

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008年4月3日 (03.04.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/038832 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

中央区南1条西17丁目 札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 今井 浩三 (IMAI, Kohzoh) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目 札幌医科大学内 Hokkaido (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2007/069413

(74) 代理人: 葛和 清司 (KUZUWA, Kiyoshi); 〒1620067 東京都新宿区富久町8番21号 T & T ビル 葛和国际特許事務所 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日:

2007年9月27日 (27.09.2007)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2006-263232 2006年9月27日 (27.09.2006) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 北海道公立大学法人札幌医科大学 (SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600061 北海道札幌市中央区南1条西17丁目291番地 Hokkaido (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 豊田 実 (TOYOTA, Minoru) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目 札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 時野 隆至 (TOKINO, Takashi) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目 札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 平田 公一 (HIRATA, Kouichi) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目 札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 西川 紀子 (NISHIKAWA, Noriko) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目 札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 大村 東生 (OHMURA, Tousei) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

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

(54) Title: THERAPEUTIC AGENT, DETECTION METHOD AND DETECTION KIT FOR BREAST CANCER AND OVARIAN CANCER

(54) 発明の名称: 乳癌および卵巣癌の治療薬、検出方法ならびに検出用キット

(57) Abstract: The object is elucidate the role of a PRDM family on cancer and to provide a novel therapeutic agent for cancer associated with PRDM and a method for detection of the cancer. Thus, provided are: a therapeutic agent for breast or ovarian cancer, which comprises an inhibitor of the expression of PRDM14 gene or an inhibitor of PRDM14; and a method for detecting breast or ovarian cancer in a subject based on the level of the expression of PRDM14 gene in a biological sample collected from the subject.

(57) 要約: 本発明の課題は、PRDMファミリーの癌における役割を解明し、PRDMに関連した新規な癌の治療薬および癌の検出方法を提供することである。前記課題は、PRDM14遺伝子の発現阻害剤またはPRDM14の阻害剤を含有一する、乳癌または卵巣癌のための治療薬、および対象から得た生物学的試料におけるPRDM14遺伝子の発現量を基準として、前記対象における乳癌または卵巣癌を検出する方法により解決される。

WO 2008/038832 A1

明 細 書

乳癌および卵巣癌の治療薬、検出方法ならびに検出用キット

5 技術分野

本発明は、乳癌および卵巣癌の治療薬、乳癌および卵巣癌を検出する方法、ならびに乳癌および卵巣癌の検出用キットに関する。

背景技術

- 10 ヒストン修飾は遺伝子発現の制御機構として重要である。ヒストン修飾のなかでも、ヒストンメチル化は遺伝子の活性化および不活性化において重要な働きをする（図1参照）。ヒストンメチル化活性を有するタンパク質は、SET (Suvar3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax) ドメイン、あるいはこのSET ドメインと20〜30%の相同性を有するPR (PRDI-BF1 and RIZ) ドメインを持つことが示唆されている（図2参照）。現在、ヒトにおいて、ヒストンメチル化酵素として機能する
- 15 タンパク質をコードする遺伝子は約60種類存在すると考えられており、一部については次第にその機能が解明されつつある。

- 例えば、近年、SET ドメインを有するSMYD3 (SET and MYND domain-containing protein 3) が、ヒストンメチル化酵素活性を有することが示されるとともに、大
- 20 腸癌や肝癌において、SMYD3 遺伝子の発現が上昇しており、これが癌化や癌細胞の増殖に関与することが示され（非特許文献1参照）、さらにまた、SMYD3 のプロモーター領域におけるCCGCC配列の多型が、大腸癌、肝癌および乳癌の発癌リスクに関与することが示されている（非特許文献2参照）。また、ヒストンH3 リジン27のメチル化に関与するヒストンメチル化酵素として知られている、SET ド
- 25 メインを有するEZH2 (enhancer of zeste homolog 2) は、前立腺癌において発現が上昇していることが明らかにされるとともに（非特許文献3参照）、DNAメチル化依存性遺伝子サイレンシングを介して、癌化に関与することも示唆されている（非特許文献4参照）。

これらの結果から、癌におけるヒストンメチル化酵素の解析は、発癌の分子機

構を解明するためだけでなく、新しい癌の診断法・治療法開発の基礎的知見を得るためにも重要であると考えられてきた。

一方、PR ドメインを有するタンパク質は、PRDM (PR-domain containing protein) ファミリーとして分類され、ヒトにおいては、現在 PRDM1~17 の 17 種類が存在
5 することが知られている。PRDM ファミリーに属するメンバーのうち、PRDM1 (Blimp1) は、B細胞の分化調節因子であり、インターフェロン β の転写抑制に関与することが知られている（非特許文献5および6参照）。これに対し、PRDM2 (RIZ1) は、乳癌、肝癌、大腸癌、肺癌、胃癌においてDNAメチル化により不活性化されていることが報告され（非特許文献7および8参照）、また、PRDM5 (PFM2)
10 は、癌においてサイレンシングされており、その不活性化が癌化に関与することが示唆されている（非特許文献9参照）ことから、PRDM2 遺伝子および PRDM5 遺伝子は癌抑制遺伝子として機能していると推測されている。しかしながら、これら以外の PRDM ファミリーに属するタンパク質は、いずれも機能が未だ解明されておらず、癌における役割についても何ら知られていないのが現状である。

15

参考文献リスト

- 非特許文献1. Hamamoto R et al., Nature Cell Biology, 6: 731-40, 2004
非特許文献2. Tsuge M et al., Nature Genetics, 37: 1104-7, 2005
非特許文献3. Varambally S et al., Nature, 419: 624-9, 2002
20 非特許文献4. Vire E et al., Nature, 439: 871-4, 2006
非特許文献5. Keller A. D. et al., Genes & Development, 5: 868, 1991
非特許文献6. Turner, C. A. et al., Cell, 77: 297-306, 1994
非特許文献7. Du Y et al., Cancer Research, 61: 8094-9, 2001
非特許文献8. Tokumaru Y et al., Oncogene, 22: 6954-8, 2003
25 非特許文献9. Deng Q et al., Oncogene, 23: 4903-10, 2004

発明の開示

発明が解決しようとする課題

したがって、本発明の課題は、PRDM ファミリーの癌における役割を解明し、PRDM

に関連した新規な癌の治療薬および癌の検出方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

そこで、本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を行う中で、PRDM ファミリーのうち、PRDM14 をコードする遺伝子の発現が、正常組織と比較して乳癌および卵巣癌において特異的に増加していることを初めて見出し、さらに、この PRDM14 遺伝子の特異的な発現の増加が遺伝子増幅によるものであること、また、PRDM14 の発現が癌細胞の増殖や抗癌剤に対する感受性低下に関与することをも見出した。そして、これらの知見に基づいてさらに検討を進めた結果、PRDM14 遺伝子の発現阻害剤や PRDM の阻害剤が乳癌または卵巣癌の治療に有効であるとともに、PRDM 遺伝子の発現量を定量することにより乳癌や卵巣癌を検出することが可能となることを発見し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は、PRDM14 遺伝子の発現阻害剤を含有してなる、乳癌または卵巣癌のための治療薬に関する。

また、本発明は、PRDM14 遺伝子の発現阻害剤が、PRDM14 遺伝子の発現を阻害するアンチセンス、siRNA または shRNA から選択される、前記治療薬に関する。

さらに本発明は、PRDM14 遺伝子の発現を阻害するアンチセンスが、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその一部であるペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチドである、前記治療薬にも関する。

本発明は、またさらに、PRDM14 遺伝子の発現を阻害する siRNA または shRNA が、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその一部であるペプチドに対する siRNA または shRNA である、前記の治療薬に関する。

そしてまた、本発明は、PRDM14 の阻害剤を含有してなる、乳癌または卵巣癌のための治療薬にも関する。

本発明はまた、PRDM14 の阻害剤が、抗 PRDM14 抗体またはその断片である、前記治療薬に関する。

さらに、本発明は、対象から得た生物学的試料における PRDM14 遺伝子の発現量を基準として、前記対象における乳癌または卵巣癌を検出する方法にも関する。また、本発明は、対象から得た生物学的試料における内部標準遺伝子の発現量に対する PRDM14 遺伝子の発現量の比が、前記対象と同種の健常な対象から得た生物学的試料における内部標準遺伝子の発現量に対する PRDM14 遺伝子の発現量の比よりも少なくとも 5 倍多いことを基準として乳癌または卵巣癌を検出することを特徴とする、前記方法に関する。

本発明はさらに、PRDM14 遺伝子の発現量が、PRDM14 をコードする mRNA の発現量に基づいて定量される、前記の方法に関する。

- 10 本発明はまた、PRDM14 をコードする mRNA の発現量が、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応により定量される、前記の方法に関する。

さらに本発明は、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応が、配列番号 2 で表される塩基配列と同一もしくは実質的に同一の塩基配列の一部を含むセンスプライマー、および配列番号 2 で表される塩基配列と同一もしくは実質的に同一の塩基配列に相補的な塩基配列の一部を含むアンチセンスプライマーを用いて行われる、前記の方法に関する。

本発明は、配列番号 2 で表される塩基配列と同一もしくは実質的に同一の塩基配列の一部を含むセンスプライマー、および配列番号 2 で表される塩基配列と同一もしくは実質的に同一の塩基配列に相補的な塩基配列の一部を含むアンチセンスプライマーを含む、前記の方法を行うための乳癌または卵巣癌検出用キットにも関する。

さらに、本発明は、PRDM14 遺伝子の発現量が、PRDM14 の発現量に基づいて定量される、前記の方法に関する。

また本発明は、PRDM14 の発現量が、抗 PRDM14 抗体またはその断片を用いた抗原抗体反応により定量される、前記の方法に関する。

本発明は、さらにまた、抗 PRDM14 抗体またはその断片を含む、前記の方法を行うための乳癌または卵巣癌検出用キットにも関する。

発明の効果

本発明の治療薬は、PRDM14 遺伝子の発現阻害剤または PRDM14 の阻害剤を含んでなるものである。したがって、本発明の治療薬は、PRDM14 遺伝子の発現阻害作用または PRDM14 の阻害作用を介して、癌細胞の増殖を抑制するとともに、抗癌剤に対する感受性を増大させて抗癌剤により惹起される癌細胞のアポトーシスを増強することができ、優れた治療効果を得ることが可能である。また、細胞増殖抑制効果を有する抗癌剤と共に本発明の治療薬を使用することにより、癌の治療効果において相乗効果を得ることが可能になり、良好な予後が期待できる。

また、本発明の治療薬の標的である PRDM14 遺伝子または PRDM14 は、乳癌組織および卵巣癌組織において特異的に高発現している一方で、正常組織における発現量が極めて少ないことから、本発明の治療薬は、治療が必要な標的癌組織において特異的に効果を発揮することができる、副作用が少なく安全性が高いものである。さらにまた、本発明の治療薬において、PRDM14 遺伝子の発現阻害剤として PRDM14 遺伝子に対するアンチセンス、siRNA または shRNA を用いる場合、あるいは、PRDM14 阻害剤として PRDM14 の抗体を用いる場合は、PRDM14 遺伝子または PRDM14 に対する特異性が極めて高いことから、他の遺伝子やタンパク質に対して望ましくない作用を及ぼす可能性が極めて低くなり、さらに副作用が低減された安全性の高いものとなる。

本発明による乳癌または卵巣癌の検出方法および検出用キットは、検出の標的である PRDM14 遺伝子の発現が、乳癌組織および卵巣癌組織において特異的に上昇している一方で、正常組織においては少ないことから、良好な精度で乳癌および卵巣癌を検出することが可能であり、これらの癌の早期発見にも資するものである。

図面の簡単な説明

図 1 は、ヒストンメチル化酵素の機能を示す模式図である。

図 2 は、SET ドメインを有する SMYD3、ならびに PR ドメインを有する PRDM1 および PRDM2 の構造を示す模式図である。

図 3 A は、乳癌患者 case 8、9、87 および 96 の癌組織における PRDM1～15 遺伝子の発現プロファイルを示す図である。

図3Bは、乳癌患者 case 7～9、19、20、87、96 および 112 の癌組織における PRDM1～15 遺伝子の発現プロファイルを示す図である。

図4Aは、多数の臨床例（正常乳房 (Normal breast)、非浸潤性乳管癌 (DCIS)、乳癌 (Breast cancer)、正常胃 (Normal stomach) および胃癌 (Gastric cancer)）における PRDM14 遺伝子の発現レベルを示す図である。

図4Bは、各種卵巣癌細胞株 (SKOV-3、OVCA-3、PA-1、Caov-3、MH、KURA、AMOC-2、MCAS、KF、KFr、HTBOA、TOV-21G、SW626、TOV112D および OV-90)、正常卵巣、ならびにテラトカルシノーマ細胞株 (NCC-IT-A3) における PRDM14 遺伝子の発現レベルを示す図である。

10 図5は、乳癌患者 case 86、92、96 および 105 の癌組織における PRDM14 の免疫染色を示す図である。

図6は、各乳癌患者における染色体 8q13.3 に位置する遺伝子 (SLC05A1、PRDM14、LACTB2、EYA1、TPD52) の遺伝子増幅の有無と PRDM14 遺伝子の発現レベル (mRNA 発現レベル) との関連を示す図である。

15 図7は、各乳癌患者における染色体 8q13.3 に位置する遺伝子 (SLC05A1、SULF1、PRDM14、NCOA2、TRAM1、LACTB2、XKR9、EYA1) の遺伝子発現レベル (mRNA 発現レベル) と PRDM14 遺伝子の増幅との関連を示す図である。

図8は、PRDM14 の細胞内局在を示す図である。

20 図9Aは、乳癌細胞株 MCF7 および SKBr-3 における PRDM14 の発現によるコロニー形成を示す図である。

図9Bは、乳癌細胞株 MCF7 および SKBr-3 における PRDM14 の発現によるコロニー数の増加を示す図である。

図10は、PRDM14 を安定発現した乳癌細胞株 SKBr-3 における抗癌剤 (CDDP、VP-16、アドリアマイシンまたはドセタキセル) 感受性の低下を示す図である。

25 図11は、卵巣癌細胞株 PA-1 における遺伝子導入効率を示す図である。

図12は、PRDM14 に対する siRNA を導入した PA-1 細胞における PRDM14 遺伝子の発現抑制を示す図である。

図13は、PRDM14 に対する siRNA を導入した PA-1 細胞の増殖抑制を示す図である。

図14は、PRDM14に対する siRNA を導入した PA-1 細胞における抗癌剤 (CDDP またはドセタキセル) 処置により惹起されるアポトーシスの増強を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

5 以下、本発明について詳細に説明する。

本明細書中に別記のない限り、本発明に関して用いられる科学のおよび技術的用語は、当業者に通常理解されている意味を有するものとする。一般的に、本明細書中に記載された細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝子およびタンパク質および核酸化学に関して用いられる用語、およびその技術は、
10 当該技術分野においてよく知られ、通常用いられているものとする。また、別記のない限り、本発明の方法および技術は、当該技術分野においてよく知られた慣用の方法に従って、本明細書中で引用され、議論されている種々の一般的な、およびより専門的な参考文献に記載されたとおりに行われる。かかる文献としては、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.,
15 Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) および Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press (2001); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992, および 2000 の補遺); Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in
20 Molecular Biology - 4th Ed., Wiley & Sons (1999); Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); および Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999) などが挙げられる。

本明細書中に記載された分析化学、合成有機化学ならびに医薬品化学および薬
25 化学に関して用いられる用語、ならびにその実験手順および技術は、当該技術分野においてよく知られ、通常用いられているものである。標準的な技術を、化学合成、化学分析、薬剤の製造、製剤および送達、ならびに対象の処置に用いるものとする。

なお、本発明における用語「対象」は、任意の生物個体を意味し、好ましくは

脊椎動物、より好ましくは哺乳動物、さらに好ましくはヒトの個体である。本発明において、対象は健常であっても、何らかの疾患に罹患していてもよいものとするが、乳癌または卵巣癌に対する処置が企図される場合には、該疾患に罹患している対象または実験的に罹患させた対象、例えばマウス、ラット、スナネズミ、
5 モルモットなどの齧歯類、ネコ、ピューマ、トラなどのネコ科動物、シカ、オオシカなどのシカ科動物等の他、ウサギ、イヌ、ミンク、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、サル、ヒトなどであることが好ましい。

