

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4201057号

(P4201057)

(45) 発行日 平成20年12月24日(2008.12.24)

(24) 登録日 平成20年10月17日(2008.10.17)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/705 (2006.01)

C O 7 K 14/705

C O 7 K 16/32 (2006.01)

C O 7 K 16/32

G O 1 N 33/574 (2006.01)

G O 1 N 33/574 A

請求項の数 14 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-532754
 (86) (22) 出願日 平成8年4月25日(1996.4.25)
 (65) 公表番号 特表平11-504803
 (43) 公表日 平成11年5月11日(1999.5.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1996/005848
 (87) 国際公開番号 WO1996/034117
 (87) 国際公開日 平成8年10月31日(1996.10.31)
 審査請求日 平成15年3月28日(2003.3.28)
 (31) 優先権主張番号 08/430,225
 (32) 優先日 平成7年4月28日(1995.4.28)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者

アメリカ合衆国
 アメリカ合衆国メリーランド州20852
 , ロックヴィル, エグゼキューティヴ・ブ
 ールヴァード 6011, スウィート 3
 25, ナショナル・インスティテューツ・
 オブ・ヘルス, オフィス・オブ・テクノロ
 ジー・トランスファー

(73) 特許権者

ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシテイ
 アメリカ合衆国メリーランド州21231
 -1001, バルティモア, ノース・ボン
 ド・ストリート 422

(74) 代理人

弁理士 清水 初志

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト転移サプレッサー遺伝子K A I 1 に由来する試薬を使用する診断方法及び遺伝子療法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験者における悪性癌の存在をインビトロで検出する方法であって、以下の工程を含む方法：

(a) K A I 1 m R N A の存在に関して被験者から単離したm R N A を分析する工程、および

(b) 前記被験者のK A I 1 m R N A を、配列番号：20に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする、正常なヒト由来の野生型K A I 1 m R N A と比較することを含み、該野生型と比較した前記被験者のK A I 1 m R N A の発現の喪失または低下の存在が、前記被験者における悪性癌の存在を実証する方法。

【請求項2】

分析する工程がノーザンブロット分析を含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】

分析する工程がR T - P C Rを含む、請求項1記載の方法。

【請求項4】

P C R 工程に用いられるプライマーが、配列番号：20に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするK A I 1 c D N A から誘導される、請求項3記載の方法。

【請求項5】

P C R 工程がプライマー対を使用し、プライマー対の一方のプライマーが、配列番号：1～14のいずれかに示される核酸配列からなる、請求項4の方法。

【請求項 6】

分析する工程が R T - P C R - S S C P を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

P C R 工程に用いられるプライマーが K A I 1 c D N A から誘導される、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

プライマーが、配列番号：1～14 に示される核酸配列から選択される、請求項 7 の方法。

【請求項 9】

被験者における悪性癌の存在をインビトロで検出する方法であって、以下の工程を含む方法： 10

(a) K A I 1 タンパク質の存在に関して、被験者由来のサンプルにおいてタンパク質を分析する工程、および

(b) 前記被験者の K A I 1 タンパク質を、配列番号：20 に示されるアミノ酸配列からなる、正常なヒト由来の野生型 K A I 1 タンパク質と比較することを含み、該野生型タンパク質と比較した前記被験者の K A I 1 タンパク質の発現の喪失または低下の存在が、前記被験者における悪性癌の存在を実証する方法。

【請求項 10】

分析する工程がウェスタンブロッティングを含む、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

分析する工程がイムノヒストケミストリーを含む、請求項 9 記載の方法。

【請求項 12】

配列番号：1～14 のいずれかに示される群から選択される核酸配列からなる、精製単離されたプライマー。

【請求項 13】

被験者における悪性癌の存在の検出に用いるための診断キットであって、配列番号：1～14 から成る群から選択される核酸配列からなるプライマーを含むキット。

【請求項 14】

被験者に野生型 K A I 1 遺伝子を供給するための薬剤の製造のための、配列番号：20 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする、正常なヒト由来の野生型 K A I 1 遺伝子を含む組換えベクターの使用。 30

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は癌診断法及び治療法の分野である。特に、本発明は被験者における悪性癌の存在の確認に有用な野生型 K A I 1 遺伝子配列、K A I 1 m R N A 及び K A I 1 タンパク質の変化の検出と、被験者における悪性疾患に対する遺伝的素因の検出とに関する。本発明はさらに野生型 K A I 1 遺伝子産物を修復するための遺伝子療法の使用に関する。

発明の背景

発癌現象が細胞増殖と分化との分子制御を不良に調節する遺伝的及び後成的 (epigenetic) 変化を含む多段階プロセスであることが、広く受け入れられている。これらの遺伝的変化は、腫瘍形成を開始させ、並びに腫瘍を進行させることができるプロト-癌遺伝子 (proto-oncogene) の活性化及び／又は腫瘍サプレッサー遺伝子の不活化を包含しうる。例えば、腫瘍サプレッサー遺伝子 p 5 3 は結腸直腸癌の後期に関与する可能性があり (Baker, S. J. 等 (1989) Science, 244: 217～221)、推定の転移サプレッサー遺伝子 nm 2 3 は転移腫瘍対非転移腫瘍においてダウンレギュレートされることが判明した (Steeg, P. S. 等 (1988) J. Natl. Canc. Inst., 80: 200～204)。さらに、ras 癌遺伝子の活性化と N-myc の増幅とが、例えば胸部癌 (Liu, E. 等 (1988) Oncogene, 3: 323～327) 及び神経芽細胞腫 (Brodeur, G. M. 等, (1984) Science, 224: 1121～1124; Schwab, M. 等, (1984) Proc. Natl. 40

Acad. Sci. U. S. A., 81:4940-4944)のようなヒト腫瘍の進行に関係づけられているが、これらは腫瘍進行の万能的な決定因子であるとは思われない (Nicolson, G. L. Bio Essays, 13:337-342 (1991))。

しかし、発癌現象の基礎をなす遺伝的变化の理解におけるこれらの進歩にも拘わらず、大抵の癌患者の主要な死因である転移 (Rosenberg, S. A., Surgical Treatment of Metastasis Cancer (Lippincott, Philadelphia PA 1987)) は依然として癌の最も重要な面であるにも拘わらず、殆ど理解されていない1面である (Liotta, L. A. 等 (1991) Cell, 64:327-336; Nicolson, G. L. (1991) Bio Essays, 13:337-342 及び Steeg, P. S. (1992) Curr. Opin. Oncol., 4:134-141)。したがって、転移腫瘍サプレッサー遺伝子の単離は癌の診断と治療のために非常に重要である。

非転移性腫瘍細胞と転移性腫瘍細胞とのハイブリダイゼーションが腫瘍形成性であるがもはや転移性ではない細胞ハイブリッドを生成しているという、Ramshaw等による細胞融合研究 ((1983) Int. J. Cancer, 32:471-478) は、転移サプレッサー遺伝子の存在を実証した。さらに最近では、Ichikawa等 (1991) (Cancer Res. 51:3788-3792) は、ラット前立腺癌細胞の転移能力が、非転移性癌細胞に融合した場合には抑制されること及び転移の再発現が正常ラット染色体の一貫した欠失に関係することを実証した。微小核細胞-仲介染色体転移を用いたその後の研究は、さらに、推定のヒト転移サプレッサー遺伝子をヒト染色体11のp11.2-13領域にマッピングしている (Ichikawa等 (1992) Cancer Res., 52:3486-3490)。この研究では、これらの研究者は、ヒト染色体11cent-p13を保有するハイブリッドが転移の抑制を示すが、ヒト染色体11cent-p11.2を保有するハイブリッドは示さないことを実証した。

要約すると、Ichikawa等の論文に示されたデータは、ヒト染色体11のp11.2-13領域における推定サプレッサー遺伝子が転移において役割を有していることを示唆した。しかし、現在まで、この領域における、転移サプレッサー遺伝子の候補である遺伝子は同定されていない。したがって、この染色体領域におけるこのような遺伝子 (単数又は複数) を同定し、このような遺伝子 (単数又は複数) が転移に関係するかどうかを確認することが当該技術分野で必要とされている。

発明の概要

本発明は、野生型KAI1遺伝子の変化の検出が被験者における悪性癌の存在又は被験者における悪性疾患の遺伝的素因を検出するために有用である場合に、このような変化の検出方法に関する。野生型KAI1遺伝子の変化を検出する第1方法は、KAI1遺伝子の突然変異に関して被験者のDNAを分析することを含む。KAI1遺伝子の変化を検出する第2方法は、KAI1遺伝子のmRNA産物の突然変異及び発現の変化に関して被験者のRNAを分析することを含む。

それ故、本発明は野生型KAI1遺伝子の変化を検出するための核酸プローブを提供する。

本発明はさらに、野生型KAI1遺伝子の変化に関して被験者のRNA又はDNAを分析する場合にPCRプライマーとして有用な精製単離された核酸配列を含有する診断キットを提供する。これらのPCRプライマーはKAI1対立遺伝子のヌクレオチド配列を決定するためにも使用可能である。

野生型KAI1遺伝子の変化を検出する第3方法は、KAI1タンパク質の発現の変化に関して被験者のタンパク質を分析することを含む。

それ故、本発明はKAI1タンパク質に対する抗体と、被験者におけるKAI1タンパク質発現の変化を検出するために有用な、KAI1タンパク質に対する抗体を含有する診断キットとに関する。

本発明はさらに、KAI1タンパク質発現の変化を有する細胞に野生型KAI1遺伝子を

供給する方法であって、野生型遺伝子が細胞中で発現されるように、K A I 1 タンパク質発現の変化を有する細胞に野生型 K A I 1 遺伝子を導入することを含む方法を提供する。

