

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

**特表2006-501465
(P2006-501465A)**

(43) 公表日 平成18年1月12日(2006.1.12)

(51) Int.C1.	F 1	テーマコード (参考)		
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574	Z	2 G O 4 5	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088		4 B O 2 4	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H	4 B O 2 9	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E	4 B O 6 3	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T	4 C O 8 4	
			(全 44 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-541214 (P2004-541214)	(71) 出願人	504445356 オンコセラピー・サイエンス株式会社 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1
(86) (22) 出願日	平成15年8月14日 (2003.8.14)	(71) 出願人	504137912 国立大学法人 東京大学 東京都文京区本郷7丁目3番1号
(85) 翻訳文提出日	平成17年3月9日 (2005.3.9)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(86) 國際出願番号	PCT/JP2003/010339	(74) 代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
(87) 國際公開番号	W02004/031775	(72) 発明者	中村 祐輔 神奈川県横浜市青葉区あざみ野1丁目17 番33号
(87) 國際公開日	平成16年4月15日 (2004.4.15)		
(31) 優先権主張番号	60/414,709		
(32) 優先日	平成14年9月30日 (2002.9.30)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】結腸直腸癌の転移を治療または予防する方法

(57) 【要約】

結腸直腸癌の転移病変を治療するための物質を同定する方法を開示する。結腸直腸癌の転移病変を治療するまたは結腸直腸癌の転移を予防する方法も同様に開示する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の段階を含む、結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための化合物をスクリーニングする方法：

(1) 以下からなる群より選択されるポリペプチドに被験化合物を接触させる段階：

(a) MLX1～MLX153からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(b) 一つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加された、MLX1～MLX153からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、もとのポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質と同等の生物活性を有するポリペプチド；ならびに 10

(c) MLX1～MLX153からなる群より選択されるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、MLX1～MLX153からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等の生物活性を有するポリペプチド；

(2) ポリペプチドと被験化合物との結合活性を検出する段階；ならびに

(3) ポリペプチドに結合する化合物を選択する段階。

【請求項 2】

以下の段階を含む、結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための化合物をスクリーニングする方法：

(1) 以下からなる群より選択されるポリペプチドに被験化合物を接触させる段階：

(a) MLX1～MLX153からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(b) 一つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加された、MLX1～MLX153からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、もとのポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質と同等の生物活性を有するポリペプチド；ならびに

(c) MLX1～MLX153からなる群より選択されるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、MLX1～MLX153からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等の生物活性を有するポリペプチド； 30

(2) 段階 (a) のポリペプチドの生物活性を検出する段階；ならびに

(3) 被験化合物の非存在下で検出される生物活性と比較して、ポリペプチドの生物活性を抑制する化合物を選択する段階。

【請求項 3】

以下の段階を含む、結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための化合物をスクリーニングする方法：

(1) 一つまたは複数のマーカー遺伝子を発現する細胞に被験化合物を接触させる段階であって、マーカー遺伝子がMLX1～MLX153からなる群より選択される段階；および

(2) 一つまたは複数のマーカー遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する段階。 40

【請求項 4】

一つまたは複数のマーカー遺伝子を発現する細胞が結腸直腸癌細胞を含む、請求項3記載の方法。

【請求項 5】

以下の段階を含む、結腸直腸癌を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための化合物をスクリーニングする方法：

(1) レポーター遺伝子の上流にMLX1～MLX153からなる群より選択される遺伝子の転写調節領域を含むベクターを構築する段階；

(2) 段階 (1) のベクターによって細胞を形質転換する段階； 50

(3) 段階(2)の細胞に被験化合物を接触させる段階；

(4) レポーター遺伝子の発現を検出する段階；および

(5) 被験化合物の非存在下での発現と比較して、レポーター遺伝子の発現を抑制する被験化合物を選択する段階。

【請求項6】

MLX1～MLX153からなる群より選択される一つまたは複数の核酸配列にそれぞれ結合する一つまたは複数の検出試薬を含む、キット。

【請求項7】

MLX1～MLX153からなる群より選択される一つまたは複数の核酸配列にそれぞれ結合する一つまたは複数の核酸を含む、アレイ。

【請求項8】

請求項1～5のいずれか一項記載の方法によって得られる化合物の薬学的有効量を投与する段階を含む、結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための方法。