本明細書においては、別記のない限り、タンパク質の名称はアルファベット大文字またはカタカナで表記し、そのタンパク質をコードする遺伝子は、前記のアルファベット大文字またはカタカナで表記したものに「遺伝子」と付記するか、
10 または前記のアルファベット大文字またはカタカナで表記したものに下線を付して表記するものとする。したがって、別記のない限り、例えば、単に「PRDM14」と表記した場合には、PRDM14 (PR domain-containing protein 14) そのものの自体であるタンパク質を意味し、「PRDM14 遺伝子」と表記した場合には、PRDM14 をコードする遺伝子を意味し、また、「PRDM14」と表記した場合も PRDM14 をコードする遺伝子を意味する。
15

本発明において用いられる PRDM14 は、PR domain-containing protein 14 (別名 PFM11 または MGC59730) と呼ばれる、PR ドメインおよび zinc finger ドメインを有するタンパク質であり、例として、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質が挙げられる。ここで、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以上、さらに好ましくは約 95% 以上、最も好ましくは約 98% 以上の相同性を有するアミノ酸配列等を例示することができる。
20

また、本発明において用いられる PRDM14 遺伝子には、例えば、配列番号 2 で表される塩基配列を含有する DNA、または、配列番号 2 で表される塩基配列とストリンジェントな条件下で特異的にハイブリダイズする塩基配列を含有し、かつ前記の配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同等の性質を有するタンパク質をコードする DNA などが含まれる。ここで、配列番
25

号2で表される塩基配列とストリンジェントな条件下で特異的にハイブリダイズする塩基配列を含有するDNAとしては、例えば配列番号2で表される塩基配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、特に好ましくは約95%以上、最も好ましくは約98%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNA等を用いることができる。

5 8%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNA等を用いることができる。ここで、「ストリンジェントな条件」とは、通常、42℃、2×SSCおよび0.1% SDSの条件であり、好ましくは、65℃、0.1×SSCおよび0.1% SDSの条件である。

なお、異種動物間はもちろんのこと、同種動物間でも、多型、アイソフォーム等によって PRDM14 遺伝子の塩基配列に相違が見られる場合があるが、塩基配列が相違する場合であっても PRDM14 をコードする限り、PRDM14 遺伝子に含まれる。

本発明においては、PRDM14 遺伝子の発現阻害剤または PRDM14 の阻害剤を含有してなる、乳癌または卵巣癌のための治療薬が提供される。

本発明において、乳癌とは、乳房組織を構成している乳腺、脂肪層、皮膚において発生する悪性の腫瘍を指し、浸潤性乳癌、非浸潤性乳癌、パジェット病に分類されるものを含む。

また、本発明において、卵巣癌とは、卵巣組織を構成している表層上皮、性腺間質、胚細胞において発生する悪性の腫瘍を指し、上皮性卵巣癌、性索間質性卵巣癌、胚細胞性卵巣癌に分類されるものを含む。

本発明の治療薬に用いられる PRDM14 遺伝子の発現阻害剤としては、PRDM14 遺伝子の発現を阻害することができるものであれば特に限定されず、PRDM14 遺伝子の mRNA への転写や mRNA からタンパク質への翻訳といった過程において阻害作用を発揮するものが含まれ、例えば、配列番号1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその一部であるペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物またはその塩等を挙げることができる。ここで、前記「配列番号1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその一部であるペプチドをコードするポリヌクレオチド」はDNAであってもRNAであってもよい。

PRDM14 遺伝子の発現阻害剤の好ましい例としては、PRDM14 遺伝子の発現を特異的に阻害するアンチセンス、siRNA (small interfering RNA) または shRNA (short hairpin RNA) が挙げられ、PRDM14 遺伝子の発現を阻害するアンチセンスの好適な例としては、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の
5 アミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその一部であるペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチドが挙げられ、かかるアンチセンスポリヌクレオチドは、DNA であっても RNA であってもよい。PRDM14 遺伝子の発現を特異的に阻害する siRNA または shRNA の好適な例としては、配列番号 1 で表されるアミノ酸
10 配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその一部であるペプチドに対する siRNA または shRNA が挙げられる。

また、本発明において用いられる siRNA は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその一部であるペプチドをコードするポリヌクレオチド RNA (例えば、PRDM14 の mRNA)
15 からの連続する 18~28ヌクレオチドのセンス鎖配列とその相補的配列であるアンチセンス鎖配列とを含むものであることが好ましく、さらに、前記ポリヌクレオチド RNA からの連続する 19~22ヌクレオチドヌクレオチドのセンス鎖配列とその相補的配列であるアンチセンス鎖配列とを含むものであることが特に好ましい。好適な siRNA 配列の選択には、公知の知識を使用することができる
20 (例えば、Dykxhoorn D.M. et al., Nature Rev. Mol. Cell Biol. 4; 457-67 (2003); Khvorovova A et al., Cell, 115:209-16 (2003) 等を参照)。

本発明における好ましい siRNA 配列 (センス鎖およびアンチセンス鎖の組み合わせ) の例を以下に示す。

例 1 : siRNA-PRDM14-1

25 センス : 5' -CCAGUGAAGUGAAGACCUATT-3' (配列番号 3)

アンチセンス : 5' -UAGGUCUUCACUUCACUGGTT-3' (配列番号 4)

例 2 : siRNA-PRDM14-2

センス : 5' -GGACAAGGGCGAUAGGAAATT-3' (配列番号 5)

アンチセンス : 5' -UUUCCUAUCGCCCUGUCCTT-3' (配列番号 6)

例3 : siRNA-PRDM14-3

センス : 5' -GGGAAAAUCUUCUCAGAUCTT-3' (配列番号7)

アンチセンス : 5' -GAUCUGAGAAGAUUUCCCTT-3' (配列番号8)

本発明ではさらに、選択された siRNA 配列は、標的 mRNA の切断を可能にする限り、そのセンス鎖配列に 1 ~ 3 個、好ましくは 1 ~ 2 個までのヌクレオチドの欠失、置換もしくは付加を含むように変異していてもよい。変異は、中央から 3' 側での変異は失活の原因となりやすいので、5' 側にあるのが好ましい。なお、選択された siRNA は、臨床使用の際にいわゆる off-target 効果 (使用した siRNA に部分的に相同性を有する標的遺伝子以外の遺伝子の発現を抑制する効果) を示さないものであることが好ましい。したがって、off-target 効果を避けるために、候補 siRNA について、予めジーンチップなどを利用して交差反応がないことを確認しておくことが望ましい。

本発明において用いることができる shRNA は、センス鎖配列およびそれに対するアンチセンス鎖配列との間を共有結合によって結合する一本鎖ループ配列を含むものであり、細胞内 RNAse である Dicer によってプロセシングされて siRNA が形成される RNA である。siRNA をコードするヘアピン型 DNA の 3' 末端には、転写停止シグナル配列として、あるいはオーバーハングのために、1 ~ 6 個、好ましくは 1 ~ 5 個の T からなるポリ T 配列、たとえば 4 個もしくは 5 個の T からなる TTTT または TTTTT が連結される。ベクター DNA から転写された siRNA 前駆体としての shRNA は、そのアンチセンス鎖の 3' 末端に 2 ~ 4 個の U からなるオーバーハングを有することが望ましく、オーバーハングの存在によって、センス RNA およびアンチセンス RNA はヌクレアーゼによる分解に対して安定性を増すことができる。本発明においては、前記一本鎖ループ配列は、公知のループ配列を適宜使用することが可能である。

本発明における他の siRNA の態様は、タンデム型 DNA から形成されるものであり、これは前記センス鎖をコードする DNA 配列と前記アンチセンス鎖をコードする DNA 配列とを 5' → 3' 方向に連続して含み、各鎖の 5' 末端にプロモーターが、また各鎖の 3' 末端にポリ T 配列がそれぞれ連結された配列からなり、細胞内で転写後、同時に生成したセンス RNA とアンチセンス RNA とが一緒に

ハイブリダイズして siRNA を形成する。ポリ T 配列は、上記と同様に、転写停止シグナル配列としての 1～5 個、特に 4～5 個の T からなることが好ましい。また、ヘアピン型と同様に、生成する siRNA は、センスおよび／またはアンチセンス鎖の 3' 末端に 2～4 個の U からなるオーバーハングを有していてもよい。

本発明の治療薬において、PRDM14 遺伝子の発現を特異的に阻害するアンチセンス、siRNA または shRNA を用いる場合、公知の方法によって製剤化し、対象に投与することができる。例えば、PRDM14 遺伝子の発現を特異的に阻害するアンチセンス RNA または siRNA は、標的組織である乳癌組織または卵巣癌組織に直接導入することが可能であり、このような場合には、それらを、例えば、リポフェクタミン（登録商標）、リポフェクチン（登録商標）およびセルフェクチン（登録商標）（Invitrogen）等のリポソームと複合体を形成させて注入することもできる。

また、PRDM14 遺伝子の発現を特異的に阻害するアンチセンス DNA は、例えば、適当なプロモーター配列の下流に組み込んでアンチセンス RNA 発現ベクターとして対象に投与することが可能である。さらにまた、PRDM14 遺伝子の発現を特異的に阻害するアンチセンス RNA 発現ベクター、siRNA 発現ベクター、shRNA 発現ベクターを作製し、これらのベクターを対象に投与することができる。すなわち、本発明において、PRDM14 遺伝子の発現を特異的に阻害するアンチセンス RNA、siRNA もしくは shRNA をコードする DNA は、発現ベクター中に組み込まれ、適当なプロモーターの調節下で PRDM14 遺伝子の発現を特異的に阻害する RNA に転写される。本発明で使用する発現ベクターには、プラスミドベクターおよびウイルスベクターが含まれる。

プラスミドベクターは、既知の方法を用いて調製することができ、また、市販のベクター、例えば、p i GENE（登録商標）U6 ベクター、p i GENE（登録商標）H1 ベクター、p i GENE（登録商標）tRNA ベクター（タカラバイオ株式会社）等を利用することもできる（Brummelkamp T. R. et al., Science, 296: 550-3, 2002; Lee N. S. et al., Nature Biotechnology, 20: 500-5, 2002; M. Miyagishi et al., Nature Biotechnology, 20: 497-500, 2002; Paul C.P. et al., Nature Biotechnology, 20: 505-8, 2002; 多比良和誠ら編、RNA i 実験

プロトコール、羊土社、2003年等参照)。

プラスミドベクターは一般に、本発明のアンチセンスRNA、siRNA、shRNAをコードするDNA配列およびプロモーターの他に、薬剤耐性遺伝子、転写停止配列、制限酵素切断部位、複製開始点などを含むことができる。

- 5 また、ウイルスベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクターなどを使用することができる。ウイルスベクターは、自己複製能を欠損するように改変されているものであることが好ましい。ウイルスベクターの作製方法は、当業者に既知である。上記ウイルスベクターは、患部に
- 10 ベクターを直接注入し細胞に感染させることによって細胞内に遺伝子導入することができる。

- 本発明の治療薬に用いられる PRDM14 の阻害剤としては、PRDM14 を特異的に阻害することが可能なものであれば特に限定されず、例えば、配列番号1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク
- 15 質もしくはその一部であるペプチドの機能を阻害する化合物またはその塩等を挙げることができる。PRDM14 の阻害剤の好ましい例としては、抗 PRDM14 抗体またはその断片等が挙げられ、抗 PRDM14 抗体としては、PRDM14 を特異的に認識する限り制限されることなく、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよく、細胞内発現抗体 (intrabody)、ヒト化抗体等であってもよい。また、「その断片」には、対象の PRDM14 を特異的に認識する限り、いかなる断片も
- 20 含まれ、抗体の断片としては、例えば、Fab断片、F(ab)₂断片、一本鎖抗体 (scFv) 等が挙げられる。

- 抗 PRDM14 抗体またはその断片の好適な例としては、配列番号1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくは
- 25 はその一部であるペプチドに対して特異的に結合する抗体またはその断片が含まれる。

本発明に用いられる抗 PRDM14 抗体またはその断片は、公知の方法によって製剤化し、対象に投与することができる。

対象の PRDM14 を特異的に認識する抗体を作製する際には、免疫用抗原として、

対象の PRDM14 の一部または全部を利用することができる。具体的には、(1) PRDM14 を発現している対象の細胞、組織または器官の破砕物もしくはその精製物、

(2) 遺伝子組換え技術を用いて対象の PRDM14 遺伝子またはその一部を昆虫細胞、動物細胞等の宿主細胞に導入して発現させた組換えタンパク質もしくはペプチド、

- 5 (3) 対象の PRDM14 のアミノ酸配列に従ってその全長または一部を化学合成したペプチド等を利用することができる。

また、免疫用抗原としては、対象の PRDM14 以外のタンパク質を利用することもできる。例えば、対象の PRDM14 のアミノ酸配列に対して人為的に欠失、置換、付加等の変異を導入したタンパク質、あるいは、欠失、置換、付加等の変異が加えられた状態で天然に存在するタンパク質（例えば、対象と異なる動物種由来の PRDM14）や、このタンパク質のアミノ酸配列に対して人為的に欠失、置換、付加等の変異を導入したタンパク質等を免疫用抗原として利用することができる。 PRDM14 に導入される欠失、置換、付加等の変異の位置や数は特に限定されるものではないが、PRDM14 の立体構造が保持される位置や数であることが好ましい。

- 15 ポリクローナル抗体の作製にあたっては、免疫用抗原を用いて、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ウマ、ウシ等の哺乳動物を免疫する。免疫の際には、抗体産生誘導する為に、免疫助剤を用いてエマルジョン化した後、複数回の免疫を行うことが好ましい。免疫助剤としては、フロイント完全アジュバント (F C A) の他、フロイント不完全アジュバント (F I A)、水酸化アルミニウムゲル等を利用することができる。哺乳動物 1 匹当たりの抗原の投与量は、哺乳動物の種類に応じて適宜設定できる。投与部位は、例えば、静脈内、皮下、腹腔内等である。免疫の間隔は、通常、数日から数週間間隔、好ましくは 4 日～3 週間間隔で、合計 2～8 回、好ましくは 2～5 回免疫を行う。そして、最終免疫日から 5～10 日後に、PRDM14 に対する抗体力価を測定し、抗体力価が上昇した後に採血し、抗血清を得る。抗体力価の測定は、E L I S A (enzyme linked immunosorbent assay)、ラジオイムノアッセイ等により行うことができる。
- 25

抗血清から抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸アンモニウムによる塩析、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法を適宜選択しあるいはこれらを組み合わせて利用

することができる。

モノクローナル抗体の作製にあたっては、ポリクローナル抗体の場合と同様に免疫用抗原を用いて哺乳動物を免疫し、最終免疫日から2～5日後に抗体産生細胞を採取する。抗体産生細胞としては、例えば、脾臓細胞、リンパ節細胞、胸腺細胞、末梢血細胞等が挙げられるが、一般的には脾臓細胞が利用される。

5 細胞、末梢血細胞等が挙げられるが、一般的には脾臓細胞が利用される。

次いで、ハイブリドーマを得るために、抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行う。抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞としては、ヒト、マウス等の哺乳動物由来の細胞であって一般に入手可能な株化細胞を利用することができる。利用する細胞株としては、薬剤選択性を有し、融合していない状態では選択培地（例えばHAT培地）中で生存することができないが、抗体産生細胞と融合した場合には生存することができる性質を有するものが好ましい。

10 選択培地（例えばHAT培地）中で生存することができないが、抗体産生細胞と融合した場合には生存することができる性質を有するものが好ましい。

細胞融合は、血清を含まないDMEM、RPMI-1640培地等の細胞培養用培地中に、抗体産生細胞とミエローマ細胞とを所定の割合（例えば1：1～1：10）で混合し、ポリエチレングリコール等の細胞融合促進剤の存在下で、または電気パルス処理（例えばエレクトロポレーション）により、融合反応を行う。

15 は電気パルス処理（例えばエレクトロポレーション）により、融合反応を行う。

細胞融合処理後、選択培地を用いて培養し、目的とするハイブリドーマを選別する。次いで、増殖したハイブリドーマの培養上清中に、目的とする抗体が存在するか否かをスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは、通常の方法に従えばよく、特に限定されるものではないが、例えば、ハイブリドーマの培養上清の一部を採集し、ELISAやラジオイムノアッセイ等を利用してスクリーニングすることができる。