図面の説明

図 1 は、正常組織（ヒト前立腺）からと、転移腫瘍細胞（A T 6 . 1、A T 6 . 1 - 1 1 - 2 及び A T 6 . 1 - 1 1 - 3）及び非転移腫瘍細胞（A T 6 . 1 - 1 1 - 1*）の両方からの mRNA のノーザン・プロットの結果を示す。サンプルにつき 2 μ g のポリ A⁺ RNA を各レーンに装填し、プロットを K A I 1 cDNA プローブとラット β -アクチンプローブとによって連続的にハイブリダイズした。星印（*）は、1 1 p c e n - p 1 3 領域を含有し、転移能力を抑制されたハイブリッド A T 6 . 1 - 1 1 - 1 を同定する。

図 2 は、ヒト胎盤、齧歯類細胞（A 9 及び A T 6 . 1）及びヒト齧歯類微小核細胞ハイブリッド（A 9 - 1 1 n e o、A T 6 . 1 - 1 1 - 1*、A T 6 . 1 - 1 1 - 2 及び A T 6 . 1 - 1 1 - 3）から単離された DNA のサザン・プロット分析の結果を示す。各サンプルに関して、1 5 μ g の DNA を H i n d I I I によって消化させ、1 . 2 % アガロースゲル上で分離させ、K A I 1 cDNA プローブにハイブリダイズさせた。図 1 に示すように、星印（*）は、1 1 p c e n - p 1 3 領域を含有し、転移能力を抑制されたハイブリッド A T 6 . 1 - 1 1 - 1 を同定する。

図 3 は、K A I 1 cDNA のヌクレオチド配列（上部ライン、配列番号：1 9）と演繹されたアミノ酸配列（下部ライン、配列番号：2 0）とを示し、これらの配列においてアミノ酸残基の略号は次の通りである：A, A l a ; C, C y s ; D, A s p ; E, G l u ; F, P h e ; G, G l y ; H, H i s ; I, I l e ; K, L y s ; L, L e u ; M, M e t ; N, A s n ; P, P r o ; Q, G l n ; R, A r g ; S, S e r ; T, T h r ; V, V a l ; W, T r p ; Y, T y r . 4 個の推定上の膜通過ドメインは点線の下線によって表示され、可能な N-結合グリコシル化部位は二重に下線を施される。

図 4 は、ヒト正常前立腺組織からと、ヒト転移前立腺癌由来の細胞株から単離された総 RNA（1 5 μ g）のノーザン・プロット分析の結果を示す。プロットは K A I 1 プローブとヒト β -アクチンプローブとによって連続的にハイブリダイズさせた。

図 5 は、図 5 の頂部に表示した種々なヒト組織から製造されたポリ A⁺ RNA（2 μ g）のノーザン・プロット分析の結果を示す。プロットは K A I 1 プローブとヒト β -アクチンプローブとによって連続的にハイブリダイズさせた。

図 6 は、図 6 の頂部に表示した種々な種の E c o R I 消化されたゲノム DNA の“ズー（zoo）”プロットの結果を示す。プロットは K A I 1 プローブによってハイブリダイズさせた。

発明の詳細な説明

本発明はヒト染色体 1 1 上の転移サプレッサー遺伝子のクローニング及び特徴づけに関する。本明細書では K A I 1 と呼ばれる、この遺伝子のヌクレオチド配列と演繹アミノ酸配列とを図 3 に示す。図 3 に示したヌクレオチド配列は転移抑制細胞ハイブリッドクローン A T 6 . 1 - 1 1 - 1* からクローン化されたものであり、野生型 K A I 1 配列を表す。

G e n B a n k データベースと E M B L データベースとにおける K A I 1 cDNA 配列の探求は、K A I 1 cDNA 配列が異なる実験室によって C 3 3、R 2 及び I A 4 と呼ばれる、ヒトリンパ球からの 3 種の cDNA クローンと同じであることを明らかにした（I m a i, T. 等（1 9 9 2）J. Immunol., 1 4 9, 2 8 7 9 - 2 8 8 6（1 9 9 2）；F u k u d o m e, K. 等（1 9 9 2）J. Virol., 6 6, 1 3 9 4 - 1 4 0 1（1 9 9 2）；G a u g i t s c h, H. W. 等（1 9 9 1）Eur. J. Immunol., 2 1, 3 7 7 - 3 8 3（1 9 9 1）；G i l, M. L. 等（1 9 9 2）J. Immunol., 1 4 8, 2 8 2 6 - 3 3（1 9 9 2））。C 3 3 はウイルス誘導シ

ンシチウム形成の阻害に関係する（I m a i, T. 等（1 9 9 2）；F u k u d o m e, K. 等（1 9 9 2））。R 2 はマイトジェン活性化ヒト T 細胞中で強度にアップレギュレートされ（G a u g i t s c h, H. W. 等（1 9 9 1））、I A 4 は数種の B リンパ球ライン中に高度に発現される（G i l, M. L. 等（1 9 9 2））。しかし、これらの 3 種のクローンのいずれも転移に作用するとは示唆されていず、これらのクローンによ

てコードされるタンパク質の機能は本発明の前には知られていなかった。

本発明はさらに、野生型K A I 1 遺伝子の変化と転移との関係に関する。したがって、本発明は被験者における野生型K A I 1 遺伝子の変化を検出する方法に関し、このような方法は診断及び予後情報を与えることができる。例えば、転移前立腺腫瘍ではK A I 1 遺伝子の発現喪失が観察されているので、これらの腫瘍は、K A I 1 が転移に関係している腫瘍である。したがって、被験者における野生型K A I 1 遺伝子の変化の検出は、臨床医によって選択される治療コースに影響を与える。さらに、K A I 1 は脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、結腸、血液白血球、心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓及び脾臓を含めた、あらゆる被験組織に発現されるので、野生型K A I 1 遺伝子の変化がこれらの組織における転移に寄与すると考えられる。

10

さらに、本発明の方法が、野生型K A I 1 の変化が生じる任意の腫瘍に対して適用可能であることが当業者によって理解される。その上、本発明に開示される検出方法は胎児をスクリーニングするために胎児期に使用可能であるか、又は被験者の家族歴に基づいて癌を有する危険性にある被験者をスクリーニングするために前兆的に使用可能である。本発明の目的のためには、被験者とは哺乳動物を意味する。

本発明の診断方法によると、野生型K A I 1 遺伝子の変化を検出する。明細書と請求の範囲とを通して用いる“野生型K A I 1 遺伝子の変化”は野生型K A I 1 遺伝子の突然変異を含み、このような突然変異は野生型K A I 1 遺伝子の欠失、逆位、挿入、転換又は点突然変異を包含する。腫瘍組織中に見い出される多くの突然変異はK A I 1 タンパク質の発現を低下させるような突然変異であると考えられる。しかし、非機能性遺伝子産物をもたらす突然変異は悪性疾患をも生じる可能性がある。点突然変異が調節領域（例えば、プロモーター）において発生しうるか、又は正常なRNAプロセッシングを妨害して、K A I 1 遺伝子産物の発現をそれぞれ喪失させうることがさらに理解される。

20

明細書と請求の範囲とを通して用いる“野生型K A I 1 遺伝子の変化”は、野生型K A I 1 特異的mRNA及びK A I 1 タンパク質の発現の変化に基づいて検出されることができる。これらのK A I 1 遺伝子産物の発現の変化は、野生型レベルに比べてK A I 1 mRNA及びタンパク質のレベルの喪失若しくは低下として検出されることもできる。或いは、K A I 1 タンパク質の発現の変化はK A I 1 タンパク質の機能の喪失を包含する可能性がある。それ故、K A I 1 遺伝子産物の発現変化が、非限定的に、野生型K A I 1 遺伝子の突然変異、K A I 1 タンパク質の翻訳後修飾（例えば、グリコシル化）の変化、又はK A I 1 遺伝子の転写のために必要なトランス作用因子の喪失を包含する多様なイベントによって惹起されうることが、当業者に理解されることが考えられる。

30

図3に示すK A I 1 cDNAと演繹されたアミノ酸配列とを提供されるならば、野生型K A I 1 遺伝子の変化の検出に有用な特定のプローブの設計は、十分に当業者の技能の範囲内である。

本発明の1実施態様では、K A I 1 遺伝子の変化を検出する方法は、野生型K A I 1 遺伝子の突然変異に関して被験者のDNAを分析することを含む。DNAの分析のために、被験者から生物学的標本を採取する。本発明の方法に用いるために入手することができる生物学的標本の例は、非限定的に、組織バイオプシー、全血、リンパ球及び腫瘍を包含する。腫瘍細胞に関して組織標本を富化させる手段は当技術分野で公知である。例えば、組織をパラフィン切片又はクライオスタット(cryostat)切片から単離することができる。癌細胞も当技術分野で周知のフローサイトメトリー及び他の方法によって正常細胞から分離することができる。或いは、当業者に公知の方法を用いて一次細胞培養物を腫瘍バイオプシーから確立することができる。

40

生物学的標本から単離されたDNAを野生型K A I 1 遺伝子の突然変異に関して、非限定的に、適当な制限酵素による消化後のサザン・ブロッティング(制限フラグメント長さ多形現象, RFLP) (Botstein, D. (1980) Amer. J. Hum. Genet., 69:201~205)、変性勾配電気泳動方法(Myers, R. M., (1985) Nature, 313:495~498)、オリゴヌクレオチド ハイブリダイゼーション(Conner, R. 等(1984) EMBO J. 3:13321~13

50

26)、プローブRNAとターゲットDNAの間のジュープレックス(Duplex)のRNAアーゼ消化(Winter, E.等(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82:7575~7579)、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)(Saiki, P. K.等(1988) Science, 239:487~491; 米国特許第4,683,195号と第4,683,202号)、リガーゼ連鎖反応(LCR)(ヨーロッパ特許出願第0.320,308号と第0.439,182号)、並びにPCR一本鎖コンフォメーション分析(PCR-SSCP)(Orita, M.等(1989) Genomics, 5:874~879; Dean, M.等(1990) Cell, 61:863~871)を包含する多様な方法によって分析することができる。

