活性希釈剤、潤滑剤、表面活性剤、または分散剤と混合して、適した機械において圧縮することによって調製してもよい。成形錠剤は、不活性液体希釈剤によって湿らせた粉末化合物の混合物を適した機械において成形することによって作製してもよい。錠剤は、当技術分野で周知の方法にしたがってコーティングすることができる。経口液体調製物は、例えば、水性もしくは油性懸濁液、溶液、乳液、シロップ剤、もしくはエリキシル剤の形であってもよく、または使用前に水もしくは他の適した溶剤で構成するための乾燥製品として提供してもよい。そのような液体調製物は、懸濁剤、乳化剤、非水性溶剤(食用油が含まれてもよい)、または保存剤のような通常の添加剤を含んでもよい。錠剤は任意で、そこに活性成分の徐放または制御放出を提供するように調製してもよい。

10

20

【0363】

非経口投与のための製剤には、抗酸化剤、緩衝剤、制菌剤および対象とするレシピエントの血液と製剤を等張にする溶質を含んでもよい水性および非水性滅菌注射剤、ならびに懸濁剤および濃化剤を含んでもよい水性および非水性滅菌懸濁液が含まれる。製剤は、単位用量または複数回用量で容器、例えば密封アンプルおよびバイアルに入れてもよく、滅菌液体担体、例えば生理食塩液、注射用水を使用直前に加えるだけでよい凍結乾燥状態で保存してもよい。または、製剤を持続注入用とすることができます。即時調合注射溶液および懸濁液は、既に説明した種類の滅菌粉末、顆粒、および錠剤から調製することができる。

30

【0364】

直腸投与用のための製剤は、カカオバターまたはポリエチレングリコールのような有用な担体を含む坐剤として提供してもよい。口内への、例えば口腔内または舌下への局所投与のための製剤には、ショ糖およびアカシアまたはトラガカントのような着香基剤に活性成分を含むトローチ剤、ならびにゼラチンとグリセリンまたはショ糖とアカシアのような基剤に活性成分を含む香錠が含まれる。鼻腔内投与の場合、本発明によって得られる化合物を、液体スプレーもしくは分散性の粉末として、または点鼻剤の形態で用いてもよい。点鼻剤は、一つまたは複数の分散剤、溶解剤、または懸濁剤も含む水性または非水性基剤によって製剤化してもよい。液体スプレーは、加圧パックから都合よく送達される。

40

【0365】

吸入による投与の場合、吸入器、ネブライザー、加圧パック、または他のエアロゾル噴霧を送達するための都合のよい手段によって、化合物を都合よく送達する。加圧容器は、適切な噴霧剤(ジクロロジフルオロメタン、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、炭酸ガス、または他の適切なガス)を含む場合がある。加圧エアロゾルの場合、投与単位は、一定量を送達するバルブを提供することで決定することができる。

50

【 0 3 6 6 】

または、吸入もしくは吹入による投与の場合、化合物は、乾燥粉末組成物、例えば化合物と、乳糖またはデンプンのような適した粉末基剤との粉末混合物の形状をとってもよい。粉末組成物は、例えば、カプセル剤、カートリッジ、ゼラチン、またはプリスター・パック中で、単位投与剤形で提供してもよく、粉末はそこから吸入器または吹入器を利用して投与され得る。

【 0 3 6 7 】

必要に応じて、活性成分が徐放性となるように適合した上記の製剤を使用することができる。薬学的組成物はまた、抗菌剤、免疫抑制剤、または保存剤のような他の活性成分を含んでもよい。

10

【 0 3 6 8 】

好ましい単位投与製剤は、以下に列挙するような有効用量、または活性成分の適切な画分を含むものである。

【 0 3 6 9 】

当業者に周知の方法を用いて、本発明の薬学的化合物を、例えば動脈内注射、静脈内注射、経皮内注射として、および同様に鼻腔内投与、経気管支投与、筋肉内投与、または経口投与として患者に投与することができる。投与量および投与法は、患者の体重および年齢ならびに投与法に応じて変動するが、当業者であればこれらを慣例的に選択することができる。該化合物がDNAによってコード可能である場合、該DNAを遺伝子治療用のベクターに挿入し、該ベクターを投与して治療を実施することができる。投与量および投与法は、患者の体重、年齢、および症状に応じて変化するが、当業者であればこれらを適切に選択することができる。

20

【 0 3 7 0 】

例えば、症状によって若干の違いはあるものの、本発明のポリペプチドと結合してその活性を調節する化合物の用量は、正常な成人（体重60kg）に対して経口投与する場合、約0.1mg～約100mg/日、好ましくは約1.0mg～約50mg/日、より好ましくは約1.0mg～約20mg/日である。

【 0 3 7 1 】

注射液の形状で正常な成人（体重60 kg）に非経口的に投与する場合は、患者、標的器官、症状、および投与方法によって若干の違いはあるものの、約0.01 mg～約30 mg/日、好ましくは約0.1 mg/日～約20 mg/日、より好ましくは約0.1 mg/日～約10 mg/日の用量を静脈内に注射することが好都合である。また他の動物の場合でも、体重60kgに換算した量を投与することが可能である。

30

【 0 3 7 2 】

作用物質は、好ましくは経口的または注射（静脈内もしくは皮下）によって投与され、対象に投与される厳密な量は、対象の年齢および性別、治療される厳密な障害およびその重症度を含む、数多くの要因を考慮した上で、主治医の責任の下で決定されると考えられる。また、投与の経路も、病状およびその重症度に応じて異なる可能性がある。

【 0 3 7 3 】

さらに、本発明は、本発明のポリペプチドに対する抗体を用いる、乳癌の治療または予防のための方法を提供する。本方法により、本発明のポリペプチドに対する抗体の薬学的有効量が投与される。BCタンパク質の発現は癌細胞において上方制御されており、かつこれらのタンパク質の発現抑制によって細胞増殖活性の低下がもたらされるため、抗体とこれらのタンパク質との結合によって乳癌を治療または予防できることが予想される。このため、本発明のポリペプチドに対する抗体を、本発明のタンパク質の活性を低下させるのに十分な投与量で投与してもよく、これは0.1～約250mg/kg/日の範囲内である。成人の用量範囲は一般に、約5 mg～約17.5 g/日であり、好ましくは約5 mg～約10 g/日であり、最も好ましくは約100 mg～約3 g/日である。

40

【 0 3 7 4 】

一般に、1つまたは複数のBCタンパク質インヒビターの効果的なまたは有効な量は、低

50

用量または少量のBCタンパク質インヒビターをまず投与し、続いて、毒性副作用が最小限であるかまたは毒性副作用を伴わず、治療された対象において乳癌の阻害または予防という所望の効果が観察されるまで、1回または複数回の投与量を徐々に増やすこと、および／または第2のBCタンパク質インヒビターを必要に応じて追加することによって決定される。本発明の薬学的組成物の投与のために適切な用量および投薬スケジュールを決定するために適用し得る方法は、例えば、Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th Ed., Brunton, et al., Eds., McGraw-Hill (2006)およびRemington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed., University of the Sciences in Philadelphia (USIP), Lippincott Williams & Wilkins (2005)に記載されており、これらはいずれも参考により本明細書に組み入れられる。

10

【0375】

本発明によってスクリーニングされた作用物質はさらに、対象における乳癌、例えば浸潤性乳管癌（IDC）を治療または予防するために用いることができる。投与は、BCタンパク質の異常なリン酸化活性と関連のある障害のリスクがある（またはそれに対する感受性がある）か、またはその障害を有する対象に対して予防的であっても治療的であってもよい。本方法は、乳癌細胞におけるBCタンパク質の機能を低下させることを含む。本発明のスクリーニング方法によって得られた作用物質の投与を通じて、機能を阻害することができる。

【0376】

本明細書において、「予防すること」という用語は、腫瘍の形成を遅延もしくは予防する、または癌の少なくとも1つの臨床症状を遅延、抑制、もしくは軽減するために、作用物質が予防的に投与されることを意味する。対象における腫瘍の状態は、標準的な臨床的プロトコールを用いて評価することができる。

20

【0377】

あるいは、腫瘍細胞に特異的な細胞表面マーカーと結合する抗体を、薬物送達のツールとして用いることができる。例えば、細胞傷害剤と接合させた抗体を、腫瘍細胞を損傷させるのに十分な用量で投与する。

【0378】

抗腫瘍免疫を誘導する方法および腫瘍ワクチン

また本発明は、抗腫瘍免疫を誘導する方法にも関し、該方法は、A7322もしくはF3374V1タンパク質もしくはその免疫活性断片、または該タンパク質をコードするポリヌクレオチドもしくはその断片を投与する段階を含む。A7322もしくはF3374V1タンパク質またはその免疫活性断片は、乳癌に対するワクチンとして有用である。場合によっては、本タンパク質またはその断片を、T細胞受容体（TCR）と結合した形態で、または、マクロファージ、樹状細胞（DC）もしくはB細胞などの抗原提示細胞（APC）によって提示された形態で投与することができる。DCが強い抗原提示能力を有するため、APCの中でもDCの使用が最も好みしい。

30

【0379】

本発明において、乳癌に対するワクチンとは、動物に接種した時に抗腫瘍免疫を誘導する機能を有する物質を指す。一般に、抗腫瘍免疫は以下のような免疫応答を含む：

40

- 乳癌に対する細胞傷害性リンパ球の誘導、
- 乳癌を認識する抗体の誘導、および
- 抗腫瘍サイトカイン産生の誘導。

【0380】

したがって、あるタンパク質が、動物への接種時にこれらの免疫応答のいずれか1つを誘導する場合、該タンパク質は抗腫瘍免疫誘導効果を有するとみなされる。タンパク質による抗腫瘍免疫の誘導は、該タンパク質に対する宿主における免疫系の応答をインピボまたはインピトロで観察することによって検出できる。

【0381】

例えば、細胞傷害性Tリンパ球の誘導を検出する方法は周知である。生体に侵入する外

50

来物質は、抗原提示細胞（APC）の作用によってT細胞およびB細胞に提示される。APCによって提示された抗原に抗原特異的に応答するT細胞は、抗原による刺激のために細胞傷害性T細胞（または細胞傷害性Tリンパ球；CTL）に分化し、後に増殖する（これはT細胞の活性化と呼ばれる）。したがって、あるペプチドによるCTLの誘導は、ペプチドをAPCによってT細胞に提示させ、CTLの誘導を検出することで評価できる。さらに、APCは、CD4+ T細胞、CD8+ T細胞、マクロファージ、好酸球、およびNK細胞を活性化する効果を有する。またCD4+ T細胞およびCD8+ T細胞は抗腫瘍免疫においても重要なので、これらの細胞の活性化効果を指標として用いることによって、ペプチドの抗腫瘍免疫誘導作用を評価することができる。

【0382】

10

樹状細胞（DC）をAPCとして用いてCTLの誘導作用を評価する方法は当技術分野で周知である。DCは、APCの中で最も強力なCTL誘導作用を有する代表的なAPCである。この方法では、被験ポリペプチドをまずDCに接触させて、次にこのDCをT細胞に接触させる。DCとの接触後に関心対象の細胞に対して細胞傷害作用を有するT細胞が検出されることによって、被験ポリペプチドが細胞傷害性T細胞を誘導する活性を有することが示される。腫瘍に対するCTLの活性は、例えば⁵¹Cr標識腫瘍細胞の溶解を指標として用いることによって、検出できる。あるいは、³H-チミジンの取り込み活性またはLDH（ラクトースデヒドロゲナーゼ）の放出を指標として用いることによって腫瘍細胞損傷の程度を評価する方法も周知である。

【0383】

20

DCのほかに、末梢血単核球（PBMC）をAPCとして使用することもできる。CTLの誘導は、GM-CSFおよびIL-4の存在下でPBMCを培養することによって増強され得ることが報告されている。同様に、CTLは、PBMCをキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）およびIL-7の存在下で培養することによって誘導されることが示されている。

【0384】

30

これらの方針によってCTL誘導活性を持つことが確認された被験ポリペプチドは、DC活性化効果と、引き続くCTL誘導活性とを有するポリペプチドである。したがって、腫瘍細胞に対してCTLを誘導するポリペプチドは、腫瘍に対するワクチンとして有用である。さらに、ポリペプチドに接触することによって腫瘍に対するCTLの誘導能を獲得したAPCは、腫瘍に対するワクチンとして有用である。さらに、APCによるポリペプチド抗原の提示によって細胞傷害性を獲得したCTLも同様に、腫瘍に対するワクチンとして用いることができる。APCおよびCTLによる抗腫瘍免疫を用いたそのような腫瘍治療法は、細胞免疫療法と呼ばれる。

【0385】

一般に、細胞免疫療法にポリペプチドを用いる場合、異なる構造を有する複数のポリペプチドを組み合わせてこれらをDCに接触させることにより、CTL誘導の効率が高くなることが知られている。したがって、DCをタンパク質断片で刺激する場合、複数種類の断片の混合物を用いることが有利である。

【0386】

40

または、ポリペプチドによる抗腫瘍免疫の誘導は、腫瘍に対する抗体産生の誘導を観察することで確認できる。例えば、ポリペプチドに対する抗体が、該ポリペプチドで免疫した実験動物において誘導される場合、および腫瘍細胞の成長が該抗体によって抑制される場合には、該ポリペプチドは抗腫瘍免疫を誘導する能力を有すると判定することができる。

【0387】

50

抗腫瘍免疫は本発明のワクチンを投与することによって誘導され、かつ、抗腫瘍免疫の誘導により、乳癌の治療および予防が可能になる。癌に対する治療法または癌の発症の予防は、癌細胞の成長の阻害、癌の退縮、および癌の発症の抑制といった段階のいずれかを含む。癌を有する個体の死亡率の低下、血液中の腫瘍マーカーの減少、癌に付随する検出可能な症状の緩和なども、癌の治療または予防に含まれる。このような治療効果および予

防効果は、統計的に有意であることが好ましい。例えば、所見において、5%またはそれ未満は有意水準である、ここで、乳癌に対するワクチンの治療または予防の効果はワクチン投与を行わない対照と比較される。例えば、スチューデントのt検定、Mann-WhitneyのU検定、またはANOVAを統計解析に用いることができる。

【0388】

免疫活性を有する上記のタンパク質または該タンパク質をコードするベクターを、アジュバントと併用してもよい。アジュバントとは、免疫活性を有するタンパク質と同時に（または連続的に）投与した場合、該タンパク質に対する免疫応答を増大させる化合物を意味する。アジュバントの例には、コレラ毒素、サルモネラ毒素、ミヨウバンなどが含まれるが、これらに限定されるわけではない。さらに、本発明のワクチンは、薬学的に許容される担体と適切に組み合わせることができる。このような担体の例には、滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液などがある。また、ワクチンは必要に応じて安定剤、懸濁剤、保存剤、界面活性剤などを含む場合がある。ワクチンは全身投与または局所投与する。ワクチン投与は、1回投与で実施してもよく、または複数回投与によって追加免疫してもよい。10

【0389】

本発明のワクチンとしてAPCまたはCTLを用いる場合、例えばエクスピボ法によって腫瘍を治療または予防することができる。より具体的には、治療または予防を受ける対象のPBMCを採取し、細胞をエクスピボでポリペプチドと接触させ、APCまたはCTLの誘導後に、細胞を対象に投与することができる。またAPCは、ポリペプチドをコードするベクターをPBM Cにエクスピボで導入することによって誘導することもできる。インビトロで誘導されたAPCまたはCTLを、投与前にクローニングすることができる。標的細胞を障害する活性が高い細胞をクローニングして成長させることによって、細胞免疫療法を、より効果的に実施することができる。さらに、このようにして単離されたAPCおよびCTLを、細胞が由来する個体に対してのみならず、他の個体由来の類似のタイプの腫瘍に対する細胞免疫療法のためにも用いることができる。20

【0390】

さらに、本発明のポリペプチドの薬学的有効量を含む、乳癌を治療または予防するための薬学的組成物も提供する。薬学的組成物を、抗腫瘍免疫を生じさせるために用いることもできる。正常組織中では、A7322の発現は脳に限局している；正常臓器におけるF3374V1の発現は、精巣、胸腺、胎盤、および骨髄に限局している。このため、これらの遺伝子の抑制は他の臓器には有害な影響を及ぼさないと考えられる。したがって、A7322ポリペプチドおよびF3374V1ポリペプチドは、乳癌の治療にとって好ましい。本発明において、ポリペプチドまたはその断片は、抗腫瘍免疫を誘導するのに十分な投与量で投与され、これは0.1 mg～10 mg、好ましくは0.3 mg～5 mg、より好ましくは0.8 mg～1.5 mgの範囲である。投与は反復して行う。抗腫瘍免疫を誘導するためには、例えば、1 mgのペプチドまたはその断片を2週間毎に4回投与するとよい。30

【0391】

阻害するドミナントネガティブタンパク質

本発明は、MEGISNFKTPSKLSEKKKK (SEQ ID NO : 98) を含む阻害性ポリペプチドに関する。いくつかの好ましい態様において、阻害性ポリペプチドには、MEGISNFKTPSKLSEKKKK (SEQ ID NO : 98) ; そのポリペプチドと機能的に同等なポリペプチド；またはそのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが含まれ、ここでポリペプチドはSEQ ID NO : 92からなるペプチドの生物機能を欠いている。SEQ ID NO : 92に示されたアミノ酸配列は、W02005/028676号に開示されている。癌細胞の増殖はそのアミノ酸配列の発現を阻害することによって制御できることが知られている。しかし、上記のアミノ酸配列中に特定の変異を有する配列を含む断片が癌細胞の増殖を阻害することは、本発明者らによって証明された新規な知見である。40

【0392】

本発明の選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドは、そのポリペプチドが癌細胞の50

増殖を阻害する限り任意の長さであってよい。具体的には、アミノ酸配列の長さは、8~70残基、例えば、8~50残基、好ましくは8~30残基、より具体的には8~20残基、さらにより具体的には8~16残基の範囲であってよい。

【0393】

本発明のポリペプチドは、2つまたはそれ以上の「選択されたアミノ酸配列」を含み得る。2つまたはそれ以上の「選択されたアミノ酸配列」は、同じアミノ酸配列でも異なるアミノ酸配列でもよい。さらに、「選択されたアミノ酸配列」は、直接連結することができる。または、それらの間に何らかの介在配列が配置されていてもよい。

【0394】

さらに本発明は、本明細書に具体的に開示するMEGISNFKTPSKLSEKKK / SEQ ID NO : 98ポリペプチドに対して相同な（すなわち、配列同一性を有する）ポリペプチドに関する。本発明において、MEGISNFKTPSKLSEKKK / SEQ ID NO : 98ポリペプチドに対して相同なポリペプチドとは、1つまたは複数のアミノ酸残基の付加、欠失、置換、および挿入から選択される任意の変異を含み、かつMEGISNFKTPSKLSEKKK / SEQ ID NO : 98ポリペプチドと機能的に同等なもののことである。「MEGISNFKTPSKLSEKKK / SEQ ID NO : 98ポリペプチドと機能的に同等な」という語句は、CDK1およびサイクリンB1の複合体とPBK / TOPKとの結合を阻害する機能を有することを指す。MEGISNFKTPSKLSEKKK / SEQ ID NO : 98配列は、MEGISNFKTPSKLSEKKK / SEQ ID NO : 98ポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを構成するアミノ酸配列中では保存されていることが好ましい。このため、本発明におけるMEGISNFKTPSKLS EKKK / SEQ ID NO : 98ペプチドと機能的に同等なポリペプチドは、MEGISNFKTPSKLSEKKK / SEQ ID NO : 98配列以外の部位にアミノ酸変異を有することが好ましい。本発明におけるMEGISNFKTPSKLSEKKK / SEQ ID NO : 98ペプチドと機能的に同等なポリペプチドのアミノ酸配列は、MEGISNFKTPSKLSEKKK / SEQ ID NO : 98配列を保存しており、「選択されたアミノ酸配列」に対して60%もしくはそれ以上、通常は70%もしくはそれ以上、好ましくは80%もしくはそれ以上、より好ましくは90%もしくはそれ以上、または95%もしくはそれ以上、およびさらにより好ましくは98%もしくはそれ以上の相同性を有する。アミノ酸配列の相同性は、当技術分野で周知のアルゴリズム、例えば、デフォルトの設定に設定されたBLASTまたはALIGNを用いて決定することができる。

【0395】

または、変異を受け得るアミノ酸の数は、MEGISNFKTPSKLSEKKK / SEQ ID NO : 98ペプチドの活性が維持される限り、特に限定されない。一般に、最大で約10アミノ酸、さらにより好ましくは最大で約3アミノ酸である。同様に、変異の部位も、変異がMEGISNFKTPSKLSEKKK / SEQ ID NO : 98ペプチドの活性の損失をもたらさない限り、特に限定されない。

【0396】

1つの好ましい態様において、MEGISNFKTPSKLSEKKK / SEQ ID NO : 98ペプチドの活性には、PBK / TOPKを発現する細胞、すなわち乳癌細胞における細胞周期停止の誘導効果が含まれる。細胞周期停止とは、DNA複製および有糸分裂のチェックポイントで止まるることを意味する。細胞周期停止を検出するための方法は周知である。例えば、FACS（フローサイトメトリー）を用いることによって細胞周期停止を確かめてよい。

【0397】

もう1つの態様において、MEGISNFKTPSKLSEKKK / SEQ ID NO : 98ペプチドの活性には、PBK / TOPKを発現する細胞、すなわち乳癌細胞におけるアポトーシス誘導効果が含まれる。アポトーシスとは細胞それ自体によって引き起こされる細胞死を意味し、これは時にはプログラム細胞死と呼ばれる。アポトーシスを来している細胞では、核染色体の凝集、核の断片化、または細胞質の凝縮が観察される。アポトーシスを検出するための方法は周知である。例えば、TUNEL染色（末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼビオチン-dUTP二重端標識；Gavrieli et al., (1992) J. Cell Biol. 119: 493-501, Mori et al., (1994) Anat. & Embryol. 190: 21-28）によって、アポトーシスを確かめてよい。または、DNAラダーアッセイ、アネキシンV染色、カスパーゼアッセイ、電子顕微鏡検査、または核もしくは細胞膜上のコンホーメーション変化の観察を、アポトーシスの検出のた

10

20

30

40

50

めに用いてもよい。アポトーシスによって誘導される細胞におけるこれらの挙動を検出するためには任意の市販のキットを用いてもよい。例えば、そのようなアポトーシス検出キットは、以下の供給元から市販されている：

LabChem Inc.,
Promega,
BD Biosciences Pharmingen,
Calbiochem,
Takara Bio Company (CLONTECH Inc.),
CHEMICON International, Inc.,
Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.、など。

10

【0398】

本発明のポリペプチドは、選択されたアミノ酸配列に基づいて任意の位置から化学合成することができる。通常のペプチド化学に用いられる方法を、ポリペプチドを合成する方法のために用いることができる。具体的には、これらの方法には、以下の文書および日本特許公報に記載されているものが含まれる：

Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966 ; The Proteins, Vol. 2, Academic Press Inc., New York, 1976 ;

Peptido gousei (Peptide Synthesis), Maruzen (Inc.), 1975 ;

Peptido gousei no kiso to jikken (Fundamental and Experimental Peptide Synthesis), Maruzen (Inc.), 1985 ;

20

Iyakuhin no kaihatsu (Development of Pharmaceuticals), Sequel, Vol. 14: Peptido gousei (Peptide Synthesis), Hirokawa Shoten, 1991 ;

国際特許公開第W099/67288号。

【0399】

また、本発明のポリペプチドを、公知の遺伝子工学の手法によって合成することもできる。遺伝子工学の手法の一例は以下の通りである。具体的には、所望のペプチドをコードするDNAを適切な宿主細胞に導入して形質転換細胞を調製する。本発明のポリペプチドは、この形質転換細胞によって産生されたポリペプチドを回収することによって得ることができる。あるいは、所望のポリペプチドを、タンパク質合成のために必要な要素がインビトロで再構成されたインビトロ翻訳系で合成することもできる。

30

【0400】

遺伝子工学の手法を用いる場合には、本発明のポリペプチドを、異なるアミノ酸配列を有するペプチドとの融合タンパク質として発現させることができる。所望の融合タンパク質を発現するベクターは、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、異なるペプチドをコードするポリヌクレオチドと、それらが同じリーディングフレーム中にあるように連結させて、統いて、結果として生じたヌクレオチドを発現ベクター中に導入することによって得ることができる。融合タンパク質は、結果として生じたベクターによって適切な宿主を形質転換することによって発現される。融合タンパク質の形成に用いられる異なるペプチドには、以下のペプチドが含まれる：

FLAG (Hopp et al., (1988) BioTechnology 6, 1204-10)、

40

6つのHis (ヒスチジン) 残基からなる6xHis、10xHis、

インフルエンザ血球凝集素 (HA)、

ヒトc-myc断片、

VSV-GP断片、

p18 HIV断片、

T7タグ、

HSVタグ、

Eタグ、

SV40T抗原断片、

Ickタグ、

50

- チュープリン断片、
 Bタグ、
 プロテインC断片、
 GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ) 、
 HA (インフルエンザ血球凝集素) 、
 免疫グロブリン定常領域、
 - ガラクトシダーゼ、および
 MBP (マルトース-結合タンパク質) 。