20 培養上清の一部を採集し、ELISAやラジオイムノアッセイ等を利用してスクリーニングすることができる。

また、ハイブリドーマのクローニングは、例えば、限界希釈法、軟寒天法、フィブリンゲル法、蛍光励起セルソーター法等により行うことができ、最終的にモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得る。

得られたハイブリドーマからのモノクローナル抗体の採取は、通常の方法にしたがって行うことができる。例えば、ハイブリドーマを10～20%牛胎仔血清含有RPMI-1640培地、MEM培地等の細胞培養培地中、通常の培養条件（例えば37℃、5%CO₂濃度）で3～10日間培養することにより、その培養上清からモノクローナル抗体を取得することができる。また、ハイブリドーマ

25 得られたハイブリドーマからのモノクローナル抗体の採取は、通常の方法にしたがって行うことができる。

をマウス等の腹腔内に移植し、10～14日後に腹水を採取し、この腹水からモノクローナル抗体を取得することもできる。

モノクローナル抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸アンモニウムによる塩析、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法を適宜選択してまたはこれらを組み合わせて利用することができる。

本発明において、PRDM14 遺伝子の発現阻害剤または PRDM14 の阻害剤は、医薬上許容可能な担体（例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、安定剤、防腐剤、pH調整剤、矯味矯臭剤、希釈剤、注射剤用溶剤等）と組み合わせて乳癌または卵巣癌のための治療薬として製剤化して提供することができる。また、本発明の治療薬は、特異的に標的組織へ送達させることを可能にする標識やナノカプセル等を含有してもよい。なお、本発明の治療薬には、PRDM14 遺伝子の発現阻害剤および PRDM14 の阻害剤の両者が含まれていてもよい。

さらに、本発明の治療薬は、乳癌または卵巣癌の治療に有効な公知の抗癌剤（例えば、フルオロウラシル、タモキシフェン、アナストロゾール、アクリルビシン、ドキソルビシン、テガフル、シクロホスファミド、イリノテカン、シタラビン、パクリタキセル、ドセタキセル、エピルビシン、カルボプラチン、シスプラチン、チオテパ、またはこれらの医薬上許容される塩等）などの他の薬効成分をさらに含んでもよく、また、これらの有効成分と組み合わせて用いることもできる。

本発明の治療薬の投与経路としては、例えば、経口投与、非経口投与（例えば、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、腹腔内投与、局所投与等）が挙げられ、投与剤形としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、懸濁剤等が例示される。例えば、局所投与の場合、外科手術にて患部を露出し、癌組織に注射器等の手段で本発明の治療薬を直接投与することができ、また、非局所投与の場合、腫瘍栄養血管内投与により行うことができる。好ましい投与経路は、局所投与である。

投与量及び投与回数は、目的とする作用効果、投与方法、治療期間、対象の年齢、体重、性別等により異なるが、抗 PRDM14 抗体もしくはその断片を利用する場合の投与量は、対象がヒトである場合には成人1日当たり通常100 μ g～10

0 mg、好ましくは1～20 mgの範囲から適宜選択でき、PRDM14 遺伝子に対するアンチセンスDNA、アンチセンスRNA、siRNA、shRNA またはこれらを発現するベクターを利用する場合の投与量は、対象がヒトである場合には成人1日当たり通常0.01 mg/kg～1 g/kg、好ましくは0.1 mg/kg～500 mg/kgの範囲から適宜選択でき、投与回数は、1日1回から数回の範囲から適宜選択できる。但し、投与量は、種々の条件により変動し得るため、上記範囲に限定されない。

本発明においては、さらに、対象から得た生物学的試料における PRDM14 遺伝子の発現量を基準として、前記対象における乳癌または卵巣癌を検出する方法が提供される。

本発明における「対象から得た生物学的試料」としては、乳癌または卵巣癌を検出することが可能な限りにおいて、特に限定されることなく、例えば、血液、血清、腹水、あるいは、乳房を構成する乳腺、脂肪層もしくは皮膚等の組織、乳腺から分泌される分泌物、乳腺から分泌される洗浄液（乳管洗浄液（ductal fluid））、または、卵巣を構成する表層上皮、性腺間質もしくは胚細胞等の組織等を利用することができる。PRDM14 遺伝子の発現レベルは、一般に、いずれの正常組織でも低く、乳癌組織または卵巣癌組織において発現レベルが亢進していることから、対象から得た生物学的試料は、乳房を構成する乳腺、脂肪層もしくは皮膚等の組織、乳腺から分泌される分泌物、乳腺から分泌される洗浄液（乳管洗浄液（ductal fluid））、または卵巣を構成する表層上皮、性腺間質もしくは胚細胞等の組織であることが好ましい。また、かかる生物学的試料は、どのような方法で採取されたものでも本発明の方法に用いることができ、例えば、外科手術により採取されたものでもよく、組織採取用の穿刺針により採取されたものでもよく、あるいは、乳腺から分泌される分泌物または乳腺から分泌される洗浄液（乳管洗浄液（ductal fluid））として採取されたものでもよい。

本発明の方法においては、「PRDM14 遺伝子の発現量を基準として」いる限り限定されることなく、どのような基準を採用して乳癌または卵巣癌を検出してもよいが、好ましくは、PRDM14 をコードするmRNAの発現量、あるいは、PRDM14 の発現量を基準として乳癌または卵巣癌が検出される。PRDM14 をコードする mRNA

には、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその一部であるペプチドをコードするポリヌクレオチド RNA が含まれる。

PRDM14 遺伝子の発現量は、組織や個体間で発現レベルが大きく変動しない遺伝子（例えば、 β -アクチン遺伝子、GAPDH 遺伝子等のハウスキーピング遺伝子）を内部標準遺伝子として、この内部標準遺伝子の発現量に基づいて補正することが好ましい。

したがって、PRDM14 遺伝子の発現量を基準として乳癌または卵巣癌を検出するとは、例えば、対象から得た生物学的試料における内部標準遺伝子の発現量に対する PRDM14 遺伝子の発現量の比が、前記対象と同種の健常な対象から得た生物学的試料における内部標準遺伝子の発現量に対する PRDM14 遺伝子の発現量の比よりも、一定程度多い場合に、前記対象が乳癌または卵巣癌を罹患していると判断することが含まれる。ここで、本発明においては、対象から得た生物学的試料における内部標準遺伝子の発現量に対する PRDM14 遺伝子の発現量の比は、前記対象と同種の健常な対象から得た生物学的試料における内部標準遺伝子の発現量に対する PRDM14 遺伝子の発現量の比よりも、好ましくは少なくとも 5 倍多いことを基準とし、さらに好ましくは少なくとも 10 倍多いことを基準とし、特に好ましくは少なくとも 100 倍多いことを基準とする。

対象から得た生物学的試料における PRDM14 をコードする mRNA の発現量の定量にあたっては、公知の技術、例えば、ハイブリダイゼーション技術（ノーザンハイブリダイゼーション法、ドットハイブリダイゼーション法、RNAse プロテクションアッセイ、cDNA マイクロアレイ等）、遺伝子増幅技術（逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）（competitive RT-PCR、リアルタイム PCR 等を含む））等を利用することができる。

ハイブリダイゼーション技術を用いる場合には、PRDM14 をコードするポリヌクレオチドまたはその一部にハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドをプローブとして利用することができ、遺伝子増幅技術を用いる場合には、当該オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをプライマーとして利用することができる。

「PRDM14 をコードするポリヌクレオチドまたはその一部」としては、DNA および RNA の両者が含まれ、例えば、mRNA、cDNA、cRNA 等が含まれる。したがって、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを構成するヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドのいずれであつてもよい。本発明における PRDM14 をコードする mRNA の発現量の定量にあたっては、用いられるオリゴヌクレオチドの塩基長は、特に限定されないが、通常 15 ～ 100 塩基、好ましくは 17 ～ 35 塩基であり、また、用いられるポリヌクレオチドの塩基長は特に限定されないが、通常 50 ～ 1000 塩基、好ましくは 150 ～ 500 塩基である。

- 10 PRDM14 をコードするポリヌクレオチドまたはその一部にハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、PRDM14 をコードするポリヌクレオチドまたはその一部にストリンジェントな条件下で特異的にハイブリダイズし得ることが好ましい。ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、通常、42℃、2×SSC および 0.1% SDS の条件であり、好ましくは、65℃、0.1×SSC および 0.1% SDS の条件である。

- 15 PRDM14 をコードするポリヌクレオチドまたはその一部にハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドの塩基配列は、対象の PRDM14 遺伝子の塩基配列から公知の知識に基づき適宜設計することができる。プライマーおよびプローブには、蛍光色素、ラジオアイソトープ等の標識を付加してもよい。

20 本発明によれば、対象から得た生物学的試料における PRDM14 をコードする mRNA の発現量の定量においては、精度や操作の簡便性の観点から、上記の種々の技術の中でも、RT-PCR を用いることが特に好ましい。

- 25 ここで、以下に RT-PCR を利用する場合を例に、対象から得た生物学的試料における PRDM14 をコードする mRNA の発現量の測定方法について具体的に説明する。

まず、対象から採取した生物学的試料から全 RNA を抽出し、抽出した全 RNA から cDNA を合成する。次いで、合成した cDNA を鋳型とし、PRDM14 をコードする cDNA にハイブリダイズし得るプライマーを用いて PCR を行う。そ

して、PCRにおいて増幅されたPCR増幅断片を定量することによって、PRDM14をコードするmRNAの存在量を測定することができる。この際、PCRは、PCR増幅断片生成量が初期鋳型cDNA量を反映するような条件（例えば、PCR増幅断片が指数関数的に増加するPCRサイクル数）で行うことが望ましい。

- 5 用いるプライマーとしては、PRDM14をコードする遺伝子に特異的な一对のプライマー、例えば、配列番号2で表される塩基配列と同一もしくは実質的に同一の塩基配列の一部を含むセンスプライマー、および配列番号2で表される塩基配列と同一もしくは実質的に同一の塩基配列に相補的な塩基配列の一部を含むアンチセンスプライマーを挙げることができ、該プライマーの塩基長は、例えば17～35塩基、好ましくは20～28塩基である。

PCR増幅断片の定量方法は、特に限定されるものではなく、例えば、ラジオアイソトープ（RI）を用いた定量方法、蛍光色素を用いた定量方法等を適宜利用することができる。

- RIを用いた定量方法としては、例えば、（1）反応液にRI標識したヌクレオチド（例えば³²P標識されたdCTP等）を基質として加えておき、PCR増幅断片に取り込ませてPCR増幅断片をRI標識し、PCR増幅断片を電気泳動等で分離した後、放射活性を測定してPCR増幅断片を定量する方法、（2）RI標識したプライマーを用いることによりPCR増幅断片をRI標識し、PCR増幅断片を電気泳動等で分離した後、放射活性を測定してPCR増幅断片を定量する方法、（3）PCR増幅断片を電気泳動した後、メンブレンにブロッティングし、RI標識したプローブをハイブリダイズさせ、放射活性を測定してPCR増幅断片を定量する方法等が挙げられる。放射活性は、例えば、液体シンチレーションカウンタ、X線フィルム、イメージングプレート等を用いて測定することができる。

- 25 また、蛍光色素を用いた定量方法としては、（1）二本鎖DNAにインターカレートする蛍光色素（例えば、エチジウムブロマイド（EtBr）、SYBR（登録商標）Green I、PicoGreen（登録商標）等）を用いてPCR増幅断片を染色し、励起光の照射によって発せられる蛍光強度を測定してPCR増幅断片を定量する方法、（2）蛍光色素で標識したプライマーを用いることによりP

PCR増幅断片を蛍光色素で標識し、PCR増幅断片を電気泳動等で分離した後、蛍光強度を測定してPCR増幅断片を定量する方法等が挙げられる。蛍光強度は、例えば、CCDカメラ、蛍光スキャナー、分光蛍光光度計等を用いて測定することができる。

- 5 一方、対象から得た生物学的試料におけるPRDM14の発現量の定量にあたっては、公知の技術、公知のタンパク質解析技術、例えば、抗PRDM14抗体またはその断片を用いた抗原抗体反応に基づくウェスタンブロッティング法、ドットブロット法、免疫沈降法、ELISA、免疫組織化学染色法等を利用することができる。

10 抗PRDM14抗体としては、上記でも述べた通り、PRDM14を特異的に認識する限り制限されることなく、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよく、細胞内発現抗体 (intrabody)、ヒト化抗体等であってもよい。また、「その断片」には、対象のPRDM14を特異的に認識する限り、いかなる断片も含まれ、抗体の断片としては、例えば、Fab断片、F(ab)₂断片、一本鎖抗体 (scFv) 等が挙げられる。

- 15 対象から得た生物学的試料におけるPRDM14の発現量を測定する際には、例えば、放射免疫測定法 (RIA)、酵素免疫測定法 (EIA)、化学発光免疫測定法 (CLIA)、蛍光免疫測定法 (FIA) 等を利用することができる。

20 抗PRDM14抗体またはその断片を利用して、対象から得た生物学的試料におけるPRDM14の発現量を定量する具体的方法としては、例えば、抗PRDM14抗体またはその断片を用いて、対象から得た生物学的試料中のPRDM14を捕捉した後、捕捉されたPRDM14を、前記の抗PRDM14抗体またはその断片に対する結合部位がPRDM14とは異なる結合部位を有する、前記の抗PRDM14抗体またはその断片に結合することができる標識化物質 (例えば、ペルオキシダーゼやアルカリホスファターゼ等の酵素、FITCやローダミン等の蛍光物質、あるいはRI等により標識した抗体 (二次抗体) もしくは物質) を用いて定量することができる。

25 また、対象から得た生物学的試料におけるPRDM14の発現量の定量は、対象から得た生物学的試料に含まれるPRDM14の活性を測定することによって行うことも可能である。PRDM14の活性は、そのヒストメンチル化酵素活性、転写活性化能あるいは転写抑制能を公知の方法にしたがって測定することができる。

本発明による乳癌または卵巣癌の検出方法では、乳房組織または卵巣組織の癌化および癌の進行に伴って PRDM14 遺伝子の発現レベルが亢進する（すなわち、乳癌細胞または卵巣癌細胞における PRDM14 遺伝子の発現レベルは、正常細胞における PRDM14 遺伝子の発現レベルよりも高い）ことを利用し、対象から採取した生物学的試料における PRDM14 遺伝子の発現量を指標として、当該試料における癌細胞の有無を検出する。すなわち、例えば、対象から採取した生物学的試料における PRDM14 遺伝子の発現量が、前記対象と同種の健常な対象から採取した生物学的試料における PRDM14 遺伝子の発現量よりも高い場合に、対象から採取した生物学的試料において癌細胞が存在すると判断することができる。また、例えば、対象の乳房組織または卵巣組織から採取した生物学的試料における PRDM14 遺伝子の発現量が、同一対象の（乳房組織または卵巣組織以外の）他の組織から採取した生物学的試料における PRDM14 遺伝子の発現量よりも高い場合に、対象の乳房組織または卵巣組織から採取した生物学的試料において癌細胞が存在すると判断することもできる。

対象と、前記対象と同種の健常な対象との間で、PRDM14 遺伝子の発現量を比較する際には、生物学的試料として同一の組織または器官の細胞を使用することが好ましく、さらに、複数の健常な対象（健常群）における PRDM14 遺伝子の発現量を定量し、その値の分布から正常範囲を設定して、対象における PRDM14 の発現レベルが正常範囲以上になるか正常範囲以下になるかを判別することが好ましい。このとき、対象の生物学的試料における PRDM14 遺伝子の発現レベルが正常範囲以上であるときに、対象の試料中に癌細胞が存在すると判断することにより、対象における癌を検出することができる。

したがって、例えば、対象から得た生物学的試料における PRDM14 遺伝子の発現量が、前記対象と同種の健常な対象から得た生物学的試料における PRDM14 遺伝子の発現量よりも、好ましくは少なくとも 5 倍多いことを基準とし、さらに好ましくは少なくとも 10 倍多いことを基準とし、特に好ましくは少なくとも 100 倍多いことを基準として、対象における癌を検出することができる。