【請求項9】

MLX1～MLX153からなる群より選択される一つまたは複数の遺伝子に対するアンチセンス核酸または低分子干渉RNAの薬学的有効量を被験者に投与する段階を含む、被験者における結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための方法。

【請求項10】

MLX1～MLX153からなる群より選択される遺伝子によってコードされるタンパク質に結合する抗体またはその断片の薬学的有効量を被験者に投与する段階を含む、被験者における結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための方法。

【請求項11】

(a)～(c)からなる群より選択されるポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、または該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターの薬学的有効量を被験者に投与する段階を含む、被験者における結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための方法：

(a) MLX1～MLX153からなる群より選択されるポリヌクレオチドまたはその断片によってコードされるアミノ酸配列を含む、ポリペプチド；

(b) 一つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加された、MLX1～MLX153からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、もとのポリヌクレオチドまたはその断片によってコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質と同等の生物活性を有するポリペプチド；ならびに

(c) MLX1～MLX153からなる群より選択されるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、MLX1～MLX153からなる群より選択されるポリヌクレオチドまたはその断片によってコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等の生物活性を有するポリペプチド。

【請求項12】

(a)～(c)からなる群より選択されるポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドを含むベクターに、抗原提示細胞を接触させる段階を含む、抗腫瘍免疫を誘導する方法：

(a) MLX1～MLX153からなる群より選択される；

(b) 一つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加された、MLX1～MLX153からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、もとのポリヌクレオチドまたはその断片によってコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質と同等の生物活性を有するポリペプチド；ならびに

(c) MLX1～MLX153からなる群より選択されるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、MLX1～MLX153からなる群より選択されるポリヌクレオチドまたはその断片によってコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等の生物活性を有するポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 1 3】

抗原提示細胞を被験者に投与する段階をさらに含む、請求項12記載の抗腫瘍免疫を誘導する方法。

【請求項 1 4】

請求項1~5のいずれか一項記載の方法によって得られる化合物の薬学的有効量を含む、被験者における結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための組成物。

【請求項 1 5】

MLX1~MLX153からなる群より選択される一つまたは複数の遺伝子に対するアンチセンス核酸または低分子干渉RNAの薬学的有効量を含む、被験者における結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための組成物。
10

【請求項 1 6】

MLX1~MLX153からなる群より選択される遺伝子によってコードされるタンパク質に結合する抗体またはその断片の薬学的有効量を含む、被験者における結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための組成物。

【請求項 1 7】

(a)~(c)からなる群より選択されるポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドを含むベクターの薬学的有効量を含む、被験者における結腸直腸癌の転移病変を治療または結腸直腸癌の転移を予防するための組成物：
20

(a) MLX1~MLX153からなる群より選択されるポリヌクレオチドまたはその断片によってコードされるアミノ酸配列を含む、ポリペプチド；

(b) 一つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加された、MLX1~MLX153からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、もとのポリヌクレオチドまたはその断片によってコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質と同等の生物活性を有するポリペプチド；ならびに
(c) MLX1~MLX153からなる群より選択されるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、MLX1~MLX153からなる群より選択されるポリヌクレオチドまたはその断片によってコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等の生物活性を有するポリペプチド。
30

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

本出願は、参照として本明細書に組み入れられる、2002年9月30日に提出された米国特許出願第60/414,709号に関する。

【0 0 0 2】**技術分野**

本発明は、結腸直腸癌の転移病変を治療する方法および結腸直腸癌の転移を予防する方法に関する。

【背景技術】**【0 0 0 3】****背景技術**

肝転移は、結腸直腸癌(CRC)患者の主な死因である。治療アプローチが進歩しているにもかかわらず、完全な治癒のためにはより有効な戦略が必要である。肝転移の予防または有効な治療は、何千人の患者の命を救うであろう。
40

【0 0 0 4】

転移過程は、原発性部位からの癌細胞の放出、隣接する血管への浸潤、血流を通した転移部位への輸送、遠位臓器の血管外遊出および/または梗塞、ならびに新しい環境で栄養を獲得した浸潤細胞の再増殖など、多数の段階を伴う。したがって、多数の遺伝子が転移過程に関連すると予想される。多くの研究者が、この臨床的に重要な問題に取り組んでい
50