【 0 4 0 1 】

本発明のポリペプチドは、そのようにして産生された融合タンパク質を適切なプロテアーゼで処理し、続いて所望のポリペプチドを回収することによって得ることができる。ポリペプチドを精製するためには、融合タンパク質を、融合タンパク質と結合するアフィニティークロマトグラフィーによって前もって捕捉し、続いて捕捉された融合タンパク質をプロテアーゼで処理することができる。プロテアーゼ処理により、所望のポリペプチドがアフィニティークロマトグラフィーから分離され、高純度の所望のポリペプチドが回収される。

【 0 4 0 2 】

本発明のポリペプチドには修飾ポリペプチドが含まれる。本発明において、「修飾された」という用語は、例えば、他の物質との結合のことを指す。したがって、本発明において、本発明のポリペプチドは、細胞膜透過性物質などの他の物質をさらに含み得る。他の物質には、ペプチド、脂質、糖類、および様々な天然性または合成性のポリマーなどの有機化合物が含まれる。本発明のポリペプチドは、ポリペプチドがCDK1およびサイクリンB1の複合体とPBK / TOPKとの結合を阻害するという所望の活性を保っている限りにおいて任意の修飾を有し得る。ある態様において、阻害性ポリペプチドは、PBK / TOPKとCDK1およびサイクリンB1の複合体との結合に対して直接競合することができる。また、修飾が本発明のポリペプチドに対して追加的な機能を付与することもできる。追加的な機能の例には、標的指向能力 (targetability) 、到達能力、および安定化が含まれる。

【 0 4 0 3 】

本発明における修飾の好ましい例には、例えば、細胞膜透過性物質の導入が含まれる。通常、細胞内構造は細胞膜によって外界と遮断されている。このため、細胞外物質を細胞内に効率的に導入することは困難である。ポリペプチドを細胞膜透過性物質で修飾することにより、本発明のポリペプチドに細胞膜透過性を付与することができる。その結果として、本発明のポリペプチドを細胞と接触させることにより、このポリペプチドを細胞内に送達してそこで作用させることができる。

【 0 4 0 4 】

「細胞膜透過性物質」とは、哺乳動物の細胞膜を透過して細胞質に入ることのできる物質のことを指す。例えば、ある種のリポソームは細胞膜と融合して、その内容物を細胞内に放出する。その一方で、ある種のポリペプチドは、哺乳動物細胞の細胞質膜を透過して細胞の内側に入る。そのような細胞侵入活性を有するポリペプチドとして、本発明においては細胞質膜などが物質として好ましい。具体的には、本発明は、以下の一般式

[R] - [D]

を有するポリペプチドを含み、式中、[R]は細胞膜透過性物質を表し、[D]はMEGISNFKTPSKLSEKKK / SEQ ID NO : 98を含む断片配列を表す。上記の一般式において、[R]および[D]は直接的に連結させることができ、またはリンカーを介して間接的に連結させることができる。ペプチド、複数の官能基を有する化合物などをリンカーとして用いることができる。具体的には、-G-を含むアミノ酸配列をリンカーとして用いることができる。あるいは、細胞膜透過性物質と、選択された配列を含むポリペプチドとを、微小粒子の表面に結合させることもできる。[R]は、[D]の任意の位置に連結させることができる。具体的には、[R]を[D]のN末端もしくはC末端に、または[D]を構成するアミノ酸の側鎖に連結させることができる。さらに、複数の[R]分子を1つの[D]分子に連結させることもできる。[R]分子は

10

20

30

40

50

、[D]分子の複数の異なる位置に導入することができる。あるいは、[D]を互いに連結した複数の[R]で修飾することもできる。

【0405】

例えば、細胞膜透過性を有する、様々な天然のまたは人工的に合成されたポリペプチドが報告されている (Joliot A. & Prochiantz A., Nat Cell Biol. 2004; 6: 189-96)。これらの公知の細胞膜透過性物質のすべてを、本発明においてポリペプチドを修飾するために用いることができる。本発明においては、例えば、以下の群から選択される任意の物質を上記の細胞透過性物質として用いることができる：

- ポリ-アルギニン； Matsushita et al., (2003) J. Neurosci.; 21, 6000-7.
- [Tat / RKKRRQRRR] (SEQ ID NO: 100) Frankel et al., (1988) Cell 55, 1189-93. 10
- Green & Loewenstein (1988) Cell 55, 1179-88.
- [ペネトラチン (Penetratin) / RQIKIWFQNRRMKWKK] (SEQ ID NO: 101)
- Derossi et al., (1994) J. Biol. Chem. 269, 10444-50.
- [ブフォリンII (Buforin II) / TRSSRAGLQFPVGRVHRLRK] (SEQ ID NO: 102)
- Park et al., (2000) Proc. Natl Acad. Sci. USA 97, 8245-50.
- [トランスポータン (Transportan) / GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL] (SEQ ID NO: 10
3)
- Pooga et al., (1998) FASEB J. 12, 67-77.
- [MAP (model amphipathic peptide) / KLALKLALKALKAAALKLA] (SEQ ID NO: 104)
- Oehlke et al., (1998) Biochim. Biophys. Acta. 1414, 127-39. 20
- [K-FGF / AAVALLPAVLLALLAP] (SEQ ID NO: 105)
- Lin et al., (1995) J. Biol. Chem. 270, 14255-8.
- [Ku70 / VPMLK] (SEQ ID NO: 106)
- Sawada et al., (2003) Nature Cell Biol. 5, 352-7.
- [Ku70 / PMLKE] (SEQ ID NO: 114)
- Sawada et al., (2003) Nature Cell Biol. 5, 352-7.
- [Prion / MANLGWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP] (SEQ ID NO: 107)
- Lundberg et al., (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun. 299, 85-90.
- [pVEC / LLIILRRRIRKQAHHSK] (SEQ ID NO: 108)
- Elmquist et al., (2001) Exp. Cell Res. 269, 237-44. 30
- [Pep-1 / KETWWETWWTEWSQPKKKRKV] (SEQ ID NO: 109)
- Morris et al., (2001) Nature Biotechnol. 19, 1173-6.
- [SynB1 / RGGRRLSYSRRRFSTSTGR] (SEQ ID NO: 110)
- Rousselle et al., (2000) Mol. Pharmacol. 57, 679-86.
- [Pep-7 / SDLWEMMMVSLACQY] (SEQ ID NO: 111)
- Gao et al., (2002) Bioorg. Med. Chem. 10, 4057-65.
- [HN-1 / TSPLNIHNGQKL] (SEQ ID NO: 112)
- Hong & Clayman (2000) Cancer Res. 60, 6551-6

【0406】

本発明において、細胞膜透過性物質の一例として上記に挙げたポリ-アルギニンは、任意の数のアルギニン残基によって構成される。具体的には、例えば、それは連続した5~20個のアルギニン残基によって構成される。アルギニン残基の好ましい数は11である (SEQ ID NO: 113)。

【0407】

MEGISNFKTPSKLSEKKK / SEQ ID NO: 98を含む薬学的組成物

本発明のポリペプチドは癌細胞の増殖を阻害する。このため、本発明は、有効成分として、MEGISNFKTPSKLSEKKK / SEQ ID NO: 98を含むポリペプチド；またはそれをコードするポリヌクレオチドを含む、癌を治療および/または予防するための作用物質を提供する。あるいは、本発明は、本発明のポリペプチドを投与する段階を含む、癌を治療および/または予防するための方法に関する。さらに、本発明は、癌を治療および/または予防する 40
50

ための薬学的組成物の製造における本発明のポリペプチドの使用に関する。本発明によって治療または予防され得る癌は、PBK / TOPKの発現が癌細胞において上方制御される限りにおいて限定されない。例えば、本発明のポリペプチドは乳癌を治療するために有用である。

【0408】

あるいは、本発明の阻害性ポリペプチドを、癌細胞の細胞周期停止を誘導するために用いることもできる。このため、本発明は、有効成分として、MEGISNFKTPSKLSEKKK / SEQ ID NO : 98を含むポリペプチド、またはそれをコードするポリヌクレオチドを含む、細胞に対する細胞周期停止を誘導する作用物質を提供する。本発明の細胞周期停止を誘導する作用物質は、癌などの細胞増殖性疾患を治療するために用いてもよい。本発明によって治療または予防され得る癌は、PBK / TOPKの発現が癌細胞において上方制御される限りにおいて限定されない。例えば、本発明のポリペプチドは乳癌を治療するために有用である。あるいは、本発明は、本発明のポリペプチドを投与する段階を含む、細胞のアポトーシスを誘導するための方法に関する。さらに、本発明は、細胞における細胞周期停止を誘導するための薬学的組成物の製造における本発明のポリペプチドの使用に関する。10

【0409】

本発明の阻害性ポリペプチドは、乳癌などのPBK / TOPK発現細胞における細胞周期停止を誘導する。一方、ほとんどの正常臓器ではPBK / TOPK発現は観察されていない。一部の正常臓器では、PBK / TOPKの発現レベルは癌組織と比べて相対的に低い。したがって、本発明のポリペプチドは、特に癌細胞において細胞周期停止を誘導すると思われる。20

【0410】

本発明のポリペプチドを、癌を治療するため、または細胞における細胞周期停止を誘導するために、ヒトおよび他の哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、ヒヒ、およびチンパンジーに対して調製された医用薬剤として投与する場合には、単離された化合物を直接投与することができ、または公知の医用薬剤調製法を用いて適切な剤形として製剤化することもできる。例えば、必要に応じて、医用薬剤を、糖衣錠、カプセル剤、エリキシル剤、およびマイクロカプセルとして経口投与することもでき、あるいは水もしくは他の任意の薬学的に許容される液体を用いた滅菌溶液もしくは懸濁液である注射用剤形で非経口的に投与することもできる。例えば、一般に許容される医用薬剤を製造するために必要な単位用量剤形中で、化合物を、薬理学的に許容される担体または媒質、具体的には滅菌水、生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、溶媒剤、防腐剤、および結合剤と混合することができる。これらの製剤における有効成分の量に応じて、指定された範囲内にある適切な用量を決定することができる。30

【0411】

錠剤およびカプセル剤中に混合してもよい添加剤の例には、ゼラチン、コーンスター、トランガントガム、およびアラビアゴムなどの結合剤；結晶性セルロースなどの媒体；コーンスター、ゼラチン、およびアルギン酸などの膨張剤；ステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤；ショ糖、乳糖、またはサッカリンなどの甘味剤；ならびに、ペパーミント、冬緑油、またはチェリーなどの香味剤がある。単位用量剤形がカプセルである場合には、上記の成分に油などの液体担体をさらに含めることができる。注射用の滅菌混合物は、通常の医用薬剤の実現に即して、注射用蒸留水などの媒体を用いて製剤化することができる。40

【0412】

注射用の水溶液としては、生理食塩水、グルコース溶液、および、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、および塩化ナトリウムなどのアジュバントを含む他の等張液を用いることができる。それらは、適切な可溶化剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ならびにポリアルコール、例えばプロピレングリコールおよびポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80（商標）およびHCO-50等と組み合わせて用いることができる。50

【 0 4 1 3 】

油性液としてはゴマ油または大豆油を用いることができ、可溶化剤としての安息香酸ベンジルまたはベンジルアルコールと組み合わせて用いることもできる。さらに、それらを、リン酸緩衝液および酢酸ナトリウム緩衝液などの緩衝剤；塩酸プロカインなどの鎮痛剤；ベンジルアルコールおよびフェノールなどの安定化剤；ならびに酸化防止剤とともに製剤化することもできる。そのようにして調製された注射液は適切なアンプル中に充填する。

【 0 4 1 4 】

本発明の薬学的化合物を患者に投与するためには、例えば、動脈内、静脈内、または皮下への注射による、さらには同様に鼻腔内投与、経気管支投与、筋肉内投与、または経口投与による、当業者に周知の方法を用いることができる。用量および投与方法は、患者の体重および年齢、ならびに投与方法によって様々である。しかしながら、当業者はそれらを規定通りに選択することができる。本発明のポリペプチドをコードするDNAは、遺伝子治療用のベクター中に挿入することができ、そのベクターを治療のために投与することができる。用量および投与方法は、患者の体重、年齢、および症状などによって様々であるが、当業者はそれらを適切に選択することができる。例えば、本発明のポリペプチドと結合して、その活性を調節する化合物の用量は、健常成人（体重60kg）に対して経口投与される場合には、症状によって幾分変わってくるものの、約0.1mg～約100mg／日、好ましくは約1.0mg～約50mg／日、より好ましくは約1.0mg～約20mg／日である。

【 0 4 1 5 】

化合物が健常成人（体重60kg）に対して注射剤形で非経口的に投与される場合には、患者、標的臓器、症状、および投与方法によって幾分変わってくるものの、約0.01mg～約30mg／日、好ましくは約0.1mg～約20mg／日、より好ましくは約0.1mg～約10mg／日の用量を静脈内注射することが好都合である。同様に、化合物を、他の動物に対して、体重60kgでの用量から換算された量で投与することもできる。

【 0 4 1 6 】

以下では、実施例を参照することにより、本発明をさらに詳細に説明する。しかしながら、以下の材料、方法、および例は本発明の諸局面を例示しているに過ぎず、本発明の範囲を限定するものでは全くない。このため、本明細書で記載したものに類似するか同等である方法および材料を、本発明の実施または検討のために用いることができる。

【 0 4 1 7 】**実施例**

以上に提示した開示から理解されるように、本発明には多岐にわたる用途がある。したがって、以下の例は例示のみを目的として提供されるものであり、本発明に関する限定であるとみなされることは全く意図していない。当業者は、重要ではない種々のパラメータを変更または改変しても本質的に類似した結果が得られることを容易に理解すると考えられる。

【 0 4 1 8 】

本発明は以下の実施例によって詳細に例示されるが、これらの実施例には限定されない。

【 0 4 1 9 】**実施例1 材料および方法****(1) 細胞株および臨床材料**

ヒトの乳癌細胞株HBL100、HCC1937、MCF-7、MDA-MB-435S、SKBR3、T47D、BT-549、YMB1、ZR-75-1、OCUB-F、MDA-MB-453、MDA-MB-157、HCC1599、HCC1500、HCC1395、HCC1143、BT-474およびBT-20、ならびにヒト胎児腎細胞株HEK293T細胞、BTL100およびCOS7は、American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) から購入した。HBC4、HBC5、BSY-1、およびMDA-MB-231細胞株は、癌化学療法センター (Cancer Chemotherapy Center, Japanese Foundation for Cancer Research) 分子薬理学部門のDr. Yamoriに寄贈いただいた。細胞はすべて、それぞれの寄託者の推奨に従って培養した；すなわち、RPMI-1640 (Sig

10

20

30

40

50

ma-Aldrich, St. Louis, MO) を、HBC4、HBC5、BT-483、SKBR3、BT-549、HCC1143、HCC1599、HCC1500、HCC1395、T47D、YMB1、HCC1937、BSY-1、およびZR-75-1に対して用い(2mM L-グルタミンを使用) ; ダルベッコ変法イーグル培地(Invitrogen, Carlsbad, CA)を、HBL100 BT-474およびOCUB-Fに対して用い; EMEM(Sigma-Aldrich)に0.1mM必須アミノ酸(Roche, Basel, Switzerland)、1mMピルビン酸ナトリウム(Roche)、0.01mg/mlインスリン(Sigma-Aldrich)を加えたものを、MCF-7およびBT-20に対して用い; L-15(Roche)を、MDA-MB-231およびMDA-MB-435S、MDA-MB-453、およびMDA-MB-157に対して用いた。それぞれの培地には、10%ウシ胎仔血清(Cansera)および1%抗生物質/抗菌薬溶液(Sigma-Aldrich)を加えた。MDA-MB-231細胞およびMDA-MB-435S細胞は、CO₂を含まない加湿空气中で37℃に維持した。他の細胞株は、5% CO₂を含む加湿空气中で37℃に維持した。外科的に切除した乳癌からの組織試料、およびそれらの対応する臨床情報は、書面によるインフォームドコンセントを得た上で入手した。
10

【0420】

(2) 半定量的RT-PCR分析

本発明者らは、乳癌臨床試料のそれぞれから全RNAを抽出した。本発明者らは、マイクロダイセクションを行った細胞から全RNAを抽出し、続いてT7に基づく増幅および逆転写を以前の記載の通りに行った(Nishidate T et al. Int J Oncol 2004; 25: 797-819)。本発明者らは、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(2MG)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)、およびファルネシル-ニリン酸ファルネシルトランスフェラーゼ1(FDFT1)を定量用内部対照としてモニタリングすることにより、その後のPCR増幅のための各一本鎖cDNAの適切な希釈物を調製した。PCRプライマー配列は以下の通りとした:

2MGに対して、

5'-AACTTAGAGGTGGGAGCAG-3' (SEQ ID NO: 1) および
5'-CACAAACCATGCCTTACTTATC-3' (SEQ ID NO: 2);

A7322に対して、

5'-CTTGACAAGGCCTTGGAGT-3' (SEQ ID NO: 3) および
5'-CAATATGCTTTCCCGCTTT-3' (SEQ ID NO: 4);

F3374に対して、

5'-AACCAAGCACACCATAGCCTTA-3' (SEQ ID NO: 5) および
5'-GGAGATGGTAGGGATACAAAC-3' (SEQ ID NO: 6);

AURKBに対して、

5'-GGGAGAGCTGAAGATTGCTG-3' (SEQ ID NO: 7) および
5'-GACAGATTGAAGGGCAGAGG-3' (SEQ ID NO: 8);

GAPDHに対して、

5'-CGACCACCTTGTCAAGCTCA-3' (SEQ ID NO: 9) および
5'-GGTTGAGCACAGGGTACTTTATT-3' (SEQ ID NO: 10);

FDFT1に対して、

5'-AGTGAAATGCAGGTGAGAAGAAC-3' (SEQ ID NO: 11) および
5'-TCATTCTAGCCAGGATCATACTAAG-3' (SEQ ID NO: 12);

PBK/TOPKに対して、

5'-AGACCCTAACAGATCGCCTTCTG-3' (SEQ ID NO: 13) および
5'-GTGTTTAAGTCAGCATGAGCAG-3' (SEQ ID NO: 14); ならびに

PHB2/REAに対して、

5'-GCTGACAACCTTGTGCTGAA-3' (SEQ ID NO: 15) および
5'-TGAGAAATCACGCAGTGTCC-3' (SEQ ID NO: 16)。

【0421】

(3) ノーザン-プロット分析

すべての乳癌細胞株から、RNeasyキット(Qiagen, Valencia, CA)を製造元の指示に従って用いて全RNAを抽出した。DNアーゼI(Nippon Gene, Osaka, Japan)による処理の後
50

に、mRNA精製キット（GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom）を製造元の指示に従って用いてmRNAを単離した。健常成人の乳腺（Biochain, Hayward, CA）、肺、心臓、肝臓、腎臓、および骨髄（BD Biosciences, San Jose, CA）から単離した各mRNAの1 μgのアリコートを1%変性アガロースゲル上で分離し、ナイロン膜に転写させた（乳癌ノーザンプロット）。ヒト多組織ノーザンプロット（BD Biosciences）を、RT-PCRによって調製したA7322の[³²P]-dCTP標識したPCR産物とハイブリダイズさせた（下記参照）。プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、および洗浄は供給元の推奨に従って行った。プロットのオートラジオグラフィーは増感スクリーンを-80 °で14日間用いて行った。A7322 (459 bp) およびF3374に対する特異的プローブは、以下のプライマーセット：

10

A7322の3'UTR内の、

5' -CAAGCTTGCTTACAGAGACCTG-3' (SEQ ID NO: 17) および
5' -GGGCCAACCTACCAAAGTT-3' (SEQ ID NO: 18) ;

F3374に対する、

5' -GCAATCTGCTATGTCAGCCAAC-3' (SEQ ID NO: 19) および
5' -CAGGATCAGCTAAAGTCTGACA-3' (SEQ ID NO: 20) ;
5' -AGACCCTAAAGATCGTCCTCTG-3' (SEQ ID NO: 13) および
5' -GTGTTTAAGTCAGCATGAGCAG-3' (SEQ ID NO: 14)

を用いるRT-PCRによって調製した上で、メガプライムDNA標識システム（GE Healthcare）により放射性標識した。

20

【0422】

(4) cDNA 5'末端の迅速增幅 (5' RACE)

5' RACE実験は、SMART RACE cDNA增幅キット（Takara Clontech）を製造元の指示に従って用いて行った。A7322 cDNAの5'部分の增幅のためには、次の遺伝子特異的プライマー：5' -GCCTCCTTCTGCAGCTTCCTCAGGATT-3' (SEQ ID NO: 21)、およびキット中に供給されたユニバーサルプライマー混合物（universal primer mix）を用いた。cDNAテンプレートは、MDA-MB-453乳癌細胞から抽出および精製したmRNAから、Superscript III逆転写酵素（Invitrogen）を用いて合成した。PCR産物をTAクローニングキット（Invitrogen）を用いてクローニングし、配列をDNA配列決定によって決定した（ABI3700；PE Applied Bio systems, Foster, CA）。

30

【0423】

(5) 発現ベクターの構築

A7322、PHB2 / REA、またはF3374の発現ベクターを構築するためには、A7322またはcDNAの全コード配列を、KOD-Plus DNAポリメラーゼ（Toyobo, Osaka, Japan）を用いるPCRによって増幅した。プライマーセットは以下の通りとした：

A7322- フォワード；5' -CGGAATTCCATGGAAGAAATCCTGAGGAAGC-3' (SEQ ID NO: 22) (下線部はEcoRI部位を表す) および

A7322- リバース；5' -ATAGTTAGCGGCCGCACAATGATGTCATAGACACGG-3' (SEQ ID NO: 23) (下線部はNotI部位を表す) ;

PHB2 / REA- フォワード；5' -CGGAATTCCAGACCGTGCATGGCCCAGAACTTGAAGGA-3' (SEQ ID NO: 24) (下線部はEcoRI部位を表す) および

PHB2 / REA- リバース；5' -CCGCTCGAGTTCTTACCCCTTGATGAGGCTGT-3' (SEQ ID NO: 25) (下線部はXhoI部位を表す) ;

ER - フォワード；5' -CGGAATTCCATGACCATGACCCCTCCACACCAAAGCATCC-3' (SEQ ID NO: 26) および

ER - リバース；5' -CCGCTCGAGGACCGTGGCAGGGAAACCCCT-3' (SEQ ID NO: 27) (下線部は制限酵素の認識部位を表す) ;

F3374- フォワード；5' -AAGGAAAAAGCGGCCGATGCTCTTCAATTGGTGC-3' (SEQ ID NO: 28) (下線部はNotI部位を表す) および

F3374- リバース；5' -CCGCTCGAGTAATTCTGTTGAGTGGTCAGGACC-3' (SEQ ID NO: 29) (下

40

50

線部はXhol部位を表す)。

【0424】

PCR産物を、pCAGGS-nH3F発現ベクターの、EcoRI部位およびNotI部位に(A7322の場合)、EcoRI部位およびXhol部位(PHB2/REAの場合)、EcoRI部位およびXhol部位(ERの場合)、またはNotI部位およびXhol部位(B3374の場合)に、N末端HAタグおよびC末端Flagタグと共にインフレームに挿入した。構築物はDNA配列決定によって確認した(ABI3700, PE Applied Biosystems, Foster, CA)。

【0425】

(6) 抗A7322ポリクローナル抗体および抗F3374ポリクローナル抗体の作製

pET21a(+)ベクターを用いて、N末端のT7タグおよびC末端のヒスチジン(His)タグ(Novagen, Madison, WI)と共にインフレームに、A7322の2つの断片(コドン459~572および799~1200)を発現するようにプラスミドを設計した。この2つの組換えペプチドを大腸菌(Escherichia coli)BL21コドンプラス株(Stratagene, La Jolla, CA)でそれぞれ発現させ、Ni-NTA樹脂アガロース(QIAGEN)を供給元のプロトコールに従って用いて精製した。これらの精製組換えタンパク質を混ぜ合わせ、続いてウサギの免疫化のために用いた(Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japan)。その後に免疫血清を、Affigel 15ゲル(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)を供給元の指示に従って用いて、抗原アフィニティカラム上で精製した。本発明者らは、この抗体が乳癌細胞株SK-BR-3細胞において内在性A7322タンパク質を特異的に認識し得ることを確かめた。アフィニティー精製した抗A7322抗体を、以下に述べるようにウエスタンプロット法、免疫細胞化学染色および免疫組織化学染色分析のために用いた。

【0426】

そのC末端にHisタグを有する、F3374の一部(437~730アミノ酸)を発現するように設計されたプラスミドを、pET21ベクター(Merck, Novagen, Madison, WI)を用いて調製した。この組換えペプチド(36kDa)を大腸菌BL21コドンプラス(Stratagene, La Jolla, CA)で発現させ、Ni-NTA樹脂アガロース(Qiagen)を供給元のプロトコールに従って用いて精製した。混入物としての大腸菌のタンパク質を除去するために、F3374断片タンパク質をSDS-PAGEゲルから切り出し、エレクトロ-エリューター(Bio-Rad, Hercules, CA)を用いることによって抽出した。抽出したタンパク質をウサギに接種し、その後に免疫血清を、Affigel 15ゲル(Bio-Rad)を供給元の指示に従って用いて、抗原アフィニティーカラム上で精製した。アフィニティー精製した抗F3374抗体を、以下に述べるようにウエスタンプロット法、免疫組織化学染色、および免疫細胞化学分析のために用いた。