上記で述べた通り、PRDM14 遺伝子の発現量を、組織や個体間で発現レベルが大きく変動しない遺伝子（例えば、 β -アクチン遺伝子、GAPDH 遺伝子等のハ

ウスキーピング遺伝子)を内部標準遺伝子として、この内部標準遺伝子の発現量に基づき補正する場合には、対象から得た生物学的試料における内部標準遺伝子の発現量に対する PRDM14 遺伝子の発現量の比は、前記対象と同種の健常な対象から得た生物学的試料における内部標準遺伝子の発現量に対する PRDM14 遺伝子の

5 発現量の比よりも、好ましくは少なくとも5倍多いことを基準とし、さらに好ましくは少なくとも10倍多いことを基準とし、特に好ましくは少なくとも100倍多いことを基準とすることができる。

本発明による癌検出用キットは、対象から採取した生物学的試料における PRDM14 遺伝子の発現量を定量するための試薬として、対象の PRDM14 をコードする

10 るポリヌクレオチドまたはその断片にハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド、あるいは、抗 PRDM14 抗体またはその断片を含む。

本発明の癌検出用キットは、上記オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド、あるいは、上記抗体またはその断片を含む限り、いかなる形態であってもよく、試薬、器具等を適宜含むことができる。

本発明の癌検出用キットが、上記オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを含む場合には、組織や細胞からの DNA または RNA の抽出に用いられる溶液

(例えば、組織もしくは細胞溶解用のバッファー、フェノール/クロロホルム、エタノール等)や器具、逆転写に必要な試薬(例えば H_2O 、バッファー、 $MgCl_2$ 、dNTP ミックス、オリゴ dT、ランダムプライマー、逆転写酵素等)、

15 PCR に必要な試薬(例えば H_2O 、バッファー、 $MgCl_2$ 、dNTP ミックス、Taq ポリメラーゼ等)、PCR 増幅断片の定量に必要な試薬(例えば RI、蛍光色素等)、DNA マイクロアレイ、DNA チップなどの1種または2種以上を含むことができる。

本発明の癌検出用キットが、RT-PCR 等の遺伝子増幅技術により PRDM14

25 遺伝子の発現量を定量するために用いられる場合には、上記オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、配列番号2で表される塩基配列と同一もしくは実質的に同一の塩基配列の一部を含むセンスプライマー、および配列番号2で表される塩基配列と同一もしくは実質的に同一の塩基配列に相補的な塩基配列の一部を含むアンチセンスプライマーを含むものであることが好ましい。該プライマーの

塩基長は、例えば 17～35 塩基、好ましくは 20～28 塩基である。

また、本発明の癌の診断用キットが、上記抗 PRDM14 抗体またはその断片を含む場合には、前記抗体またはその断片を固定化するための固相担体（例えば、イムノプレート、ラテックス粒子等）、抗 γ -グロブリン抗体（二次抗体）等の抗 PRDM14 抗体またはその断片に結合する物質、抗体（二次抗体を含む）またはその断片を標識する物質（例えば、酵素、蛍光物質等であって、これらは、前記抗 PRDM14 抗体またはその断片に結合する物質に結合していてもよい）、各種試薬（例えば、酵素基質、緩衝液、希釈液等）などの 1 種または 2 種以上を含むことができる。

本発明を以下の実施例を用いてより具体的に説明するが、本発明の範囲は、これらの実施例に限定されない。

<実施例 1> 遺伝子発現解析

（1）乳癌患者における PRDM14 遺伝子の発現

まず、PRDM1～15 の遺伝子発現プロファイルを調べるため、8 人の乳癌患者（case 7～9、19、20、87、96、112：性別、年齢、疾患の分類を表 1 に示す）から手術により得た凍結した癌組織および癌組織周囲の正常組織から Torizol（Invitrogen）を用いて全 RNA を抽出し、TaqMan probe を用いた delta/delta CT 法により、ABI7900 real-time PCR 解析装置（Applied Biosystems）を用いて各 PRDM 遺伝子の発現を解析した。内部標準としては GAPDH 遺伝子を用いた。

また、PRDM1～15 および GAPDH に対するプライマーは、いずれも Applied Biosystems から購入し、それぞれ、PRDM1：ABI：Hs00153357、PRDM2：ABI：Hs00210612、PRDM3：ABI：Hs00602795、PRDM4：ABI：Hs00183764、PRDM5：ABI：Hs00218855、PRDM6：ABI：Hs01373000、PRDM7：ABI：Hs00364862、PRDM8：ABI：Hs00220274、PRDM9：ABI：Hs00360639、PRDM10：ABI：Hs00360651、PRDM11：ABI：Hs00220293、PRDM12：ABI：Hs00222080、PRDM13：ABI：Hs00222082、PRDM14：ABI：Hs00225842、PRDM15：ABI：Hs00411330、GAPDH：ABI：Hs99999905 を使用した。

PCR 反応は、cDNA 1 μ l、ABI TaqMan Fast Master mix 10 μ l、プライマー（50 μ M）1 μ l および水 8 μ l を含む合計 20 μ l の溶液により、96℃ 5 秒、60℃

15 秒、40 サイクルで行った。

表 1

＜実施例1＞(1) 乳癌患者における PRDM14 遺伝子の発現

乳癌患者:8 人

Case No.	性別	年齢	疾患の分類	組織学的分類
7	女	66	乳癌	硬癌
8	女	49	乳癌	充実腺管癌
9	女	52	非浸潤性乳管癌(DCIS)	DCIS
19	女	69	乳癌	乳頭腺管癌
20	女	51	乳癌	充実腺管癌
87	女	63	乳癌	乳頭腺管癌
96	女	52	乳癌	硬癌
112	女	40	乳癌	乳頭腺管癌

実験結果は、各患者ごとに、GAPDH 遺伝子の発現量に対する各 PRDM 遺伝子の発現量の比(すなわち、各 PRDM 遺伝子の発現量/GAPDH 遺伝子の発現量)について、さらに乳癌組織と同一患者の乳癌組織周囲の正常組織との比(すなわち、(乳癌組織における各 PRDM 遺伝子の発現量/GAPDH 遺伝子の発現量)/(正常組織の各 PRDM 遺伝子の発現量/GAPDH 遺伝子の発現量))に換算することにより、各 PRDM 遺伝子の発現を図 3 A および B に表した。

図 3 A および B から明らかな通り、case 7～9、20、96 においては、PRDM14 mRNA の発現量が他の PRDM の mRNA の発現量に比べて顕著に高かった。また、case 112 においては PRDM14 mRNA が高発現していたが、それ以外に PRDM3、6 および 7 の mRNA も高発現を示した。

したがって、乳癌患者においては、高い確率で PRDM14 遺伝子の発現量が上昇している可能性が示唆された。

(2) 多数の臨床例における PRDM14 遺伝子の発現解析

次にさらに臨床例を増やし、非浸潤性乳管癌 (DCIS) 患者 4 人および (浸潤性) 乳癌患者 51 人 (case 番号、性別、年齢、疾患の分類は表 2 に示す) から手術により得た凍結組織 (乳癌組織およびその周囲の正常組織)、ならびに、胃癌患者 1

2人（case 番号、性別、年齢、疾患の分類は表3に示す）から手術により得た凍結組織（胃癌組織およびその周囲の正常組織）について、上記（1）と同様にし

て全 RNA を抽出した。また、乳癌細胞株である MCF7、MDA-MB-231、MDA-MB-435S、MDA-MB-436、MDA-MB-468、SKBr-3 および T-47D、胃癌細胞株である MKN7、KatoIII、JRST、SNU638、JRST、AZ521、MKN28 および MKN74、卵巣癌細胞株である SKOV-3、OVCA-3、PA-1、Caov-3、MH、KURA、AMOC2、MCAS、KF、KFr、HTBOA、TOV-21G、SW626、
5 TOV112D および OV-90、正常卵巣、ならびに、テラトカルシノーマ (teratocarcinoma) 細胞株である NCC-IT-A3 から同様に全 RNA を抽出した。

前記各サンプルから得られた全 RNA を用いて上記 (1) と同様に real-time PCR 法により PRDM14 の遺伝子発現を解析した。内部標準として GAPDH 遺伝子を用い、GAPDH 遺伝子の発現量に対する PRDM14 遺伝子の発現量の比 (すなわち、PRDM14
10 遺伝子の発現量 / GAPDH 遺伝子の発現量) により、各サンプルにおける PRDM14 遺伝子の発現を図 4 A および B に表した (卵巣癌細胞株、正常卵巣およびテラトカルシノーマ細胞株以外は各サンプルにつき 3 回ずつ実験を行った)。

図 4 A に示される通り、PRDM14 遺伝子は、乳癌組織中において高頻度に発現上昇が認められた。一方で、胃癌組織においては、PRDM14 遺伝子の発現上昇は軽微
15 であった。また、図 4 B に示される通り、卵巣癌細胞株 PA-1 は非常に高いレベルで PRDM14 遺伝子を発現していた。PA-1 は組織型がテラトカルシノーマを示すため、テラトカルシノーマ細胞株である NCC-IT-A3 における発現についても検討したところ、PRDM14 遺伝子を高発現していた。

表 2

<実施例1> (2) 多数の臨床例における PRDM14 の発現解析

非浸潤性乳管癌(DCIS)患者: 4人

Case No.	性別	年齢	疾患の分類	組織学的分類
5	女	42	非浸潤性乳管癌(DCIS)	DCIS
9	女	52	非浸潤性乳管癌(DCIS)	DCIS
104	女	33	非浸潤性乳管癌(DCIS)	DCIS
120	女	56	非浸潤性乳管癌(DCIS)	DCIS

乳癌患者: 51人

Case No.	性別	年齢	疾患の分類	組織学的分類
1	女	39	乳癌	硬癌
2	女	60	乳癌	化学療法後
4	女	57	乳癌	硬癌
6	女	62	乳癌	硬癌
7	女	66	乳癌	硬癌
8	女	49	乳癌	充実腺管癌
10	女	75	乳癌	硬癌
11	女	29	乳癌	特殊型, 管状癌
12	女	55	乳癌	充実腺管癌
13	女	57	乳癌	硬癌
14	女	64	乳癌	硬癌
15	女	40	乳癌	硬癌
16	女	55	乳癌	乳頭腺管癌
17	女	54	乳癌	充実腺管癌
18	女	63	乳癌	硬癌
19	女	69	乳癌	乳頭腺管癌
20	女	51	乳癌	充実腺管癌
81	女	73	乳癌	硬癌
82	女	46	乳癌	乳頭腺管癌
83	女	40	乳癌	乳頭腺管癌

(表 2 のつづき)

84	女	35	乳癌	硬癌
85	女	68	乳癌	乳頭腺管癌
86	女	52	乳癌	硬癌
87	女	63	乳癌	乳頭腺管癌
88	女	63	乳癌	特殊型, 浸潤性小葉癌
89	女	48	乳癌	乳頭腺管癌
90	女	78	乳癌	硬癌
92	女	56	乳癌	乳頭腺管癌, 硬癌
93	女	81	乳癌	硬癌
94	女	63	乳癌	充実腺管癌
95	女	55	乳癌	硬癌
96	女	52	乳癌	硬癌
97	女	44	乳癌	硬癌
98	女	44	乳癌	硬癌
100	女	54	乳癌	硬癌
101	女	53	乳癌	特殊型, アポクリン癌
102	女	53	乳癌	乳頭腺管癌
103	女	54	乳癌	乳頭腺管癌
105	女	71	乳癌	乳頭腺管癌, 硬癌
106	女	45	乳癌	乳管内乳頭腫
108	女	78	乳癌	硬癌
109	女	64	乳癌	乳頭腺管癌
110	女	62	乳癌	充実腺管癌
111	女	73	乳癌	充実腺管癌
112	女	40	乳癌	乳頭腺管癌
113	女	61	乳癌	硬癌
114	女	57	乳癌	乳頭腺管癌
115	女	51	乳癌	乳頭腺管癌, 硬癌, 粘液癌
116	女	82	乳癌	充実腺管癌, 硬癌
117	女	65	乳癌	特殊型, 骨・軟骨化生を伴う癌
119	女	58	乳癌	充実腺管癌

表 3

実施例1(2)多数の臨床例における PRDM14 の発現解析

胃癌患者:12人

Case No.	性別	年齢	疾患の分類	組織学的分類
300T	女	89	胃癌	低分化型腺癌(por)
304T	女	80	胃癌	低分化型腺癌(por)
311T	女	75	胃癌	高分化型管状腺癌(tub1)
313T	女	83	胃癌	高分化型管状腺癌(tub1)
314T	女	75	胃癌	低分化型腺癌(por)
315T	女	89	胃癌	高分化型管状腺癌(tub1)
318T	男	87	胃癌	低分化型腺癌(por)
319T	男	72	胃癌	高分化型管状腺癌(tub1)
320T	女	90	胃癌	低分化型腺癌(por)
321T	男	85	胃癌	低分化型腺癌(por)
322T	男	82	胃癌	高分化型管状腺癌(tub1)
323T	男	87	胃癌	低分化型腺癌(por)

<実施例2>免疫染色

実施例1において PRDM14 遺伝子の発現量が上昇していた乳癌患者4人 (case
 5 86、92、96、105:性別、年齢、疾患の分類は表4に示す) について、
 手術により得た癌組織をホルマリンにより固定して定法によりパラフィン切片を
 作製し、1次抗体として抗 PRDM14 抗体 (ABGENT 社、AP1214A、50 倍) を用いて 4℃
 で一晩インキュベーション後、2次抗体としてストレプトアビジン標識ヤギ抗ウ
 10 サギ抗体 (DAKO 社) を用いてインキュベーションを行い、EnVision-Plus (DAKO
 社) を用いて免疫染色を行った。また、核染色はヘマトキシリンを用いて行った。

結果を図5に示す (染色画像の倍率は400倍)。いずれの症例においても、
 PRDM14 が高発現しており、PRDM14 遺伝子の発現が上昇している症例では、PRDM14
 の発現も上昇していることが確認され、遺伝子発現の増加によりタンパク質の発
 現増加が引き起こされていることが示唆された。

表 4

<実施例2>免疫染色**乳癌患者:4人**

Case No.	性別	年齢	疾患の分類	組織学的分類
86	女	52	乳癌	硬癌
92	女	56	乳癌	乳頭腺管癌,硬癌
96	女	52	乳癌	硬癌
105	女	71	乳癌	乳頭腺管癌,硬癌

<実施例3>遺伝子増幅の解析

10 (1) PRDM14 遺伝子のコピー数の解析

PRDM14 遺伝子は、乳癌においてしばしば遺伝子増幅を認める染色体 8 番長腕 (8q13.3) に位置することから、遺伝子発現上昇に染色体増幅が関与するかを検討した。PRDM14 遺伝子中の 2 箇所のゲノム領域 (エクソン 1 周辺およびイントロン 6) の DNA コピー数を調べるため、サンプルとして、乳癌患者 23 人 (case 1、

15 6、8、11、13、15、18~20、81、83、85、90、94~98、103、105、106、112、114: 性別、年齢、疾患の分類は表 5 に示す) から手術により得た凍結組織からフェノール/クロロホルム法を用いて定法によりゲノム DNA を抽出し、実施例 1 と同様に delta/delta CT 法により、ABI7900real-time PCR 解析装置 (Applied Biosystems) を用いて解析した。内部標

20 準として、乳癌において染色体増幅や欠失がほとんど認められない、染色体 4q11 に存在するアルブミン遺伝子のゲノム領域を用いた。

表 5

<実施例3> (1) PRDM14 遺伝子のコピー数の解析

乳癌患者:23 人

	Case No.	性別	年齢	疾患の分類	組織学的分類
5	1	女	39	乳癌	硬癌
	6	女	62	乳癌	硬癌
	8	女	49	乳癌	充実腺管癌
	11	女	29	乳癌	特殊型, 管状癌
	13	女	57	乳癌	硬癌
10	15	女	40	乳癌	硬癌
	18	女	63	乳癌	硬癌
	19	女	69	乳癌	乳頭腺管癌
	20	女	51	乳癌	充実腺管癌
	81	女	73	乳癌	硬癌
	83	女	40	乳癌	乳頭腺管癌
15	85	女	68	乳癌	乳頭腺管癌
	90	女	78	乳癌	硬癌
	94	女	63	乳癌	充実腺管癌
	95	女	55	乳癌	硬癌
	96	女	52	乳癌	硬癌
	97	女	44	乳癌	硬癌
20	98	女	44	乳癌	硬癌
	103	女	54	乳癌	乳頭腺管癌
	105	女	71	乳癌	乳頭腺管癌, 硬癌
	106	女	45	乳癌	硬癌
	112	女	40	乳癌	乳頭腺管癌
25	114	女	57	乳癌	乳頭腺管癌