好ましい実施態様では、サザン・ブロット分析を用いて、KAI1遺伝子の全体的な再配列(rearrangement)転位に関して被験者から単離されたDNAを試験することができる。サザン分析によって分析すべきDNAを1種以上の制限酵素によって消化させる。制限消化後に、得られたDNAフラグメントをゲル電気泳動によって分離し、フラグメントを標識核酸プローブとのハイブリダイゼーションによって検出する(Southern, E. M. (1975) J. Mol. Biol. 98:503~517)。

サザン分析にプローブとして用いる核酸配列を一本鎖又は二本鎖形で標識することができる。核酸配列の標識は当業者に公知の方法によって実施することができる。このような標識方法は放射性標識と酵素を包含することができる(Sambrook, J.等(1989) “分子クローニング、実験室マニュアル”, Cold Spring Harbor Press, Plainview, New York)。さらに、ピリミジン及びプリン環に化学成分を取り付ける方法(Dale, R. N. K.等(1973) Proc. Natl. Acad. Sci., 70:2238~2242; Heck, R. F. (1968) S. Am. Chem. Soc. 90:5518~5523)、化学ルミネセンスによる検出を可能にする方法(Barton, S. K.等(1992) J. Am. Chem. Soc. 114:8736~8740)、ビオチン化核酸プローブを用いる方法(Johnson, T. K.等(1983) Anal. Biochem., 133:126~131; Erickson, P. F.等(1982) J. of Immunology Methods, 51:241~249; Matthaei, F. S.等(1986) Anal. Biochem., 157:123~128)並びに商業的に入手可能な製品を用いて蛍光による検出を可能にする方法を含めて、非放射性的シグナル増幅方法が知られている。サザン分析にプローブとして用いられる核酸配列の各々は野生型KAI1遺伝子に由来する。好ましいプローブは図3に示すcDNA配列を有して得られる。

分離されたDNAフラグメントを標識核酸プローブにハイブリダイズさせたならば、オートラジオグラフィによって制限消化パターンを可視化して、野生型KAI1遺伝子の制限消化パターンと比較することができる。野生型制限パターンに比べて被験者のDNAの制限パターン中の制限フラグメント長さ多形現象(RFLP)の有無は、野生型KAI1遺伝子の変化を実証する。

他の好ましい実施態様では、ゲノムDNAを野生型KAI1遺伝子中の突然変異に関してPCR-SSCPによって分析することができる。この方法では、PCRに用いるために選択されたプライマー対の各々を野生型KAI1遺伝子の配列とハイブリダイズするように設計し、増幅させ、次にこの変性した増幅生成物中の突然変異を非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって検出する。1実施態様では、図3に示したKAI1 cDNA配列からプライマー対が誘導される。

他の実施態様では、野生型KAI1遺伝子のゲノムDNA突然変異の分析に有用なプライマー対を、KAI1遺伝子のある一定のエキシソンの5'末端と3'末端に接するイントロン配列から誘導することができる。KAI1遺伝子の特異的エキソンの特異的増幅を可能にするプライマー対の例は下記配列を包含する：

配列番号：1：AGAAGATCAAGTTGAAGAGG

配列番号：2：GGGACCTCATTTTCCTAGCTG

配列番号：3：ATGAAACTGCTCTTTGTCGG

配列番号：4：TCAGCTCTTGGCTCCCCATT

配列番号：5：TGGGCACGGGTTTCAGGAAAT

配列番号：6：TGCAGAGAGCCCCAAATGCA

配列番号：7：AGGGTGAGCCGTGAGCACAA

配列番号：8：TGCTGAGAGTACCCAGATGC

配列番号：9：GATGGCCACACCCACGCCC

配列番号：10：TGCATGGAGAAGGTGCAGGC

配列番号：11：CCTCTTGCCCCACCCTGACTGA

配列番号：12：TTCACACCATTCTCCTGCCT

10

20

上記配列において配列番号：1と2はエキソン3に結合し；配列番号：3と4はエキソン4に結合し；配列番号：5と6はエキソン6に結合し；配列番号：7と8はエキソン7に結合し；配列番号：9と10はエキソン8に結合し；配列番号：11と12はエキソン9に結合した。

対の各プライマーは、二本鎖ターゲット配列の鎖の1つの3'末端の配列に相補的である約15～約50塩基対長さの一本鎖オリゴヌクレオチドである。KAI1遺伝子配列に充分に特異的にハイブリダイズさせるための増幅反応の最適化は、充分に当該技術分野の技能の範囲内であり、好ましくは、アニーリング温度を調節することによって達成される。さらに他の実施態様では、KAI1遺伝子の突然変異に関してRNAをRT-PCR-SSCPによって分析することができる。この方法では、一本鎖cDNAを全RNAから又はポリA⁺富化RNAから逆転写酵素を用いて調製する。この方法では、得られた一本鎖cDNAのPCRに用いるために選択した各プライマー対を遺伝子中の適当な距離（少なくとも約100～300ヌクレオチド）離れたKAI1 cDNA中の配列とハイブリダイズするように設計して、増幅させ、次にこの変性した増幅生成物中の突然変異を非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって検出する。このようなプライマー対は図3に示したKAI1 cDNA配列から誘導することができる。各対は一般に約100～約300塩基対によって分離された各鎖上の配列に相補的な、このような2プライマーを含む。本発明のプライマーはオリゴヌクレオチド合成の公知方法を用いて合成することができる

30

（例えば、Agarwal等のホスホジエステル方法（1972）Agnew. Chem. Int. Ed. Engl. 11：451；Hsiung等のホストリエステル方法（1979）Nucleic Acids Res. 6：1371；若しくはBeuacage等の自動化ジエチルホスホルアミダイト方法（1981）Tetrahedron Letters, 22：1859～1862），又はこれらは天然に生成するDNA若しくはクローン化DNAの単離フラグメントであることができる。さらに、当業者は、オリゴヌクレオチドが種々な製造業者から販売される自動化機器を用いて合成されうることも又は商業的に注文されて、製造されうることに気づくと考えられる。1実施態様では、プライマー伸長生成物を検出及び／又は同定するために適した検出可能なラベル（例えば、ビオチン、アビジン若しくは放射性標識されたdNTP）を含むように、又は増幅生成物の単離を容易にする物質（例えば、ビオチン及びアビジン）によって、プライマーを誘導体化することができる。

40

50

それ故、本発明はK A I 1 遺伝子の突然変異を検出するための診断キットを提供する。この診断キットは、DNA又はRNAを野生型K A I 1 遺伝子の変化に関して分析するためのハイブリダイゼーションプローブ又はPCRプライマーとして有用な、精製単離された核酸配列を含む。

他の実施態様では、核酸プローブをK A I 1 遺伝子の突然変異対立遺伝子にハイブリダイズするように選択することができる。これらの対立遺伝子特異的なプローブは、ミス対合ではなくハイブリダイゼーションに基づいて、他の被験者における同様な突然変異を検出するために有用である。このような核酸プローブがK A I 1 遺伝子配列の突然変異にハイブリダイズするプライマー対である場合には、これらのプライマー対を用いて、生物学的サンプル中に存在する特異的な突然変異遺伝子配列をPCRによって増幅させることができる。

10

PCRの増幅生成物は直接又は間接的に検出することができる。増幅生成物の直接の検出はプライマー対の標識によっておこなわれる。本発明のプライマーの標識に適したラベルは当業者に公知であり、放射性ラベル、ビオチン、アビジン、酵素及び蛍光性分子を包含する。増幅反応をおこなう前に望ましいラベルをプライマーに組み入れることができる。好ましい標識方法は放射性標識ATPとT4ポリヌクレオチドキナーゼとを用いる (Sambrook, J. 等 (1989) “分子クローニング, 実験室マニュアル”, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY)。或いは、増幅反応中に1種以上の標識dNTPとして望ましいラベルをプライマー伸長生成物に組み入れることができる。本発明では、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動、変性ポリア

20

クリルアミドゲル電気泳動 (PCR-SSCP) 又はPCR生成物の直接の配列決定によるPCR生成物の分離を介して、標識された増幅PCR生成物をK A I 1 遺伝子の突然変異に関して分析することができる。さらに他の実施態様では、非標識増幅生成物をK A I 1 疾患遺伝子の突然変異に関して、サザン・ブロット又はドット・ブロットにおいて、放射性標識された若しくはビオチン標識された核酸プローブとのハイブリダイゼーションを介して分析することができる。この実施態様に有用な核酸プローブはサザン分析に関して前述したようなプローブである。さらなる実施態様では、図3に示すcDNA配列を用いて腫瘍組織中に存在する対立遺伝子を分子クローニングし、次にこの対立遺伝子を当技術分野で周知の方法を用いて配列決定することによって、点突然変異を検出することができる。

30

野生型K A I 1 遺伝子の変化を検出する第2方法は、被験者のRNAを突然変異と、K A I 1 特異的mRNAの発現の変化とに関して分析することを含む。

この方法によるRNAの分析に関して、RNAを例えば前記被験者から入手した腫瘍バイオプシーサンプルから単離することができ、前記腫瘍は非限定的に前立腺腫瘍を包含する。

分析すべきRNAは血液又は腫瘍バイオプシーサンプルから、全細胞RNAとして又はポリ(A)⁺RNAとして単離することができる。全細胞RNAは当業者に公知の方法によって単離することができる。このような方法は示差沈降によるRNAの抽出 (Birnbom, H. C. (1988) Nucleic Acids Res., 16:1487~1497)、有機溶媒によるRNAの抽出 (Chomczynski, P. 等 (1987) Anal. Biochem., 162:156~159) 及び強変性剤によるRNAの抽出 (Chirgwin, J. M. 等 (1979) Biochemistry, 18:5294~5299) を包含する。ポリ(A)⁺RNAはオリゴd(T)カラム上でのアフィニティクロマトグラフィーによって全細胞RNAから選択することができる (Aviv, H. 等 (1972) Proc. Natl. Acad. Sci., 69:1408~1412)。