【0427】

(7) クローニングおよび突然変異誘発

PBK/TOPK発現ベクターを構築するために、PBP/TOPK cDNAの全コード配列を、KOD-Plus DNAポリメラーゼ(Toyobo, Osaka, Japan)を用いるPCRによって増幅した。プライマーセットは、以下の通りとした：

野生型PBP/TOPKに対して、

5'-CCGGAATTCTGGAAAGGGATCAGTAATTTC-3' (SEQ ID NO: 30) および

5'-CCGCTCGAGTCAGACATCTGTTCCAGAGCTTC-3' (SEQ ID NO: 31)

(下線部は制限酵素の認識部位を表す)。

PCR産物を、pCAGGS-nHA発現ベクターのEcoRI部位およびXhol部位に挿入した。以前の記載のように(Gaudet S, et al., Proc Natl Acad Sci USA 2000, 97: 5167-72)、二段階変異誘発PCRを行って、Lys64およびLys65がアラニンに置換されたキナーゼ-デッド(kinase-dead)変異体(K64-65A)を作製した。変異体K64-65Aに対して用いたプライマーセットは、以下の通りとした：

5'-CATTCTCCTTGGGCTGTAGCAGCGATTAATCCTATATGTAATG-3' (SEQ ID NO: 32) および

5'-CATTACATATAAGGATTAATCGCTGCTACAGCCCCAAGGAGAATG-3' (SEQ ID NO: 33)

(下線部は、野生型から置き換えられたヌクレオチドを表す)。

構築物はすべて、DNA配列決定によって確認した(ABI3700, PE Applied Biosystems, Fos

10

20

30

40

50

ter, CA)。

【0428】

(8) 免疫細胞化学染色

乳癌細胞における内在性A7322タンパク質の細胞内局在について調べるために、SK-BR-3細胞を1ウェル当たり 1×10^5 個として播いた (Lab-Tek II Chamber Slide System; Nalge Nunc International, Naperville, IL)。24時間のインキュベーションの後に、細胞を4%パラホルムアルデヒドを含むPBS (-)により4度30分間かけて固定し、0.1%Triton X-100を含むPBS (-)により4度2分間かけて透過性を与えた。その後、非特異なハイブリダイゼーションをブロックするために、細胞をPBS (-)中3%のBSAで1時間覆い、その後に1:250に希釈した抗A7322ポリクローナル抗体と一緒にインキュベーションをさらに1時間行つた。PBS (-)で洗浄した後に、細胞を、1:1000に希釈したAlexa 488結合抗ウサギ二次抗体 (Molecular Probe, Eugene, OR) によって1時間かけて染色した。核は4',6'-ジアミジン-2'-フェニルインドール二塩酸 (DAPI) で対比染色した。蛍光画像はTCS SP2 AO BS顕微鏡 (Leica, Tokyo, Japan) の下で得た。10

【0429】

F3374の細胞内局在について調べるために、HBC5細胞を1ウェル当たり 5×10^4 個として播いた。続いて、細胞を4%パラホルムアルデヒドを含むPBSにより20分間かけて固定し、0.1%Triton X-100を含むPBSにより室温で2分間かけて透過性を与えた。その後、非特異なハイブリダイゼーションをブロックするために、細胞をPBS中3%のBSAにより室温で1時間覆つた。その後、細胞を1:100に希釈したウサギ抗A3374抗体と一緒にインキュベートした。PBSで洗浄した後に、細胞を1:1000に希釈したAlexa 488結合抗ウサギ二次抗体 (Molecular Probe) によって染色した。核は4',6'-ジアミジン-2'-フェニルインドール二塩酸 (DAPI) で対比染色した。蛍光画像はTCS SP2 AO BS顕微鏡 (Leica, Tokyo, Japan) の下で得た。内在性F3374タンパク質およびAURKBタンパク質の細胞内局在について調べるために、T47D細胞を1ウェル当たり 1×10^5 個として播いた。細胞の固定、ブロッキング反応、および染色手順は、1:100希釈した抗F3374抗体または1:500希釈した抗AURKB抗体 (Abcam, Cambridge, MA) を用いた点を除き、上記の条件下で行った。20

【0430】

乳癌細胞株T47D、BT-20、およびHBC5における内在性PBK / TOPKタンパク質の細胞内局在について調べるために、細胞を1ウェル当たり 2×10^5 個として播いた (Lab-Tek II chamber slide, Nalgen Nunc International, Naperville, IL)。48時間のインキュベーションの後に、細胞を4%パラホルムアルデヒドを含むPBS (-)により15分間かけて固定し、0.1%Triton X-100を含むPBS (-)により4度2.5分間かけて透過性を与えた。その後、非特異なハイブリダイゼーションをブロックするために、細胞をPBS (-)中の3%BSAにより4度12時間覆い、その後に1:100に希釈したマウス抗PBK / TOPKモノクローナル抗体 (BD Biosciences)と一緒にインキュベーションを行つた。PBS (-)で洗浄した後に、細胞を、1:1000に希釈したAlexa594-結合抗マウス二次抗体 (Molecular Probe, Eugene, OR) で染色した。核は4',6'-ジアミジン-2'-フェニルインドール二塩酸 (DAPI) で対比染色した。蛍光画像はTCS SP2 AO BS顕微鏡 (Leica, Tokyo, Japan) の下で得た。Ser10でのヒストンH3のリン酸化について調べるために、タンパク質をホスホ-ヒストンH3 (Ser10) 特異的ウサギポリクローナル抗体 (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA) によって検出した。3040

【0431】

(9) ウエスタンプロット分析

外来A7322タンパク質を検出するために、FuGene 6 (Roche) を用いて、pCAGGSnHsF-A73 22発現ベクタープラスミド (20 μg) をBT-549細胞にトランスフェクトした。24時間後に、0.1%プロテアーゼインヒビター混合物III (Calbiochem, San Diego, CA) を含む溶解緩衝液 (50mM Tris-HCl、pH 8.0 / 150mM NaCl / 0.1%NP-40、0.5%CHAPS) 中で細胞を溶解させた。全タンパク質の量をタンパク質アッセイキット (Bio-Rad, Hercules, CA) によって評価し、続いてタンパク質をSDS-試料緩衝液と混合して煮沸し、その後、6% SDS-50

PAGEゲルにロードした。電気泳動の後に、タンパク質をニトロセルロース膜（GE Healthcare）にプロットした。タンパク質を含む膜をブロッキング溶液によってブロックし、外来A7322タンパク質の検出のために抗Flag M2モノクローナル抗体と一緒にインキュベートした。最後に膜をHRP結合二次抗体と一緒にインキュベートし、タンパク質バンドをECL検出試薬（GE Healthcare）によって可視化した。

【0432】

SK-BR-3細胞における内在性A7322タンパク質の発現について調べるために、0.1%プロテアーゼインヒビター混合物III（Calbiochem, San Diego, CA）を含む溶解緩衝液（50mM Tris-HCl、pH 8.0、150mM NaCl、0.1%NP-40、および0.5%CHAPS）により細胞を溶解させた。均質化の後に、細胞溶解物を氷上で30分間インキュベートし、上清のみを細胞片から分離するために14,000rpmで5分間遠心分離した。全タンパク質の量をタンパク質アッセイキット（Bio-Rad）によって測定し、続いてタンパク質をSDS-試料緩衝液と混合して5分間煮沸し、その後に7.5% SDS-PAGEゲルにロードした。電気泳動の後に、タンパク質をニトロセルロース膜（GE Healthcare）にプロットした。タンパク質を含む膜をブロッキング溶液によって1時間ブロックし、内在性A7322タンパク質を検出するために精製抗A7322ポリクローナル抗体と一緒にさらに1時間インキュベートした。最後に、膜をHRP結合二次抗体と一緒に1時間インキュベートし、タンパク質バンドをECL検出試薬（GE Healthcare）によって可視化した。10

【0433】

乳癌細胞株（HBC4、BT-549、HBC5、HBL100、HCC1937、MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-453、SKBR3、T47D、およびZR75-1）およびヒト乳腺上皮細胞（HMEC）における内在性のF3374タンパク質およびAURKBタンパク質を検出するために、0.1%プロテアーゼインヒビター混合物III（Calbiochem, San Diego, CA）を含む溶解緩衝液（50mM Tris-HCl、pH 8.0 / 150mM NaCl / 0.5%NP-40）中で細胞を溶解させた。全タンパク質の量をタンパク質アッセイキット（Bio-Rad, Hercules, CA）によって評価し、続いてタンパク質をSDS-試料緩衝液と混合して煮沸し、その後に10% SDS-PAGEゲルにロードした。電気泳動の後に、タンパク質をニトロセルロース膜（GE Healthcare）にプロットした。ブロッキング溶液（4% BlockAce ; Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd, Osaka, Japan）によるブロッキングの後に、膜にプロットしたタンパク質を、内在性F3374タンパク質またはAURKBタンパク質の検出のために、1 : 100希釈した抗F3374ポリクローナル抗体または1 : 100希釈した抗AURKBウサギポリクローナル抗体（abcam, Cambridge, UK）と一緒にインキュベートした。最後に膜をHRP結合-二次抗体と一緒にインキュベートし、タンパク質バンドをECL検出試薬（GE Healthcare）によって可視化した。添加対照として利用するために - アクチンを調べた。2030

【0434】

乳癌細胞（BT-20、HBC4、HBC5、HBL-100、MCF-7、MDA-MB-231、SKBR3、およびT47D）における内在性PBK / TOPKタンパク質を検出するために、0.1%プロテアーゼインヒビター混合物III（Calbiochem, San Diego, CA）を含む溶解緩衝液（50mM Tris-HCl、pH 8.0 / 150mM NaCl / 0.5%NP-40）中で細胞を溶解させた。均質化の後に、細胞溶解物を氷上で30分間インキュベートし、上清のみを細胞片から分離するために14,000rpmで15分間遠心分離した。全タンパク質の量をタンパク質アッセイキット（Bio-Rad, Hercules, CA）によって評価し、続いてタンパク質をSDS-試料緩衝液と混合して煮沸し、その後に10% SDS-PAGEゲルにロードした。電気泳動の後に、タンパク質をニトロセルロース膜（GE Healthcare）にプロットした。タンパク質がプロットされた膜をブロッキング溶液を用いてブロックし、内在性PBK / TOPKタンパク質の検出のために抗PBK / TOPKモノクローナル抗体（BD Biosciences）と一緒にインキュベートした。最後に膜をHRP結合二次抗体と一緒にインキュベートし、タンパク質バンドをECL検出試薬（GE Healthcare）によって可視化した。添加対照として利用するために - アクチンを調べた。40

【0435】

野生型およびキナーゼ-デッド型のPBK / TOPKタンパク質を、pCAGGS-nHA発現ベクターを

50

用いたT47D細胞へのトランスフェクションによって外因的に発現させた。全細胞溶解物をトランスフェクションから48時間後に収集した。細胞は上記のように細胞溶解緩衝液中で溶解させた。以下の手順は、抗HAラット高親和性抗体 (Roche) を抗体反応のために用いた点を除き、上記と同じである。さらに、活性化PBK / TOPKタンパク質を内在的に検出するため、T47D細胞を100nMのオカダ酸 (OA) (Calbiochem) または0.3 μg / mLのノコダゾール (Sigma-Aldrich) でそれぞれ6時間または18時間処理し、その後に収集した (本文参照)。以下の手順も上記の通りに行った。リン酸化タンパク質は、1Uの プロテインホスファターゼ (New England Biolabs, Ipswich, MA) による30 °Cでの2時間の処理によつて確かめた。

【0436】

10

(10) ホスファターゼアッセイ

乳癌細胞におけるF3374タンパク質のリン酸化状態について調べるために、本発明者らは、T47D細胞からの細胞抽出物を - ホスファターゼ (New England Biolabs, Beverly, MA) で処理した。細胞をNP-40溶解緩衝液 (50mM Tris-HCl (pH8.0)、150mM NaCl、0.5% NP-40) により溶解させ、細胞溶解物を、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.1 mM Na2EDTA、5 mMジチオトレイトール、2 mM MgCl₂、および0.01% Brij-35を含むホスファターゼ緩衝液中にて、400単位のプロテインホスファターゼ (New England Biolabs) により30 °Cで2時間処理した。さらに、F7433タンパク質のリン酸化部位を明確にするために、HEK293T細胞を10cmディッシュ当たり 2×10^6 個として播いた。24時間後に、本発明者らは、FuGENE 6トランスクレクション試薬 (Roche) を製造元の指示に従って用いて、8 μgのpCAGGS-F3374-

20

1-HA、2、および3をHEK293T細胞に一過性にトランスクレクトした。細胞をNP-40緩衝液 (0.5% NP-40、150mM NaCl、50mM Tris-HCl (pH7.5))、50 mM Tris-HCl、pH 7.5、0.1 mM Na2EDTA、5 mMジチオトレイトール、2 mM MgCl₂、および0.01% Brij-35を含むホスファターゼ緩衝液によって溶解させた。トランスクレクションから48時間後に、細胞をNP-40溶解緩衝液によって溶解させた。続いて、溶解された細胞を、400単位のプロテインホスファターゼ (P0753S New England Biolabs) により30 °Cで2時間処理した。

【0437】

30

PBK / TOPKタンパク質のリン酸化について調べるために、10ngの活性PBK / TOPKタンパク質、ならびに15 μgおよびすべての有糸分裂細胞溶解物を、2単位の PPアーゼおよびPP1組換えタンパク質と一緒に製造元の指示に従ってインキュベートした。30 °Cでの2時間のインキュベーションの後に、SDS-試料緩衝液の添加および煮沸によって反応を終了させた。最後に、上記の通りにタンパク質試料の電気泳動およびイムノプロットを行った。

【0438】

(11) A7322、F3374V1、またはPBK / TOPK特異的なsiRNA発現ベクターの構築

本発明者らは、以前の記載の通りに (Taniuchi K et al. Cancer Res., 65: 105-112. 2005) psiU6BX3.0 siRNA発現ベクターを用いる、ベクターに基づくRNAi (RNA干渉) 発現系を樹立した。A7322 (psiU6BX3.0-A7322)、F3374V1 (psiU6BX3.0-F3374V1)、EGFP (psiU6BX3.0-EGFP)、スクランブル (Scramble) (psiU6BX3.0-SCR)、およびモック (Mock) (psiU6BX3.0-モック) に対するsiRNA発現ベクターを、psiU6BX3.0ベクターのBbsI部位への二本鎖オリゴヌクレオチドのクローニングによって調製した。siRNAのための合成オリゴヌクレオチドの標的配列は以下の通りとした：

40

A7322に対して、

si-#2; 5' -AAGAAAGCATCGCAGTCTCAG-3' (SEQ ID NO : 34)、

si-#3; 5' -AAGATGCGTTCTCTGCCACAC-3' (SEQ ID NO : 35) および

si-#m3; 5' -AATATTCGATCTCTGCCACAC-3' (SEQ ID NO : 36) (下線部は、si-#3に対するミスマッチ配列を表す)；

F3374に対して、

si-#1; 5' -GATCATGTCTCCGAGAAAA-3' (SEQ ID NO : 37)、

si-#4; 5' -GGAAGCCATAGAATTGCTC-3' (SEQ ID NO : 38)；

PBK / TOPKに対して、

50

si-#2; 5' -CTGGATGAATCATACCAGA-3' (SEQ ID NO : 39)、
si-#3; 5' -GTGTGGCTTGCCTAAATAA-3' (SEQ ID NO : 40)；

対照に対して、

si-スクランブル; 5' -GCGCGCTTGAGGATTG-3' (SEQ ID NO : 41) および
si-EGFP; 5' -GAAGCAGCACGACTTCTTC-3' (SEQ ID NO : 42)。

構築物はすべてDNA配列決定によっても確認した。

【0439】

p97に対するsiRNAにおける細胞増殖の影響について、T47D細胞を60mmディッシュ当たり 1×10^5 個として播いた。インキュベーションの2日後に、Lipofectamine RNAiMAX試薬を製造元の指示に従って用いて、細胞に各100pmolのsi-EGFPおよびsi-p97のsiRNA二重鎖 (5' -AAGUAGGGUAUGAUGACAUUG-3' : SEQ ID NO : 121 ; Wojcik C et al., J Cell Sci 117; 281-292 (2004)) をトランスフェクトした。siRNAによるトランスフェクションから2日後に、細胞形態を位相差顕微鏡検査によって観察した。続いて細胞を収集し、等量の全タンパク質を、抗TOPKモノクローナル抗体 (1 : 3,000)、抗-アクチンモノクローナル抗体 (1 : 10,000) を用いてイムノプロットした。

【0440】

(表1)

			SEQ ID No.
A7322	#2	F	5'-CACCAAGAAAGCATCGCAGTCTCAGTTCAAGAGACTTC AAGAGACTGAGACTGCATGCAGTCTCAGTCT-3' 43 20
		R	5'-AAAAAAAGAAAGCATCGCAGTCTCAGTCT-3' CTTGAAC TGAGACTGCATGCAGTCT-3' 44
		ヘアピン	AAGAAAGCATCGCAGTCTCAGTTCAAGAGACT GAGACTGCATGCAGTCT-3' 45
		F	5'-CACCAAGATGCCTCTGCCACACTTC AAGAGAGTGTGGCAGAGAACGCATCTT-3' 46
		R	5'-AAAAAAAGATGCCCTCTGCCACACTCT CTTGAAGTGTGGCAGAGAACGCATCTT-3' 47
	#3	ヘアピン	AAGATGCCCTCTGCCACACTCAAGAGAGT GTGGCAGAGAACGCATCTT 48
		F	5'-CACCGATCATGCTCCGAGAAAATTC AAGAGATTTCTCGGAGACATGATC-3' 49
		R	5'-AAAAGATCATGCTCCGAGAAAATCT CTTGAATTTCTCGGAGACATGATC-3' 50 30
		ヘアピン	GATCATGCTCCGAGAAAATTCAAGAGATTTCT TCGGAGACATGATC 51
		F	5'-CACCGGAAGCCATAGAATTGCTCTTC AAGAGAGAGCAATTCTATGGCTTCC-3' 52
F3374	#4	R	5'-AAAAGGAAGCCATAGAATTGCTCTTC CTTGAAGAGCAATTCTATGGCTTCC-3' 53
		ヘアピン	GGAAGCCATAGAATTGCTCTCAAGAGAGAGC AATTCTATGGCTTCC 54
		F	5'-CACCTGGATGAATC ATACCAGATT AAGAGATCTGGATGATTATCCAG-3' 55
		R	5'-AAA ACTGGATGAATC ATACCAGATCTC TTGAATCTGGATGATTATCCAG-3' 56 40
		ヘアピン	CTGGATGAATC ATACCAGATTCAAGAGAGATCTGG TATGATTCAATCCAG 57
	#2	F	5'-CACCGTGTGGCTTGCCTAAATAATTCAA GAGATTATTACGCAAGCCACAC-3' 58
		R	5'-AAAAGTGTGGCTTGCCTAAATAATTCTT GAATTATTACGCAAGCCACAC-3' 59
		ヘアピン	GTGTGGCTTGCCTAAATAATTCAAGAGATTATT ACGCAAGCCACAC 60

【0441】

(12) A7322、F3374V1、AURKB、またはPBK / TOPKの遺伝子サイレンシング効果

ヒト乳癌細胞株BT-549およびBT-474 (A7322の場合)ならびにT47DおよびHBC4 (F3374の場合)を、10cmディッシュ (2×10^6 個 / ディッシュ)にプレーティングし、上記の通りにFuGENE6試薬 (Roche)を用いて、各8μgのpsiU6BX3.0-モック (挿入を伴わない)、psiU6BX3.0-A7322 (#2、#3、および#3の中に3塩基の置換を含むミスマッチ構築物 (m#3))、psiU6BX3.0-F3374V1 (#1および#4)、psiU6BX3.0-EGFP、psiU6BX3.0-SCRをトランスフェクトした。本発明者らは、psiU6BX3.0が導入されたBT-549、BT-474、T47D、およびHBC4を、0.2mg / mlまたは1mg / mlのネオマイシン (ジェネティシン, Gibco BRL, Carlsbad, CA)のそれぞれを含む培地を用いて選択した。ジェネティシン (geneticine)処理から48時間後に、細胞をコロニー形成アッセイ (細胞 2×10^6 個 / 10cmディッシュ)、RT-PCR (細胞 2×10^6 個 / 10cmディッシュ)、およびMTTアッセイ (細胞 2×10^5 個 / ウェル)のために再び播いた。siRNAの効果を評価するために、ネオマイシンとの4日間のインキュベーションの時点で全RNAを細胞から抽出し、続いてsiRNAのノックダウン効果を、以下の特異的なプライマーセットを用いる半定量的RT-PCRによって調べた：

内部対照としての 2MGに対して、

5' -AACTTAGAGGTGGGAGCAG-3' (SEQ ID NO: 1) および
5' -CACAAACCATGCCCTACTTTATC-3' (SEQ ID NO: 2) ; ならびに

A7322に対して、

5' -GCCCTTGAAGCCAATATTCC-3' (SEQ ID NO: 61) および
5' -AGATGGTTTCAGTGGGCTTG-3' (SEQ ID NO: 62) ;

F3374V1に対して、

5' -GCAATCTGCTATGTCAGCCAAC-3' (SEQ ID NO: 19) および
5' -CAGGATCAGCTAAAGTCTGACA-3' (SEQ ID NO: 20)。

【0442】

siRNAを発現するトランスフェクタントを、ネオマイシンを含む選択培地中で4週間増殖させ、続いて4%パラホルムアルデヒドで15分間固定した後に、コロニー数を評価するためにギムザ溶液 (Merck, Whitehouse Station, NJ)で染色した。細胞の生存度を定量するために、トランスフェクションから4日後に細胞計数キット-8を製造元 (Wako, Osaka, Japan)の推奨に従って用いてMTTアッセイを行った。波長570nmの吸光度をMicroplate Reader 550 (Bio-Rad)で測定した。これらの実験は3回ずつ行った。

【0443】

さらに、本発明者らは、siRNAによってA7322遺伝子がノックダウンされた細胞におけるPHB2 / REAタンパク質の細胞内局在をさらに検証するために、siRNAオリゴヌクレオチド (Sigma Aldrich Japan KK, Tokyo, Japan)を、その高いトランスフェクション効率を理由として用いた。A7322またはモックを標的とする配列は以下の通りとした：

si-A7322 ; 5' -GAUGCGUUUCUCUGGCCACACUU-3' (SEQ ID NO: 63)、
siEGFP (対照) ; 5' -GCAGCACGACUUUCUCAAG-3' (SEQ ID NO: 64)。

【0444】

MCF-7細胞 (FACS分析用の10cmディッシュ中に細胞 2.5×10^5 個)に対して、それらのsiRNAを、リポフェクトアミンRNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA)を、Optimem (Invitrogen)培地中にて、製造元の指示に従って用いてトランスフェクトした。トランスフェクションから48時間後に、細胞を1μMのE2 (-エストラジオール; Sigma-Aldrich)で処理し、続いて、抗PHB2 / REAポリクローナル抗体 (abcam, Cambridge, UK)ならびに抗A7322抗体および抗ER モノクローナル抗体 (LAB VISION, Fremount, CA)を免疫細胞化学染色分析の項に従って用いて免疫細胞化学染色およびウエスタンプロット分析を行った。蛍光画像はTCS SP2 AOB5顕微鏡の下で得た。

【0445】

さらに、本発明者らは、細胞形態に対するF3374およびAURKBのノックダウン効果についてさらに検証するために、siRNAオリゴヌクレオチド (Sigma Aldrich Japan KK, Tokyo, Japan)を、その高いトランスフェクション効率を理由として用いた。各配列を標的とする配列は以下の通りとした：

10

20

30

40

50

siF3374に対して、5'-ACUCCUACGUUCUCUUAUUA-3' (SEQ ID NO: 65)、
 siAURKBに対して、5'-AAGGUGAUGGAGAAUAGCAGU-3' (SEQ ID NO: 66)、
 siEGFP(対照)に対して、5'-GCAGCACGACUUCAAG-3' (SEQ ID NO: 64)。

【0446】

T47D細胞またはHBC4細胞(FACS分析用の10cmディッシュ中に細胞 2.5×10^5 個)に対して、それらのsiRNAを、Lipofectamin RNAiMAX(Invitrogen)を、Optimem(Invitrogen)培地中にて、製造元の指示に従って用いてトランスフェクトした。トランスフェクションから48時間後に、HBC4細胞の形態学的变化を、顕微鏡検査、およびAlexa Fluor 594ファロイジン(Molecular Probe)を用いる免疫細胞化学染色分析によって調べた。

		標的配列	SEQ ID No.	10
F3374	siF3374	ACTCCTACGTTCTCTATT	67	
AURKB	siAURKB	AAGGTGATGGAGAAATAGCAGT	68	
EGFP	siEGFP	GCAGCACGACTTCTTCAG	69	