また同様にして、PRDM14 遺伝子が遺伝子増幅の標的であるか確認する目的で、染色体 8q13.3 に位置する PRDM14 遺伝子以外の遺伝子 (SLC05A1、LACTB2、EYA1、TPD52) についても遺伝子増幅が認められるかどうかを検討するため、そのコピー数を調べた。

使用したプライマーの配列は、それぞれ

PRDM14 : センスプライマー : 5' -CCTGACGGACACCCTCTCTGA-3' (配列番号 9) ; アンチセンスプライマー : 5' -GTGGGTACCTGCATCCTAACACAT-3' (配列番号 10)、
アルブミン : センスプライマー : 5' -AAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAG-3' (配列番号 11)

号 1 1) ; アンチセンスプライマー : 5' -CCTGTCATCAGCACATTCAAGCAGA-3' (配列番号 1 2)、

SLC05A1 : センスプライマー : 5' -CTACTTTGGAGCAGTCATTGACAC-3' (配列番号 1 3); アンチセンスプライマー : 5' -CACGTTGTACTCCCAGCAAGA-3' (配列番号 1 4)、

5 LACTB2 : センスプライマー : 5' -TCCTTACCCACCAGAATGGCAATC-3' (配列番号 1 5);
アンチセンスプライマー : 5' -TGAAATTCTTCGTGGTTTTGGGTC-3' (配列番号 1 6)、

EYA1 : センスプライマー : 5' -GAAGTTCTGGTGTGCGTGAGTG-3' (配列番号 1 7);
アンチセンスプライマー : 5' -AATCCCCTAAAGTTAACCTAATGATG-3' (配列番号 1 8)、

10 TPD52 : センスプライマー : 5' -CCTCTAACTCCTGGGGTTGATTTC-3' (配列番号 1 9);
アンチセンスプライマー : 5' -CCTTCAGTTGAGTGCCGCTTTG-3' (配列番号 2 0)

であった。

なお、PCR 反応は、TaqMan PCR (Applied Biosystems) 法により cDNA 1 μ l、ABI TaqMan Fast Master mix 10 μ l、プライマー (50 μ M) 1 μ l および水 8 μ l を
15 含む合計 20 μ l の溶液を用い、96 $^{\circ}$ C 5 秒、60 $^{\circ}$ C 15 秒、40 サイクルで行った。

さらに、PRDM14 遺伝子の発現レベルを調べるため、実施例 1 と同様に、各サンプルから得られた全 RNA を用いて real-time PCR 法により PRDM14 mRNA の発現量を定量した。内部標準としては、GAPDH 遺伝子を用いた。プライマーは、実施例
20 1 と同様に Applied Biosystems から購入し、それぞれ PRDM14: ABI: Hs00225842、GAPDH: ABI: Hs99999905 を使用した。

また、PCR 反応は、TaqMan PCR (Applied Biosystems) 法により cDNA 1 μ l、ABI TaqMan Fast Master mix 10 μ l、プライマー (50 μ M) 1 μ l および水 8 μ l を
25 含む合計 20 μ l の溶液を用い、96 $^{\circ}$ C 5 秒、60 $^{\circ}$ C 15 秒、40 サイクルで行った。

結果を図 6 に示す。PRDM14 遺伝子のコピー数が 2 倍以上増幅している症例 (case 6、18、20、81、83、90、94~98、105、114) は、PRDM14 遺伝子の増幅を認めない症例 (case 1、8、11、13、15、19、85、103、106、112) に比べ、PRDM14 mRNA の発現レベルの平均値が有

意に高く ($p=0.013766$)、PRDM14 遺伝子の増幅がその発現上昇に関与することが示唆された。一方、染色体 8q13.3 領域に存在する他の遺伝子については、PRDM14 遺伝子のコピー数や PRDM14mRNA の発現量と相関したコピー数の増加は特に観察されなかった。

5 (2) 遺伝子増幅と遺伝子発現の関連性についての解析

実施例 3 (1) と同様にして、乳癌患者 17 人 (case 1、11、17~20、81、85、94、96~98、105、106、108、112、114 : 性別、年齢、疾患の分類は表 6 に示す) から得たサンプルを用いて、PRDM14 の mRNA 発現量に加え、さらに染色体 8q13.3 領域に存在する遺伝子である SLC05A1、SULF1、

10 NCOA2、TRAM1、LACTB2、XKR9、EYA1 についてもその mRNA 発現量を調べた。

遺伝子発現解析に使用したプライマーは、いずれも Applied Biosystems より購入し、それぞれ SLC05A1 : ABI: Hs00229597、PRDM14 : ABI: Hs00225842、SULF1 : ABI: Hs00290918、NCO2 : ABI: Hs00197990、TRAM1 : ABI: Hs00560089、LACTB2 : ABI: Hs00211288、XKR9 : ABI: Hs00416980、EYA1 : ABI: Hs00166804 であった。

表 6

<実施例3>(2)遺伝子増幅と遺伝子発現の関連性についての解析

乳癌患者:17人

Case No.	性別	年齢	疾患の分類	組織学的分類
1	女	39	乳癌	硬癌
11	女	29	乳癌	特殊型, 管状癌
17	女	54	乳癌	充実腺管癌
18	女	63	乳癌	硬癌
19	女	69	乳癌	乳頭腺管癌
20	女	51	乳癌	充実腺管癌
81	女	73	乳癌	硬癌
85	女	68	乳癌	乳頭腺管癌
94	女	63	乳癌	充実腺管癌
96	女	52	乳癌	硬癌
97	女	44	乳癌	硬癌
98	女	44	乳癌	硬癌
105	女	71	乳癌	乳頭腺管癌, 硬癌
106	女	45	乳癌	硬癌
108	女	78	乳癌	硬癌
112	女	40	乳癌	乳頭腺管癌
114	女	57	乳癌	乳頭腺管癌

その結果を図 7 に示す。

PRDM14 遺伝子の増幅が認められた乳癌患者 9 人 (case No. 18、20、81、94、96~98、105、114) においてはいずれも PRDM14 mRNA 量が増加していた。一方、NCOA2 mRNA は多くの乳癌患者において顕著に発現上昇が認められたが、その発現は PRDM14 遺伝子の増幅とは無関係であった。また、SLC05A1、SULF1、TRAM1、LACTB2、XKR9 については、mRNA 量の増加は観察されなかった。したがって、染色体 8q13.3 領域の遺伝子増幅の標的遺伝子は PRDM14 遺伝子であることが示唆された。

<実施例 4>PRDM14 の細胞内局在の解析

PRDM14 の細胞内局在を明らかにする目的で、蛍光免疫染色を行った。

まず PRDM14 遺伝子 (Genbank Accession number: BC052311) (配列番号 2) を

発現ベクター pCMV-Tag2A (Stratagene) に挿入し、発現コンストラクト pCMV-Tag2A/PRDM14 を作製して、PRDM14 が発現していない細胞株である SKBr-3 細胞に、エレクトロポレーション法により導入した。導入から 24 時間後に細胞を 100%メタノールで固定し、定法により一次抗体に抗 PRDM14 抗体 (ABGENT 社、
5 AP1214A、100 倍希釈で使用)、二次抗体に Alexa488 で標識した抗ウサギ抗体 (Molecular Probe 社、Alexa Flour 488、goat anti rabbit IgG、500 倍希釈で使用) を用いて蛍光免疫染色を行った。また、同時に Vectashield (Vector Laboratories) を用いて、DAPI (4', 6-ジアミノ-2-フェニルインドール) により核染色を行った。コントロールとして発現ベクター pCMV-Tag2A
10 (Stratagene) のみを導入した細胞を用いた。

結果を図 8 に示す (画像の倍率は 400 倍)。

抗 PRDM14 抗体による染色像 (Anti-PRDM14) と DAPI による染色像 (DAPI) とを重ね合わせた画像 (Merge) をみると、PRDM14 が主に核に局在していることが理解される。この観察結果は、PRDM14 がヒストンメチル化酵素であることを考える
15 と妥当なものであると考えられる。

<実施例 5>細胞増殖における PRDM14 の関与

PRDM14 の癌化における役割を明らかにする目的で、PRDM14 が発現していない細胞に PRDM14 遺伝子を導入した場合の細胞増殖について検討した。

20 PRDM14 遺伝子 (Genbank Accession number: BC052311) (配列番号 2) を発現ベクター pCMV-Tag2A (Stratagene) に挿入し、発現コンストラクト pCMV-Tag2A/PRDM14 を作製した。pCMV-Tag2A/PRDM14 を乳癌細胞株である MCF7、SKBr-3 細胞にエレクトロポレーション法により導入し、コンストラクトが導入された細胞を薬剤マーカー G418 により選別して、コロニー形成能を解析した。エ
25 クトロポレーションによるコンストラクト導入から 14 日後に、細胞をメタノールにより固定して、ギムザ液にて染色し、コロニー数を測定した。コントロールとして発現ベクター (pCMV-Tag2A) のみを導入した細胞を用い、コロニー形成能を比較した (各サンプルにつき 3 回ずつ実験を行った)。

結果を図 9 A、B に示す。

PRDM14 遺伝子を導入した場合には、MCF7、SKBr-3 のいずれの細胞株でもコロニー数が大きく増加しており、PRDM14 が癌細胞のコロニー形成能を促進し、細胞増殖に関与することが示唆された。3 回同様の実験を行い、実験に再現性を認めた。

5 <実施例 6> 薬剤抵抗性における PRDM14 の関与

PRDM14 の機能をさらに詳細に解析するため、乳癌細胞株 SKBr-3 に PRDM14 遺伝子を導入して抗癌剤への抵抗性に対する PRDM14 の作用を検討した。

PRDM14 遺伝子 (Genbank Accession number: BC052311) (配列番号 2) を発現ベクター pCMV-Tag2A (Stratagene) に挿入し、安定発現のためのコンストラクト pCMV-Tag2A/PRDM14 を作製した。このコンストラクトを乳癌細胞株である SKBr-3 細胞に Nucleofector (Amaxa) を用いてエレクトロポレーション法により導入し、コンストラクトが導入された細胞を 0.7mg/ml の G418 により選別して、PRDM14 遺伝子を安定発現する細胞株を樹立した。コントロールとして、発現ベクター pCMV-Tag2A のみを導入した細胞株を作製した。PRDM14 を過剰発現させていない細胞株 (発現ベクターのみが導入された細胞株) と PRDM14 を安定発現する細胞株 (2 クローン: P-8 および P-9) について、抗癌剤であるシスプラチン (CDDP) (50 μ M)、エトポシド (VP-16) (50 μ M)、アドリアマイシン (200 ng/ml)、ドセタキセル (1 μ M) をそれぞれ 48 時間処置し、MTT 法により細胞の生存率を測定した。

20 結果を図 10 に示す。

PRDM14 を安定発現した細胞株においては、PRDM14 を発現していない細胞に比べ、いずれの薬剤を処置した場合にも、細胞の生存率が上昇し、薬剤抵抗性を示した。したがって、PRDM14 の発現は、抗癌剤感受性の低下に関与することが示唆された。

25 <実施例 7> PRDM14 遺伝子のノックダウンによる細胞増殖抑制効果および薬剤感受性の増強

細胞増殖および薬剤感受性における内在性 PRDM14 の役割を検討する目的で、PRDM14 に対する siRNA を用い、PRDM14 を過剰発現する卵巣癌細胞株 PA-1 において PRDM14 遺伝子のノックダウンを行った。

まず、エレクトロポレーション法を用いて、GFP を発現するベクターを PA-1 細胞に導入し、その遺伝子導入効率を検討・最適化した。GFP 発現ベクターを導入した PA-1 細胞の顕微鏡画像（倍率は 400 倍）（位相差顕微鏡による細胞画像（左：Phase）、蛍光顕微鏡による細胞画像（中：GFP）および前記 2 つの細胞画像の重ね合わせ（右：Merge））を図 1 1 に示す。図 1 1 から明らかな通り、約 80% の細胞に遺伝子導入が可能となったことが理解される。

この条件を用い、下記配列を有する 3 種類の siRNA（siRNA-PRDM14-1、siRNA-PRDM14-2 および siRNA-PRDM14-3）のカクテルを PA-1 細胞に導入した。各 siRNA の塩基配列は以下の通りであった；

- 10 siRNA-PRDM14-1：センス：5' -CCAGUGAAGUGAAGACCUATT-3'（配列番号 3）、アンチセンス：5' -UAGGUCUUCACUUCACUGGTT-3'（配列番号 4）；
 siRNA-PRDM14-2：センス：5' -GGACAAGGGCGAUAGGAAATT-3'（配列番号 5）、アンチセンス：5' -UUUCCUAUCGCCCUGUCCTT-3'（配列番号 6）；
 siRNA-PRDM14-3：センス：5' -GGGAAAAUCUUCUCAGAUCTT-3'（配列番号 7）、アンチセンス：5' -GAUCUGAGAAGAUUUUCCCTT-3'（配列番号 8）

また、コントロールとして、下記 3 種類の配列を有する siRNA（siRNA-control-1、siRNA-control-2 および siRNA-control-3）のカクテルを用いた。

- siRNA-control-1：5' -ATCCGCGCGATAGTACGTA-3'（配列番号 2 1）
 siRNA-control-2：5' -TTACGCGTAGCGTAATACG-3'（配列番号 2 2）
 20 siRNA-control-3：5' -TATTCGCGGTATAGCGGT-3'（配列番号 2 3）

siRNA 導入から 48 時間後における PRDM14 遺伝子の発現レベルについて、ABI7900real-time PCR 解析装置 (Applied Biosystems) を使用し、実施例 1 と同様に、内部標準として GAPDH 遺伝子を用い、GAPDH 遺伝子の発現量に対する PRDM14 遺伝子の発現量の比（すなわち、PRDM14 遺伝子の発現量 / GAPDH 遺伝子の発現量）により解析したところ、図 1 2 に示す通り、コントロール siRNA を導入した細胞における PRDM14 の発現レベルを 100% とした場合に、上記 siRNA-PRDM14-1~3 のカクテルを導入した細胞では、PRDM14 遺伝子の発現レベルが 14.3% まで抑制されることが示された。

次に、PRDM14 遺伝子のノックダウンによる増殖抑制効果を解析する目的で、上

記 siRNA-PRDM14-1~3 のカクテルを PA-1 細胞に導入してから 48 時間後および 96 時間後における細胞数を計測したところ、図 1 3 に示すように、PRDM14 に対する siRNA (siRNA-PRDM14-1~3) を導入した PA-1 細胞では、コントロール siRNA (siRNA-control-1~3) を導入した細胞に比べ、細胞数が 48 時間後では約 40 %、
5 96 時間後では約 70 % 減少しており、細胞増殖の顕著な抑制が認められた。したがって、癌細胞における PRDM14 遺伝子の発現を抑制することにより、あるいは、癌細胞における PRDM14 の阻害により、癌細胞の増殖抑制が可能となることが示された。

さらに、PRDM14 のノックダウンによる薬剤感受性の増強効果について検討するため、上記 siRNA-PRDM14-1~3 のカクテルを導入してから 48 時間後、抗癌剤であるシスプラチン (CDDP) ($50 \mu\text{M}$) またはドセタキセル ($1 \mu\text{M}$) をそれぞれ 48 時間処置し、フローサイトメトリーによりサブ G1 期の細胞数の割合を測定して、各薬剤により惹起される細胞のアポトーシスを検出した。結果を図 1 4 に示す。PRDM14 siRNA (siRNA-PRDM14-1~3) を導入した PA-1 細胞では、コントロール siRNA を導入した細胞に比べ、CDDP またはドセタキセルのいずれを処置した細胞でも、アポトーシスが惹起された細胞の数が約 15 % 程度増加しており、PRDM14 遺伝子のノックダウンにより、CDDP およびドセタキセルによるアポトーシスを増強することが示された。したがって、癌細胞における PRDM14 遺伝子の発現を抑制することにより、あるいは、癌細胞における PRDM14 の阻害により、抗癌剤
15 に対する感受性が増強することが示唆された。