るが、正確なメカニズムまたは重要な遺伝子は未だ明らかになっていない。肝転移に関連する多くの分子が報告されているが、ほとんどの研究では、一つのみまたはごく一部の分子に注目しているため、複雑な過程におけるそれぞれの遺伝子の重要性は、依然として曖昧なままである。

【0005】

マイクロアレイ技術の進歩により、何千もの遺伝子の発現レベルを1回の実験で同定することが可能になり、腫瘍組織における多数の遺伝子の発現変化に基づく癌の分類が示唆されている (Golubら、*Science* 286: 531~7 (1999) ; Alizadehら、*Nature* 403: 503~11 (2000))。cDNAマイクロアレイ技術により、正常細胞および悪性細胞における遺伝子発現の包括的プロファイルを得ること、ならびに悪性細胞および対応する正常細胞における遺伝子発現を比較することが可能になった (Okabeら、*Cancer Res* 61: 2129-37 (2001) ; Kitaharaら、*Cancer Res* 61: 3544-9 (2001) ; Linら、*Oncogene* 21: 4120-8 (2002) ; Hasegawaら、*Cancer Res* 62: 7012-7 (2002))。このアプローチは癌細胞の複雑な性質を明らかにすることを可能にし、発癌の機序を解明する一助となる。腫瘍において脱制御される遺伝子の同定は、個々の癌のより正確で間違いのない診断、および新規な治療標的の開発につながる可能性がある (BenzおよびClevers、*Cell* 103: 311-20 (2000))。

【0006】

最近、二つの研究グループが、cDNAマイクロアレイを用いて、悪性黒色腫の転移に関する遺伝子を発見した。一方のグループは、高転移性黒色腫細胞の発現プロフィールを、同じ細胞株から確立した低転移細胞と比較した (Clarkら、*Nature* 406: 532~5 (2000))。他方のグループは、様々な黒色腫細胞株と原発性黒色腫における発現プロフィールを分析した (Bittnerら、*Nature* 406: 536~40 (2000))。さらに、結腸直腸癌の肝転移の基礎的メカニズムを明らかにするために、本発明者らは以前、遺伝子9192個を含むcDNAマイクロアレイを用いて、原発性腫瘍10例とその対応する転移病変の発現プロフィールを分析した (Yanagawaら、*Neoplasia* 3: 395~401 (2001))。

【0007】

発癌のメカニズムを解明するためにデザインされた研究によって、抗腫瘍物質の分子標的を同定することは、既に容易になっている。特定の遺伝子産物の発癌活性を抑制するように設計された様々な物質が、腫瘍治療に有効であることが判明している (Heら、*Cell* 99: 335~45 (1999) ; Linら、*Cancer Res.* 61: 6345~9 (2001) ; Fujitaら、*Cancer Res.* 61: 7722~6 (2001))。したがって、癌性細胞において通常アップレギュレートされる遺伝子産物は、新規抗癌剤を開発するための可能な分子標的として役立ちうる。

【0008】

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

【0009】

TAAに関する基礎研究および臨床研究の著しい進歩にもかかわらず (Rosenbergら、*Natur*

10

20

30

40

50

e Med 4: 321-7 (1998) ; Mukherjiら、Proc Natl Acad Sci USA 92: 8078-82 (1995) ; Huら、Cancer Res 56: 2479-83 (1996))、結腸直腸癌を含む腺癌の治療のための候補となるTAAの数は非常に限られている。癌細胞で大量に発現されると同時にその発現が癌細胞に限定されるTAAは、免疫治療の標的として有望な候補になると考えられる。さらに、強力かつ特異的な抗腫瘍免疫応答を誘発する新たなTAAの同定は、様々な種類の癌におけるペプチドワクチン接種の臨床使用を促すと考えられる (Boonおよびvan der Bruggen、J Exp Med 183: 725-9 (1996) ; van der Bruggenら、Science 254: 1643-7 (1991) ; Brichardら、J Exp Med 178: 489-95 (1993) ; Kawakamiら、J Exp Med 180: 347-52 (1994) ; Shichijoら、J Exp Med 187: 277-88 (1998) ; Chenら、Proc Natl Acad Sci USA 94: 1914-8 (1997) ; Harris、J Natl Cancer Inst 88: 1442-5 (1996) ; Butterfieldら、Cancer Res 59: 3134-42 (1999) ; Vissersら、Cancer Res 59: 5554-9 (1999) ; van der Burgら、J Immunol 156: 3308-14 (1996) ; Tanakaら、Cancer Res 57: 4465-8 (1997) ; Fujieら、Int J Cancer 80: 169-72 (1999) ; Kikuchiら、Int J Cancer 81: 459-66 (1999) ; Oisoら、Int J Cancer 81: 387-94 (1999))。