【0447】

ヒト乳癌細胞株T47DおよびBT-20を15cmディッシュ(細胞 4×10^6 個/ディッシュ)にプレーティングし、FuGENE6試薬(Roche)を製造元の指示に従って用いて、各 $16 \mu\text{g}$ のpsiU6 BX3.0-モック(挿入を伴わない)およびpsiU6BX3.0-PBK/TOPK(#2および#3、表1)をトランスフェクトした。トランスフェクションから24時間後に、細胞をコロニー形成アッセイ(細胞 2×10^6 個/10cmディッシュ)、RT-PCR(細胞 2×10^6 個/10cmディッシュ)、およびMTTアッセイ(細胞 1×10^5 個/ウェル)のために再び播いた。psiU6BX3.0が導入されたT47D細胞またはBT-20細胞を、それぞれ $0.7\text{mg}/\text{ml}$ または $0.6\text{mg}/\text{ml}$ のネオマイシン(ジェネティシン、Invitrogen, Gibco BRL, Carlsbad, CA)を含む培地を用いて選択した。培地は週2回交換した。siRNAの効果を評価するために、ネオマイシンとの11日間のインキュベーションの時点で全RNAを細胞から抽出し、続いてsiRNAのノックダウン効果を、以下の特異的なプライマーセットを用いる半定量的RT-PCRによって調べた：

内部対照としてのGAPDHに対して、

5'-ATGGAAATCCCACCATCACCATCT-3' (SEQ ID NO: 70) および
 5'-GGTTGAGCACAGGGTACTTTATT-3' (SEQ ID NO: 10)、ならびに

PBK/TOPK遺伝子に対して、

5'-GCCTTCATCATCCAAACATT-3' (SEQ ID NO: 71) および
 5'-GGCAAATATGTCTGCCTTGT-3' (SEQ ID NO: 72)。

siRNAを発現するトランスフェクタントを、ネオマイシンを含む選択培地中で3週間増殖させ、続いて4%パラホルムアルデヒドで15分間固定した後に、コロニー数を評価するためにギムザ溶液(Merck, Whitehouse Station, NJ)で染色した。細胞の生存度を定量するために、細胞計数キット-8を製造元(Wako, Osaka, Japan)の推奨に従って用いてMTTアッセイを行った。波長570nmの吸光度をMicroplate Reader 550(Bio-Rad)で測定した。これらの実験は3回ずつ行った。

【0448】

(13) pCAGGS-HAベクターを用いた短縮型F3374V1タンパク質の構築

F3374V1タンパク質のリン酸化領域を決定するために、以下のプライマーセットを用いて欠失構築物を調製した。

-1構築物に対して(第1の下線部はNotI部位を表し、第2の下線部はXhoI部位を表す)、dF3374V1-F703-NotI；

5'-AAGGAAAAAGCGGCCGCGCTGTGGATGGATAATCAAA-3' (SEQ ID NO: 73) および
 dF3374V1-R721-Xho1；

5'-CCGCTCGAGTTGATTATCCCATCCACAGC-3' (SEQ ID NO: 74)

-2構築物に対して(第1の下線部はNotI部位を表し、第2の下線部はXhoI部位を表す)、dF3374V1-F1162-NotI；

5'-AAGGAAAAAGCGGCCGCTGGCGCTTGAATAGAGGC-3' (SEQ ID NO: 75) および
 dF3374V1-R1203-Xho1；

10

20

30

40

50

5' -CCGCTCGAGATCACCTCCTGGTTCTCCTC-3' (SEQ ID NO: 76)

-3構築物に対して(第1の下線部はNotI部位を表し、第2の下線部はXhol部位を表す)、
dF3374V1-F1729-NotI;

5' -AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTGATGCCAAGTTGAAAAT-3' (SEQ ID NO: 77) および
dF3374V1-R1770-Xhol;

5' -CCGCTCGAGGCAGCACAGATCCAATGAAG-3' (SEQ ID NO: 78)。

構築物はDNA配列決定によって確認した(ABI3700, PE Applied Biosystems, Foster, CA
).

【0449】

(14) 免疫組織化学染色

10

乳癌および正常組織におけるA7322タンパク質の発現について調べるために、本発明者
らは、パラフィン包埋した乳癌組織切片(試料番号240、241、238、242、および290)、
正常乳房組織切片(試料番号453)および他の市販の正常ヒト組織(肺、心臓、および肝
臓)(BioChain)を調製した。キシレンおよびエタノールによる処理によって検体の脱パ
ラフィン処理を行い、続いて高pHの抗原回収溶液(DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark
)中での108°での15分間のオートクレーブ処理によって抗原回収のために加工処理して
、ペルオキシダーゼプロッキング試薬(DAKO Cytomation)で1時間処理した。組織切片を
、1:150に希釈した抗A7322ポリクローナル抗体と一緒に1時間インキュベートし、その後
に西洋ワサビペルオキシダーゼ結合二次抗体(DAKO Cytomation)と一緒に30分間インキ
ュベートした。特異的な免疫染色を、ペルオキシダーゼ基質(3,3'-ジアミノベンジジン
四塩酸塩)(DAKO液体DAB+色素原; DAKO Cytomation)を用いて可視化した。最後に、核
を細胞質から識別するためにヘマトキシリンによって組織検体を染色した。

20

【0450】

乳癌および正常ヒト組織におけるF3374V1タンパク質の発現パターンを、以前に記載し
た通りの手順に従って調べた(Togashi A et al., Cancer Res 2005, 65: 4817-26)。乳
癌(10005T、10317T、10069T、10571T、10164T、および10185T)、正常乳房組織(10441N
)、および正常ヒト組織(肺、心臓、肝臓、腎臓、結腸、膀胱、骨格筋、小腸、および精
巣)のパラフィン包埋検体のスライドを、パラフィンを除去するためにキシレンおよびエ
タノールで処理した。抗原回収は高pHの標的回収溶液(DAKO, Carpinteria, CA)中でオ
ートクレーブにより121°で15分間かけて行った。F3374を検出するためにENVISION+ Kit
/ HRP(DakoCytomation, Kyoto, Japan)を用いた; 内在性のペルオキシダーゼおよびタ
ンパク質をブロックする反応の後に、アフィニティー精製したウサギ抗F3374 pAbを一次
抗体として1:50希釈で添加し、混合物をHRP標識抗ウサギIgGで処理した。最後に、基質-
色素原を添加し、核を細胞質から識別するために組織検体をヘマトキシリンで対比染色し
た。

30

【0451】

乳癌および正常組織におけるPBK/TOPKタンパク質の発現パターンについて、抗PBK/T
OPKマウスモノクローナル抗体(BD Biosciences)を用いて、以前の記載の通りに調べた
(Togashi A et al., Cancer Res 2005, 65: 4817-26)。正常臓器を調べるために、心臓、
肺、肝臓、腎臓、および精巣の市販の組織切片(Biochain)を購入した。具体的には、パ
ラフィン包埋検体をキシレンおよびエタノールで処理し、タンパク質-ブロッキング試薬
(Dako Cytomation, Carpinteria, CA)でブロックした。抗体希釈溶液(1:50)中にあ
るモノクローナル抗体を添加し、続いて基質-色素原(DAKO液体DAB色素原、DakoCytomat
ion)で染色した。最後に、核を細胞質から識別するために組織検体をヘマトキシリンで染
色した。

40

【0452】

(15) 蛍光活性化細胞選別(FACS)分析

上記に示した通りにsiRNA実験を行ったBT-474乳癌細胞を、1.0mg/mlのネオマイシンを
含む選択培地中の2日間のインキュベーション後に収集した。細胞を収集して冷70%エ
タノールで固定し、使用時まで4°で維持した。細胞を、PBS(-)中10mg/mlのRNアーゼI

50

と一緒に37℃で30分間インキュベートし、50 μgのヨウ化プロピジウム(PI)により室温で30分間染色した。フローサイトメーター(FACS calibur; Becton Dickinson, San Diego, CA)によって、細胞懸濁液をDNA含有量に関して分析した。データはCELLQuestソフトウェア(BD Biosciences)によって解析した。アッセイは独立に3回ずつ行った。

【0453】

培養したT47D乳癌細胞を2 μg/mlのアフィディコリン(Sigma-Aldrich)により24時間処理することにより、それらの細胞周期を同調させた。その後に、細胞をPBS(-)で5回洗浄し、細胞周期停止から解除するために新たな培地を添加した。細胞周期停止からの解除の後に細胞を収集し、70%エタノールで固定した上で、使用時まで4週間に保った。細胞をPBS(-)中10mg/mlのRNアーゼIと一緒に37℃で30分間インキュベートし、50 μgのヨウ化プロピジウム(PI)により室温で30分間染色した。各時点では細胞懸濁液をFACscan(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)により分析した。さらに、内在性F3374タンパク質の発現レベルを調べるために、本発明者らは、3時間毎に収集した細胞について、ウエスタンプロット分析の項に記載したように抗F3374ポリクローナル抗体を用いてウエスタンプロット法を行った。10

【0454】

PBK / TOPKに関しては、培養T47D乳癌細胞の細胞周期を、アフィディコリン(Sigma-Aldrich)による16時間の処理によって同調させ、PBS(-)で5回洗浄して、細胞周期停止から解除するために新たな培地を添加した。解除から15時間にわたって(3時間毎に)、細胞を収集し、70%エタノールで固定した上で、使用時まで4週間に保った。細胞をPBS(-)中10mg/mlのRNアーゼIと一緒に37℃で30分間インキュベートし、50 μgのヨウ化プロピジウムにより室温で30分間染色した。各時点では細胞懸濁液をFACscan(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)により分析した。20

【0455】

G2/Mで停止した細胞を収集するためには、収集前の最終16時間にかけて培地を0.3 μg/mlのノコダゾール(Sigma-Aldrich)で処理した。

【0456】

(16) 免疫共沈降およびイムノプロット分析

A7322タンパク質の相互作用タンパク質を同定するために、BT-549ヒト乳癌細胞を15cmディッシュにプレーティングし(細胞1×10⁷個/ディッシュ)、FuGENE6試薬(Roche)を製造元の指示に従って用いて、20 μgのpCAGGSnH3F-モック(挿入を伴わない)およびpCAGGSnH3F-A7322をそれぞれトランスフェクトした。本発明者らは、各構築物について6枚のディッシュをトランスフェクトした。48時間後に、ウエスタンプロット分析の項に記載した通りに細胞を0.1%NP-40溶解緩衝液で溶解させた。細胞溶解物を、正常マウスIgGおよびrec-プロテインGセファロース4B(Zymed, San Francisco, CA)により4℃で1時間かけて予めクリーニングした。その後に、溶解物を抗FLAG M2アガロース(Sigma-Aldrich)と一緒に4℃で一晩インキュベートした。溶解緩衝液で5回洗浄した後に、ビーズ上のタンパク質をSDS-試料緩衝液で5分間煮沸することによって溶出させた。溶出したタンパク質試料を、NuPAGE 4~12% Bis-Trisゲル(Invitrogen)を用いるSDS-PAGEによって分離した。ポリアクリルアミドゲル中のタンパク質を、SilverQuest銀染色キット(Invitrogen)により、製造元の指示に従って銀染色した。モックおよびA7322をトランスフェクトしたレーンの間で差異のあるバンドをきれいな鋭いメスで切り出し、MALDI TOF-MSを用いるPMF(Peptide Mass Fingerprint)分析を行った(Shimadzu Biotech, Tsukuba, Japan)。40

【0457】

COS-7細胞に対して、pCAGGSn3FC-A7322、pCAGGSnHC-PHB2/REAを個別に、または両方と一緒に、一過性にトランスフェクトした。トランスフェクションから48時間後に、ウエスタンプロット分析の項に記載した通りに、細胞を0.1%NP-40溶解緩衝液で溶解させた。細胞溶解物を4℃で1時間かけて予めクリーニングし、その後に抗FLAG M2アガロース(Sigma-Aldrich)またはモノクローナル抗HAアガロース結合物(Sigma-Aldrich)と一緒に4℃で一晩インキュベートした。以前に記載した通りに、ビーズを洗浄してタンパク質を溶出50

させた。最後に、本発明者らは、外因性に発現されたPHB2 / REAタンパク質またはA7322タンパク質を検出するために、それぞれ抗HA高親和性（3F10）ラットモノクローナル抗体（Roche）または抗FLAG M2モノクローナル抗体（Sigma-Aldrich）を用いるウエスタンプロット分析を行った。

【0458】

HEK293T細胞を5枚のディッシュにプレーティングして（細胞 8×10^6 個 / 15cmディッシュ）、F3374（pCAGGSn-F3374-HA）およびAURKB（pCAGGSn-AURKB-3F）を発現する8μgのプラスミドをコトランスフェクトした。pCAGGSn-AURKB-3Fプラスミドは以前に調製した（未発表データ；Daigo Y and Nakamura Y）。トランスフェクションから48時間後に、プロテアーゼインヒビター（Calbiochem）の存在下で、細胞を免疫沈降緩衝液（50mM Tris-HCL（pH 7.5）、150mM NaCl、0.5% NP-40、50mM NaF、1mM NaVO3、および1mMジチオトレイトール）によって溶解させた。細胞溶解物を、200μlのプロテインG-アガロースビーズ（Zymed Laboratories, South San Francisco, CA）中で3.75μgの正常マウスIgGと一緒に4で3時間インキュベートすることにより、予めクリーニングした。14,000rpm、4で1分間遠心分離した後に、上清を30μgの抗Flag M2またはマウス正常IgGと一緒に4で1時間インキュベートし、続いて100μlのプロテインG-アガロースビーズを添加した。14,000rpmで1分間の遠心分離によって各試料からビーズを収集して、1mlの免疫沈降緩衝液で5回洗浄した後に、それらを30μlのLaemmli試料緩衝液によって溶出させて5分間煮沸した。タンパク質を8% SDS-PAGEゲル（Bio-Rad）上で分離した。電気泳動の後に、ウエスタン-プロット分析の項に記載した方法に従って、タンパク質をウエスタン-プロット分析により検出した。10

【0459】

内在性F3374V1タンパク質とAURKBタンパク質との相互作用について調べるために、T47D細胞を 6×10^6 個 / 15cmディッシュとして播いた。2日後に、プロテアーゼインヒビター（Calbiochem）の存在下で、細胞を、免疫沈降緩衝液（50mM Tris-HCL（pH 7.5）、150mM NaCl、0.5% NP-40、50mM NaF、1mM NaVO3、および1mM DTT）中で溶解させた。細胞溶解物を、750μlのプロテインG-アガロースビーズ中で7.5μgの正常マウスIgGと一緒に4で3時間インキュベートすることにより、予めクリーニングした。上清を30μgの抗F3374V1抗体またはウサギ正常IgGと一緒に4で1時間インキュベートし、続いて100μlのプロテインG-アガロースビーズを添加した。14,000rpmで1分間の遠心分離によって各試料からビーズを収集して、1mlの免疫沈降緩衝液で5回洗浄した後に、それらを30μlのLaemmli試料緩衝液によって溶出させて5分間煮沸した。タンパク質を8% SDS-PAGEゲル（Bio-Rad）上で分離した。電気泳動の後に、ウエスタン-プロット分析の項に記載した方法に従って、タンパク質をウエスタン-プロット分析によって検出した。20

【0460】

PBK / TOPK（WT、T9A、KD、T9A / KD）、p47、p97、またはPP1 タンパク質の発現を検出するため、以前の報告に従ってイムノプロット法を行った（Park et al., 2006）。簡潔には、細胞を溶解緩衝液（50mM Tris-HCl、pH 8.0 / 150mM NaCl / 0.5% NP-40）によって溶解させ、その後に均質化および氷上での30分間のインキュベーションを行い、遠心分離によって可溶性画分のみを細胞片から分離した。SDS-PAGE（ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動）後に、タンパク質をニトロセルロース膜（GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom）にプロットし、対応する抗体と一緒にインキュベートして、ECL検出キットを（GE Healthcare）を用いて可視化した。有糸分裂細胞を収集するために、本発明者らは、以前に記載された「有糸分裂シェイクオフ（mitotic shake-off）」法を用いた（Dechat T et al., EMBO J 17: 4887-902 (1998)）。p97 / VCP-myc-6xHisタンパク質を沈降させるために抗6xHis抗体（Santa Cruz Biotechnology）を用いた点を除き、FuGene6試薬（Roche）を以前の記載の通りに用いて（Shimo A et al., Cancer Sci 98: 174-81 (2007)）、COS-7細胞に対する関心対象の上記の構築物によるコトランスフェクションの後に、タンパク質-タンパク質相互作用を、免疫沈降によって調べた。溶解緩衝液で5回洗浄した後に、上記の通りに免疫複合体をSDS-PAGEゲルにロードしてイ40

ムノプロットを行った。

【0461】

(17) インビトロおよびインビボでのキナーゼアッセイ

AURKBによるF3374V1リン酸化について調べるために、本発明者らは、F3374のC末端組換えタンパク質(437~730アミノ酸)およびAURKBの完全長組換えタンパク質(Upstate, Temecula, CA)を用いてインビトロキナーゼアッセイを行った。F3374組換えタンパク質の調製は、抗F3374ポリクローナル抗体の作製の項に記載した手順に従って行った。簡潔には、1μgのAURKBを20μlのキナーゼアッセイ緩衝液(50mM Tris-HCl(pH 7.5)、10mM MgCl₂、2mMジチオトレイトル、1mM EGTA、0.01%Brij35、500μM ATP)中でインキュベートし、続いて5μCiの[³²P-]ATP(GE Healthcare)を加えた。基質に関しては、本発明者らは、1μgのF3374組換えタンパク質を反応溶液に添加した。30°での10分間のインキュベーション後に、SDS試料緩衝液の添加によって反応を終了させた。煮沸した後に、タンパク質試料を10% SDSゲル上で電気泳動し、続いてオートラジオグラフィーを行った。
。

【0462】

PBK / TOPKのキナーゼ活性を評価するために、完全長組換えPBK / TOPKタンパク質(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いてインビトロキナーゼアッセイを行った。具体的には、1μgのPBK / TOPKタンパク質を30μlのキナーゼアッセイ緩衝液(50mM Tris-HCl、pH 7.5/150mM NaCl/10mM MgCl₂/10mM NaF/1mM Na₃V0₄/1mM EDTA/1mM DTT/50μM ATP)中でインキュベートし、続いて5μCiの(³²P-)ATP(GE Healthcare)を加えた。基質として、5μgのヒストン混合物または2.5μgのヒストンH3(Roche)を反応溶液に添加した。30°での30分間のインキュベーション後に、SDS-試料緩衝液の添加によって反応を終了させた。煮沸の後に、タンパク質試料を10~20%勾配ゲル(Bio-Rad)上で電気泳動し、続いてオートラジオグラフィーを行った。ヒストンH3(Ser10)がPBK / TOPKによってリン酸化されたか否かをさらに調べるために、野生型タンパク質およびキナーゼ-デッド変異体(K64-65A)をT47D細胞にトランスフェクトした。48時間の培養の後に、PBK / TOPKタンパク質を活性化するために、細胞を100nMのOAで6時間処理した。H3タンパク質の総量およびそのリン酸化のレベルを、それぞれ抗ヒストンH3抗体(Abcam, Cambridge, UK)および抗ホスホ-H3(Ser10)抗体(Cell Signaling Technologies)を用いて調べた。

【0463】

インビトロキナーゼアッセイに関しては、大腸菌発現系によって生成された0.5μgの不活性組換えPBK / TOPKタンパク質を、5μCiの³²P-ATP(GE Healthcare)を加えた30μlの反応緩衝液(50mMのTris-HCl、pH 7.5/10mMのMgCl₂/2mMのジチオトレイトル/1mMのEGTA/0.01%のBrij 35/50μMの非放射性ATP)中で、0.5単位のCDK1-サイクリンB1(New England Biolabs)と一緒にインキュベートした。30°での30分間のインキュベーション後に、反応をSDS-試料緩衝液の添加によって終了させた。煮沸後に、タンパク質試料の電気泳動およびオートラジオグラフィーを行った。

【0464】

p97がPBK / TOPKキナーゼの基質であることを調べるために、本発明者らはインビトロキナーゼアッセイを行った。手短に述べると、沈降させたp97タンパク質を、上記の手順に従って1μgの組換えTOPKタンパク質と反応させた。

【0465】

(18) エストロゲン非含有条件下での細胞培養およびトランスフェクション

MCF-7細胞またはSK-BR-3細胞を以下の培地で培養した; minisart-plus(Sartorius AG, Goettingen, Germany)で濾過した、10%FBS(Cansera International)および1%抗生素/抗真菌薬溶液(Sigma-Aldrich)を加えた、それぞれフェノールレッド非含有D-MEM/F-12またはRPMI-1640(Invitrogen)。細胞は5%CO₂を含む加湿空気雰囲気中で37°に維持した。トランスフェクションは、フェノールレッド非含有Opti-MEM(Invitrogen)を製造元の指示に従って用い、FuGENE6トランスフェクション試薬(Roche)を用いて行った。トランスフェクションから24時間後に、培地を1μMのE2(-エストラジオール; Sigma

10

20

30

40

50

-Aldrich) を含むフェノールレッド非含有Opti-MEMに交換して、さらに24時間インキュベートした。免疫細胞化学染色は、それぞれ1:500に希釈した抗HA高親和性(3F10)ラットモノクローナル抗体(Roche)および抗FLAGウサギポリクローナル抗体(Sigma-Aldrich)、ならびにそれぞれ1:1000に希釈したAlexa 488-結合抗ラットマウス二次抗体およびAlexa 594-結合抗ウサギまたは抗ラット二次抗体(Molecular Probe, Eugene, OR)を用いて行った。

【0466】

(19) エストロゲン応答性エレメント(ERE)レポーター遺伝子アッセイ

EREレポーター遺伝子構築物プラスミドおよび蛍光SEAPアッセイキットは、Clontech(Takara, Kyoto, Japan)から購入した。MCF-7(ER+)細胞またはSK-BR-3(ER-)細胞に対して、FUGENEトランスフェクション試薬(Roche)を用いて、FLAGタグ付加A7322(FLAG-A7322)構築物とエストロゲン応答性レポーター遺伝子(pERE-TA-SEAP)構築物、またはモック対照とpERE-TA-SEAPレポーター構築物のそれぞれを同時にトランスフェクトした。トランスフェクションから48時間後に、細胞を1μMのE2(-エストラジオール;Sigma-Aldrich)で処理して、SEAPアッセイおよびウエスタンプロット分析のためにそれぞれさらに48時間および72時間インキュベートした。SEAPアッセイキット(Clontech)を供給元の推薦に従って用いて、SEAPレポーターアッセイを行った。

【0467】

(20) 統計学的分析

統計学的有意性は、Statview 5.0ソフトウェア(SAS Institute, Cary, NC)を用いて、スチュードントt検定によって算出した。P<0.05の差を統計学的に有意とみなした。

【0468】

(21) タンパク質、構築物、抗体、および試薬

活性組換えPBK/TOPKタンパク質はInvitrogen(Carlsbad, CA)から購入し、ヒストンH3およびプロテインホスファターゼ1-(PP1)の組換えタンパク質はUpstate Biotechnology(Lake Placid, NY)から購入した。サイクリン依存性キナーゼ-1(CDK1キナーゼ)(cdc2/サイクリンB1)およびプロテインホスファターゼ(PPアーゼ)は、New England Biolabs(Ipswich, MA)から購入した。グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)タグ付加PBK/TOPK(GST-PBK/TOPK)タンパク質は、以前の報告(Lin et al., 2007)に従って、大腸菌で発現させ、グルタチオンセファロース4Bビーズ(GE Heath care, Buckinghamshire, United Kingdom)によって精製した。N末端HAタグ付加PBK/HAPBKTOPK)、N末端GSTタグ付加PP1(GST-PP1)、およびC末端GSTタグ付加p47(p47-GST)タンパク質は、それぞれpCAGGSnHA、pCAGGS-nGST、およびpCAGGS-cGST発現ベクターを用い、以前の報告(Park et al., 2006)に従って構築した。N末端にHAタグを付加したThr9でのアラニン置換変異体(T9A)、キナーゼ-デッド(KD)変異体、および二重変異体(T9A/KD)タンパク質は、pCAGGSnHAを用いて構築した。C末端myc-6xHisタグ付加p97/VCP-myc-6xHis(p97/VCP-myc-His)も、pCDNA3.1-myc-Hisベクター(Invitrogen)を用いることによって構築した。PBK/TOPK、-アクチン、およびHAに対するモノクローナル抗体は、それぞれBD Biosciences(San Jose, CA)、Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)、およびRoche(Basel, Switzerland)から購入した。全PP1、ホスホ-PP1(T320)に対するポリクローナル抗体は、Cell Signaling Technologies(Beverly, MA)から購入し、全Rb、ホスホ-Rb(Ser807/811)、およびp97/VCPに対するものは、Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA)から購入した。オカダ酸(OA)、CDK1インヒビター(CGP74514A)、およびプロテアーゼインヒビター-カクテルIIIはCalbiochem(San Diego, CA)から購入した。