40

RNAを突然変異と、K A I 1 特異的mRNAの発現の変化とに関して分析する方法はノーザン・ブロットティング (Alwine, J. C. 等 (1977) Proc. Natl. Acad. Sci., 74:5350~5354)、ドット及びスロットハイブリダイゼーション (Kafatos, F. C. 等 (1979) Nucleic Acids Res

50

., 7:1541~1522)、フィルターハイブリダイゼーション(Hollander, M. C. 等(1990) Biotechniques; 9:174~179)、S₁分析(Sharp, P. A. 等(1980) Meth. Enzymol., 65:750~768)、RNアーゼ保護(Sambrook, J. 等(1989) “分子クローニング:実験室マニュアル”, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY)、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)(Watson, J. D. 等(1992) “組換えDNA”, 第2版, W. H. Freeman and Company, New York)並びにRT-PCR-SSCPを包含する。

KAI1 mRNAの発現を測定する場合には、KAI1 mRNA発現の減少が野生型KAI1遺伝子の変化を示唆する。KAI1特異的mRNA発現のレベルの変化を測定するための好ましい1方法はノーザン・ブロッティングであり、この方法ではKAI1特異的mRNA発現を検出するためのプローブとして用いられる核酸配列は図3に示すKAI1 cDNA配列の全て又は一部に対して相補的である。

KAI1特異的mRNA発現のレベルの変化を測定するための好ましい第2方法は、生物学的サンプルから単離されたRNAから形成されたRT-PCR生成物に対するKAI1 cDNA配列に由来する核酸プローブのハイブリダイゼーションによるKAI1 mRNA発現の検出である。

野生型KAI1遺伝子の変化を検出するための第3方法は、被験者のタンパク質を野生型KAI1タンパク質の変化に関して分析することを含む。1実施態様では、野生型KAI1タンパク質の変化は生物学的サンプル中のKAI1タンパク質の発現レベルの喪失又は減少を包含する。

KAI1タンパク質の発現レベルの測定に有用なイムノアッセイの例は、非限定的に、免疫沈降、ラジオイムノアッセイ、ウェスタン・ブロット分析、免疫蛍光分析、エンザイムイムノアッセイ、化学発光分析、イムノヒストケミカル(immunohistochemical)分析及びエンザイムリンクト・イムノソルベント・アッセイ(enzyme-linked immunosorbent assay)(ELISA)を包含する。さらに、上記イムノアッセイは、例えば免疫沈降と、その後のウェスタン・ブロットのように、組み合わせることもできる。上記方法は Principles and Practice of Immunoassay, PriceとNewman編集, Stcchton Press, 1991に述べられている。このような分析は当該技術分野で述べられているように、直接、間接、競合又は非競合イムノアッセイでありうる(Oelbrick, N. (1984) J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 22:895~904)。このような方法によって分析されるタンパク質は例えば腫瘍バイオプシーのような生物学的サンプルから得ることができ、タンパク質は粗溶解物として得ることができるか、又はKAI1タンパク質に対する抗体を用いるイムノアフィニティ・クロマトグラフィーを包含する当業者に公知の方法によってさらに精製することができる(Sambrook, J. 等(1989) “分子クローニング:実験室マニュアル”, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY)。或いは、固定した又は凍結した腫瘍切片のイムノヒストケミストリーによってKAI1タンパク質レベルを検出することができる。

イムノアッセイによってKAI1タンパク質を検出するために、本発明は抗KAI1抗体を提供するが、このような抗体はポリクローナル又はモノクローナルでありうる。ポリクローナル抗体が望ましい場合には、KAI1タンパク質に対するポリクローナル抗体を含有する血清を用いることができるか、又はポリクローナル抗体を血清中に存在する他の抗原からイムノアフィニティ・クロマトグラフィーによって精製することができる。或いは、KAI1に対するモノクローナル抗体は当業者によって容易に製造することができる。モノクローナル又はポリクローナル抗体の製造方法は当業者に公知である(Goding, J. W. (1983) モノクローナル抗体:原理と実際, Plodermic Press社, NY, NY. 56~97頁; Hurn, B. A. L. 等(1980) Meth. Enzymol., 70:104~141)。

本発明のポリクローナル又はモノクローナル抗体の製造に用いることができる適当な免疫

10

20

30

40

50

原は、組換え K A I 1 タンパク質によってトランスフェクトされた細胞から製造された細胞溶解物、部分的若しくは実質的に精製された組換え若しくはネイティブ K A I 1 タンパク質、又は図 3 に示す K A I 1 アミノ酸配列から誘導されるペプチドを包含する。組換え若しくはネイティブ K A I 1 タンパク質の精製が望ましい場合には、示差沈降、モレキュラーシーブクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、等電点フォーカシング (focusing)、ゲル電気泳動、アフィニティ及びイムノアフィニティクロマトグラフィー等を包含することができる、当技術分野で公知の標準的タンパク質精製方法によって、この精製をおこなうことができる。イムノアフィニティクロマトグラフィーの場合には、K A I 1 タンパク質に特異的な抗体がそれに結合した樹脂を含有するカラムに通すことによって組換えタンパク質を精製することができる。

10

好ましい実施態様では、免疫原は組換えによって製造された K A I 1 タンパク質又はそのフラグメントである。組換え K A I 1 タンパク質又はそのフラグメントの製造は、適当な発現ベクターに挿入された天然又は合成核酸配列によって導かれることができる。好ましい核酸配列は図 3 に示す K A I 1 c D N A 配列である。1 実施態様では、K A I 1 のコーディング配列を含有する、全長 c D N A 又はそのフラグメントを含有する制限消化フラグメントを適当な発現ベクター中に挿入することができる。適当な発現ベクターとは、真核細胞又は原核細胞中で機能することができ、K A I 1 タンパク質又はそのフラグメントをコードする核酸配列を有するか又は発現することができるベクターを意味する。このようなベクターと、組換えタンパク質の製造へのそれらの使用とは当業者に公知である (S a m b r o o k, J. 等 (1989) “分子クローニング：実験室マニュアル”, C o l d S p r i n g H a r b o r P r e s s, P l a i n v i e w, N Y)。

20

本発明の免疫原は例えば生理的食塩水若しくは水のような適当な希釈剤中、又は完全若しくは不完全アジュバント中で用いることができる。さらに、免疫原はタンパク質を免疫原性にするためにキャリアーに結合することも、結合しないことも可能である。このようなキャリアー分子の例は、非限定的に、ウシ血清アルブミン (B S A)、キーホールリンペットヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin) (K L H)、破傷風トキソイド等を包含する。免疫原は、例えば静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下等のような、抗体産生のために適当な任意のルートで投与することができる。免疫原は抗 K A I 1 抗体の有意な力価が得られるまで、1 回に又は定期的な間隔をおいて投与することができる。抗体は血清中でイムノアッセイを用いて検出することができる。

30

抗体又は抗原結合フラグメントも遺伝子工学によって産生することができる。E. c o l i における H 鎖 (heavy chain) と L 鎖 (light chain) の両方を発現させる方法は P C T 特許出願；公開番号 W O 9 0 1 4 4 3、W O 9 0 1 4 4 3 及び W O 9 0 1 4 4 2 4 並びに H u s e 等 (1989) S c i e n c e, 246: 1275~1281 の主題である。

或いは、免疫原としての抗イディオタイプ抗体を投与することによって、抗 K A I 1 抗体を誘導することができる。便利には、上述したように調製した精製抗 K A I 1 抗体を用いて、宿主動物に抗イディオタイプ抗体を誘導することができる。適当な希釈剤中の組成物を宿主動物に投与する。投与後に、通常は反復投与後に、宿主は抗イディオタイプ抗体を産生する。F c 領域に対する免疫源反応を除去するために、宿主動物と同じ種によって産生された抗体を用いることができ、又は投与された抗体の F c 領域を除去することができる。宿主動物における抗イディオタイプ抗体の誘導後に、血清又は血漿を取り出して、抗体組成物を得る。この組成物は抗 K A I 1 抗体に関して上述したように、又はアフィニティマトリックスに結合した抗 K A I 1 抗体を用いるアフィニティクロマトグラフィーによって精製することができる。

40

他の実施態様では、本発明の抗体を i n s i t u で用いて、細胞又は組織中の K A I 1 タンパク質を検出することができる。1 実施態様では、この抗体を直接又は間接的免疫蛍光に用いる。直接的方法では、例えばフルオレセインイソチオシアネート、ローダミン B イソチオシアネート等のような蛍光試薬で標識された抗 K A I 1 抗体を細胞又は組織中に存在する K A I 1 と直接反応させる。間接的方法では、未標識の抗 K A I 1 抗体を細胞又は組織中に存在する K A I 1 タンパク質と反応させる。次に、未標識抗 K A I 1 抗体を標

50

識された第2抗体と反応させる。第2抗体は上述したように蛍光タグによって標識することができる。次に、蛍光標識された細胞又は組織を、例えば蛍光活性化細胞ソーター、蛍光灯を用いる光学顕微鏡検査等のような、当業者に公知の方法を用いて検出することができる。或いは、K A I 1タンパク質を *in situ* で、放射性標識された抗K A I 1抗体を用いて、又は未標識の抗K A I 1抗体を用い、次に抗K A I 1抗体と反応する放射性標識された第2抗体を用いて検出することができる。

本発明の抗体を用いて、タンパク質の混合物からK A I 1タンパク質を免疫沈降させることもできる。タンパク質混合物中のターゲット抗原を検出し、定量するための敏感で特異的な方法としての免疫沈降の使用は当業者に周知である（“分子クロニング：実験室マニュアル”，第2版，Maniatis, T. 等編集（1989）Cold Spring Harbor Pressを参照のこと）。