10

【発明の開示】

【0010】

発明の概要

本発明は、結腸直腸癌の転移病変に相關した遺伝子発現パターンの発見に基づいている。

20

【0011】

したがって本発明は、結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための化合物をスクリーニングする方法を特徴とする。本方法には、MLXポリペプチドを被験化合物に接触させる段階、およびMLXポリペプチドに結合する被験化合物を選択する段階が含まれる。

20

【0012】

さらに、本発明は、MLXポリペプチドを被験化合物に接触させる段階、およびMLXポリペプチドの生物活性を抑制する化合物を選択する段階を含む、結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための化合物をスクリーニングする方法を提供する。

30

【0013】

本発明はさらに、一つまたは複数のMLXポリペプチドを発現する細胞を被験化合物に接触させる段階、および一つまたは複数のMLXポリペプチドの発現レベルを抑制する被験化合物を選択する段階を含む、結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための化合物をスクリーニングする方法を提供する。

30

【0014】

さらに、本発明は、被験化合物と、MLX遺伝子の転写調節領域の下流にレポーター遺伝子を含むベクターとを、レポーター遺伝子の発現にとって適切な条件で接触させる段階、およびレポーター遺伝子の発現を阻害する被験化合物を選択する段階を含む、結腸直腸癌を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための化合物をスクリーニングする方法を提供する。

40

【0015】

本出願はまた、結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための組成物を提供する。本組成物は、例えば、抗癌剤であってもよい。本組成物は、MLXポリヌクレオチドのアンチセンスS-オリゴヌクレオチドもしくは低分子干渉RNA(sirNA)の少なくとも一部、または、MLXタンパク質に対する抗体もしくは抗体断片として記載されうる。本組成物はまた、結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための化合物をスクリーニングする本発明の方法によって選択された化合物を含む組成物であってもよい。

40

【0016】

薬学的組成物の作用経過とは、望ましくは、結腸直腸癌の転移病変の成長または増殖の

50

阻害である。薬学的組成物は、ヒトおよび家畜哺乳類を含む哺乳類に適用されうる。

【0017】

さらに、本発明は、MLXタンパク質、そのタンパク質をコードするポリヌクレオチド、またはそのポリヌクレオチドを含むベクターを含む、結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための組成物を提供する。そのような組成物は、抗腫瘍免疫を誘導すると期待される。

【0018】

本発明はさらに、本発明によって提供される任意の組成物を用いて、結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための方法を提供する。

【0019】

本発明はまた、一つもしくは複数のMLX核酸配列に結合するまたはその核酸配列によってコードされる遺伝子産物に結合する検出試薬を有するキットを提供する。一つまたは複数のMLX核酸に結合する核酸アレイも同様に提供される。そのようなキットおよびアレイは、結腸直腸癌の転移を診断するために有用であると期待される。

【0020】

本発明の前述の概要および以下の詳細な説明はいずれも、好ましい態様に関するものであり、本発明または本発明の他の代替的態様を制限するものではないと理解されるべきである。

【0021】

発明の詳細な説明

本明細書において用いられる「一つの(a)」、「一つの(an)」、および「その」は、特記しない限り「少なくとも一つ」を意味する。

【0022】

本発明は、転移を伴う結腸直腸癌患者の転移病変において、対応する原発性病変と比較して、多数の核酸配列の発現パターンが変化(増加)しているという発見に一部基づいている。遺伝子発現の差は、レーザー捕捉型顕微解剖(LCM)および包括的cDNAマイクロアレイシステムを用いて同定された。本明細書において同定された、差次的に発現された遺伝子は、結腸直腸癌、特に結腸直腸癌の転移病変の治療用の遺伝子標的治療アプローチを開発するために、ならびに結腸直腸癌の転移を阻害するために用いられる。

【0023】

結腸直腸癌を患う患者の転移病変において発現レベルが増加している遺伝子を表1に要約するが、これらは、本明細書において集合的に「転移関連遺伝子」、「MLX核酸」、または「MLXポリヌクレオチド」と称され、対応するコードされるポリペプチドは「MLXポリペプチド」または「MLXタンパク質」と称される。特記しない限り、「MLX」とは、本明細書に開示された任意の配列(例えば、MLX1～MLX153)を指すことを意味する。遺伝子は既に記載されており、データベースアクセス番号と共に示される。