【0469】

(22) PBK/TOPK、CDK1-サイクリンB1、p47、p97、およびPP1の免疫細胞化学染色

T47D細胞を、col-1をコーティングしたガラス入りの35mmディッシュ(IWAKI)に 5×10^4 個で播種した。インキュベーションの2日後に、有糸分裂細胞を検査するために0.3μg/mlのノコダゾール(Sigma-Aldrich)でさらに18時間処理した。固定およびブロッキングの

10

20

30

40

50

後に、1:100に希釈した抗TOPKモノクローナル抗体 (BD Biosciences)、または1:300に希釈した抗CDK1-モノクローナル抗体 (BD Biosciences) およびサイクリンB1-モノクローナル抗体 (Santa Cruz) で細胞を免疫染色した。最後に、細胞を、1:1000に希釈したAlexa594 (PBK / TOPK) または488を結合させた (CDK1およびサイクリンB1) 抗マウス二次抗体 (Molecular Probe) で染色した。核は4',6'-ジアミジン-2'-フェニルインドール二塩酸 (DAPI) で対比染色した。蛍光画像は共焦点顕微鏡 (Leica) 下で得た。

【0470】

外因性に発現されたp47、p97、またはPP1 タンパク質の細胞内局在を調べるために、本発明者らは、col-1をコーティングしたガラススライド入りの6ウェルプレート (Iwaki、Tokyo, Japan) に、T47D細胞を 1×10^5 個 / ウェルで播種した。トランスフェクションから48時間後に、細胞を4%パラホルムアルデヒドを含むPBS (-) で15分間固定し、0.1% Triton X-100を含むPBS (-) により4 度2.5分間かけて透過性を与えた。その後、非特異的なハイブリダイゼーションをロックするために、細胞をPBS (-) 中の3% BSAで4 度12時間覆い、その後、PBS (-) 中の3% BSAで希釈した第1および第2の蛍光標識抗体と一緒にそれぞれ1時間ずつインキュベートした (Park et al., 2006)。
10

【0471】

(23) 細胞透過性ペプチド処理およびPBK / TOPKのThr9でのリン酸化の阻害

CDK1-サイクリンB1によるPBK / TOPKのThr9でのリン酸化を阻害するために、本発明者らは、PBK / TOPK (RRRRRRRRRRR-G-MEG1SNFKTPSKLSEKKK : SEQ ID NO : 99) のN末端 (1~18アミノ酸) と同一な透過性ペプチド (pp1-18) を設計し、Sigma-Aldrichによって合成した。PBK / TOPKのCDK1-サイクリンB1誘導性リン酸化のペプチドブロッキングの有効性を、「インピトロキナーゼ」の項に従ったインピトロキナーゼアッセイによって評価した。それぞれ0、2.5、5、10、および20 μM という様々な濃度でpp1-18ペプチドを添加した点を除き、不活性PBK / TOPKおよびCDK1-サイクリンB1の組換えタンパク質を、上述した通りにインキュベートした。PBK / TOPKタンパク質およびサイクリンB1タンパク質のリン酸化は、SDS-PAGEおよびオートラジオグラフィーによって観察した。細胞増殖アッセイのために、T47D細胞およびHMEC細胞を、12ウェルプレートにそれぞれ 1.3×10^4 個で播種した。その翌日の時点で、各濃度 (0、2.5、5、および10 μM) のpp1-18ペプチドで毎日処理し、細胞の生存度を第5日にMTTアッセイによって測定した。pp1-18ペプチドがT47D細胞の増殖を抑制する有意性を、スチュードントt検定によって統計学的に評価した。有糸分裂細胞におけるPBK / TOPKのリン酸化をpp1-18ペプチドを用いることによって阻害するために、T47D細胞を60mmディッシュに 1×10^5 個で播種した。インキュベーションの2日後、ノコダゾール (0.3 $\mu\text{g} / \text{mL}$) および透過性ペプチド (10 μM) の両方でさらに18時間または24時間処理した後に収集し、続いてPBK / TOPKのリン酸化について、抗PBK / TOPKモノクローナル抗体を用いるウエスタンプロット法およびFACS分析によって検討した。50 μM のpp1-18ペプチドで処理したT47D細胞の細胞形態を、処理から5日後に位相差顕微鏡検査によって観察した。
20
30

【0472】

(24) GSTブルダウンアッセイ

GSTタグを付加したPP1 タンパク質およびp47タンパク質を、COS-7細胞において、HAタグ付加PBK / TOPKタンパク質とともに / 伴わずに共発現させた。各細胞溶解物は以前の項に記載した通りに溶解緩衝液を用いて調製した。全タンパク質を、平衡化したグルタチオンセファロース4Bビーズ (GE Healthcare) と一緒に4 度1時間インキュベートした。溶解緩衝液で5回洗浄した後に、最終的に沈降したビーズを、SDS-PAGEのために用いるまで-20 度保存した。
40

【0473】

(25) 細胞構造の変化の観察

siRNAによるトランスフェクションの2日後に、細胞形態を位相差顕微鏡 (Olympus) によって観察した。

【0474】

RNAi-レスキュー実験では、以前の記載の通り (Zhu C et al., Proc Natl Acad Sci U

50

S A 103: 6196-201 (2006))、各siRNAによるトランスフェクションの24時間前に、T47D細胞にpCAGGS-PBK / TOPK-HA構築物をトランスフェクトした。T47D細胞は60mmディッシュに 1×10^5 個で播種した。インキュベーションの2日後に、細胞に100pmolのsi-EGFPまたはsiPBK / TOPK-#3をトランスフェクトし、細胞有糸分裂の持続時間をタイムラプス顕微鏡 (Sanyo) によって測定した。

【0475】

実施例2 A7322

(1) 乳癌において上方制御される遺伝子としてのA7322の同定

新規治療薬の標的として適用できる可能性のある分子を同定するために、本発明者らは以前に、27,648種のcDNAに相当するcDNAマイクロアレイを用いて、81例の乳癌患者の網羅的ゲノム遺伝子発現プロファイルを確立した (Nishidate T et al. Int J Oncol 2004; 25: 797-819)。上方制御される遺伝子のうち、本発明者らは、乳癌検体の大半で発現が上方制御されていたA7322に注目した。その後の半定量的RT-PCRおよびノーザンプロット分析により、A7322が乳癌検体 (図1A) ならびに乳癌細胞株 (22種のうち14種) では有意に上方制御されるが、脳を除く正常臓器では発現されないことが確かめられた (図1BおよびD)。

【0476】

図1Dに示すように、NCBIデータベースで集められたA7322のcDNA配列は、ノーザンプロット分析によるおよそ15kbの転写産物よりも短かったため、本発明者らは、完全長のA7322 mRNAを得るためにエクソンコネクションおよび5'RACE実験を行った。本発明者らは最終的に、2,177アミノ酸のタンパク質 (SEQ ID NO: 24) をコードする6534ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを含む、14,763ヌクレオチドのcDNA配列 (Genbankアクセッション番号 ; AB252196) を得た (SEQ ID NO: 23)。SMART (simple modular architecture research tool) プログラムにより、予想されるA7322タンパク質が、ゴルジを介した適切なタンパク質輸送に必要と思われるSec7ドメインをコドン586と798との間に含むことが明らかになった (Chardin P et al. Nature 1996; 384: 481-4; Jackson CL et al. Trends Cell Biol 2000; 10: 60-7; Shin HW et al. J Biochem (Tokyo) 2004; 136: 761-7)。

【0477】

A7322の外来発現について調べるために、本発明者らはBT549乳癌細胞にA7322発現ベクターをトランスフェクトし、続いてトランスフェクションから24時間後にウエスタンプロット分析を行った。図1Gは、トランスフェクションから24時間後にBT549でおよそ250kDaのA7322が検出されたことを示している。

【0478】

(2) A7322の免疫細胞化学分析および免疫組織化学分析

内在性A7322タンパク質について検討するために、本発明者らは抗A7322ポリクローナル抗体を作製した (「(6) 抗A7322ポリクローナル抗体および抗F3374ポリクローナル抗体の作製」の項を参照)。本発明者らはまず、精製A7322-ポリクローナル抗体が、乳癌細胞株SK-BR-3において、非特異的バンドを全く生じることなく、およそ250kDaの内在性A7322タンパク質を認識し得ることを確認した (図2A)。本発明者らは、SK-BR-3乳癌細胞を用いて、抗A7322ポリクローナル抗体による免疫細胞化学染色分析を行い、この抗体が、細胞質中の内在性A7322タンパク質の強いシグナルを検出し得ることを見いだした (図2B)。本発明者らは、MitoTrackerまたは抗ゴルジモノクローナル抗体を用いて、ミトコンドリアまたはゴルジ装置を対比染色したが、A7322はこれらのオルガネラのいずれとも共局在しなかった (図2Cおよび2D)。

【0479】

さらに、本発明者らは、乳癌および正常組織切片を用いた免疫組織化学染色実験も行った。本発明者らは、乳癌の2種類の異なる組織学的サブタイプである2例の乳頭腺管癌および3例の充実腺管癌において細胞質中に強い染色を観察した (図2E)。しかし、正常乳管 (図2E) でも、心臓、肺、および肝臓でも、染色は観察されなかった (図2E)。

【 0 4 8 0 】**(3) A7322に対するsiRNAの増殖阻害効果**

A7322の増殖促進の上での役割を評価するために、本発明者らは、A7322の過剰発現が示されている乳癌細胞株BT-549およびBT-474における内在性A7322の発現を、哺乳動物ベクターを利用したRNA干渉（RNAi）法によってノックダウンした（「(11) A7322、F3374V1、またはPBK / TOPK特異的なsiRNA発現ベクターの構築」および「(12) A7322、F3374V1、AURKB、またはPBK / TOPKの遺伝子サイレンシング効果」の項を参照）。

【 0 4 8 1 】

本発明者らは、A7322の発現レベルを半定量的RT-PCR分析によって調べた。A7322特異的siRNA（si-#2およびsi-#3）は、対照siRNA構築物、psiU6BX- モック（モック）に比して、各遺伝子の発現を有意に抑制した（図5A、D、およびG）。A7322特異的siRNAによる細胞増殖阻害を確かめるために、本発明者らはコロニー形成アッセイ（図5CおよびF）およびMTTアッセイ（図5B、E、およびH）をそれぞれ行った。本発明者らはまた、si-#3の中に3bpの置換を含むsiRNAを作製し（si-A7322-ミスマッチ（m#3）、「材料および方法」の項を参照）、これがA7322の発現に対してもBT-549細胞およびBT-474細胞の増殖に対しても抑制効果を有しないことを見いし（図5D、E、F、G、およびH）、このことによりこのsi-#2構築物がA7322に対する特異的なノックダウン効果を有することが示唆された。si-#2およびsi-#3構築物の導入は、発現低下という上記の結果に一致して、BT-549細胞およびBT-474細胞の増殖を抑制した。それぞれの結果は独立した3回の実験によって実証された。これらの知見は、A7322が乳癌細胞の細胞増殖において重要な機能を有することを示唆している。10

【 0 4 8 2 】

さらに、A7322の除去がコロニー数および細胞生存度の有意な低下をもたらしたことから、本発明者らはアポトーシスの関与について調べた。本発明者らは、蛍光活性化細胞選別（FACS）分析を行い、アポトーシス細胞集団の割合を測定した。その結果、モックに比してsi-#3によるアポトーシス（サブG1）細胞の集団の有意な増加が示され（図5I）、このことからA7322発現の阻害がアポトーシスを誘導したことが示された。20

【 0 4 8 3 】**(4) A7322の相互作用タンパク質としてのPHB2 / REAの同定**

A7322の生物機能が全く不明であることから、本発明者らは、乳癌細胞におけるA7322タンパク質の生物機能について検討するために、A7322と相互作用するタンパク質を免疫沈降および質量分析によって探索した（「(16) 免疫共沈降およびイムノプロット分析」の項を参照）。pCAGGSnH3F-A7322ベクターまたはpCAGGSnH3F- モック（モック対照）をトランسفエクトしたBT-549細胞の溶解物を抽出して、抗FLAG M2モノクローナル抗体により免疫沈降させた（「(16) 免疫共沈降およびイムノプロット分析」の項を参照）。タンパク質複合体をSDS-PAGEゲル上で銀染色した。FLAGタグ付加A7322プラスミドをトランسفエクトした細胞溶解物の免疫沈降物中には認められるが、モック対照プラスミドによるものでは認められないおよそ30kDaのタンパク質を抽出し、そのペプチド配列を質量分析によって決定した（図8A）。このアプローチにより、プロヒビチン2 / エストロゲン受容体活性レプレッサー（PHB2 / REA）が、A7322との相互作用タンパク質の候補として同定された（図8A）。その後の半定量的RT-PCRにより、調べた10例の乳癌臨床試料のうち9例および22種の乳癌細胞株のうち16種において、PHB2 / REAの発現がA7322の発現と同様であることが確認された（図8B）。A7322タンパク質とPHB2 / REAタンパク質との相互作用について検討するために、本発明者らは、FLAGタグ付加A7322（A7322-FLAG）およびHAタグ付加PHB2 / REA（PHB2 / REA-HA）を発現するように設計したプラスミドを構築した（「(5) 発現ベクターの構築」の項を参照）。これらのプラスミドをCOS-7細胞に同時にトランسفエクトし、続いてタンパク質を抗FLAG抗体により免疫沈降させた。抗HA抗体を用いた沈降物のイムノプロット法により、A7322-FLAGがPHB2 / REA-HAと共に沈することが示された（図8C；左パネル）。その反対に、本発明者らは、抗HA抗体を用いる免疫沈降に続いて、抗FLAG抗体を用いる沈降物のイムノプロット法も行った。その結果、PHB2 / REA-HAがA7322-FLAG304050

と共に沈することが示された(図8C; 右パネル)。さらに、乳癌細胞株SK-BR-3における内在性PHB2 / REAタンパク質およびA7322タンパク質の局在について調べるために、本発明者らは抗PHB2 / REAポリクローナル抗体を用いる免疫細胞化学染色分析も行った(「(8)免疫細胞化学染色」の項を参照)。本発明者らは、A7322と同様にPHB2 / REAがほとんどの細胞では主として細胞質中に局在するが(図8D)、少数の細胞ではその発現が細胞質および核の両方で認められることを観察し(図8D、矢印)、このことからそれらのタンパク質が乳癌細胞では細胞質に部分的に共局在することが示唆された。

【0484】

ホルモンで占有されたエストロゲン受容体(ER)に対して動員されるタンパク質であるPHB2 / REA(Osborne CK. Breast Cancer Res Treat 1998; 51: 227-38)は、核内でのその相互作用を通じてERの転写活性を選択的に抑制することが報告されているため(Montano MM, et al. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 6947-52; Delage-Mourroux R, et al. J Biol Chem 2000; 275: 35848-56)、本発明者らは、A7322がPHB2 / REAに加えてERタンパク質とも結合するという可能性について検討した。A7322タンパク質とERタンパク質との相互作用を調べるために、本発明者らは、FLAGタグ付加ERおよびHAタグ付加A7322を発現するように設計したプラスミドを構築した(「(5)発現ベクターの構築」の項を参照)。これらのプラスミドをCOS-7細胞に同時にトランスフェクトし、続いてタンパク質を抗FLAG抗体を用いて免疫沈降させた。抗HA抗体を用いた沈降物のイムノプロット法により、この2つのタンパク質は免疫共沈降しないことが示された(図9A; 左パネル)。本発明者らが抗HA抗体を用いる免疫沈降および抗FLAG抗体を用いるイムノプロット法を行ったところ、これらのタンパク質の相互作用は観察されなかった(図9A; 右パネル)。さらに、免疫細胞化学分析により、エストラジオール(E2)の存在下または非存在下のいずれにおいても細胞質でのA7322の発現および核にあるERが明らかとなり、これらの2つのタンパク質に相互作用がないことが支持された(図9B)。加えて、同様の結果は、本発明者らが、ERを発現しない(ER-)SK-BR-3細胞を用いた場合にも観察された(図9C)。以上を総合して、本発明者らは、A7322はPHB2 / REAと直接に結合するが、それは、乳癌細胞のER状態に関わらず、ERタンパク質とは直接的な結合を示さないと結論づける。

【0485】

(5) A7322によるPHB2 / REAの核移行の阻害

PHB2 / REAは主として細胞質に局在し、E2およびERの存在下で核に移行することが報告されている(Kasashima K, et al. J Biol Chem 2006; 281: 36401-10)。本発明者らは、A7322がE2の有無に関わらず細胞質に局在することを観察したことから、A7322が細胞質中でPHB2 / REAと相互作用し、PHB2 / REAの核移行を妨げるとの仮説を立てた。この仮説を検討するために、本発明者らはA7322発現の存在下または非存在下におけるPHB2 / REAタンパク質の細胞内分布を調べた。本発明者らは、HAタグ付加PHB2 / REA(HA-PHB2 / REA)、FLAGタグ付加ER(FLAG-ER)、およびFLAGタグ付加A7322(FLAG-A7322)、またはモック対照の構築物をMCF-7(ER+)細胞にトランスフェクトし、続いて免疫細胞化学染色を行った(「(5)発現ベクターの構築」および「(8)免疫細胞化学染色」の項を参照)。

【0486】

その結果、PHB2 / REAがA7322の非存在下ではERと同様に核内に移行するが(図10A; 左パネル、矢印)、E2処理下のA7322の存在下では細胞質に保持されることが示された(図10A; 右パネル)。A7322の存在下または非存在下におけるPHB2 / REAの細胞内局在の違いは、SK-BR-3(ER-)細胞でも観察された(図10B)。さらに、本発明者らは、A7322をノックダウンしたMCF-7細胞における内在性PHB2 / REAの細胞内局在も調べた。図10Cは、MCF-7細胞におけるA7322発現のノックダウンの確認を示している。本発明者らが予想した通り、A7322ノックダウン細胞ではPHB2 / REAはE2処理から48時間の時点で核にあることが観察されたが、対照siRNA(si-EGFP)で処理した細胞では依然として細胞質にあることが観察された(図10D)。それ故に、これらの結果から、PHB2 / REAと結合したA7322が、PHB2 / REAの核移行を阻害し、ER-PHB2 / REA相互作用を低下させ、さらにER転写活性の増強をもたらす可能性が暗示された。

10

20

30

40

50

【0487】

(6) 内在性PHB2 / REAの核移行の阻害によるER転写活性の増強

本発明者らが上記のように、A7322が細胞質中のPHB2 / REAとの相互作用を通じてPHB2 / REAの核移行を妨げることを観察したことから、本発明者らは、A7322タンパク質が乳癌細胞においてPHB2 / REA核移行の阻害を通じてER転写活性を増強するとの仮説を立てた。この仮説を検証するために、本発明者らは、MCF-7 (ER+) 細胞またはSK-BR-3 (ER-) 細胞に、FLAGタグ付加A7322 (FLAG-A7322) 構築物とエストロゲン応答性レポーター遺伝子 (pER E-TA-SEAP) 構築物、またはモック対照とpERE-TA-SEAPレポーター構築物をそれぞれ同時にトランسفェクトし、続いてSEAPアッセイキットを用いるレポーターアッセイを行った (「(19) エストロゲン応答性エレメント (ERE) レポーター遺伝子アッセイ」の項を参考)。

10

【0488】

本発明者らは、それらの細胞における外来A7322タンパク質および内在性PHB2 / REAタンパク質の発現をウエスタンプロット分析によって確かめた (図11A)。予想通り、A7322タンパク質の導入はE2処理から48時間後の時点でMCF7 (ER+) 細胞におけるER転写活性を劇的に増強したが、SK-BR-3 (ER-) 細胞ではER転写活性を増強しなかった (図11B)。これらの知見は、A7322タンパク質が、乳癌細胞においてPHB2 / REA核移行の阻害を通じてER転写活性を増強する可能性を示唆する。

【0489】

考察

20

癌関連遺伝子およびそれらの産物の同定および特性決定は、最近20年の癌治療法のための分子を標的とした薬物の開発に貢献している。しかし、現在利用可能な治療に対して良好な反応を示す患者の割合は、依然として限定されている (Taniuchi K, et al. Cancer Res 2005; 65: 3092-9)。それ故、悪性細胞に対して高度に特異的であって、しかも有害反応が最小限または皆無である新たな抗癌剤を開発することが急務である。この報告において、乳癌の高精度の発現プロファイル分析を通じて、本発明者らは乳癌症例および乳癌細胞株の大多数で有意に過剰発現されるA7322を同定した。さらに、ノーザンプロット分析により、脳以外で調べたどの正常ヒト組織中でもA7322の発現はほとんど検出されないことが示された。抗A7322ポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色実験により、乳癌細胞ではA7322発現の上方制御が明らかに示されたが、周囲の正常細胞および重要臓器では発現がみられなかった。

30

【0490】

本発明者らはまた、A7322タンパク質のある種の生物機能の特性決定も行い、それが乳癌治療のための分子標的として優れた候補であることを示した。本発明者らは、siRNAの手法により、内在性A7322発現のノックダウンが乳癌細胞の顕著な増殖抑制をもたらすことを実証した。さらに、本発明者らは、自らのcDNAマイクロアレイ分析を通じて、A7322が、乳癌に加え、膀胱癌、結腸癌、非小細胞肺癌、前立腺癌を含むほぼすべての癌において共通して上方制御されることを見いだした。これらの結果から、この遺伝子が多くの種類の臨床的癌に対する抗癌剤の開発のための有意義な標的として役立つであろうことが示された。

40

【0491】

乳癌細胞におけるA7322の生物学的意義に対する手がかりを見いだすために、本発明者らは、A7322と相互作用する可能性のあるタンパク質を免疫沈降および質量分析法によって探索し、A7322と相互作用するタンパク質としてPHB2 / REAを同定した。本発明者らは、A7322およびPHB2 / REAのインビオ相互作用、および乳癌細胞の細胞質での共局在を実証した。PHB2 / REAはエストロゲン受容体 (ER) 選択的なコレギュレーターであることが知られており、エストラジオールをリガンドとするER の転写活性を抑制する (Kasashima K, J Biol Chem 2006; 281: 36401-10)。それ故に、本発明者らは、A7322がER とPHB2 / REAとの相互作用の阻害を通じてER の転写活性を活性化し (図11C)、おそらくはER の下流遺伝子の活性化をもたらすであろうという仮説を立てた。

50

【 0 4 9 2 】

結論として、本発明者らの知見により、A7322が乳癌検体および癌細胞株の両方で過剰発現されており、PHB2 / REAとのその相互作用が乳癌細胞の増殖の増強に重大な役割を果たす可能性が高いことが明らかに示唆された。抗癌薬物の開発のための最近の方針は、メシル酸イマチニブおよびトラスツズマブのように発癌経路に決定的に関与する標的分子に焦点を当てている。本発明者らは、siRNA処理によるA7322の下方制御が乳癌の細胞増殖を有意に抑制することを見いだし、このことは乳癌の増殖および腫瘍発生におけるその重要な役割を示している。特に、本発明者らは、PHB2 / REAタンパク質の核移行の阻害を通じたER の再活性化により、乳癌発生におけるA7322の機能の可能性を示唆した。これらのデータは、乳癌発生のより良い理解に貢献すると考えられ、かつA7322が乳癌治療のための有望な分子標的であることを示唆する。

10

【 0 4 9 3 】**実施例3 F3374****(1) 乳癌において上方制御される遺伝子としてのF3374の同定**

新規治療薬の標的として適用できる可能性のある分子を同定するために、本発明者らは以前に、27,648種のcDNAに相当するcDNAマイクロアレイを用いて、81例の乳癌患者の網羅的ゲノム遺伝子発現プロファイルを確立した (Nishidate T et al. Int J Oncol 2004 ; 25: 797-819.)。上方制御される遺伝子のうち、本発明者らは、乳癌検体の大半で発現が上方制御されていたF3374に注目した。その後の半定量的RT-PCRおよびノーザンプロット分析により、F3374が12例の乳癌検体のうち10例 (図1A) および乳癌細胞株のすべて (図1B) で有意に上方制御されるが、精巣および胸腺、胎盤、骨髄を除く正常臓器では発現されないことが確かめられた (図1CおよびD)。

20

【 0 4 9 4 】

F3374V1の完全長cDNA配列は4,221ヌクレオチドからなり、オープンリードィングフレームは730アミノ酸ペプチドをコードする2,193ヌクレオチドである (図1E)。引き続いて、乳癌細胞株および正常ヒト組織におけるF3374V1の発現パターンを確かめるために、本発明者らは、F3374V1に認識されるプライマーセットを用いる半定量的RT-PCRを行った。RT-PCRによる結果から、F3374V1 (1,296bp) は正常ヒト組織と比較して乳癌細胞で優位に過剰発現されるが、他のバリエントは乳癌細胞で発現されないことが示された。このため、本発明者らはさらなる分析のためにF3374V1転写産物に注目した (図1F)。

30

【 0 4 9 5 】

内在性F3374タンパク質の発現パターンを調べるために、本発明者らはまず、F3374タンパク質に対する特異的ポリクローナル抗体を開発した。その後のウエスタンプロット分析は、乳癌細胞株HBC4、HBC5、HBL100、HCC1937、MCF-7、MDA-MB-231、SKBR3、T47D、およびYMB1細胞、ならびにHMEC (ヒト哺乳動物上皮細胞) 細胞由来の細胞溶解物を用いて行った。図1Dは、強いバンドが細胞株のほとんどで特異的に検出されたが、HMEC細胞ではほとんど検出されなかったことを示している。