本発明の抗体は、イムノアフィニティ・クロマトグラフィーによるK A I 1タンパク質の単離に用いるために、固体支持体に固定することもできる。イムノアフィニティ・クロマトグラフィー方法は当該技術分野において公知であり（Harlow, E. と Lane, D. （1988）“抗体：実験室マニュアル” Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY）、抗体を固体支持体に、抗体がそれらの免疫選択性活性を保有するように固定する方法も包含する；用いられる方法は抗体が支持体に吸着される方法並びに抗体が支持体に共有結合される方法であることができる。一般に、これらの方法は抗原を固体支持体に共有結合するのに用いられる方法と同じであるが；抗体の抗原結合部位がまだアクセス可能であるように二官能性カップリング剤にスパーサー基を包含させることができる。

上述した抗体と、その抗原結合フラグメントとは、K A I 1タンパク質の発現の変化を検出するために有用な診断キットとして供給されることができる。

第2実施態様では、野生型K A I 1タンパク質の変化はK A I 1タンパク質の機能の喪失を包含する。それ故、本発明の方法はK A I 1タンパク質の機能状態を測定するために有用な分析を含む。例えば、N-結合オリゴ糖のプロセッシングと転移表現型との関係は充分に実証されているので（Hakomori, S. I. （1989）Advanc. Cancer Res., 52: 257～331; Dennis, J. W. 等（1987）Science, 236: 582～585; Ishikawa, M. 等（1988）Cancer Res., 48: 665～670）、K A I 1タンパク質が転移サプレッサーとして機能するためには、K A I 1タンパク質のグリコシル化が必要であると考えられる。したがって、グリコシル化の不存在によって実証されるK A I 1タンパク質の機能の喪失の検出は、被験者における転移癌の存在を示唆する。

本発明はまた、野生型K A I 1遺伝子を表す核酸配列を含有する発現ベクターをK A I 1遺伝子の突然変異を有する被験者に投与する遺伝子療法にも関する。野生型K A I 1遺伝子を表す核酸配列は図3に示す配列である。このような核酸配列を当業者に公知の方法によって、適当な発現ベクターに挿入することができる。インビボで高効率の遺伝子転移（gene transfer）を生じるために適した発現ベクターは、レトロウイルス、アデノウイルス及びワクシニアウイルスベクターを包含する。

野生型K A I 1遺伝子を表す核酸配列を含有する発現ベクターは静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内又は経口投与することができる。好ましい投与ルートは腹腔内である。

本明細書に引用した論文又は特許は本明細書に援用される。下記実施例は本発明の様々な態様を説明するために提示するものであり、本発明の範囲の限定を意図するものではない。

実施例

材料と方法

細胞ライン：AT6. 1は高度に転移性のDunningラット前立腺癌細胞ラインである。AT6. 1-11クローンは、AT6. 1細胞中の唯一のヒト遺伝物質としてヒト染色体11の一部を有する微小核細胞ハイブリッドである。微小核細胞ハイブリッドAT6. 1-11-1*はヒト染色体11のフラグメント，cen-p13（セントロメアから

10

20

30

40

50

p13領域まで)を含有し、転移能力に関して抑制されたものであった。微小核細胞ハイブリッドAT6. 1-11-2及び-3はセントロメアからp11. 2までのヒト染色体11のより小さいフラグメントを有し、転移能力に関して抑制されていなかった。これらの細胞ラインの特徴と増殖条件は既に詳細に述べられている(Ichikawa等(1992) Cancer Res. 52:3486~3490)。A9-11neoはヒト染色体11pter-q23を含有するマウスA9細胞ラインである(Koi等(1989) Mol Carcinog., 2:12~21)。

KAI1 cDNAクローンの単離と配列決定

ポリ(A)⁺RNAを指数関数的に増殖するAT6. 1-11-1*細胞からFast Track mRNA単離キット(Invitrogen, San Diego, CA)を用いて単離した。Oligo(dT)を用いて、5µgのポリ(A)⁺RNAからの第1鎖cDNA合成を開始した。販売者(GIBCO BRL, Grand Island, NY)が薦める方法によって、二本鎖cDNAをプラスミドpSPORT 1ベクターにクローン化した。ヒトAlu配列プライマーAlu559(Nelson, D. L. 等(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86:6686~6690)を用いて、抑制ハイブリッドAT6. 1-11-1*と非抑制クローンAT6. 1-11-2とからゲノムDNAをPCRによって増幅させた。AT6. 1-11-1*の多重Alu-PCRフラグメントをT-末端ベクターpCR1000(Invitrogen, San Diego, CA)にクローン化した。Alu-PCR生成物の各フラグメントに対応する個々のクローンを、これらのAlu-PCR生成物のサイズを臭化エチジウムによって染色したアガロースゲル中の分子量マーカーと比較した後に、単離した。AT6. 1-11-1*に特有な11個のフラグメントをランダムプライミング(random priming)(GIBCO BRL, Bethesda, MD)によって標識して、ストリンジェント洗浄条件(0.1xSSC+0.1%SDS中で65℃、30分間)下でcDNAライブラリーの5x10⁴組換え体をスクリーニングするために用いた。5種類の独立したクローンが得られ、これらのインサートをSequenaseキット(US Biochemical, Cleveland, OH)を用いて配列決定した。DNA配列をGC Gパッケージ(バージョン7.3, 1993, Madison, WI)によって分析した。

RNA分析: AT6. 1、AT6. 1-11-1*、-2及び-3からの細胞質RNAを指数関数的に増殖する細胞からFast Track mRNA単離キット(Invitrogen, San Diego, CA)を用いて調製した。他のポリ(A)⁺RNAと、ヒトマルチプル組織ノーザン・ブロットとはClontech(Palo Alto, CA)から購入した。2µgのポリ(A)⁺RNAをホルムアミドによって変性させ、ホルムアミド緩衝剤中の1.2%アガロースゲル上で分画した。次に、RNAをナイロン膜上に移し、80℃のオープン中で90分間焼成してから、QuickHybハイブリダイゼーション溶液(Stratagene, La Jolla, CA)中で標識プローブに、68℃において1.5時間ハイブリダイズさせ、0.1%xSSC、0.1%SDS中で68℃において30分間洗浄し、オートラジオグラフィ分析した。

DNA分析: 15µgのゲノムDNAをBamHIによって消化させ、1.2%アガロースゲル上で分離させた。変性及び中和後に、ゲル中のDNAをナイロン膜に移した。ヒト、ラット、マウス、イヌ、ウシ、ウサギ、ニワトリ及び酵母からのEcoRI消化ゲノムDNAを含有する“ズー”ブロット(Zoo-ブロット)はClontech(Palo Alto, CA)から購入した。サザン・ブロットをさらにハイブリダイズさせ、ノーザン・ブロットに関して上述したと同じ条件下で洗浄した。

PCR: この試験における全てのPCRは25pmolの各プライマー、10mM Tris.HCl、500mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.01%ゼラチン、250mMの各dNTP及び0.25単位のTaq DNAポリメラーゼ(Parkinson-Elmer, Norwalk, CT)を含む50µl中でおこなった。初期DNA変性を95℃において5分間おこなった後に、94℃変性1分間、55℃アニーリング1分間、72℃伸長(extension)4分間の35サイクルをおこない、72℃、8分間の最終的

10

20

30

40

50

伸長をおこなった。

プローブとオリゴヌクレオチド配列： サザンブロット分析とノーザンブロット分析とに用いたK A I 1 プローブ (K A I 1 c D N A のヌクレオチド64～1094) は、配列番号：13 A G T C C T C C C T G C T G C T G T G T G と配列番号：14 T C A G T C A G G G T G G G C A A G A G G に示すプライマーを用いてP C R によって形成した。ヒト及びラットのβ-アクチンプローブは、C l o n t e c h (P a l o A l t o , C A) から購入した鋳型とプライマーとによって形成したP C R 生成物であった。ヒトβ-アクチンのプライマー配列は配列番号：15 G A G G A G C A C C C C G T G C T G C T G A 及び配列番号：16 C T A G A A G C A T T T G C G G T G G A C G A T G G A G G G G C C として示され、ラットβ-アクチンのプライマー配列は、配列番号：17 T T G T A A C C A A C T G G G A C G A T A T G G と配列番号：18 G T C T T G A T C T T C A T G G T G C T A G G として示される。

10

実施例 1

K A I 1 遺伝子のクローニング

A T 6 . 1 前立腺癌細胞の転移抑制の一因となるヒト染色体11上の遺伝子をクローン化するために、p 1 1 . 2 - 1 3 領域からのゲノムDNAフラグメントを、転移抑制微小核細胞ハイブリッドA T 6 . 1 - 1 1 - 1 * と、非抑制ハイブリッドA T 6 . 1 - 1 1 - 2 及びA T 6 . 1 - 1 1 - 3 とからのDNAと共に、ヒト特異的A l u 要素伸介P C R (A l u - P C R) (N e l s o n , D . L . 等 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 86 : 6686～6690) を用いて単離した。A T 6 . 1 - 1 1 - 1 D N A にのみ見出しされるA l u - P C R フラグメントを次に、プローブとして用いて、ヒト染色体領域11 cen - p 1 3 を含有する抑制細胞ハイブリッドクローンA T 6 . 1 - 1 1 - 1 * から形成されたc D N A ライブラリーをスクリーニングした。得られた5種類のc D N A クローンについて、これらのc D N A 配列に由来するプライマーを用いる逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) によって検出したときに、抑制ハイブリッドには全てが発現したが、非抑制ハイブリッドには発現しなかった。ヒト前立腺からと、細胞ラインA T 6 . 1 、 A T 6 . 1 - 1 1 - 1 * 、 - 2 及び - 3 から単離されたRNAのノーザン分析は、c D N A クローンの2つがそれぞれヒト組織と抑制A T 6 . 1 - 1 1 - 1 * 細胞とにおいて2 . 4 h b と 4 . 0 k b 転写体を検出したことを明らかにした。K a n g A i (抗癌に対する中国語) に対してK A I 1 と名付けられた、このようなクローンの1つのノーザン・ブロットの結果を図1に示すが、これはK A I 1 m R N A が転移抑制A T 6 . 1 - 1 1 - 1 * 細胞中に多く存在するが、親のA T 6 . 1 細胞と非抑制ハイブリッドには存在しないことを明白に実証する。それ故、K A I 1 クローンをさらに分析した。