以上の通り、本願発明者らは、PRDM ファミリーの遺伝子発現プロファイルについて、real-time PCR 法と delta/delta CT 法とを組み合わせることで、より解析し、乳癌および卵巣癌において PRDM14 遺伝子の発現が特異的に上昇していることを初めて明らかにした。また、この PRDM14 遺伝子の発現上昇は染色体増幅によるものであること、PRDM14 遺伝子の発現上昇によりタンパク質レベルでも癌組織における発現が増加していることを見出すとともに、PRDM14 が細胞増殖を促進することなどから、PRDM14 遺伝子が癌遺伝子としての作用を有するものであることを初めて示唆した。そしてさらに、これらの知見に基づいて、癌細胞における PRDM14 遺伝子の発現を抑制したところ、癌細胞の増殖を顕著に抑制することおよ
25

び癌細胞の抗癌剤感受性を増強することを明らかにした。

これらの結果から、本願発明の治療薬に用いられる PRDM14 遺伝子の発現阻害剤または PRDM14 の阻害剤は、乳癌または卵巣癌細胞の増殖抑制効果を奏し、さらに、抗癌剤を処置した癌細胞においては、抗癌剤に対する感受性を高めることができることが示された。そしてまた、本発明の方法に従い、あるいは、本発明のキットを用いることにより、対象から得た生物学的試料における PRDM14 遺伝子の発現量に基づいて、対象における乳癌または卵巣癌を検出することが可能であることが示された。

10 産業上の利用可能性

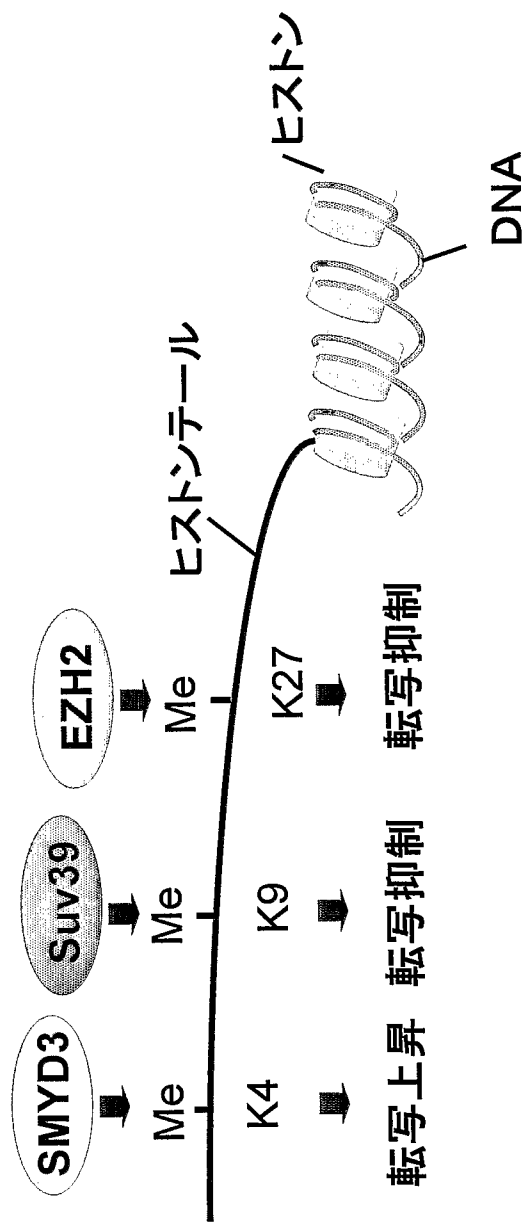
本発明において用いられる PRDM14 遺伝子は、乳癌または卵巣癌病巣で特異的に発現が亢進している。したがって、PRDM14 遺伝子の発現阻害剤または PRDM14 の阻害剤を含有してなる本発明の治療薬は、乳癌または卵巣癌のための治療薬として安全に使用することができ、高い治療効果が得られるものとして医薬品への応用が期待される。さらにまた、本発明によれば、PRDM14 遺伝子の発現に基づいた乳癌や卵巣癌のための検出方法や検出用キットも提供することができるから、本発明は、乳癌または卵巣癌の治療のみならず、その診断や研究にも大いに寄与するものである。

請 求 の 範 囲

1. PRDM14 遺伝子の発現阻害剤を含有してなる、乳癌または卵巣癌のための治療薬。
- 5 2. PRDM14 遺伝子の発現阻害剤が、PRDM14 遺伝子の発現を阻害するアンチセンス、siRNA または shRNA から選択される、請求項 1 に記載の治療薬。
3. PRDM14 遺伝子の発現を阻害するアンチセンスが、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその一部であるペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列
10 に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチドである、請求項 2 に記載の治療薬。
4. PRDM14 遺伝子の発現を阻害する siRNA または shRNA が、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその一部であるペプチドに対する siRNA または shRNA である、
15 請求項 2 に記載の治療薬。
5. PRDM14 の阻害剤を含有してなる、乳癌または卵巣癌のための治療薬。
6. PRDM14 の阻害剤が、抗 PRDM14 抗体またはその断片である、請求項 5 に記載の治療薬。
7. 対象から得た生物学的試料における PRDM14 遺伝子の発現量を基準として、
20 前記対象における乳癌または卵巣癌を検出する方法。
8. 対象から得た生物学的試料における内部標準遺伝子の発現量に対する PRDM14 遺伝子の発現量の比が、前記対象と同種の健常な対象から得た生物学的試料における内部標準遺伝子の発現量に対する PRDM14 遺伝子の発現量の比よりも少なくとも 5 倍多いことを基準として乳癌または卵巣癌を検出する
25 ことを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。
9. PRDM14 遺伝子の発現量が、PRDM14 をコードする mRNA の発現量に基づいて定量される、請求項 7 または 8 に記載の方法。
10. PRDM14 をコードする mRNA の発現量が、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応により定量される、請求項 9 に記載の方法。

- 1 1. 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応が、配列番号 2 で表される塩基配列と同一もしくは実質的に同一の塩基配列の一部を含むセンスプライマー、および配列番号 2 で表される塩基配列と同一もしくは実質的に同一の塩基配列に相補的な塩基配列の一部を含むアンチセンスプライマーを用いて行われる、請求項 10 に記載の方法。
- 5 1 2. 配列番号 2 で表される塩基配列と同一もしくは実質的に同一の塩基配列の一部を含むセンスプライマー、および配列番号 2 で表される塩基配列と同一もしくは実質的に同一の塩基配列に相補的な塩基配列の一部を含むアンチセンスプライマーを含む、請求項 7 ～ 1 1 のいずれかに記載の方法を行うための乳癌または卵巣癌検出用キット。
- 10 1 3. PRDM14 遺伝子の発現量が、PRDM14 の発現量に基づいて定量される、請求項 7 または 8 に記載の方法。
- 1 4. PRDM14 の発現量が、抗 PRDM14 抗体またはその断片を用いた抗原抗体反応により定量される、請求項 1 3 に記載の方法。
- 15 1 5. 抗 PRDM14 抗体またはその断片を含む、請求項 7、8、1 3 または 1 4 のいずれかに記載の方法を行うための乳癌または卵巣癌検出用キット。

図1



2/17

図2

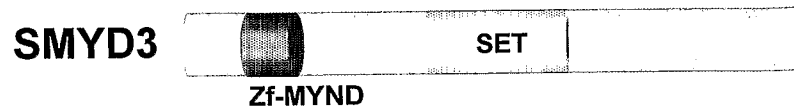
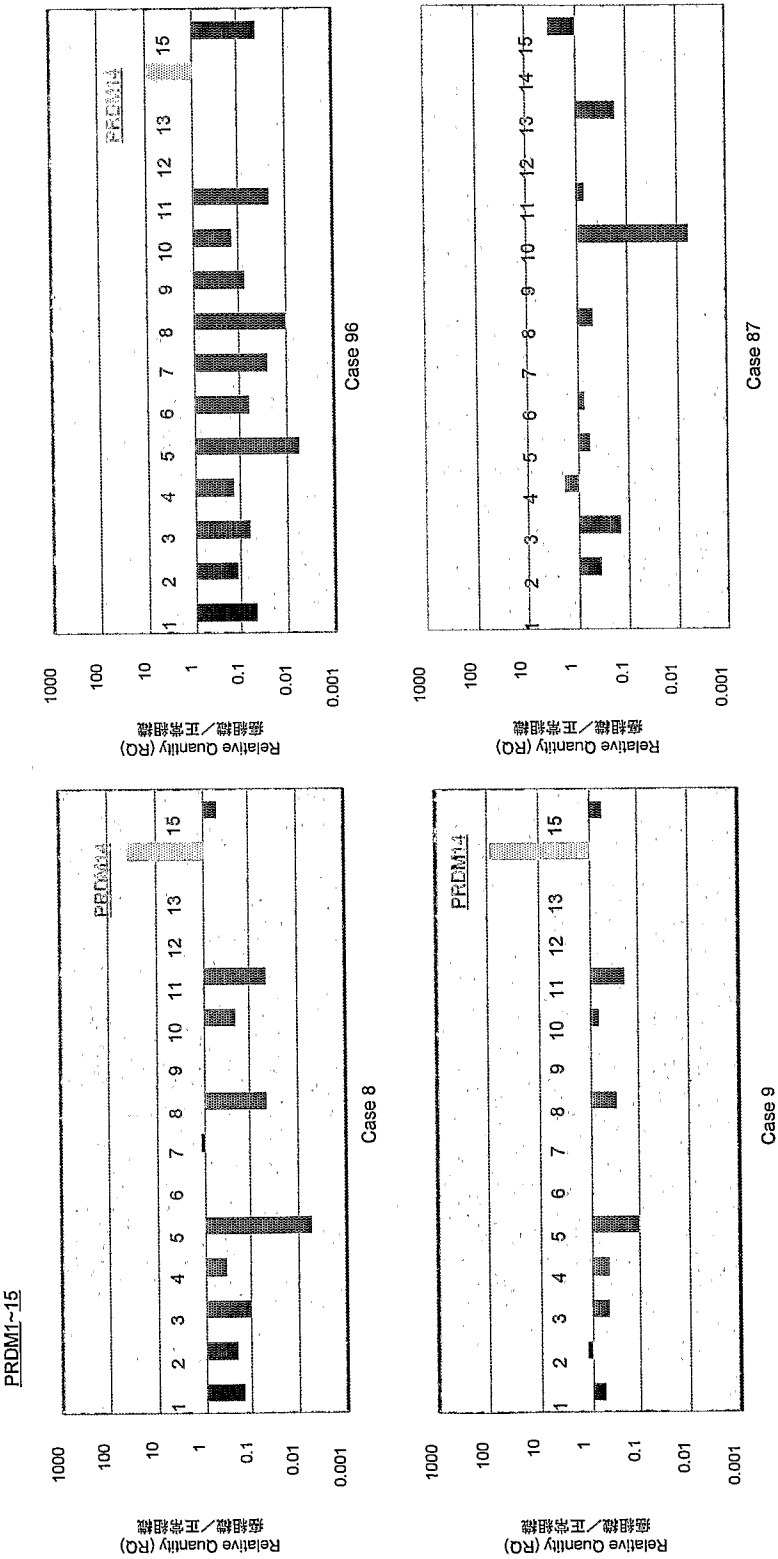
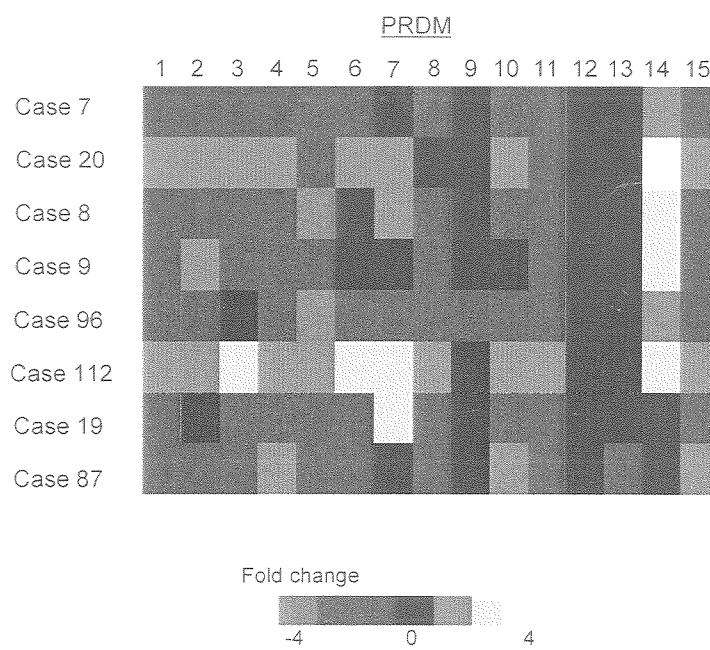


図3A





5/17

図4A

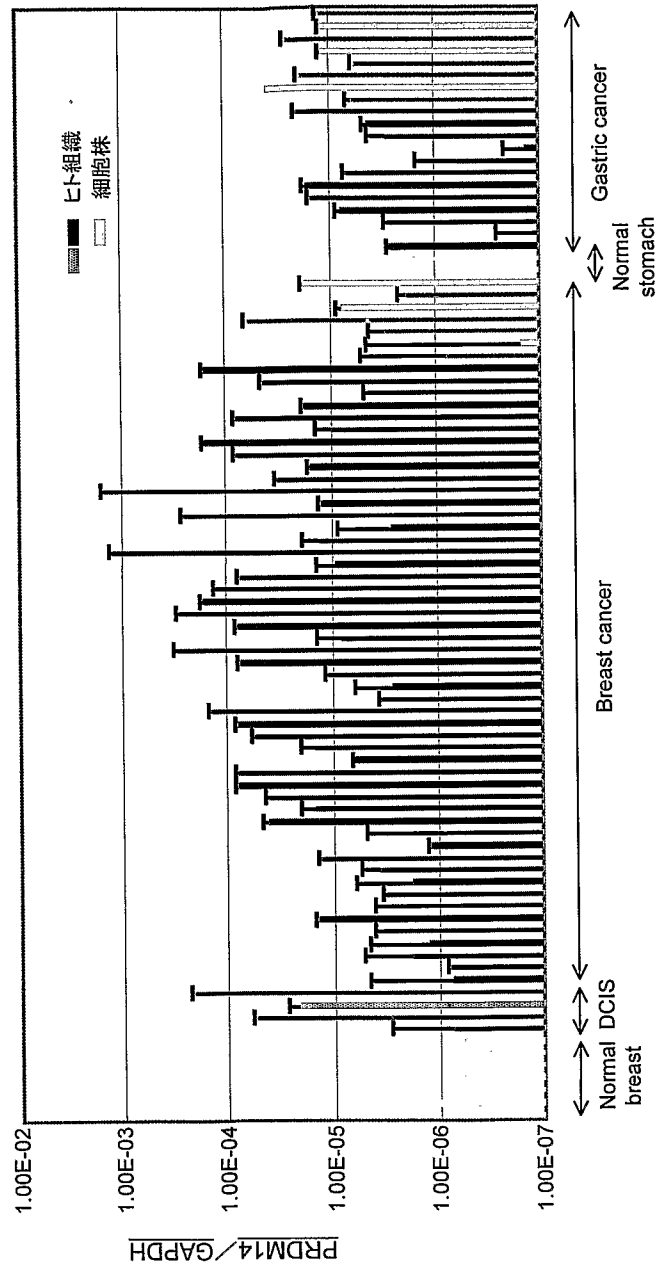
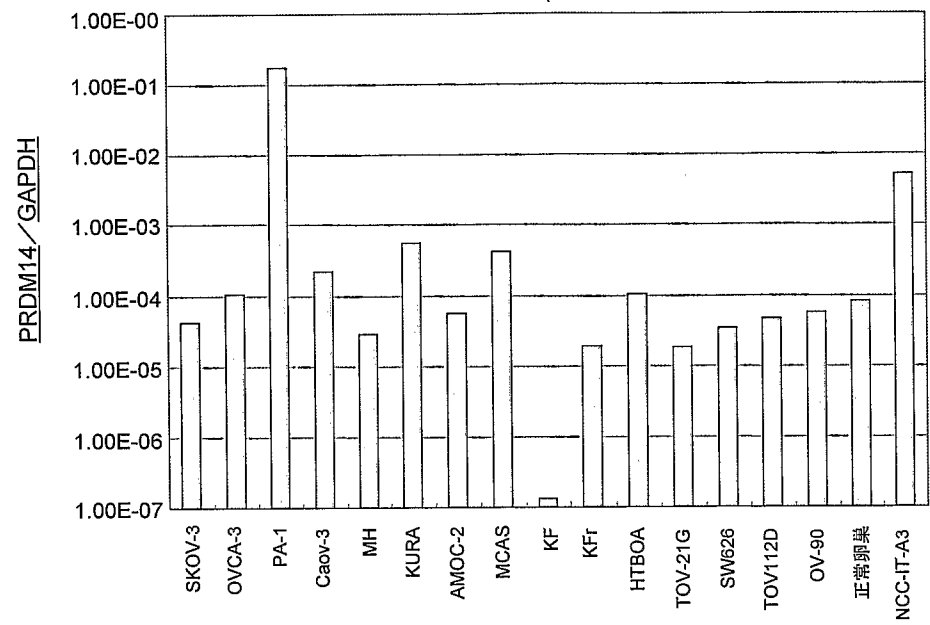
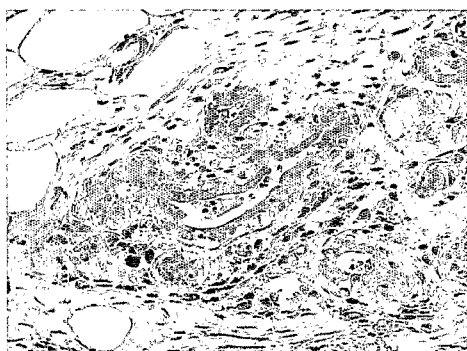