【 0 4 9 6 】

興味深いことに、BT-549、MCF-7、およびMDA-MB231は、これらの細胞株におけるF3374 mRNAの過剰発現にも関わらず、F3374タンパク質の発現も短縮も示さなかった (図3A)。このことは、これらの細胞株における選択的スプライシングに起因する切断型タンパク質をもたらす何らかの変異がある可能性を示唆するが、配列決定解析を行うことが必要であると考えられる。

40

【 0 4 9 7 】

さらに、ウエスタンプロット法の結果により、さらなる1つのバンドのほか、F3374タンパク質の予想サイズに相当する79.5kDaのバンドが示された (図3A)。このさらなる1つのバンドがリン酸化によって修飾されたF3374タンパク質の一形態に相当するか否かを検証するために、本発明者らはT47D細胞由来の細胞抽出物を -ホスファターゼで処理した後にイムノプロット法を行った。この余剰なバンドは -ホスファターゼ処理後には出現しなかったため、本発明者らは乳癌細胞ではF3374がリン酸化されると判断した (図3B)。F

50

3374のリン酸化される領域を決定するために、本発明者らはF3374の3-断片を設計した(図3C)。その結果、この余剰なバンドは、-3構築物を一過性に発現させた場合にはホスファターゼ処理後に消失するが、他の構築物を発現させた場合には変化しないことが示された(図3D)。これらの知見は、C末端領域(591~730アミノ酸)が細胞内でリン酸化されたことを示している。

【0498】

(2) F3374V1の免疫細胞化学分析および免疫組織化学分析

乳癌細胞株HBC5における内在性F3374V1タンパク質の細胞内局在を調べるために、本発明者らは抗F3374ポリクローナル抗体を用いる免疫細胞化学染色分析を行った。興味深いことに、内在性F3374V1は細胞周期依存的な局在を示した(図3E)。間期にはそれは核内に局在し、前期には染色体上に局在する。後期には、F3374V1は細胞内で、後期紡錘体中間帯にある一連の細い棒として集結する(図3E)。最後に、このタンパク質は乳癌細胞のすべてで終期の中央体に蓄積した。細胞が有糸分裂を進行させる際に、F3374V1は顕著な再分布を生じた。これらの知見は、F3374V1が細胞周期の間に、特に乳癌細胞の細胞質分裂の間に重要な役割を果たす可能性を示唆する。

10

【0499】

乳癌および正常組織切片におけるF3374発現についてさらに検討するために、本発明者らは抗F3374抗体を用いる免疫組織化学染色を行った。本発明者らは、乳癌の3種類の異なる組織学的サブタイプである乳頭腺管癌、充実腺管癌、および硬癌の核および細胞質で高度な発現を同定したが、その発現は正常乳管細胞ではほとんど検出されなかった(図3F、左パネル)。さらに、本発明者らは、乳癌組織マイクロアレイ分析を行い、39例の浸潤性乳管癌のうち33例においてF3374V1の陽性染色を実証したが、一方乳管細胞を含む5例の正常乳腺組織では染色が観察されなかった(データ示さず)。本発明者らが調べた9例の正常組織のうち、その発現は精巣では検出されたが、心臓、肝臓、腎臓、肺、結腸、脾臓、骨格筋、および小腸ではほとんど検出されず、これはノーザンプロット分析の結果に一致した(図3F、右パネル)。これらの結果は、F3374V1タンパク質がインビボで乳癌細胞において過剰発現されることを示唆する。

20

【0500】

(3) F3374の細胞周期依存的な発現

細胞周期の様々な時期でのF3374タンパク質の発現について調べるために、本発明者らは、アフィディコリン処理による細胞周期の同調後にT47D細胞を用いてFACS分析およびウエスタンプロット分析を行った。F3374タンパク質の発現はG1期からS期への移行期に高く(0~6時間)、細胞周期停止からの解除直後の時点で最も高かった(図12AおよびB)。これに対して、細胞のほとんどがG2/M期にある9~12時間の時点では、その発現は著しく低下した。興味深いことに、F3374タンパク質の大部分はG1/S期の間はリン酸化されていないが、G2/M期の間(9~12時間)はそのかなりの割合が修飾されてリン酸化型となり(図12B)、このことは内在性F3374タンパク質が細胞周期依存的な局在および修飾を示し、乳癌細胞の細胞周期の進行において重要な役割を果たす可能性を示唆する。

30

【0501】

(4) F3374V1に対するsiRNAの増殖阻害効果

40

F3374V1の増殖促進の上の役割を評価するために、本発明者らは、F3374V1の過剰発現を示している乳癌細胞株T47DおよびHBC4における内在性F3374V1の発現を、哺乳動物ベクターを利用したRNA干渉(RNAi)法によってノックダウンした(「材料および方法」の項を参照)。本発明者らは、F3374V1の発現レベルを半定量的RT-PCR分析によって調べた。調べた各遺伝子の2つのsiRNA構築物のうち、F3374V1特異的siRNAであるsi-#1およびsi-#4は、対照siRNA構築物、psiU6BX-EGFP(siEGFP)およびpsiU6BX-SCR(siSCR)と比較して、各遺伝子の発現を有意かつ中程度に抑制した(図6AおよびD)。F3374V1特異的siRNAによる細胞増殖の阻害を確かめるために、本発明者らはコロニー形成アッセイ(図6BおよびE)およびMTTアッセイ(図6CおよびF)をそれぞれ行った。F3374V1(Si-#1およびSi-#4)構築物の導入は、発現低下という上記の結果に一致して、T47D細胞およびHBC4細胞の増殖

50

を有意に抑制した。それぞれの結果は独立した3回の実験によって実証された。これらの知見は、F3374V1が乳癌細胞の細胞増殖において重要な機能を有することを示唆している。

【 0 5 0 2 】

さらに、本発明者らは、F3374特異的siRNAオリゴヌクレオチド(siF3374)をトランスフェクトしたHBC4細胞の形態学的变化についても調べ(「(12) A7322、F3374V1、AURKB、またはPBK / TOPKの遺伝子サイレンシング効果」の項を参照)、タンパク質レベルでの有意なノックダウン効果を確かめた(図6G)。興味深いことに、本発明者らは、そのノックダウンが、分離中の2つの細胞間に細胞間架橋の出現を招くことを観察しており(図6H; siF3374のパネルにおける矢印)、このことは細胞質分裂プロセスの後期における機能不全を示している。本発明者らはまた、対照siEGFPをトランスフェクトしたものと比較して、siF3374をトランスフェクトした細胞のサイズの拡大も観察した(図6H)。同様の結果はT47D細胞でも得られ(データ示さず)、このことは細胞質分裂プロセスにおける機能不全を示す。これらの知見は、F3374の欠如が細胞質分裂の不全を引き起こし、それがG2/M期細胞の停止をもたらし、続いて細胞死を誘導したことを見ている。

【 0 5 0 3 】

(5) オーロラキナーゼ-Bによって調節されたF3374タンパク質

乳癌細胞では細胞が終期および細胞質分裂の段階にある時に、F3374が収縮環の箇所でリン酸化され、集結することを上に述べた。オーロラ-Bキナーゼ(AURKB)は、HeLa細胞において後期には中心体から中間帯紡錘体に移動し、終期および細胞質分裂の際には中央体に移動する染色体パッセンジャータンパク質であることが知られているため(Terada Y. Cell Struct Funct 2001; 26: 653-7; Adams RR, et al. Trends Cell Biol 2001; 11: 49-54; Carmena M, et al. Nat Rev Mol Cell Biol 2003; 4: 842-54)、本発明者らは、細胞周期のいくつかの時期での類似した細胞内局在を考慮した。加えて、図13Aに示すように、本発明者らは、リン酸化が観察されたF3374のC末端領域(591~730アミノ酸)内部に、オーロラキナーゼ-Bに対する3つのコンセンサスリン酸化部位([R/K]X[T/S]および[R/K]X[T/S][I/L/V]; Cheeseman IM, et al. Cell 2002; 111: 163-72; Ohashi S, et al. Oncogene 2006; 25: 7691-702)を見いだした(図2D)。それ故に、乳癌細胞におけるF3374タンパク質とAURKBとの相互作用の可能性について検討した。

【 0 5 0 4 】

本発明者らはまず、F3374およびAURKBの発現パターンを半定量的RT-PCR分析によって比較し、調べた10種の乳癌細胞株のほぼすべてにおけるF3374およびAURKBの両方の上方制御を確かめた(図13B)。F3374タンパク質とAURKBタンパク質との相互作用について検討するために、本発明者らは、HAタグ付加F3374(HA-F3374)およびFlagタグ付加AURKB(Flag-AURKB)を発現するように設計したプラスミドを構築した(「(5) 発現ベクターの構築」の項を参照)。これらのプラスミドをHEK293T細胞に同時にトランスフェクトし、続いてタンパク質を抗Flag抗体により免疫沈降させた。抗HA抗体を用いた沈降物のイムノプロット法により、Flag-AURKBがHA-F3374と共に沈することが示された(図13C)。さらに、免疫細胞化学染色実験により、T47D細胞の細胞質分裂中に両方のタンパク質が中央体に蓄積することが確かめられた(図13F)。

【 0 5 0 5 】

F3374がAURKBによってリン酸化されるか否かをさらに検討するために、本発明者らは、精製したC末端F3374(437~730アミノ酸)組換えタンパク質および完全長AURKB組換えタンパク質を用いてインピトロキナーゼアッセイを行い(「(17) インピトロおよびインピボでのキナーゼアッセイ」の項を参照)、インピトロでのAURKBによるF3374タンパク質のリン酸化を見いだした(図13D)。F3374タンパク質とAURKBタンパク質との相互作用およびAURKBによるそのリン酸化の考えられる役割について検討するために、siRNA-AURKB(siAURKB)をT47D細胞にトランスフェクトし、続いてウエスタンプロット分析を行った。siAURKBをトランスフェクトしたT47D細胞では、対照siEGFPをトランスフェクトしたものと比較して、リン酸化F3374タンパク質と同様に、全F3374タンパク質の有意な減少が観察され

10

20

30

40

50

(図13E)、これはAURKBによるF3374のリン酸化が有糸分裂の後期にF3374を安定化し得る可能性を暗示している(図13F)。

【0506】

考察

癌関連遺伝子およびそれらの産物の同定および特性決定を通じて、最近20年で癌治療法のための分子を標的とした薬物が開発されているが、現在利用可能な治療による恩恵を受けることのできる患者の割合は、依然として限定されている(Navolanic PM, et al. Int J Oncol 2005; 27: 1341-4; Bange J, et al. Nat Med 2001; 7: 548-52)。このため、悪性細胞に対して高度に特異的であり、かつ有害反応のリスクが最小限である新たな抗癌剤を開発することが急務である。この研究において、乳癌の詳細な発現プロファイル分析を通じて、本発明者らは、乳癌臨床症例および乳癌細胞株では有意に過剰発現されるが、少數の臓器での低レベルの発現を除く調べたどの正常ヒト組織中でもほとんど検出されないF3374を同定した。その後のノーザンプロット分析および免疫組織化学染色分析により、乳癌細胞における転写レベルおよびタンパク質レベルの両方でのF3374発現の上方制御がみられるが、周囲の正常細胞では発現がみられないことが明らかに示された。10

【0507】

F3374遺伝子は、6つの高度に保存されたWD40反復ドメインおよびN末端のコンセンサスな核局在化シグナルを含む、730アミノ酸と推定されるタンパク質をコードする。本発明者らの結果は、F3374タンパク質が主として間期細胞の核内に局在し、後期細胞では紡錘体中間帯の箇所に一連の細い棒として蓄積して、最終的に終期および細胞質分裂の段階では収縮環の箇所に集結することも実証した。これらの知見は、細胞周期の進行におけるこのタンパク質の重要な役割を示唆する。20

【0508】

本発明者らは、siRNA法により、内在性F3374の発現のノックダウンが、おそらくは細胞質分裂プロセスの機能不全に起因する異常な細胞分裂およびその後の細胞死によって、乳癌細胞株T47DおよびHBC4の細胞増殖を有意に抑制することを実証した。本発明者らはまた、siF3374をトランスフェクトした細胞ではサイズの大きい細胞の割合が増加することも実証したが、本発明者らは多核細胞の増加は見いださなかった。F3374の不活性化は、非ストレス下のHeLa細胞においてp53の安定化を誘導したことが報告されているため(Banks D, et al. Cell Cycle 2006; 5: 1719-29)、F3374のノックダウンによるG2/M細胞の蓄積は、乳癌細胞株HBC4におけるp53によるチェックポイント系の活性化に起因する可能性がある。30

【0509】

乳癌細胞における、細胞周期のいくつかの時期での細胞内局在の類似性およびその共発現から、本発明者らは、F3374相互作用タンパク質の候補としてオーロラ-B(AURKB)セリン/トレオニンキナーゼに注目した。本発明者らは、RNAi実験を通じて、インビボでのAURKBとの相互作用、およびインビトロでのAURKBによるそのリン酸化、ならびにAURKBによるその安定化の可能性を実証した。加えて、AURKBのノックダウンは、F3374の除去と同様に、細胞質分裂の欠陥のためにHeLa細胞の増殖も抑制することが報告されている(Goto H, et al. J Biol Chem 2003; 278: 8526-30; Severson AF, et al. Curr Biol 2000; 10: 1162-71)。以上を総合して、本発明者らは本明細書で、F3374とAURKBとの相互作用が細胞質分裂において重要な役割を果たし得ることを初めて示した。さらに、F3374は、CUL4-DDB1ユビキチンE3リガーゼ複合体の構成要素として、放射線により誘導されるG2/Mチェックポイントの開始に必要なことが報告されており(Sansam CL, et al. Gene Dev 2006; 20: 3117-29; Higa LA, et al. Cell Cycle 2006; 5: 1675-80; Higa LA, et al. Nat Cell Biol 2006; 8: 1277-83)、これらは細胞周期の進行におけるF3374の複数の役割を示唆する。40

【0510】

したがって、乳癌細胞においてそれらの会合の阻害が細胞質分裂の不全の後に細胞死を招く可能性があるため、それらの会合に対するインヒビターは、乳癌に対する薬剤を開発50

するための有意義な標的となる可能性がある。

【0511】

結論として、本発明者らの結果は、F3374とAURKBとの相互作用およびAURKBによるそのリン酸化が、乳癌細胞の細胞質分裂において重大な役割を果たしている可能性が高いことを示唆した。本発明者らはまた、siRNAによるF3374の下方制御が乳癌細胞の増殖を有意に抑制することも見いだし、これは乳癌細胞の増殖におけるその決定的な役割を示している。本発明者らのデータは、乳癌発生のより良い理解に貢献すると考えられ、F3374が乳癌治療のための有望な分子標的である可能性が高いことを暗示している。さらに、本発明者らのcDNAマイクロアレイデータが、乳癌に加え、膀胱癌、胆管癌、肺癌、および腎細胞癌を含む多くの種類の臨床的癌において共通のF3374の上方制御を同定したことも特筆すべきである（データ示さず）。これらの結果から、この遺伝子が広範囲にわたるヒトの癌に対する抗癌剤の開発のための有意義な標的として役立つであろうことが示された。10

【0512】

実施例4 PBK / TOPK

(1) 乳癌におけるPBK / TOPKの上方制御

本発明者らは以前に、cDNAマイクロアレイを用いて、81例の乳癌症例の網羅的ゲノム発現プロファイル分析を行った (Nishidate T et al., Int J Oncol 2004, 25: 797-819)。乳癌において上方制御される遺伝子のうち、キナーゼドメインを含むタンパク質をコードする遺伝子を、報告されている情報に基づくか、またはタンパク質モチーフプログラム SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) による予測に従う (Schultz J et al., Proc Natl Acad Sci USA 1998, 95: 5857-64; Letunic I et al., Nucleic Acids Res 2004, 32: D142-4) かのいずれかで、探索した。探索された遺伝子のうち、本発明者らは、その高レベルのトランス活性化を乳癌細胞の大多数で確認することができたPBK / TOPK遺伝子に注目した（図1A）。10種の乳癌細胞株および6例の正常臓器のノーザンプロット分析により、PBK / TOPKは、調べた10種の乳癌細胞株のすべてで特異的に上方制御されているが、その発現は肺、心臓、肝臓、腎臓、骨髄、および乳腺ではほとんど検出されないことがさらに確かめられた（図1D）。

20

【0513】

様々な正常組織におけるPBK / TOPK遺伝子の発現パターンをさらに調べるために、23例の組織由来のmRNAを用いてノーザンプロット分析を行い、精巣および胸腺に独占的である2つの転写産物を同定した（図1C）。NCBIデータベースによれば、322アミノ酸のペプチドをコードする同じオープンリーディングフレームを有する、1,899ヌクレオチド (GenBank アクセッション番号NM_018492) および1,548ヌクレオチド (#AF189722) の2つの代表的な転写産物が、ノーザン分析で観察された2つのバンドに対応するようであった。30

【0514】

(2) PBK / TOPKの免疫細胞化学分析および免疫組織化学分析

乳癌細胞株BT-20、HBC4、HBC5、HBL-100、MCF-7、MDA-MB-231、SKBR3、およびT47D由來の細胞溶解物における内在性PBK / TOPKタンパク質の発現を、HMEC（ヒト哺乳動物上皮細胞）を実験の対照として用いて、ウエスタンプロット分析によって調べた（図4A）。乳癌細胞株はすべて高レベルのPBK / TOPK発現を示したが、正常乳房上皮細胞株であるHMEC細胞は発現を示さなかった。抗PBK / TOPKモノクローナル抗体を用いた乳癌細胞株T47D、BT-20、およびHBC5のその後の免疫細胞化学分析により、内在性PBK / TOPKの主として細胞質中の局在が示された（図4B）。

40

【0515】

乳癌および正常組織切片におけるPBK / TOPK発現についてさらに検討するために、抗PBK / TOPKモノクローナル抗体を用いる免疫組織化学染色を行った。乳癌の3種類の異なる組織学的サブタイプである乳管癌、乳頭線管癌、および硬癌の細胞質では、強い染色が検出されたが（図4C(1)～(3)）、その発現は正常乳房組織胞ではほとんど検出されなかつた（図4C(4)）。さらに、ノーザンプロット分析の結果に一致して、PBK / TOPKタンパク質の強い染色が精巣の精細管の外細胞層で検出され、一方、心臓、肺、肝臓、または腎臓

50

では発現が観察されなかった（図4D（1）～（4））。

【0516】

（3）内在性PBK / TOPKのノックダウン効果

乳癌細胞におけるPBK / TOPK遺伝子の増殖促進の上での役割を評価するために、2種の乳癌細胞であるT47DおよびBT-20において、内在性PBK / TOPKの発現をRNA干渉（RNAi）法によってノックダウンした（図7AおよびB）。半定量的RT-PCR実験により、PBK / TOPK-si-#2およびsi-#3をトランスフェクトした細胞ではPBK / TOPKの有意なノックダウン効果が検出されたが、対照siRNA（モック）では検出されなかった。その明らかになったノックダウン効果に一致して、コロニー形成アッセイおよびMTTアッセイにより、PBK / TOPK-siRNA（si-#3）によるオフターゲット効果の可能性を除外するために用いたノックダウン効果を示さない2つのsiRNAと比較して、2つのsiRNA、PBK / TOPK-si-#2およびsi-#3による乳癌細胞の増殖抑制が明らかに示された（図7AおよびB）。これらの結果は、乳癌細胞の増殖におけるPBK / TOPKの決定的な役割を暗示している。10

【0517】

加えて、有意なノックダウン効果を示すsiRNAがトランスフェクトされた細胞では、表現型の変化も観察された。PBK / TOPK発現が抑制されたT47D細胞では、異常な細胞質分裂による、不正確な細胞分裂に加え、長く伸びた中央体が観察された（図7CおよびD）。ウエスタンプロット分析およびFACS分析によても、PBK / TOPK siRNAで処理した細胞ではアポトーシス（サブG1）細胞の集団の増加が同定されたが、モック構築物がトランスフェクトされたものでは表現型の変化もサブG1集団の増加も観察されず（図7EおよびF）、これは乳癌細胞の増殖ならびに有糸分裂および／または細胞質分裂に対するPBK / TOPKの不可欠な役割を暗示している。20

【0518】

（4）PBK / TOPKの細胞周期依存的な発現

PBK / TOPKは有糸分裂性キナーゼである可能性が報告されているため（Gaudet S et al., Proc Natl Acad Sci USA 2000, 97: 5167-72）、本発明者らはそれと細胞周期の進行との関係について検討した。アフィディコリンによる細胞周期の同調後に、T47D細胞におけるPBK / TOPKタンパク質の発現を調べた。FACS分析により、G2 / M期にある細胞の割合は細胞周期停止からの解除から6時間後に有意に増加することが示された（図14A）。興味深いことに、ウエスタンプロット分析により、細胞の大部分がG2 / M期にある9～12時間後の時点で、高分子量のPBK / TOPKのさらなる1つのバンドが検出された。高分子量バンドの強度は15時間の時点では低下した（図14B）。免疫化学分析からも、有糸分裂中、特に前期および中期にある細胞において凝縮染色体の周りでのPBK / TOPKタンパク質の細胞内局在が明らかになった（図14C）。30

【0519】

高分子量PBK / TOPKの細胞周期進行における役割をさらに検討するために、T47D乳癌細胞をノコダゾールで処理してウエスタンプロット分析およびFACS分析を行った。予想された通り、T47D細胞における内在性PBK / TOPKのさらなる高分子量バンドの強度は、ノコダゾールによる処理後に時間依存的な様式（6～18時間）で増加し（図14D、左パネル）、ホスファターゼ処理によってバンドは消失した（図14D、右パネル）。加えて、FACS分析により、G2 / M期にある細胞の割合が細胞周期停止からの解除から6～18時間後に増加したことが示され（図14E）、このことから有糸分裂におけるリン酸化PBK / TOPKの重要な役割が示された。40

【0520】

（5）PBK / TOPKによるインビトロおよびインビボでヒストンH3（Ser10）のリン酸化

有糸分裂細胞、特に前期および中期において、PBK / TOPKタンパク質が主として染色体表面の周りに局在したことから、本発明者らはPBK / TOPKタンパク質に対する基質の候補としてヒストンに注目した。精製した組換えPBK / TOPKおよび混合ヒストンタンパク質（H2a、H2b、H3、およびH4）を用いてインビトロキナーゼアッセイを行ったところ（図15A）、およそ15kDaのリン酸化タンパク質が検出され（レーン2）、このことから、その分子サ50

イズに基づいて、PBK / TOPKタンパク質がヒストンH3タンパク質をリン酸化する可能性が示された（図15A、左パネル）。さらに、PBK / TOPKタンパク質がヒストンH3をリン酸化することを確かめるために、ヒストン-H3組換えタンパク質を用いてインビトロキナーゼアッセイを行った（図15A、右パネル）。加えて、図15Aに示すように、およそ40kDaの自己リン酸化したPBK / TOPKがインビトロキナーゼアッセイによって検出された（星印によって示す）。

【0521】

染色体の周りのPBK / TOPKの局在、および有糸分裂の初期におけるそのリン酸化の亢進により、乳癌細胞におけるPBK / TOPKによるヒストンH3リン酸化の生理的役割が示唆された。このため、まず野生型またはキナーゼデッド型（K64-65A）PBK / TOPKをT47D細胞にトランسفクトし、続いて細胞を、早期有糸分裂を誘導することが知られている処理であるオカダ酸（OA）で処理することによって刺激した（Gaudet S et al., Proc Natl Acad Sci USA 2000, 97: 5167-72）。抗HAラット抗体を用いたウエスタンプロット分析により、野生型およびキナーゼデッド型PBK / TOPKはいずれも、OA処理によって同レベルにリン酸化されて検出された。しかし、ヒストンH3のSer10でのリン酸化は、キナーゼデッド型変異タンパク質に比して野生型タンパク質で増強していた（図15B）。さらに、ヒストンH3のSer10でのリン酸化は、モック-siRNAをトランسفクトした細胞に比して、siRNA（s-i-#3）によってPBK / TOPKが除去されたT47D細胞において特に低下していることが確かめられた（図15C）。

【0522】

加えて、内在性PBK / TOPKタンパク質およびリン酸化ヒストンH3の局在について調べた。具体的には、T47D細胞およびHBC5細胞をアフィディコリンによって同調させ、続いて抗PBK / TOPK抗体および抗ホスホ-Ser10 H3抗体を用いて免疫細胞化学染色を行った。図15Dに示すように、前期細胞における凝縮染色体の周りでのPBK / TOPKとリン酸化ヒストンH3の部分的な重なり、中期細胞における両タンパク質の重なり（図15E）、および後期での両者の消失（図15F）が観察された。以上の結果を総合して、乳癌細胞において有糸分裂中に、特に前期から中期にかけて、内在性PBK / TOPKが、ヒストンH3をSer10で特異的にリン酸化する能力を有することが明らかにされた。