20

30

K A I 1 遺伝子が転移抑制に関係するヒト染色体11のp 1 1 . 2 - 1 3 領域から単離されたことを確認するために、ヒト胎盤、齧歯類細胞 (A 9 と A T 6 . 1) 、 及びヒト齧歯類微小核細胞ハイブリッド (A T 6 . 1 - 1 1 - 1 * 、 A T 6 . 1 - 1 1 - 2 及び A T 6 . 1 - 1 1 - 3) からの15 μ g のゲノムDNAに対してサザン・ブロット分析をおこない、H i n d I I I で消化させ、1 . 2 % アガロースゲル上で分離させ、K A I 1 プローブによってハイブリダイズさせた。図2に示す結果は、転移抑制に関係するp 1 1 . 2 - 1 3 領域を有する細胞ハイブリッド (A T 6 . 1 - 1 1 - 1 *) のみが、K A I 1 プローブにハイブリダイズしたときに、正常なヒトDNAで観察されるパターンを有することを実証する。K A I 1 プローブの中期染色体に対する蛍光 i n s i t u ハイブリダイゼーションはK A I 1 を p 1 1 . 2 領域にさらに局在化した。

40

実施例 2

K A I 1 c D N A のヌクレオチド配列と演繹アミノ酸配列

K A I 1 c D N A のヌクレオチド配列と演繹アミノ酸配列を図3に示す。K A I 1 c D N A はヌクレオチド位置166から966までの単一のオープンリーディングフレームを有し、算出分子量29,610ダルトンを有する、267アミノ酸のタンパク質であると予測される。A l u 要素はc D N A の3' - 非翻訳領域に存在した。予測されたタンパ

50

ク質は4個の疎水性の、恐らく膜通過ドメインと、1個の大きい細胞外親水性ドメインとを、3個の可能なN-グリコシル化部位と共に有する。上述したように、K A I 1 c D N A配列はヒトリンパ球C 3 3, R 2及びI A 4からの3種類のc D N Aクローンと同じである。

実施例 3

K A I 1が転移サプレッサー遺伝子であることの確認

K A I 1がA T 6. 1-1 1-1*における転移抑制の一因である遺伝子であるかどうかを研究するために、K A I 1 c D N Aを構成発現ベクターにサブクローン化し、親A T 6. 1細胞に次のようにトランスフェクトした。要約すると、K A I 1 c D N Aをp C M V n e oにクローン化したが、p C M V n e oでは転写が構成ヒトサイトメガロウイルス プロモータによっておこなわれる (E l i y a h u, D. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1989) 86: 8763~8767)。得られるプラスミドp C M V-K A I 1をリン酸カルシウム沈殿方法によってA T 6. 1細胞にトランスフェクトさせ、ベクターのみも負の対照としてトランスフェクトさせた。個々のトランスフェクタント (transfectant) を選択培地 (R P M I-1640 プラス 10%ウシ胎児血清、2単位/mlのペンストレプ (pen-strep) 及び500 µg/mlのネオマイシン) 中で単離させた。指数関数的に増殖する非トランスフェクトA T 6. 1、A T 6. 1-1 1-1*及びA T 6. 1-1 1-2細胞と、指数関数的に増殖するベクター (A T 6. 1 V E C-1、A T 6. 1 V E C-2及びA T 6. 1 V E C-3) と、K A I 1 (A T 6. 1 K A I-1、A T 6. 1 K A I-2及びA T 6. 1 K A I-3) トランスフェクタントとをスクラッピングによって回収し、細胞塊を穏やかなピペティング (pipetting) によって破壊した。細胞懸濁液を管に入れ、室温において30分間放置した。上清懸濁液からの細胞を回収し、洗浄し、冷PBS中に 10^6 細胞/mlで再懸濁させた。生後4~5週間雄N c r n u/n uヌードマウス (National Cancer Institute Animal Program, Bethesda, MD) に、0.1 mlの指定細胞懸濁液 (10^5 細胞) (表1の“クローン”なる表示の欄) を頭蓋基部から尾基部までの距離の約1/4の右側と左側の両方の側面中央の部位に皮下注射した。注射から約6週間後に、腫瘍を計量し、肺をBouin溶液で膨張させた。肺表面の腫瘍病巣を切開用 (dissecting) 顕微鏡下で評価した。個々のトランスフェクタントをK A I 1発現と、肺転移を抑制するそれらの能力とに関して分析し、1実験の結果を表1に示す。

10

20

30

表 1

クローン	KAI1* mRNA レベル	潜伏期間* (日数)	腫瘍 エージ (日数)	腫瘍 重量(g) @切除	転移を有する マウス 数	マウス平均当たりの 平均転移数† (#マウス)	P
AT6.1	0	4.3	27	2.58	19/19	58(32-135)	
AT6.1-11-1*	10	3.7	37	2.79	6/7	7(0-9)	<0.005‡
AT6.1-11-1-2	0	4.2	37	2.78	6/6	26(20-40)	
AT6.1VEC-1	0	4.9	43	2.32	17/17	30(16-57)	
AT6.1VEC-2	0	4.0	43	3.26	17/17	30(12-71)	
AT6.1VEC-3	0	5.5	43	2.57	18/18	47(15-183)	
AT6.1KAI-1	10	4.2	43	3.99	18/20	6(0-14)	<0.001§
AT6.1KAI-2	7	4.5	41	1.79	17/19	7(0-17)	<0.001§
AT6.1KAI-3	1	4.5	43	2.56	18/19	23(0-36)	<0.02§

この表に示したデータは、同時に細胞を接種された“サイドバイサイド(side by side)”ヌードマウスの大きいエージ適合集団からのものである。

* K A I 1 発現はノーザンブロット分析によって測定した。ノーザンブロット上の K A I 1 シグナルはデンストメータによって測定した。A T 6 . 1 K A I - 1 の値を 1 0 に標準化し、他のクローンの値をこれに応じて調節した。

+ 潜伏期間は、触診可能な腫瘍が発現するまでの注射後期間である。

† 括弧内の数字は個々のマウスにおける転移数の範囲を示す。

‡ A T 6 . 1 - 1 1 - 2 細胞による転移数と比較。

§ 3 種類のベクタートランスフェクタントの全てによる平均転移数に比較。

提示した結果は、K A I 1 発現がマウス当たりの肺転移数の有意な抑制を生じたが、原発腫瘍の増殖速度には影響を与えないことを示す。さらに、親 A T 6 . 1 細胞は、ヌードマウスに皮下注射されたときに、マウス当たり 5 8 転移を生じたが、A T 6 . 1 - 1 1 - 1 * 細胞に観察された高レベル発現と同じ K A I 1 m R N A 発現レベルを有する 2 トランスフェクタントは動物当たりわずか 6 乃至 7 転移を生じたにすぎない。これに反して、3 個のベクター対照トランスフェクタントはマウス当たり 3 0 ~ 4 7 肺転移を生じ、これは平均すると高い K A I 1 m R N A 発現を示した 2 K A I 1 トランスフェクタント (A T 6 . 1 K A I - 1 と A T 6 . 1 K A I - 2) によって観察された転移数の 5 . 5 倍である。さらに、低い K A I 1 発現を示した A T 6 . 1 K A I - 3 は 2 3 肺転移を生じたが、これは対照トランスフェクタントの肺転移の平均数よりもまだかなり低かった。最後に、ノーザン分析は、K A I 1 トランスフェクタントからの 2 8 肺転移において K A I 1 発現が検出

10

20

30

40

50

不能であるか又は非常に低いことを実証し、このことはK A I 1 発現が無い又は少ない細胞の選択が転移形成を生じたことを示唆する。これらの結果は、A T 6 . 1 細胞の転移能力がK A I 1 発現によって抑制されることを実証する。

実施例 4

転移ヒト前立腺腫瘍に由来する細胞ラインにおけるK A I 1 m R N A 発現

K A I 1 m R N A 発現が正常なヒト前立腺における発現に比べてヒト転移前立腺腫瘍において軽減しているかどうかを確認するために、ヒト正常前立腺組織からと転移前立腺腫瘍に由来する細胞ライン (K a i g h n, M. E. 等 (1979) I n v e s t . U r o l . 17:16; H o r o s z e w i c z, J. J. 等, 「前立腺癌モデル」, G. P. M u r p h y 編集 (A l a n. R. L i s s 社, New York, 1980) 115~132頁; T. I i z u m i 等 (1987) J. U r o l . 137:1304; D. D. M i c k e y 等, 「前立腺癌モデル」, G. P. M u r p h y 編集 (A l a n. R. L i s s 社, New York, 1980) 67~84頁) からの15 μ g の総RNAをホルムアミドによって変性させ、電気泳動させ、1.2%アガロースゲル上で分画し、K A I 1 とヒト β -アクチンプローブに連続的にハイブリダイズさせた。このノーザンブロット分析の結果は図4に示すが、これらの結果は正常な前立腺 (前立腺) に比した場合に、転移前立腺腫瘍に由来するヒト細胞ライン (P C - 3、L N C a P、T S U - P r 1 および D U 1 4 5) においてK A I 1 発現がかなり減少したことを明白に実証する。さらに、図4 (-80℃において一晚) に示したオートラジオグラムよりも長時間の暴露 (-80℃において4日間) は全ての腫瘍細胞におけるK A I 1 m R N A の発現を示したが、発現レベルは正常前立腺におけるよりも非常に低かった。