【0024】

様々な物質に対するこれらの遺伝子の発現、または遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を測定することによって、結腸直腸癌の転移病変を治療するまたは結腸直腸癌の転移を予防する物質を同定することができる。

【0025】

結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための化合物のスクリーニング

本発明は、一つまたは複数のMLXポリペプチドを用いて結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための化合物をスクリーニングする方法を提供する。本スクリーニング法の一つの態様は以下の段階を含む：(a)被験化合物をMLXポリペプチドに接触させる段階；(b)ポリペプチドと被験化合物との結合活性を検出する段階；および(c)MLXポリペプチドに結合する化合物を選択する段階。

【0026】

本発明の結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するため

10

20

30

40

50

の化合物をスクリーニングする方法のもう一つの態様において、本方法は、指標としてMLXポリペプチドの生物活性を利用する。このスクリーニング法には以下の段階が含まれる：(a) 被験化合物をMLXポリペプチドに接触させる段階；(b) 段階(a)のMLXポリペプチドの生物活性を検出する段階；および(c) 被験化合物の非存在下で検出される生物活性と比較してMLXポリペプチドの生物活性を抑制する化合物を選択する段階。

【0027】

スクリーニングのために用いられる本発明のMLXポリペプチドは、以下のポリペプチドから選択される：

- (1) MLX1～MLX153からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- (2) 一つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたMLX1～MLX153からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、もとのポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質と同等の生物活性を有するポリペプチド；ならびに
- (3) MLX1～MLX153からなる群より選択されるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、MLX1～MLX153からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等の生物活性を有するポリペプチド。

【0028】

本発明において、「生物活性」という用語は、転移病変の成長活性または増殖活性のような活性を指す。被験ポリペプチドが生物活性を有するか否かは、被験ポリペプチドをコードするDNAを、それぞれのポリペプチドを発現する細胞に導入する段階、および細胞の成長または増殖、コロニー形成活性の増加等を検出することによって判定することができる。

【0029】

所定のタンパク質の生物活性を有するポリペプチドを作製するための方法は当業者に周知であり、これにはタンパク質に変異を導入する既知の方法が含まれる。例えば、当業者は、ヒトMLXタンパク質の生物活性を有するポリペプチドを、これらのタンパク質のいずれかのアミノ酸配列に部位特異的突然変異誘発法によって適切な変異を導入することによって作製することができる(Hashimoto-Gotohら、Gene 152: 271-5 (1995); ZollerおよびSmith、Methods Enzymol 100: 468-500 (1983); Kramerら、Nucleic Acids Res. 12: 9441-9456 (1984); KramerおよびFritz、Methods Enzymol 154: 350-67 (1987); Kunkel、Proc Natl Acad Sci USA 82: 488-92 (1985); Kunkel、Methods Enzymol 85: 2763-6 (1988))。アミノ酸変異は自然下でも起こりうる。得られる変異ポリペプチドがヒトMLXタンパク質の生物活性を有するという前提で、一つまたは複数のアミノ酸が変異したヒトMLXタンパク質のアミノ酸配列を有するタンパク質がMLXポリペプチドに含まれる。このような変異体において変異させるアミノ酸の数は一般に10アミノ酸またはそれ未満、好ましくは6アミノ酸またはそれ未満、より好ましくは3アミノ酸またはそれ未満である。

【0030】

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

【0031】

変異させるアミノ酸残基は、アミノ酸側鎖の特性が保存される別のアミノ酸に変異させることができない(保存的アミノ酸置換として知られる方法)。アミノ酸側鎖の特性の例には、疎水性アミノ酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、および、以下の官能基または特徴を共通して有する側鎖がある：

10

20

30

40

50

脂肪族側鎖（G、A、V、L、I、P）；水酸基含有側鎖（S、T、Y）；硫黄原子含有側鎖（C、M）；カルボン酸およびアミド含有側鎖（D、N、E、Q）；塩基含有側鎖（R、K、H）；および芳香族含有側鎖（H、F、Y、W）。括弧内の文字はアミノ酸の一文字略号を示すことに注意されたい。