【0523】

（6）細胞増殖のために重要なThr9でのリン酸化

PBK / TOPKが乳癌において上方制御され、乳癌細胞において有糸分裂中に細胞質から核に移行することは以前に実証されている（Park JH et al., Cancer Res 66: 9186-95 (2006)）。さらに、CDK1-サイクリンB1複合体タンパク質も有糸分裂細胞において核移行することが報告されている。それ故に、本発明者らはまず、乳癌細胞におけるPBK / TOPK、CDK1、およびサイクリンB1のそれぞれの細胞内局在を確かめるために免疫細胞化学を行った。T47D乳癌細胞の有糸分裂中にこれらのタンパク質の類似した核移行が観察され、乳癌細胞におけるPBK / TOPKとCDK1-サイクリンB1複合体との間でのシグナル伝達の可能性が示唆された（図16A）。CDK1の免疫沈降物を用いた免疫複合体キナーゼアッセイによって、PBK / TOPKがThr9でCDK1-サイクリンB1によってリン酸化されることは報告されているが、そのリン酸化が直接的であるか否かは未だに未解明のままである（Matsumoto et al., Biochem Biophys Res Commun 325: 997-1004 (2004)）。野生型およびT9A変異型のPBK / TOPKの不活性な組換えタンパク質を大腸菌発現系で生成させた。野生型のPBK / TOPK組換えタンパク質はCDK1-サイクリンB1組換えタンパク質複合体によってリン酸化されたが、PBK / TOPK組換えタンパク質のThr9でのアラニン置換変異体（T9A）はリン酸化されず（図16B）、このことからインビトロでのCDK1-サイクリンB1複合体によるPBK / TOPKのThr9での直接的なリン酸化が示唆された。

【0524】

乳癌発生におけるPBK / TOPKのThr9でのリン酸化の生物学的意義を検討するために、合成ペプチドの使用によってそのリン酸化を阻害することを試みた。本発明者らは、細胞透過性を高めるためにアルギニン（R）反復配列と結合させた、PBK / TOPKペプチドのN末端

10

20

30

40

50

(pp1-18) ; SEQ ID NO : 98を設計した。図16Cは、CDK1-サイクリンB1組換えタンパク質による組換えPBK / TOPKタンパク質のリン酸化が、pp1-18ペプチドの添加によって用量依存的な様式で減少したことを示す。さらに、癌および正常ヒト乳腺上皮細胞（HMEC）をこのペプチドで処理することによって、このペプチドが癌細胞の増殖を阻害できる否かについても検討した。pp1-18ペプチド処理は、T47D乳癌細胞の増殖を用量依存的な様式で明らかに抑制したが、HMEC細胞の増殖に対しては効果を示さず（ $5 \mu\text{mol}/\text{mL}$ 、スチューデントt検定； $p=0.0096$ ）、このペプチドのオフターゲット効果の可能性は否定された（図16D）。次に、本発明者らは、このペプチドが有糸分裂細胞におけるPBK / TOPKのリン酸化を阻害するか否かについてもさらに検討した。T47D細胞をノコダゾールで処理し、その後にpp1-18ペプチドを添した。図16Eは、 $10 \mu\text{M}$ のpp1-18ペプチドの処理により、有糸分裂細胞におけるPBK / TOPKのリン酸化が時間依存的に劇的に低下したことを示す。さらに、このペプチドの処理は、ノコダゾール処理から24時間後の時点でのG2 / M期への細胞周期の移行を阻止した（図16E、下のパネル）。さらに、PBK / TOPKをノックダウンしたT47D細胞と同様に、pp1-18で処理した（ $50 \mu\text{M}$ ）T47D細胞（図16F）では、以前の記載の通りに、異常な細胞質分裂による長く伸びた中央体が観察された（Park JH et al., Cancer Res 66: 918 6-95 (2006)）。以上を総合すると、これらの知見は、CDK1-サイクリンB1によるPBK / TOPKのThr9でのリン酸化が乳癌の細胞増殖において決定的な役割を果たしている可能性を示唆するが、このペプチドはそのN末端領域を通じて他のPBK / TOPK相互作用パートナーとの相互作用を阻害している可能性もある。

【0525】

10

(7) 有糸分裂細胞におけるPBK / TOPKの自己リン酸化

有糸分裂中のPBK / TOPKのリン酸化について検討するために、本発明者らは「有糸分裂シェイクオフ」法によって有糸分裂細胞を単離し（実施例1 「材料および方法」、「(16) 免疫共沈降およびイムノプロット分析」の項を参照）（図17A、上のパネル）、有糸分裂細胞溶解物を用いてイムノプロット分析を行った。この高分子量バンドは ホスファターゼ処理後に完全にシフトしたことから、このタンパク質は乳癌細胞において細胞有糸分裂中に過剰リン酸化される（図17A）。有糸分裂細胞におけるPBK / TOPKのこの過剰リン酸化が、CDK1-サイクリンB1複合体によりそのThr9に限定して起こるか否かをさらに検討するために、T9A、キナーゼデッド（KD）、および二重（T9A / KD）変異体構築物、ならびに野生型のPBK / TOPK構築物を、それぞれT47D乳癌細胞にトランスフェクトした。興味深いことに、T9Aタンパク質のリン酸化バンドはノコダゾール処理後も依然として保持されたが、KDおよび二重（T9A / KD）変異体のバンドは、ホスファターゼで処理した細胞におけるバンド同様、完全に消失した（図17B）。これらの結果は、PBK / TOPKタンパク質が有糸分裂細胞においてそれ自体によって自己リン酸化され得ることを強く示唆する。

20

【0526】

30

(8) PBK / TOPKのリン酸化を調節するPP1

T47D乳癌細胞において、ノコダゾール処理と同様に、Ser / Thrタンパク質ホスファターゼの強力なインヒビターであるオカダ酸（OA）の処理によって、PBK / TOPKタンパク質のリン酸化が誘導されることも以前に実証されている（Park JH et al., Cancer Res 66: 9 186-95 (2006)）。しかし、乳癌細胞においてOAでの処理によって、どのようにそのリン酸化が誘導されるかは不明なままである。プロテインホスファターゼ1（PP1）は、OAに対して比較的高いIC50値を有し、さらに細胞の有糸分裂中に不活性化されることが報告されているため（Kwon YG et al., Proc Natl Acad Sci U S A 94: 2168-73 (1997)；Ammosova T et al., Retrovirology 2: 47 (2005)）、本発明者らが、ヒトのプロテインホスファターゼのうちPBK / TOPKリン酸化の調節因子の可能性があるものとしてPP1に注目することが可能になった。まず本発明者らは、T47D細胞を高濃度（ 100nM ）または低濃度（ 100nM 未満）のOAで処理し、 100nM のOAで9時間処理することによってPBK / TOPKのリン酸化が誘導されるが（図17C）、低濃度による処理では誘導されないを見いたしました（データ示さず）。引き続いて、PBK / TOPKとPP1との相互作用について調べるために、GSTタグ付加PP1（PP1-GST）構築物およびHAタグ付加PBK / TOPK（HA-PBK / TOPK）構築物をC

40

50

OS-7細胞内で共発現させ、その後にGSTプルダウンアッセイを行った。図17Dは、PP1-GS-TがHA-PBK / TOPKによって明らかにプルダウンされ（上のパネル）、反対にHA-PBK / TOPKがPP1-GSTと免疫共沈降したことを示し（下のパネル）、これは両タンパク質の相互作用を示している。PBK / TOPKタンパク質がPP1タンパク質によって直接的に脱リン酸化されるかについてもさらに調べた。活性な組換えPBK / TOPKタンパク質は、ホスファターゼ同様、組換えPP1タンパク質とのインキュベーション後に、脱リン酸化された（図17E、上のパネル）。さらに、T47D細胞由来の有糸分裂細胞溶解物中の内在性PBK / TOPKタンパク質もPP1タンパク質処理によって脱リン酸化された（図17E、下のパネル）。これらの知見により、PP1はおそらく、それらの相互作用を通じて有糸分裂中に、PBK / TOPKの自己リン酸化を調節することが暗示された。

10

【0527】

（9）PP1の不活性化を通じてPBK / TOPKを活性化するCDK1-サイクリンB1

有糸分裂細胞における、CDK1-サイクリンB1キナーゼ複合体によるPBK / TOPKのリン酸化、およびPP1によるそのリン酸化の調節について上記で示した。さらに、PP1は有糸分裂細胞においてCDK1-サイクリンB1複合体によるそのリン酸化を通じて不活性化されることが知られている（Kwon YG et al., Proc Natl Acad Sci U S A 94: 2168-73 (1997)）。このため、有糸分裂中にPBK / TOPKがどのようにCDK1-サイクリンB1またはPP1によって調節されるかをさらに詳細に調べた。T47D細胞をノコダゾールによる16時間の処理によってG2/M期に同調させ（61～70%）、その後にCDK1インヒビターと一緒に最長4時間インキュベートした（図17FおよびG）。その後、PBK / TOPKまたはPP1のリン酸化レベルをイムノプロット分析によって調べた。G2/M停止（0時間）によって誘導されるPBK / TOPKのリン酸化は、CDK1インヒビター処理後に時間依存的な様式（0～4時間）で減少することが見いだされた（図17H、第1のパネル）。同時に本発明者らは、以前の研究における結果と同様に、CDK1-サイクリンB1複合体によってリン酸化および不活性化される箇所であるThr320でのPP1のリン酸化の低下も見いだした（図17H、第3のパネル）。Rbタンパク質のSer807および811でのリン酸化レベルの低下によるCDK1の不活性化も立証された（図17H、第4のパネル）。以上を総合すると、これらの知見により、有糸分裂細胞において、CDK1-サイクリンB1によるその直接的なリン酸化、およびその自己リン酸化を抑制するPP1の不活性化を通じて、PBK / TOPKが活性化され、有糸分裂の開始前には定常レベルに保たれることが示唆される。

20

【0528】

（10）siRNAによるPBK / TOPKの除去の結果である有糸分裂不全およびG1停止

PBK / TOPKサイレンシングによって誘導される細胞質分裂の欠陥および遅延が、乳癌細胞で以前に観察されていることから、有糸分裂細胞におけるPBK / TOPKの生物学的役割について、RNAi実験によってさらに詳細に検討した。PBK / TOPK特異的siRNA、または対照としてのsi-EGFPオリゴヌクレオチドによる2日間の処理後に、PBK / TOPK特異的siRNAで処理した細胞で、PBK / TOPKタンパク質発現のノックダウンが確かめられた（図18A）。図18Bに示すように、PBK / TOPK-siRNAで処理した細胞では、顕微鏡検査および蛍光ファロイジンによる免疫細胞化学染色によって長い細胞間架橋が観察されたが、si-EGFPで処理した細胞では観察されず、このことから細胞質分裂の欠陥がPBK / TOPK発現の除去に起因することが示された（図18Bにおける白の矢印）。さらに、細胞周期に対するPBK / TOPK発現のノックダウンの効果を調べるために、PBK / TOPK特異的siRNAまたはsi-EGFPオリゴヌクレオチドで処理した細胞においてFACS分析を行った。siEGFPで処理した細胞はG1ピークからG2/Mピークへの有意な移行を示した。これに対して、siPBK / TOPKで処理した細胞は、有糸分裂停止を誘導するためのノコダゾール処理後、G1ピークからG2/Mピークへの移行を示さず（図18C）、このことからPBK / TOPKのノックダウンはG1停止を起こす可能性が高いことが示唆された。PBK / TOPK除去細胞における細胞質分裂の欠陥をさらに詳細に分類するために、本発明者らは、PBK / TOPKの非存在下における乳癌T47D細胞のリアルタイム画像を、タイムラップス顕微鏡検査によって調べた。図18Dは、EGFPをトランスフェクトした細胞（白の矢印によって示す）では、後期から終期までの細胞分裂に1分30秒を要したこ

30

40

50

とを示している。一方、PBK / TOPK除去細胞では後期から終期までの細胞分裂に4分30秒、特に細胞質分裂の段階では5分を要し、その後に最終的に分割した（図18E中の矢印によって示す）。

【 0 5 2 9 】

さらに、この結果を立証するために、本研究者らは、野生型PBK / TOPKおよびキナーゼデッド型のそれぞれの導入によるRNAi-レスキューティー実験を行った。図18Fは、PBK / TOPKの除去による細胞質分裂不全が、野生型PBK / TOPKタンパク質の導入によって回復するが（矢印によって示す）、キナーゼデッド型では回復しなかったことを示しており（矢印によって示す）、このことはPBK / TOPKのキナーゼ活性が細胞質分裂のために不可欠であることを支持している。

10

【 0 5 3 0 】

（11）インビトロでアダプタータンパク質としてのp47を介してp97 / VCPタンパク質をリン酸化するPBK / TOPK

PBK / TOPKのキナーゼ活性が乳癌細胞の細胞質分裂のために重要であることから、本発明者らは、GST融合PBK / TOPK (GST-PBK / TOPK) 組換えタンパク質および対照としてのGSTタンパク質を用いたインビトロでのタンパク質プルダウンアッセイによって、PBK / TOPK特異的な基質を同定することを試みた。プルダウンされたタンパク質を含むSDS-PAGEゲルの銀染色の比較により、GST-PBK / TOPKタンパク質と免疫共沈降するタンパク質に対応するレーン中に特異的に存在するが、対照としてのGSTでは存在しない、およそ47kDaのタンパク質を同定した（データ示さず）。MALDI-TOF分析により、この47kDaタンパク質が、細胞有糸分裂に関与するAAA ATPアーゼファミリーに属するp97 / VCP（バロシン（valosin）含有タンパク質）のアダプタータンパク質であるp47タンパク質であることが明らかになった。乳癌細胞株における転写レベルでのp47の発現パターンを半定量的RT-PCRによって調べ、調べた乳癌細胞のすべてでp47が発現されていることが見いだされた（データ示さず）。

20

【 0 5 3 1 】

PBK / TOPKタンパク質とP47タンパク質との相互作用を立証するために、インビトロでのプルダウンアッセイを行った。HAタグ付加PBK / TOPK (HA-PBK / TOPK) 構築物をCOS-7細胞にトランスフェクトし、続いて細胞を溶解緩衝液で溶解させた。その後、細胞溶解物をGSTタグ付加p47 (GST-p47) 組換えタンパク質と混合し、続いてGST-ビーズによるプルダウンを行った。抗HA抗体を用いた沈降物のイムノプロットにより、GST-p47がHA-PBK / TOPKと共に沈したことが示された（図19A）。さらに、本発明者らは免疫細胞化学染色を行い、T47D細胞における細胞質での内在性PBK / TOPKと外因性に発現されたFlagタグ付加p47タンパク質との共局在を観察した。本発明者らは、ノコダゾール処理後に、細胞の核内でのそれらの共局在を見いだし、このことからPBK / TOPKタンパク質がp47と、特に有糸分裂細胞における核で相互作用することが示唆された（図19B）。p47はp97タンパク質と強固な複合体を形成することが公知であるため、本発明者らは、PBK / TOPKがp47 / p97タンパク質複合体と結合する可能性があると考えた。乳癌細胞株ならびにHBL-100およびHMECにおける内在性p97タンパク質の発現を、まず抗p97抗体を用いるウエスタンプロット分析によって調べ、調べた乳癌細胞株のすべて、ならびにHBL-100およびHMECにおいて、内在性p97タンパク質の発現が見いだされた（図19C）。引き続いて、PBK / TOPKおよびp97 / p47複合体が相互作用するか否かをco-IP実験によって調べた。HA-PBK / TOPKおよびmycタグ付加p97 (myc-p97) 構築物をCOS7細胞にコトランスフェクトし、続いてHAタグ抗体により免疫共沈降させた。その結果、HA-PBK / TOPKはmyc-p97と直接的には相互作用しないことが示された（図19D）。これに対して、myc-p97、GST-p47、およびHA-PBK / TOPK構築物をCOS-7細胞にコトランスフェクトし、続いてmyc-tag抗体による免疫沈降および各タグ抗体によるウエスタンプロット法をそれぞれ行い、HA-PBK-TOPKが、GST-p47 / myc-97複合体と免疫共沈降したことが検出された（図19E）。以上を総合すると、これらの知見は、PBK-TOPKがアダプターとしてのp47を介してp97タンパク質と相互作用することを示唆する。

30

【 0 5 3 2 】

40

50

さらに、p97がPBK / TOPKによってリン酸化されるかを、組換え活性型PBK / TOPKタンパク質を用いる免疫複合体キナーゼアッセイによって検討した。図19Fは、PBK / TOPK組換えタンパク質が、乳癌細胞において免疫沈降したp97をリン酸化したことを示している。細胞質分裂におけるp97の役割をさらに検討するために、PBK-TOPK-siRNAを用いることによって、T47D細胞におけるp97の発現をノックダウンした(図19G)。その結果、PBK / TOPKの除去と同様に、p97の除去が細胞質分裂の欠陥を起こすことが示された(図19H)。p97 / VCP(バロシン含有タンパク質)はAAA ATPアーゼファミリーに属し、これは例えば、終期において一旦断片化され再構成されたゴルジ体の再生(Uchiyama K et al., J Biochem (Tokyo) 137: 115-9 (2005))、および有糸分裂の終了時の微小管動態(Cao K et al., Cell 115: 355-67(2003))に関与することが報告されている。これらの知見は、p97 / VCPが細胞形態形成を調節し、細胞質分裂の際にMからG1への移行に役割を果たす可能性を示している(Cao K et al., Cell Cycle 3: 422-4 (2004))。それ故に、以上を総合して、PBK / TOPKが、p97 / p47のリン酸化を通じて、癌細胞における細胞質分裂、特に有糸分裂の終了を調節する可能性があると結論づけられた。
10

【0533】

考察

本発明者らは以前に、PBK / TOPK(PDZ-結合キナーゼ/T-LAK細胞由来プロテインキナーゼ)が有糸分裂期に有意に上方制御およびリン酸化され、かつ乳癌の細胞増殖に関与することを報告した。しかし、細胞の有糸分裂におけるPBK / TOPKの生物学的役割および乳癌発生におけるその病態生理学的な役割は依然として不明である。PBK / TOPKが、その基質としてのp97 / VCPのリン酸化およびCDK1 / サイクリンB1複合体によるその調節を通じて、有糸分裂、特に細胞質分裂の進行を調節することが示された。
20

【0534】

産業的利用性

新規ヒト遺伝子A7322およびF3374V1の発現は、非癌性ヒト組織に比して乳癌において顕著に亢進している。したがって、これらの遺伝子は癌の診断マーカーとして役立つ可能性があり、それらによってコードされるタンパク質は癌の診断アッセイに用いてもよい。

【0535】

本明細書において、新規タンパク質A7322およびF3374V1の発現は細胞増殖を促進することが示され、一方、A7322遺伝子およびF3374V1遺伝子に対応するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは低分子干渉RNAによって、細胞増殖は抑制された。これらの知見は、A7322タンパク質およびF3374V1タンパク質のそれぞれが発癌活性を刺激することを示唆する。したがって、これらの新規な癌タンパク質のそれぞれは、抗癌剤の開発に有用な標的である。例えば、A7322およびF3374V1の発現を阻止する、またはその活性を妨げる作用物質には、抗癌剤、特に乳癌の治療用の抗癌剤としての治療的有用性があると考えられる。このような作用物質の例には、A7322およびF3374V1を認識するアンチセンスオリゴヌクレオチド、低分子干渉RNA、および抗体が含まれる。
30

【0536】

本明細書において引用されたすべての刊行物、データベース、Genbank配列、特許、および特許出願は、参照により本明細書に組み入れられる。
40

【0537】

本発明を、その具体的な態様に言及しながら詳細に説明してきたが、発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変更および修正をそこに加えることができることは当業者には明らかであると考えられ、その範囲は添付の特許請求の範囲によって定められる。

【0538】

本発明は、インビトロおよびインビボでヒストンH3をSer10でリン酸化するPBK / TOPKの新規な機序の知見に基づく。PBK / TOPKは癌 / 精巣抗原であり、そのキナーゼ機能はその発癌活性と関係する可能性が高いことから、このタンパク質は乳癌治療のための有望な分子標的であることが示唆される。
50

【 0 5 3 9 】

上述した方法を通じてスクリーニングされた作用物質が、乳癌細胞においてアポトーシスを誘導する可能性が高いことから、スクリーニングされた作用物質は乳癌を治療または予防するための候補となる。

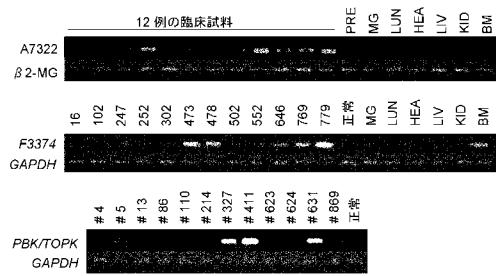
【 0 5 4 0 】

本明細書において引用されたすべての特許、特許出願、および刊行物は、その全体が参考により本明細書に組み入れられる。

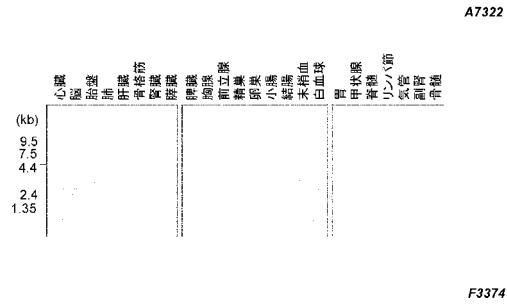
【 0 5 4 1 】

さらに、その具体的な態様に言及しながら詳細に本発明を説明してきたが、前記の説明は例示的および説明的な性質を有し、本発明およびその好ましい態様を例示することを意図していることが理解される必要がある。定型的な実験を通じて、当業者は、発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変更および修正をそこに加えることができるこ¹⁰とを容易に認識するであろう。したがって、上記の説明によってではなく、以下の特許請求の範囲およびその同等物によって本発明を規定することを意図している。

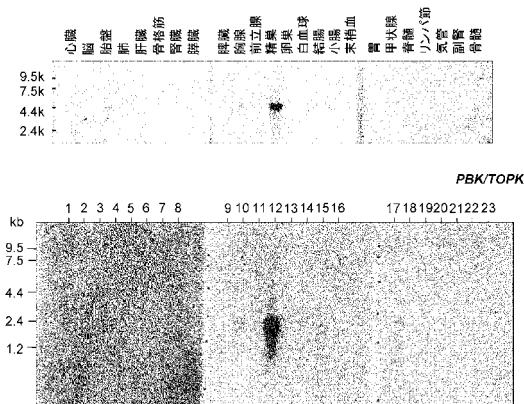
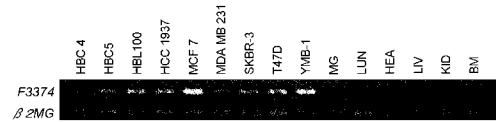
【 図 1 A 】