K A I 1 による転移抑制が間接的な免疫機構によるものである可能性を排除するために、他の2つの実験をおこなった。第一に、親A T 6 . 1 細胞、細胞ハイブリッドクローンA T 6 . 1 - 1 1 - 1 *, 又はK A I 1 トランスフェクタント (A T 6 . 1 K A I - 1) を重度な複合免疫不全 (S C I D) マウスの脚に 5×10^5 細胞/マウスで接種した。腫瘍が3~5 cm³に達したときに、腫瘍を有する脚を手術によって切除し、接種後50~60日まで、動物を追跡した。各マウスの肺転移を表1に記載するように分析した。A T 6 . 1 に関しては、9/9マウスが83/マウスの平均数で肺転移を有した。A T 6 . 1 - 1 1 - 1 * に関しては、4/9マウスが6/マウスの平均数で肺転移を有した。A T 6 . 1 K A I - 1 に関しては、2/7マウスが2/マウスの平均数で肺転移を有した。これらの試験は、ヌードマウスよりも免疫抵抗性減弱した (immune compromised) S C I D マウスにおいても、転移抑制が観察されたことを実証した。

第二に、微小核細胞-仲介染色体転移によってK A I 1 遺伝子が導入された高度に転移性のラット乳癌細胞は、ハイブリッドが同様なレベルのK A I 1 m R N A を発現したとしても、それらの転移力 (ability to metastasize) を保有した (R i n k e r - S c h a e f e r, C. W. 等 (1994) C a n c e r R e s ., 54:6249~6256)。これらのデータに基づく、K A I 1 による転移抑制の原因はより直接的な機構であるように思われる。この可能性に一致して、高K A I 1 発現性A T 6 . 1 - 1 1 - 1 * ハイブリッド細胞は、B o y d e n チャンバーアッセイ (chamber assay) において親A T 6 . 1 細胞又は非抑制A T 6 . 1 - 1 1 - 2 ハイブリッド細胞に比べて、それらの侵襲力 (invasive ability) を約50%低下させる。要約すると、B o y d e n チャンバー侵襲性分析をJ. V u k a n o v i c 等 (1993) C a n c e r R e s ., 53:(1933) が述べているように、マトリゲル (matrigel) 被覆フィルターと、下部孔におけるケモアトラクタント (chemoattractant) としての5%ウシ胎児血清とを用いて、おこなった。12時間の分析中に、高電界につき 19 ± 3 親A T 6 . 1 細胞がマトリゲルフィルターから侵入し (invade)、これに対して、転移抑制A T 6 . 1 - 1 1 - 1 * ハイブリッド細胞では 10 ± 2 、非抑制A T 6 . 1 - 1 1 - 2 ハイブリッド細胞では 18 ± 2 であった。

実施例 5

ヒト組織におけるK A I 1 遺伝子の発現

種々なヒト組織における K A I 1 遺伝子の発現レベルを評価するために、マルチプルヒト組織から単離した R N A に対してノーザン分析をおこなった。要約すると、Clontech (Palo Alto, CA) から購入したヒトマルチプル組織ノーザン・ブロットを方法の項で述べた条件下で K A I 1 プローブ及びヒト β -アクチンプローブと逐次ハイブリダイズさせた。図 5 に提示する結果は、2.4 kb K A I 1 転写体が試験した全てのヒト組織で検出され、前立腺、肺、肝臓、腎臓、骨髄及び胎盤に多く含まれ；乳腺、脾臓、骨格筋及び胸腺には中程度に含まれ；脳、心臓、卵巣、胃及び子宮には低く発現されることを示す。

実施例 6

種における K A I 1 遺伝子の保存

10

種において K A I 1 遺伝子が進化において保存されているかどうか確認するために、種々な種からの E c o R I ー消化ゲノム D N A を含有するズーブロットを Clontech (Palo Alto, CA) から購入し、K A I 1 プローブにハイブリダイズさせた。図 6 に提示する結果は、K A I 1 コーディング配列の進化における保存がヒト、サル、イヌ及びウサギにおいて高度であり、ウシ、ラット、マウスにおいて中程度であることを示す。K A I 1 の進化における保存と広範囲な組織分布とは、この遺伝子が重要な生物学的機能を有することを示唆する。

実施例 7

ヒト組織サンプルにおける K A I 1 発現の変化と転移との相関関係

20

前立腺癌患者からの肝臓転移の腫瘍バイオプシーと、健康な患者からの肝臓バイオプシーとを、ノーザンブロッティングによる K A I 1 m R N A 発現に関して分析した。腫瘍サンプルでは K A I 1 m R N A 発現が喪失し、このことは前立腺癌患者における肝臓転移の存在が K A I 1 発現の変化と相関することを実証する。

配列表

SEQUENCE LISTING

- <110> THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND
HUMAN SERVICES
JOHNS HOPKINS UNIVERSITY
- <120> Diagnostic methods and gene therapy using reagents derived from 10
the human metastasis suppressor gene KAI1
- <130> KS-A0517
- <140> JP 1996-532754
- <141> 1996-04-25
- <150> US 08/430,225 20
- <151> 1995-04-28
- <160> 20
- <170> PatentIn version 3.4
- <210> 1
- <211> 20 30
- <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>
- <223> An artificially synthesized primer sequence
- <400> 1
- agaagatcaa gttgaagagg 20 40
- <210> 2

<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 2

gggacctcat ttctagctg

10

20

<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

20

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 3

atgaaactgc tcttgctgg

19

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

30

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 4

tcagctcttg gctccccatt

40

20

<210> 5

<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 5

tgggcacggg tttcaggaaa t

10

21

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

20

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 6

tgcagagagc cccaaatgca

20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

30

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 7

agggtgagcc gtgagcacia

40

20

<210> 8

<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 8

tgctgagagt acccagatgc

20

10

<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

20

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 9

gatggccaca cccaagccc

19

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

30

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 10

tgcattggaga aggtgcaggc

20

40

<210> 11

<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 11

cctcttgccc accctgactg a

10

21

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

20

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 12

ttcacaccat tctcctgcct

20

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

30

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 13

agtcttcct gctgctgtgt g

40

21

<210> 14

<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 14

tcagtcaggg tgggcaagag g

10

21

<210> 15
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

20

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 15

gaggagcacc ccgtgctgct ga

22

<210> 16
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

30

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 16

ctagaagcat ttgcggtgga cgatggaggg gcc

40

33

<210> 17

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 17

ttgtaaccaa ctgggacgat atgg

10

24

<210> 18
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial

20

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 18

gtcttgatct tcatggtgct agg

23

<210> 19
 <211> 1624
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

30

<400> 19

ccgactgagg cagagcggg tgacgtggg cctgcagcgc ggagcagaaa gcagaacccg 60

cagagtcctc cctgctgctg tgtggacgac acgtgggcac aggcagaagt gggccctgtg 120

40

accagctgca ctggtttctg ggaaggaagc tccaggactg gcgggatggg ctcagcctgt 180

atcaaagtca ccaaatactt tctcttctc ttcaacttga tcttctttat cctgggcgca 240

gtgatcctgg gcttcgggggt gtggatcctg gccgacaaga gcagtttcat ctctgtcctg	300
caaacctcct ccagctcgt taggatgggg gcctatgtct tcacggcgt gggggcagtc	360
actatgctca tgggcttcct gggtgcac gccgcctca acgaggtccg ctgcctgctg	420
gggtgtact ttgcttctct gctcctgac ctcatgtccc aggtgacggc cggggccctc	480
ttctacttca acatgggcaa gctgaagcag gagatgggcg gcatcgtgac tgagctcatt	540
cgagactaca acagcagtcg cgaggacagc ctgcaggatg cctgggacta cgtgcaggct	600
caggtgaagt gctgcggctg ggtcagcttc tacaactgga cagacaacgc tgagctcatg	660
aatcgccctg aggtcaccta cccctgttcc tgogaagtca agggggaaga ggacaacagc	720
ctttctgtga ggaagggctt ctgcgaggcc cccggcaaca ggaccagag tggcaaccac	780
cctgaggact ggcctgtgta ccaggagggc tgcatggaga aggtgcaggc gtggctgcag	840
gagaacctgg gcatcctct cggcgtgggc gtgggtgtgg ccatcatoga gctcctgggg	900
atggtcctgt ccatctgctt gtgccggcac gtccattccg aagactacag caaggtcccc	960
aagtactgag gcagctgcta tccccatctc cctgcctggc ccccaacctc agggtccca	1020
ggggtctccc tggctccctc ctccaggcct gcctcccaact tcaactgcgaa gacctcttg	1080
cccacctga ctgaaagtag ggggctttct ggggcctagc gatctctctt ggcctatccg	1140
ctgccagcct tgagccctgg ctgttctgtg gtctctctgc tcaccgcca tcagggttct	1200
cttatcaact cagagaaaaa tgctccccac agcgtccctg gcgcaggtgg gctggacttc	1260
tacctgccct caagggtgtg tatattgtat aggggcaact gtatgaaaaa ttggggagga	1320

10

20

30

40

gggggccggg cgcggtgctc acgcctgtaa tcccagcact ttgggaggcc gaggcgggtg 1380
 gatcacgagg tcaggagatc gagaccatcc tggctaacat ggtgaaaccc cgtctctact 1440
 aaaaatacaa aaaaaattta gccgggcgcg gtggcgggca cctgtagtcc cagctacttg 1500
 ggaggctgag gcaggagaat ggtgtgaacc cgggagcgga ggttgcaagt agctgagatc 1560
 gtgctactgc actccagcct gggggacaga aagagactcc gtctcaaaaa aaaaaaaaaa 1620