図4B

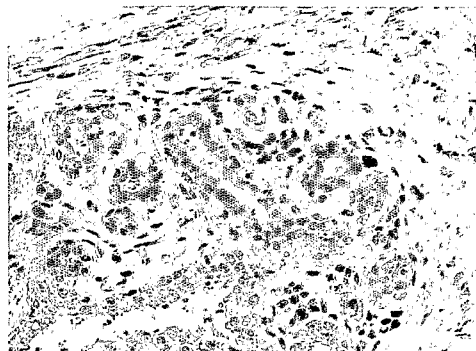


7/17

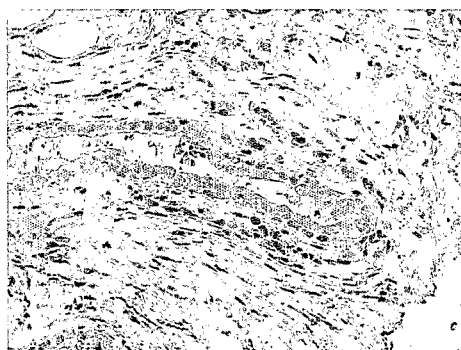
図5



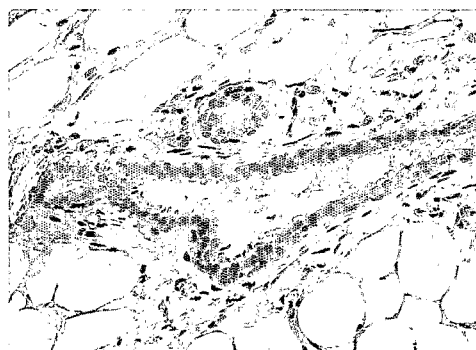
Case 105



Case 96



Case 92



Case 86

8/17

図6

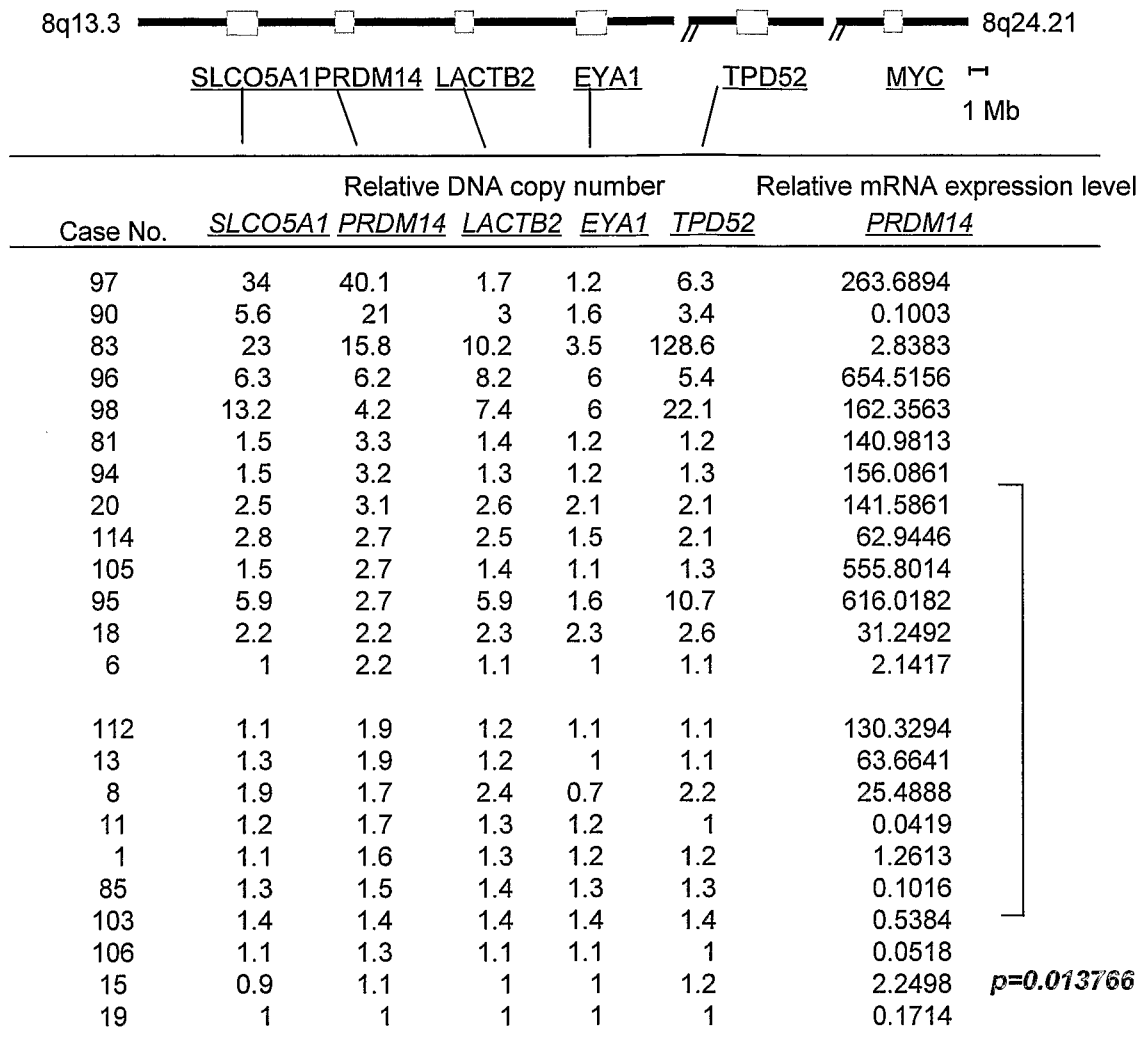


图7

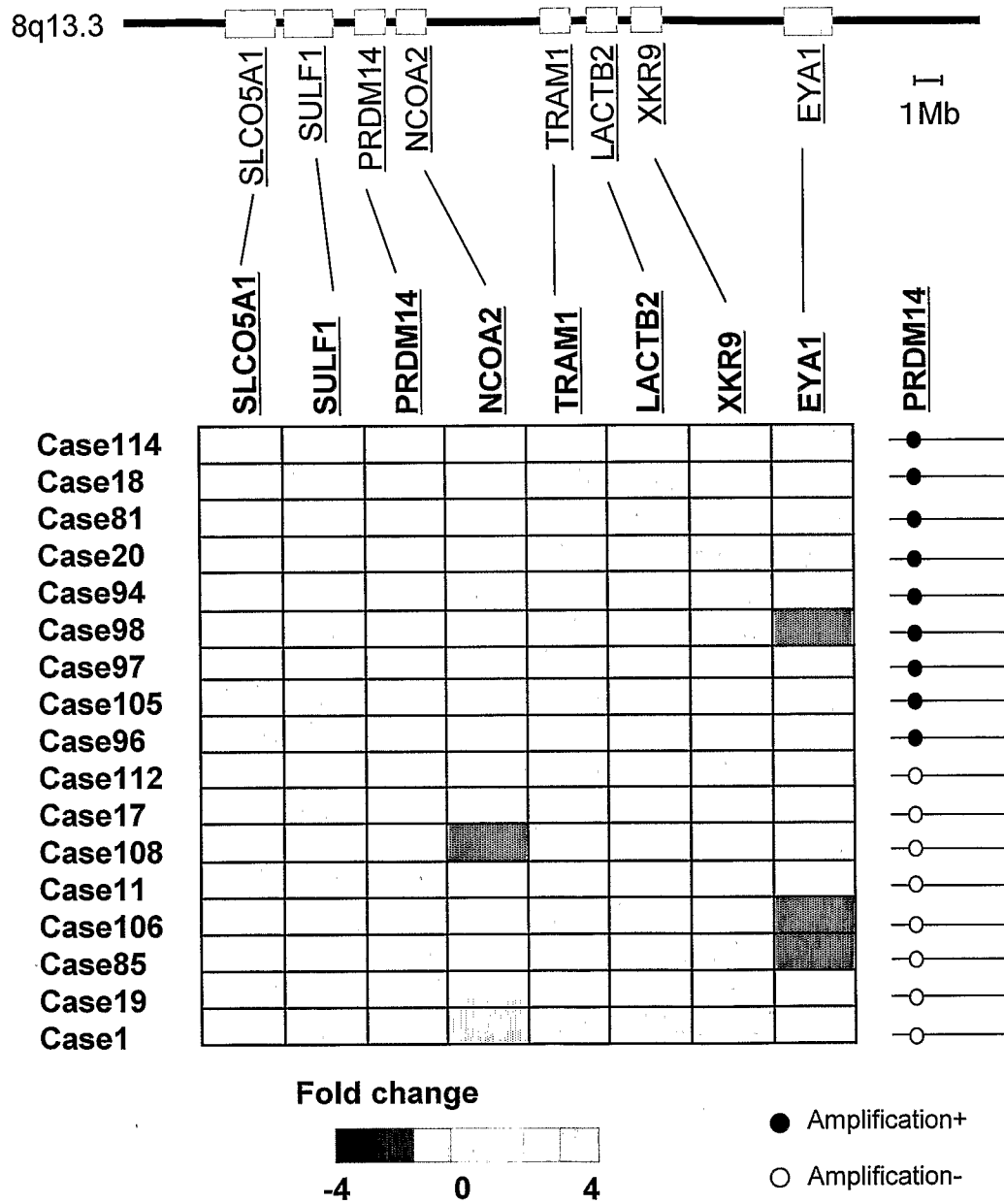
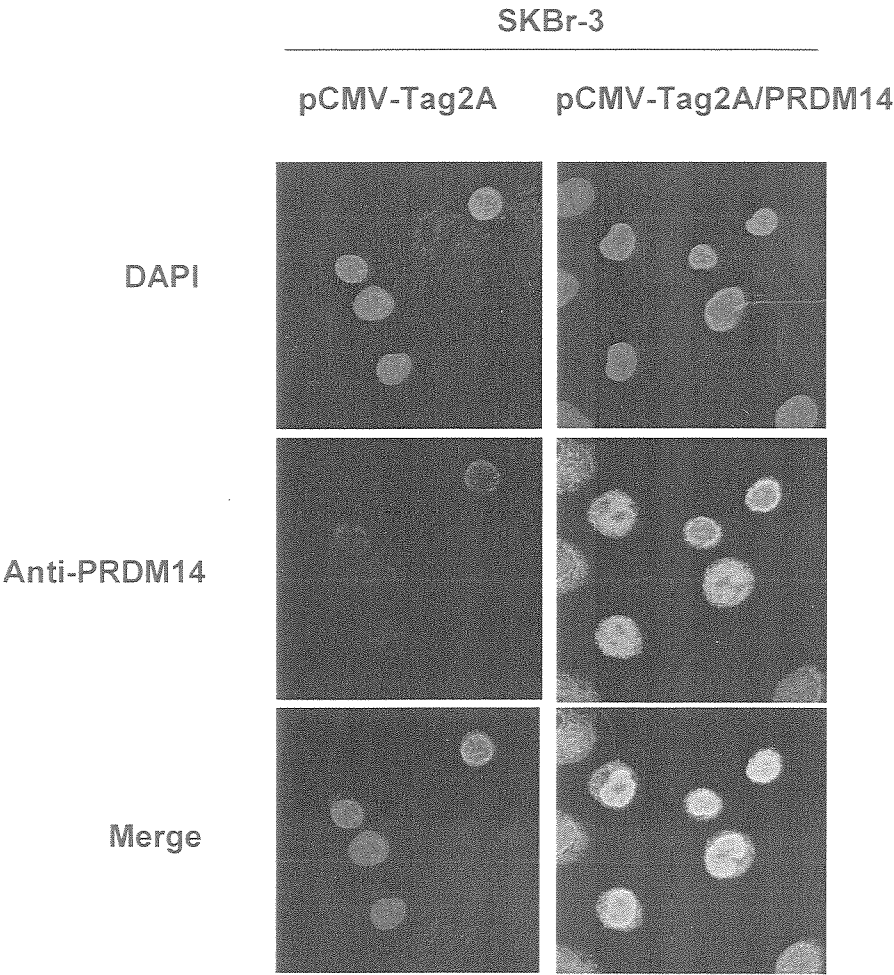
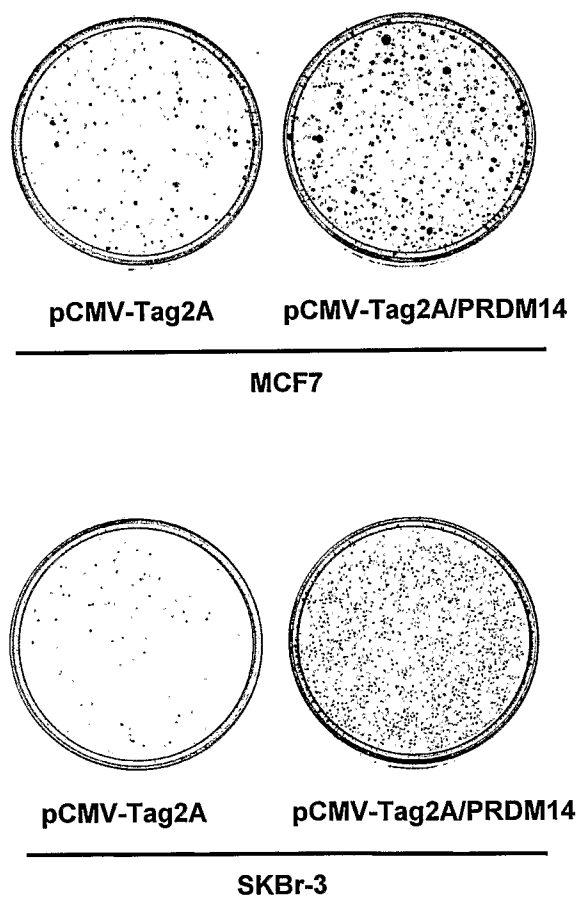