【0032】

ヒトMLXタンパク質のアミノ酸配列に1つまたは複数のアミノ酸残基が付加されたポリペプチドの一例は、ヒトMLXタンパク質を含む融合タンパク質である。融合タンパク質とは、ヒトMLXタンパク質と他のペプチドまたはタンパク質との融合物のことであり、これは本明細書記載のMLXタンパク質に含まれる。融合タンパク質は、ヒトMLXタンパク質をコードするDNAを他のペプチドまたはタンパク質をコードするDNAとフレームが合致するように連結し、この融合DNAを発現ベクターに挿入して、それを宿主において発現させるといった当業者に周知の技法によって作製しうる。MLXタンパク質と融合させるペプチドまたはタンパク質には制限はない。10

【0033】

MLXタンパク質と融合させるペプチドとして用いられる既知のペプチドには、例えば、FLAG (Hoppら、Biotechnology 6: 1204-10 (1988))、6個のHis (ヒスチジン) 残基を含む $6 \times$ His、 $10 \times$ His、インフルエンザ凝集素 (HA)、ヒトc-myc断片、VSP-GP断片、p18HIV断片、T7タグ、HSVタグ、Eタグ、SV40T抗原断片、Ickタグ、-チューブリン断片、Bタグ、プロテインC断片などが含まれる。MLXタンパク質と融合させうるタンパク質の例には、GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)、インフルエンザ凝集素 (HA)、免疫グロブリン定常領域、-ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合タンパク質) などが含まれる。20

【0034】

融合タンパク質は、上に考察したように融合ペプチドまたはタンパク質をコードする市販のDNAと、MLXポリペプチドをコードするDNAとを融合させ、作製された融合DNAを発現させることによって作製しうる。このような融合タンパク質を発現させるために、市販のエピトープ-抗体系を用いることができる (Experimental Medicine 13: 85-90 (1995))。自己のマルチクローニングサイトを用いて、例えば -ガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 等との融合タンパク質を発現できるベクターが市販されている。30

【0035】

任意のMLXタンパク質の生物活性を有するポリペプチドを単離するための当技術分野で知られた代替的な方法には、例えば、ハイブリダイゼーション法を用いる方法がある (Sambrookら、「Molecular Cloning」第2版、9.47-9.58、Cold Spring Harbor Lab. Press (1989))。当業者は、ヒトMLXタンパク質をコードするDNA配列の全体または一部に対して高い相同意を有するDNAを容易に単離して、単離されたDNAからヒトMLXタンパク質の生物活性を有するポリペプチドを単離することができる。MLXポリペプチドには、ヒトMLXタンパク質をコードするDNA配列の全体または一部とハイブリダイズするDNAによってコードされ、かつヒトMLXタンパク質の生物活性を有するポリペプチドが含まれる。これらのポリペプチドには、ヒト由来のタンパク質に対応する哺乳動物相同体 (例えば、サル、ラット、ウサギ、およびウシの遺伝子によってコードされるポリペプチド) が含まれる。ヒトMLXタンパク質をコードするDNAに対して高度に相同なcDNAを動物から単離する際には、結腸直腸癌の転移病変を用いることが特に好ましい。40

【0036】

ヒトMLXタンパク質の生物活性を有するポリペプチドをコードするDNAを単離するためのハイブリダイゼーションの条件は、当業者によって慣行的に選択されうる。例えば、30分間またはそれ以上にわたる68 °Cでのプレハイブリダイゼーションを「Rapid-hyb緩衝液」 (Amersham LIFE SCIENCE) を用いて行い、標識したプローブを添加した上で、1時間またはそれ以上にわたって68 °Cで加温することによって、ハイブリダイゼーションを行ってもよい。それに続く洗浄段階は、例えば、低ストリンジエント条件下で行いうる。低ストリ50

ンジェント条件とは、例えば、42、 $2 \times$ SSC、0.1% SDS、または好ましくは50、 $2 \times$ SSC、0.1% SDSのことである。より好ましくは、高ストリンジエント条件を用いる。高ストリンジエント条件とは、例えば、室温の $2 \times$ SSC、0.01% SDS中の20分間の洗浄を3回行った後に、37の $1 \times$ SSC、0.1% SDS中の20分間の洗浄を3回行い、50の $1 \times$ SSC、0.1% SDS中の20分間の洗浄を2回行うことである。しかし、温度および塩濃度などのいくつかの要因はハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響を及ぼすと考えられ、当業者は必要なストリンジエンシーを得るためにこれらの要因を適切に選択することができる。