10

aaaa

1624

<210> 20

<211> 267

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 20

Met Gly Ser Ala Cys Ile Lys Val Thr Lys Tyr Phe Leu Phe Leu Phe
 1 5 10 15

30

Asn Leu Ile Phe Phe Ile Leu Gly Ala Val Ile Leu Gly Phe Gly Val
 20 25 30

Trp Ile Leu Ala Asp Lys Ser Ser Phe Ile Ser Val Leu Gln Thr Ser
 35 40 45

40

Ser Ser Ser Leu Arg Met Gly Ala Tyr Val Phe Ile Gly Val Gly Ala
 50 55 60

Val Thr Met Leu Met Gly Phe Leu Gly Cys Ile Gly Ala Val Asn Glu
65 70 75 80

Val Arg Cys Leu Leu Gly Leu Tyr Phe Ala Phe Leu Leu Leu Ile Leu
85 90 95

Ile Ala Gln Val Thr Ala Gly Ala Leu Phe Tyr Phe Asn Met Gly Lys
100 105 110

Leu Lys Gln Glu Met Gly Gly Ile Val Thr Glu Leu Ile Arg Asp Tyr
115 120 125

Asn Ser Ser Arg Glu Asp Ser Leu Gln Asp Ala Trp Asp Tyr Val Gln
130 135 140

Ala Gln Val Lys Cys Cys Gly Trp Val Ser Phe Tyr Asn Trp Thr Asp
145 150 155 160

Asn Ala Glu Leu Met Asn Arg Pro Glu Val Thr Tyr Pro Cys Ser Cys
165 170 175

Glu Val Lys Gly Glu Glu Asp Asn Ser Leu Ser Val Arg Lys Gly Phe
180 185 190

Cys Glu Ala Pro Gly Asn Arg Thr Gln Ser Gly Asn His Pro Glu Asp
195 200 205

10

20

30

40

Trp Pro Val Tyr Gln Glu Gly Cys Met Glu Lys Val Gln Ala Trp Leu
 210 215 220

Gln Glu Asn Leu Gly Ile Ile Leu Gly Val Gly Val Gly Val Ala Ile
 225 230 235 240

Ile Glu Leu Leu Gly Met Val Leu Ser Ile Cys Leu Cys Arg His Val
 245 250 255

His Ser Glu Asp Tyr Ser Lys Val Pro Lys Tyr
 260 265

10

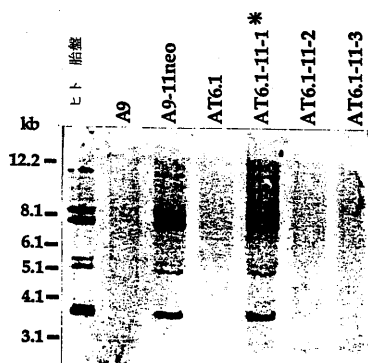
【図 1】

FIG. 1



【図 2】

FIG. 2



【図 3】

FIG. 3

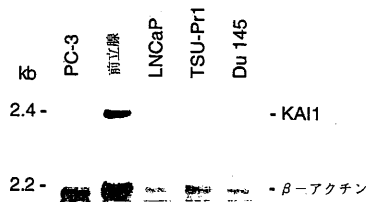
```

1  CCGACTGAGGCACGAGCGGGTGACGCTGGGCTGCAGGCGGAGCAGAAAGCAGAACCCG
61  CAGAGTCTCCCTGCTGCTGTGTGGACGACACGTGGGCACAGGCAGAAAGTGGGCCCTGTG
121 ACCAGTGCACCTGGTTTCGTGGAAGGAAGCTCCAGGACTGGCGGGATGGGCTCAGCCTGT
1  M G S A C
181 ATCAAAGTCACCAATACTTTCTCTTCTCTCAACTTGATCTTCTTTATCCTGGGCGCA
6  I K V T K Y F L F L F N L I F F I L G A
241 GTGATCCTGGGCTTCGGGGTGTGGATCCTGGCCGACAGAGCAGTTTCATCTCTGTCTCT
26  V I L G F G V W I L A D K S F I S V L
301 CAAACCTCCTCCAGCTCGCTTAGGATGGGGCTATGTCTTCATCGGCGTGGGCGCAGTC
46  Q T S S S S L R M G A Y V F I G V G A V
361 ACTATGCTCATGGGCTTCTGGGCTGCATCGGCCCGCTCAACAGAGTCCGCTGCCTGCTG
66  T M L N G F L G C I G A V N E V R C L L
421 GGGCTGTACTTTGCTTTCTGCTCTGATCTTCCAGGTGACGGCGGGGCGCTCTC
86  G L Y P A F L L L L I L I A Q V T A G A L
481 TTCTACTTCAACATGGGCAAGCTGAAGCAGGAGATGGGCGCATCTGACTGAGCTCATT
106 F Y F N M G K L K Q E M G G I V T B L I
541 CGAGACTACAACAGCAGTCGCGAGGACAGCTGCAGGATGCTGGGACTACGTGCAAGCT
126 R D Y N S S R E D S L Q D A W D Y V Q A
601 CAGGTGAAGTGTGCGGCTGGGTCACTTCTACAAGTGGACAGACAAGCTGAGCTCATG
146 Q V K C C G W V S F Y N W T D N A E L M
661 AATCGCCCTGAGGTACCTACCCCTGTTCCTGCGAAGTCAAGGGGAAGAGGACAAACAGC
166 N R P E V T Y P C S C E V K G E E D N S
721 CTTTCTGTGAGGAAGGGCTTCTCGGAGGCGCCCGCAACAGGACCCAGAGTGGCAACCCAC
186 L S V R K G F C E A P G N R T Q S G N H
781 CCTGAGGACTGGCTGTGTACAGGAGGGCTGCATGGAGAAGGTGACGCGCTGGCTGCAG
206 P E D W P V Y Q E G C M E K V Q A W L Q
841 GAGAACCTGGGCATCATCTCGGCGTGGGCTGTGGCCATCATGAGCTCTCTGGG
226 E N L G I I L G V G V A I I E L L G
901 ATGGTCTGTCCATCTGCTGTGTGCGGCGACGTCCATTCGAAGACTACAGCAAGGTCCCC
246 M V L S I C L C R H V H S E D Y S K V P
961 AAGTACTGAGGCAGCTGTATCCCATCTCCCTGCTGGCCCCCACTCAGGGCTCCCA
266 K Y *
1021 GGGGTCTCCCTGGCTCCCTCTCCAGGCGCTGCCCTCCCACTTCACTGCGAAGACCCCTCTT
1081 CCCACCTGACTGAAAGTAGGGGCTTTCTGGGCGCTAGCGATCTCTCTGGCCTATCCG
1141 CTGCCAGCCTTGAGCCCTGGCTGTCTGTGTCTCTGCTCACCGCCCATCAGGGTTCT
1201 TTATCAACTCAGAGAAAAATGCTCCCAACAGCGTCCCTGGGCGAGGTGGGCTGGAATTC
1261 TACCTGCCCTCAAGGGTGTGTATATTGTATAGGGGCAACTGTATGAAAAATTGGGGAGGA
1321 GGGGCGGGCGCGGTGCTCACGCTGTATATCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCGGGTG
1381 GATCACGAGGTGAGGAGATGAGACCATCTGGCTAACATGTGTAAACCCGCTCTTACT
1441 AAAAATACAAAAAATTTAGCCGGCGCGGTGGCGGCACTGTGCTCCAGCTACTTG
1501 GGAGGCTGAGGCAGGAGATGTTGTGAACCCGGGAGCGAGGTTCAGGTGAGCTGAGATC
1561 GTGCTACTGCACCTCAGCCTGGGGGACAGAAAGAGACTCCGTCTCAAAAAAAGAAAAA
1621 AAAA

```

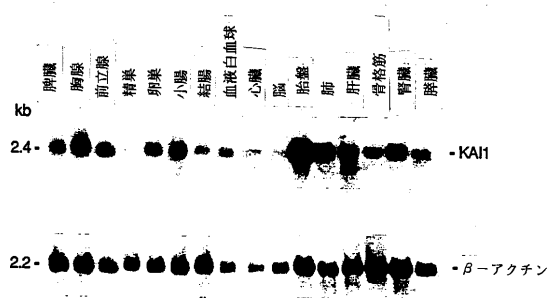
【図 4】

FIG. 4



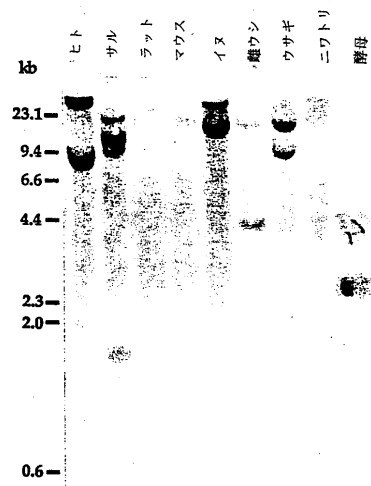
【図 5】

FIG. 5



【図 6】

FIG. 6



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 48/00 (2006.01) G 0 1 N 33/574 D
A 6 1 P 35/04 (2006.01) A 6 1 K 48/00
 A 6 1 P 35/04

(74)代理人

弁理士 新見 浩一

(72)発明者 ドン, ジンータン

アメリカ合衆国メリーランド州21030, コッカイズヴィル, ナットメグ・ノル・コート 4-
 エイ

(72)発明者 バーレット, ジェイ・カール

アメリカ合衆国ノース・カロライナ州27514, チャペル・ヒル, ターキー・ファーム・ロード
 7008

(72)発明者 ラム, パトリシア・ダブリュー

アメリカ合衆国ノース・カロライナ州27511, キャリ, ホワイトホール・ウェイ 401

(72)発明者 アイザックス, ジョン・ティー

アメリカ合衆国メリーランド州21030, フェニックス, ポップラー・ヒル・ロード 1363
 8

審査官 清水 晋治

(56)参考文献 PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING Vol.36(0),
 P.105 (1995)
 Journal of Immunology, Vol.149(9), p.2879-2886 (1992)
 Journal of Immunology, Vol.148(9), p.2826-2833 (1992)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12Q 1/68

C12N 15/00 - 15/90

C07K 14/00 - 19/00

C12P 21/08

A61K 48/00

A61P 35/00

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

CA(STN)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

REGISTRY(STN)