図8



11/17

図9A



12/17

図9B

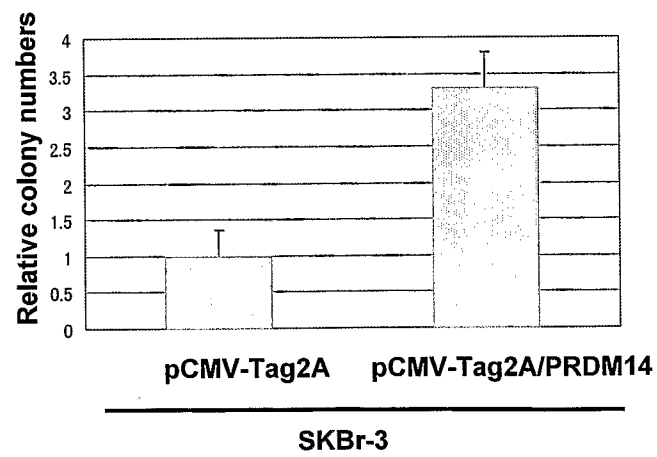
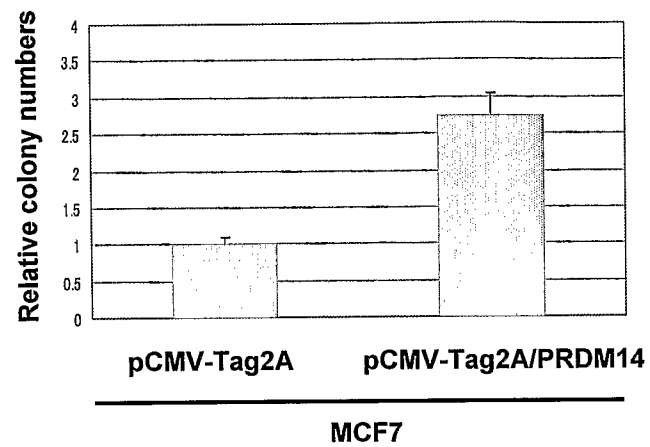
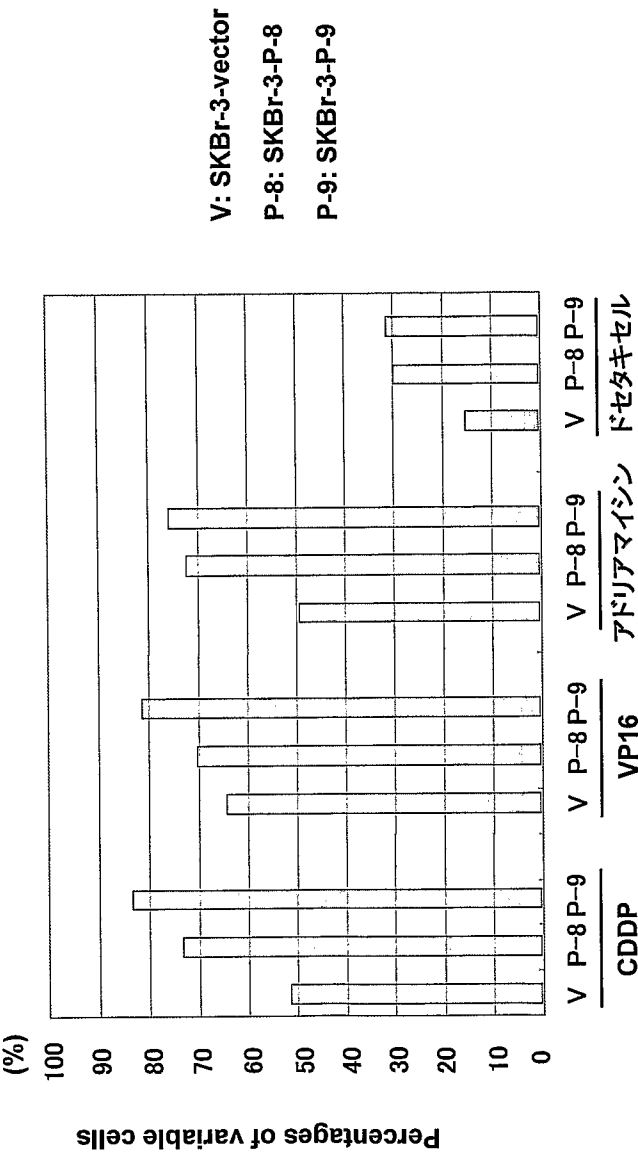


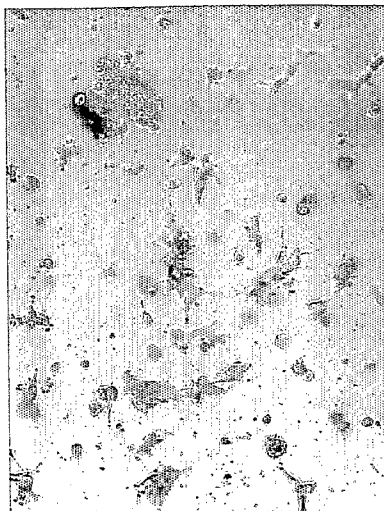
図10



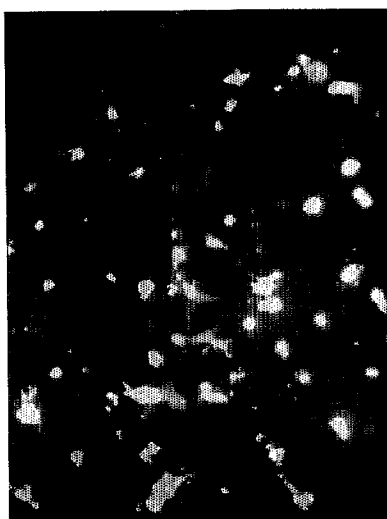
14/17

図11

Merge



GFP



Phase

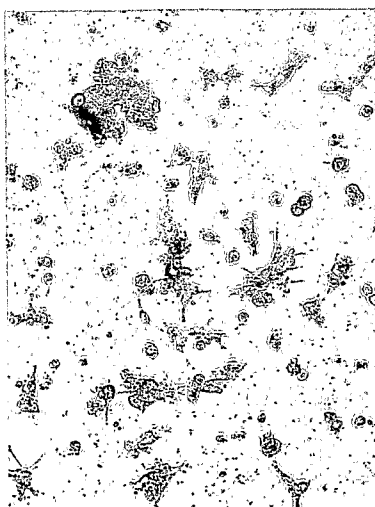


図12

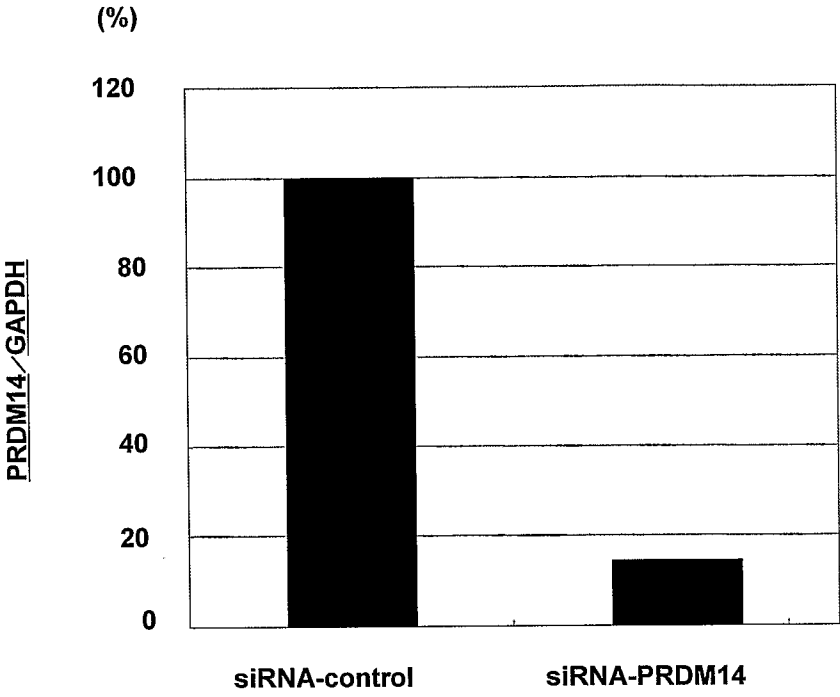


図13

16/17

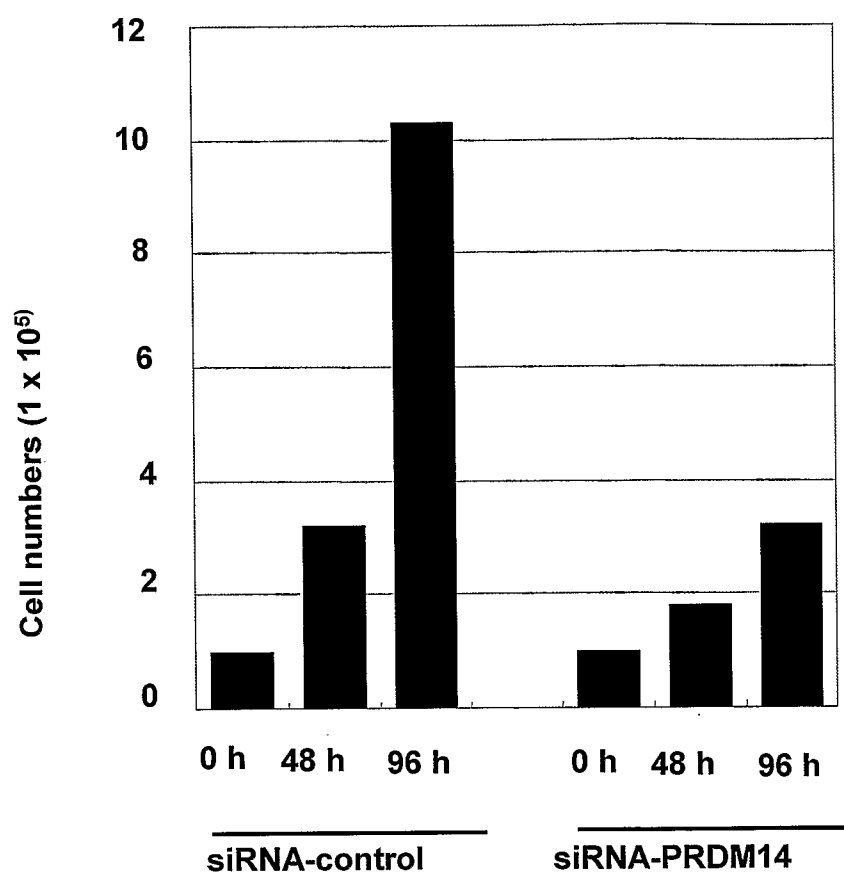
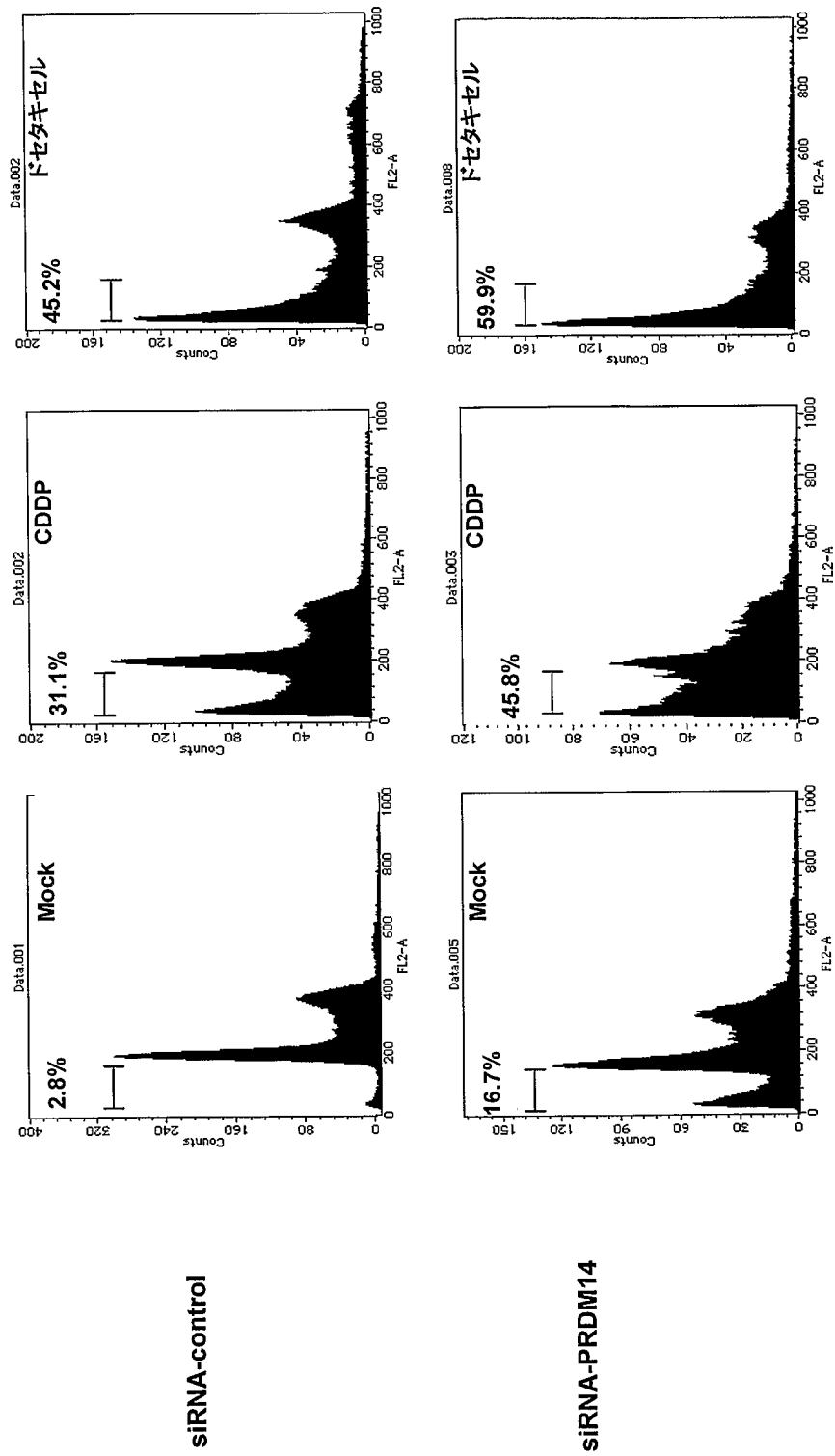


図14



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/069413

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K45/00(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i,
A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K45/00, A61K31/7105, A61K39/395, A61K48/00, A61P35/00

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

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

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

BIOSIS (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2),
JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2006/0014173 A1 (BURNHAM INST, US), 19 January, 2006 (19.01.06), Fig. 6; table 1; example VI (Family: none)	1-6, 12, 15
Y	Noriko NISHIKAWA et al., "Nyugan ni Okeru Histone Methylation Koso PRDM14 Idenshi no Hatsugen Josho Oyobi Idenshi Zofuku", Annual Meeting of the Japan Cancer Association Kiji, 28 August, 2006 (28.08.06), Vol.65th, page 154	1-6, 12, 15

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 October, 2007 (19.10.07)

Date of mailing of the international search report
30 October, 2007 (30.10.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/069413

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 7-11, 13, 14

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in the above claims pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT (continued to extra sheet)

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/069413

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

and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))			
Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))			
Int.Cl. A61K45/00, A61K31/7105, A61K39/395, A61K48/00, A61P35/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2007年 日本国実用新案登録公報 1996-2007年 日本国登録実用新案公報 1994-2007年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
BIOSIS(STN), CA(STN), MEDLINE(STN), JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
Y	US 2006/0014173 A1 (BURNHAM INST,US) 2006.01.19, Figure 6, Table 1, Example VI 参照 (ファミリーなし)	1-6, 12, 15	
Y	西川紀子 他, 乳癌におけるヒストンメチル化酵素PRDM14遺伝子の 発現上昇および遺伝子増幅, 日本癌学会学術総会記事, 2006.08.28, Vol.65th, p.154	1-6, 12, 15	
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献	
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 19.10.2007		国際調査報告の発送日 30.10.2007	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (I S A / J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 佐久 敬	4 C 3 0 3 7
		電話番号 03-3581-1101 内線 3452	

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

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

1. ☒ 請求の範囲7-11, 13, 14 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
前記請求の範囲に記載された発明は、ヒトの身体の治療方法に係るものであるから、P C T 17条(2)(a)(i)及びP C T 規則39.1(i v)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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