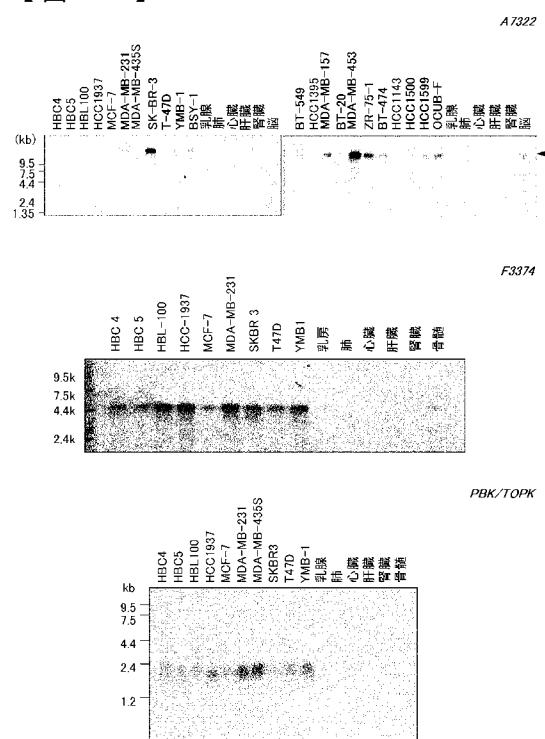
【 図 1 C 】



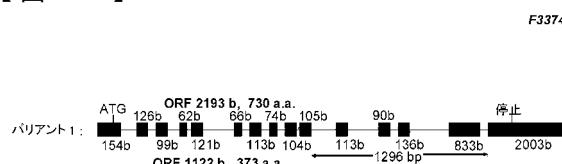
【 図 1 B 】



【図1D】



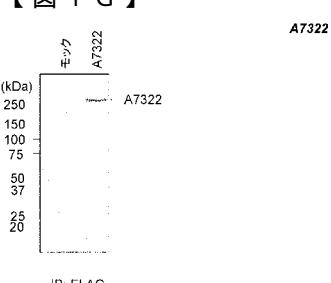
【図1E】



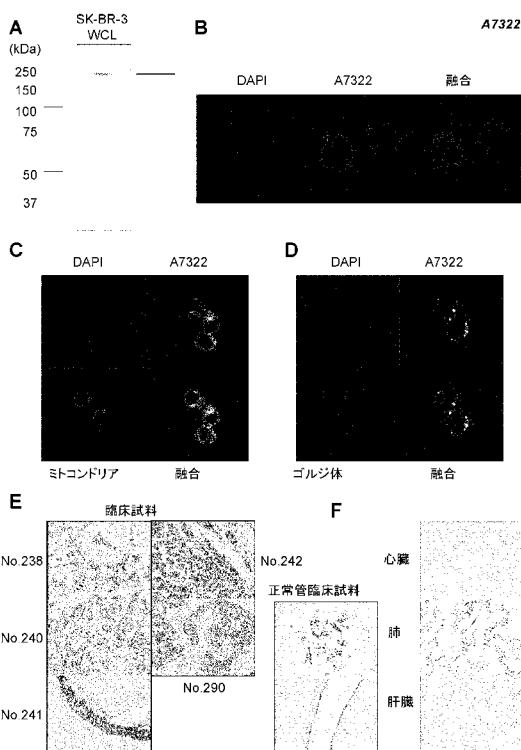
【図1F】



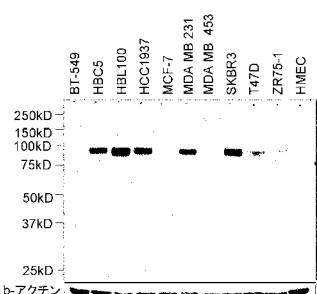
【図1G】



【図2】

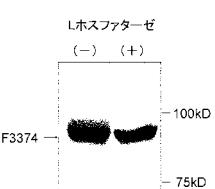


【図3A】

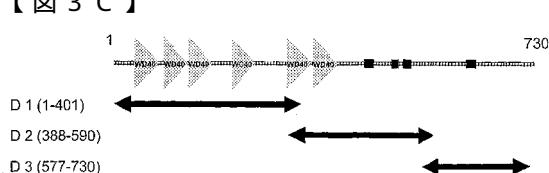


【図3B】

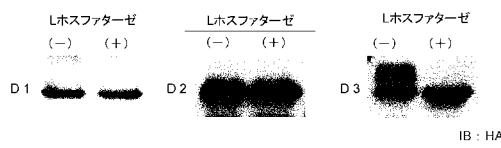
F3374



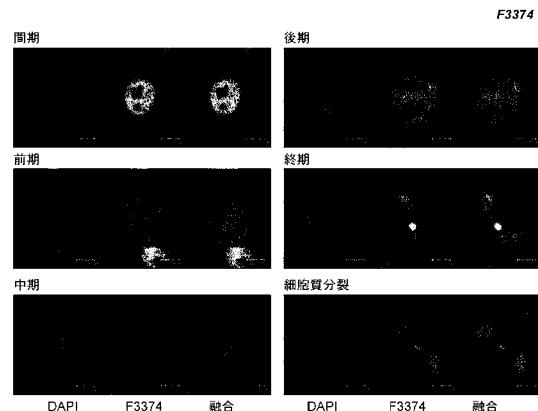
【図3C】



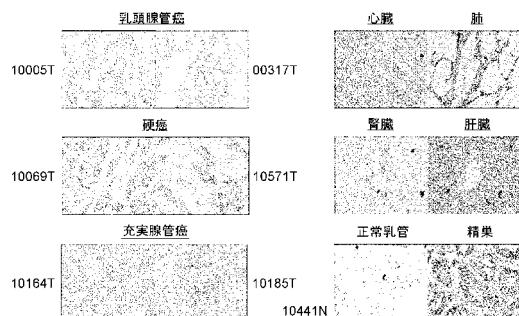
【図3D】



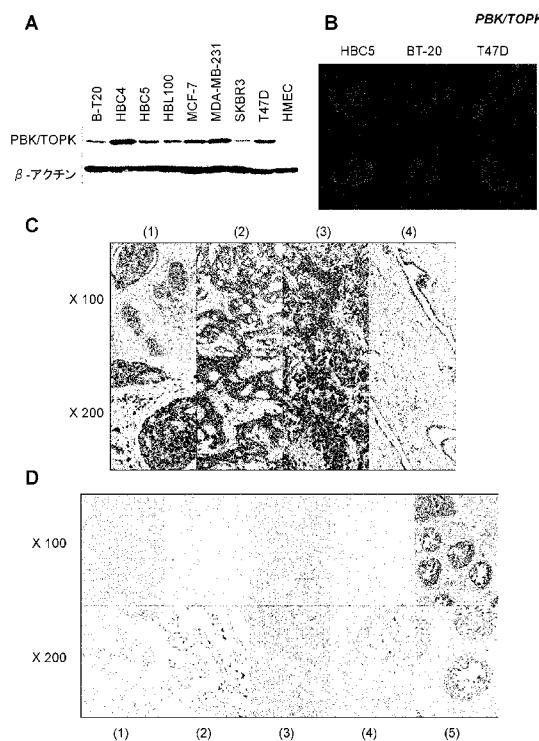
【図3E】



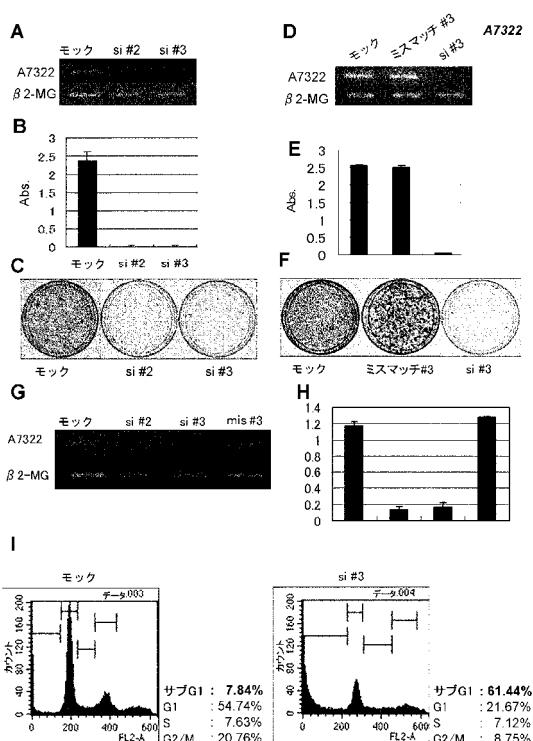
【図3F】



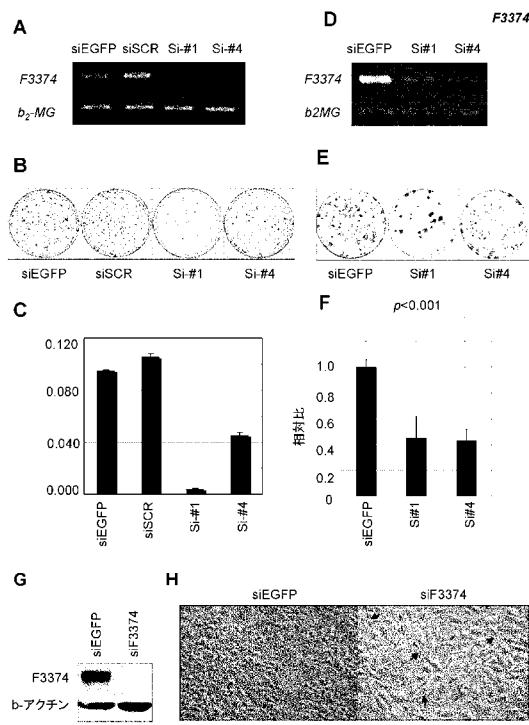
【図4】



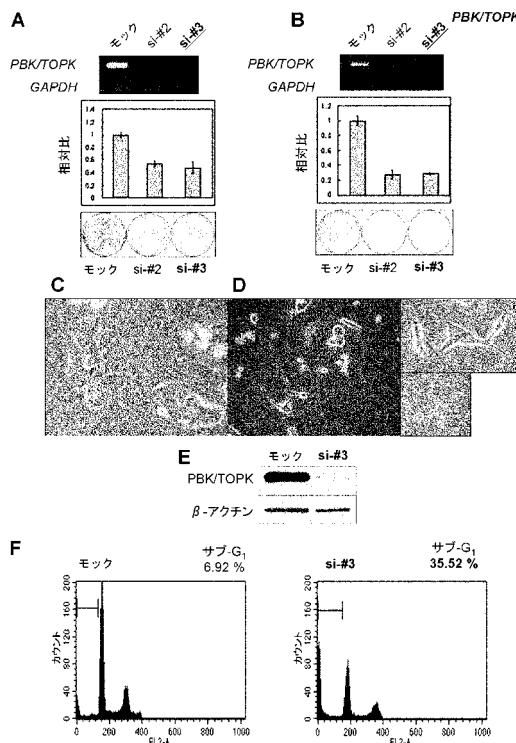
【図5】



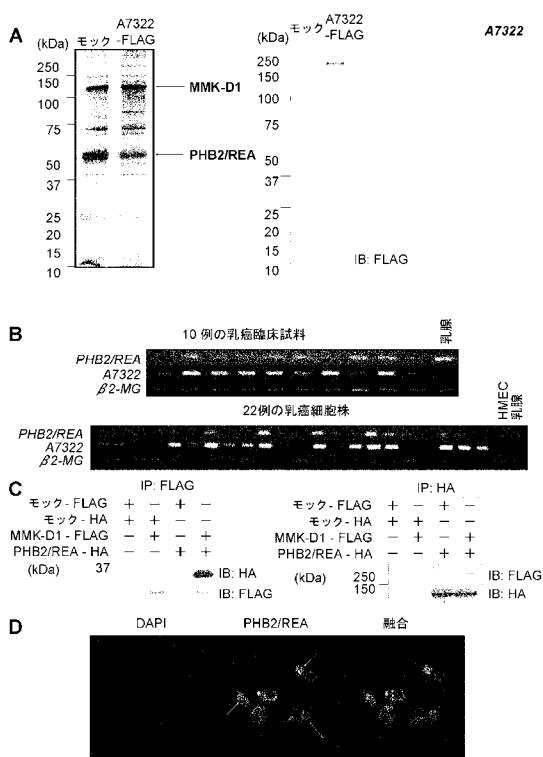
【図6】



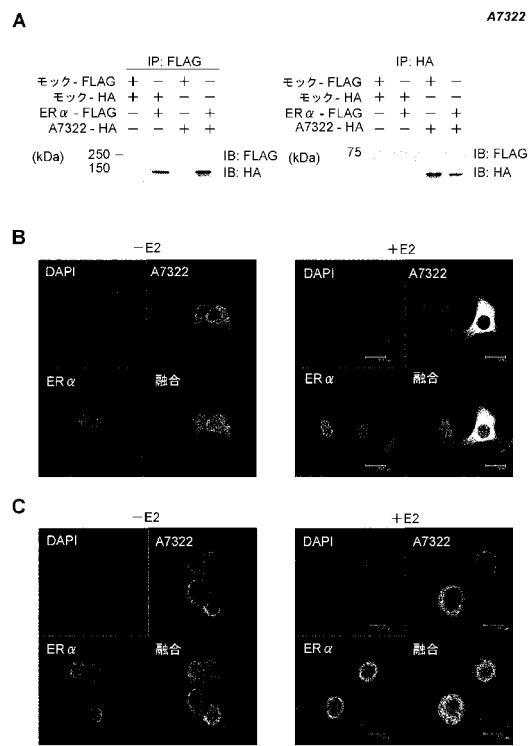
【図7】



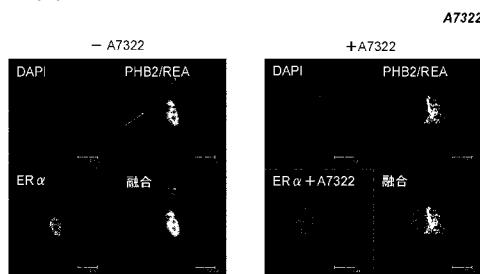
【図8】



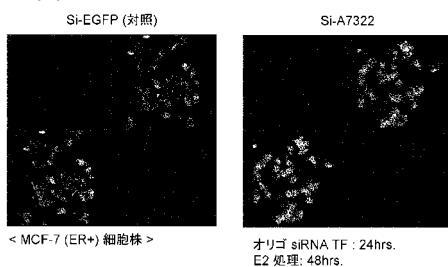
【図9】



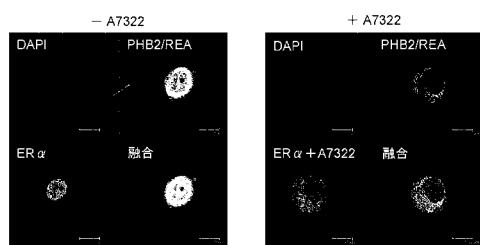
【図 10 A】



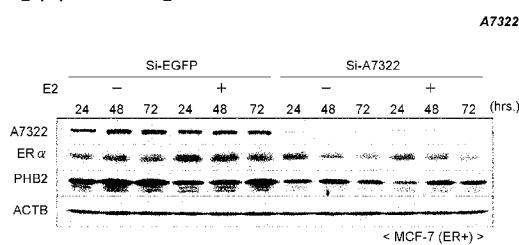
【図 10 D】



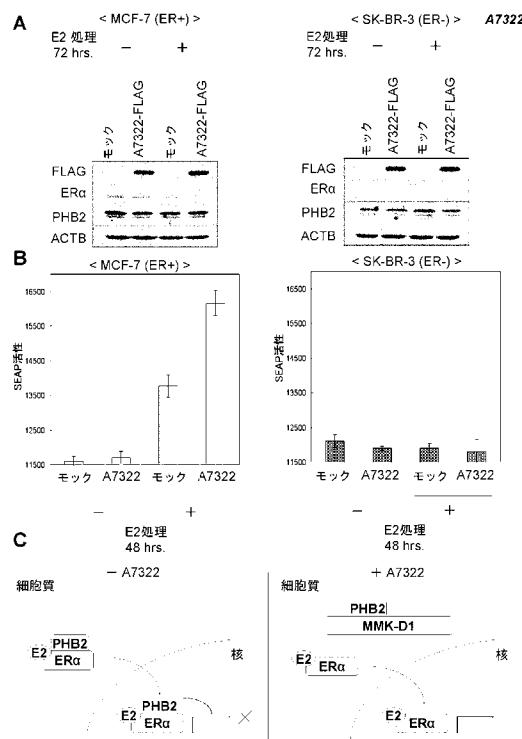
【図 10 B】



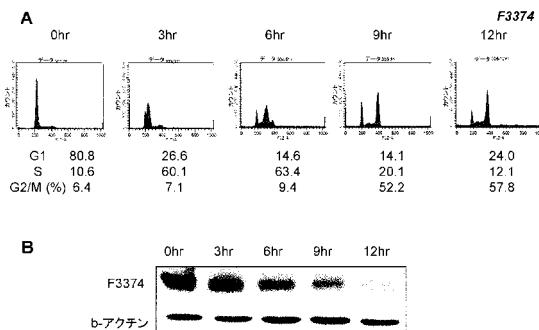
【図 10 C】



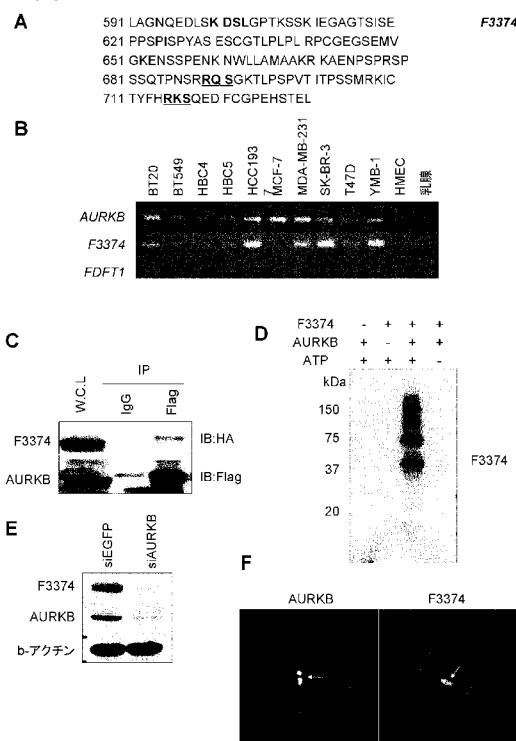
【図 11】



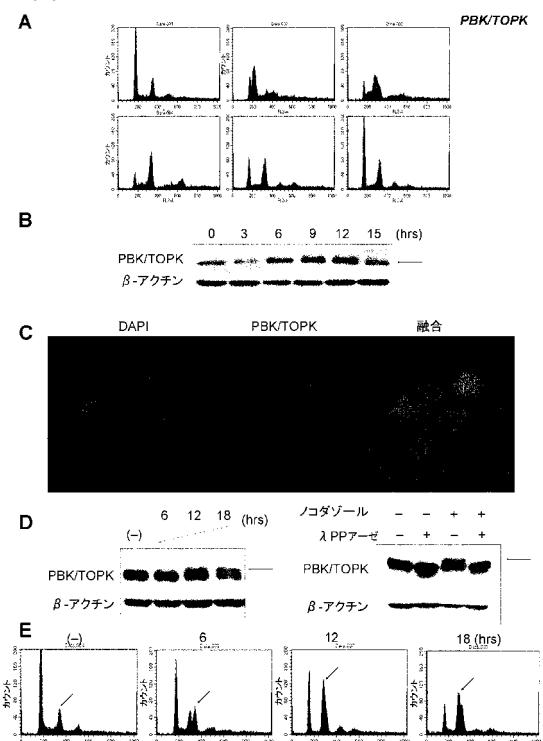
【図 12】



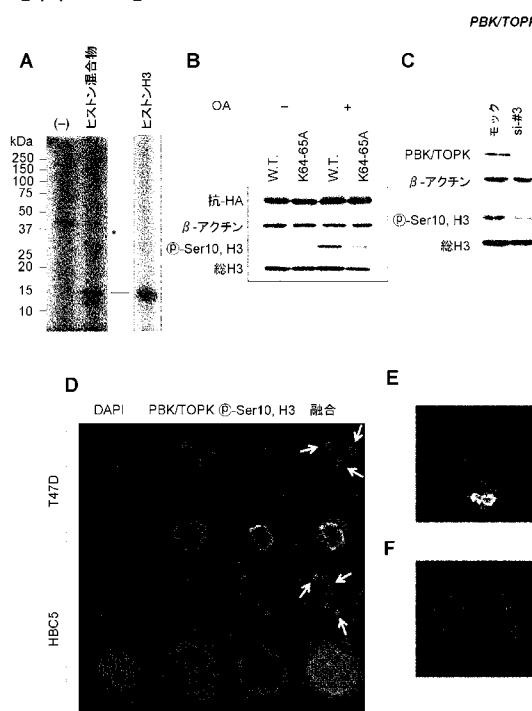
【図13】



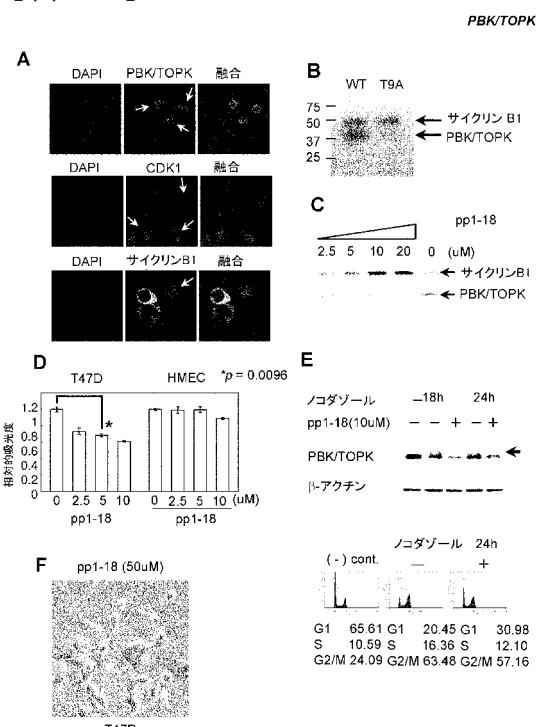
【図14】



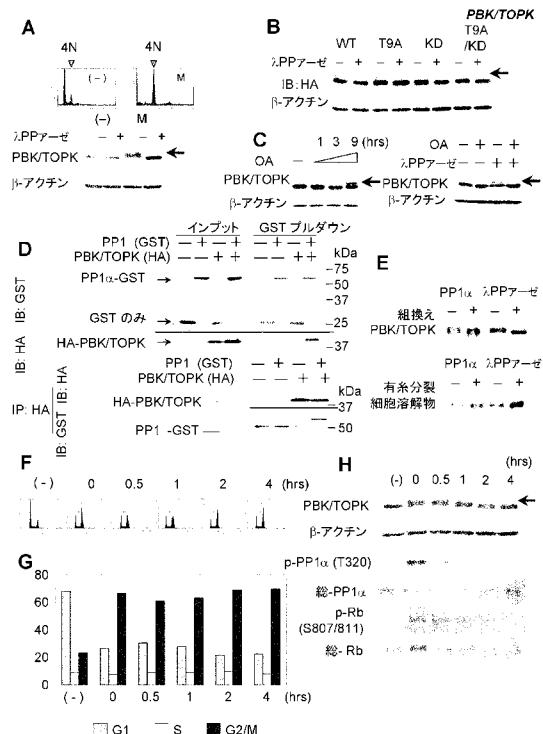
【図15】



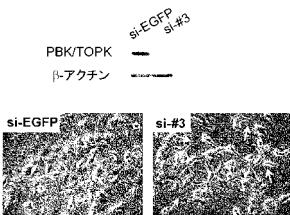
【図16】



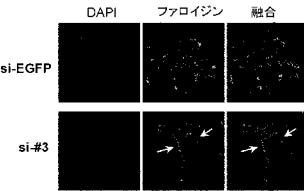
【図17】



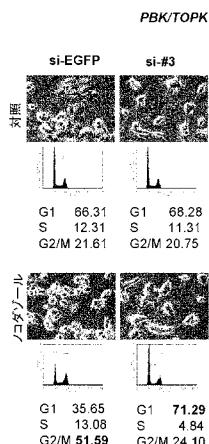
【図18 A】



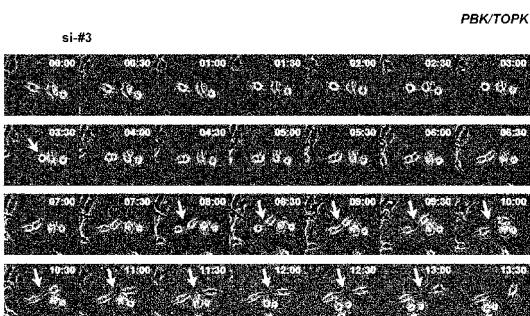
【図18 B】



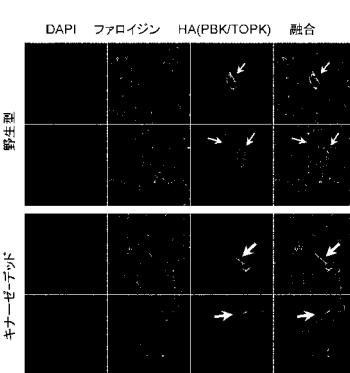
【図18 C】



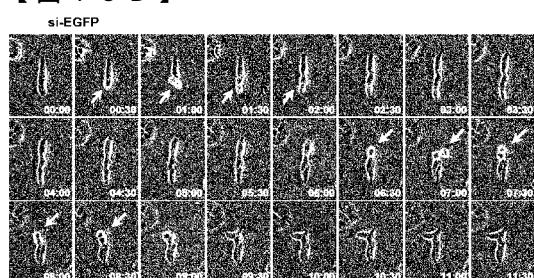
【図18 E】



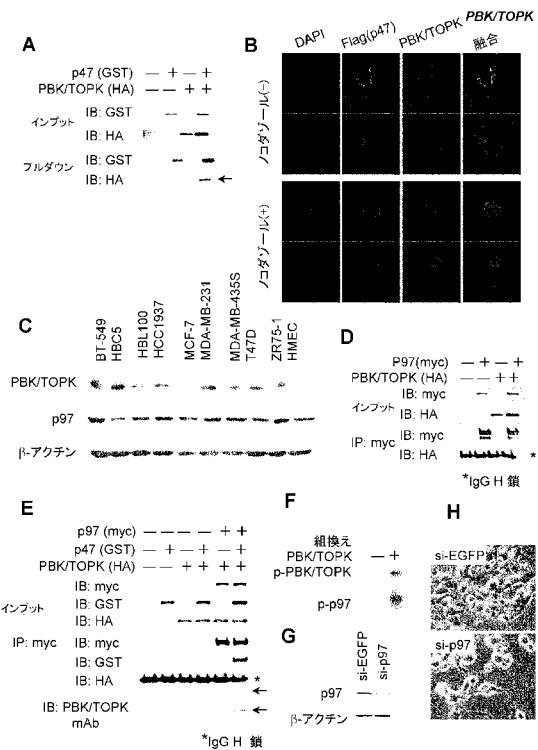
【図18 F】



【図18 D】



【図19】



【配列表】

0005339291000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/915,022
(32)優先日 平成19年4月30日(2007.4.30)
(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(72)発明者 中村 祐輔
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
(72)発明者 片桐 豊雅
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
(72)発明者 中鶴 修一
神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1 オンコセラピー・サイエンス株式会社内

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 國際公開第2005/025676 (WO, A1)
PNAS, 2000年, Vol.97, p.5167-5172
J cell sci, 1998年, Vol.111, p.3497-3506

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 12 N 15 / 00
C 12 Q 1 / 48
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 / E M B A S E / B I O S I S (S T N)