【0037】

タンパク質をコードするDNAの配列情報に基づいて合成したプライマーを用いて、ヒトMLXタンパク質の生物活性を有するポリペプチドをコードするDNAを単離するために、ハイブリダイゼーションの代わりに、遺伝子増幅法、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を使用することもできる。10

【0038】

以上のハイブリダイゼーション法または遺伝子増幅法によって単離されたDNAによってコードされる、ヒトMLXタンパク質の生物活性を有するポリペプチドは、通常、ヒトMLXタンパク質のアミノ酸配列に対して高い相同性を有する。「高い相同性」とは一般に、40%またはそれ以上、好ましくは60%またはそれ以上、より好ましくは80%またはそれ以上、さらにより好ましくは95%またはそれ以上の相同性を指す。ポリペプチドの相同性は、「WilburおよびLipman、Proc Natl Acad Sci USA 80: 726-30 (1983)」中のアルゴリズムに従って決定することができる。20

【0039】

本発明の方法において使用されるMLXポリペプチドは、その產生のために用いる細胞もしくは宿主または用いる精製方法に応じて、アミノ酸配列、分子量、等電点、糖鎖の有無、または形態に関して差異があつてもよい。しかし、それがヒトMLXタンパク質のポリペプチドと同等の生物活性を有する限り、本発明の方法において使用することができ、かつ、MLXタンパク質と同等の生物活性を有するポリペプチドを利用するこのような方法は、本発明の範囲に含まれる。

【0040】

本発明で使用されるMLXポリペプチドは、当業者に周知の方法により、組換えタンパク質として調製することもでき、または天然タンパク質として調製することもできる。MLXポリペプチドをコードするDNAを適切な発現ベクターに挿入し、そのベクターを適切な宿主細胞に導入して抽出物入手し、ポリペプチドを精製することにより、組換えタンパク質を調製することができる。30

【0041】

特に、MLXポリペプチドを調製するための宿主として大腸菌を使用する場合には、ベクターは、大腸菌内で増幅させるための「ori」、および、形質転換された大腸菌を選択するためのマーカー遺伝子（例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコールなどの薬剤によって選択される薬剤抵抗性遺伝子）を有する必要がある。さらに、大腸菌での発現対象となる発現ベクターは、大腸菌内で所望の遺伝子を効率的に発現しうるプロモーター、例えば、lacZプロモーター(Wardら、Nature 341: 544-6 (1989); FASEB J 6: 2422-7 (1992))、araBプロモーター(Betterら、Science 240: 1041-3 (1988))、またはT7プロモーターなどを有する必要がある。その点に関しては、例えば、pGEX-5X-1(Pharmacia)、「QIAexpressシステム」(Qiagen)、pEGFPおよびpET(この場合、宿主はT7RNAポリメラーゼを発現するBL21であることが好ましい)を上記のベクターの代わりに用いてもよい。さらに、ベクターは、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列をも含みうる。大腸菌の周辺質(periplasm)へのポリペプチド分泌を指令するシグナル配列の一例は、peI8シグナル配列(Leiら、J Bacteriol 169: 4379 (1987))である。ベクターを標的宿主細胞に導入するための手段には、例えば、塩化カルシウム法および電気穿孔法が含まれる。40

【0042】

10

20

30

40

50

大腸菌以外に、例えば、哺乳動物由来の発現ベクター（例えば、pcDNA3 (Invitrogen) およびpEGF-BOS (Nucleic Acids Res 18(17): 5322 (1990)) 、 pEF、pCDM8）、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば、「Bac-to-BACバキュロウイルス発現系」 (GIBCO BRL) 、 p BacPAK8）、植物由来の発現ベクター（例えば、pMH1、pMH2）、動物ウイルス由来の発現ベクター（例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw）、レトロウイルス由来の発現ベクター（例えば、pZIPneo）、酵母由来の発現ベクター（例えば、「Pichia発現キット」 (Invitrogen) 、 pNV11、SP-Q01）、および枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 由来の発現ベクター（例えば、pPL608、pKTH50）を、MLXポリペプチドの産生のために用いることもできる。

【 0 0 4 3 】

ベクターをCHO細胞、COS細胞またはNIH3T3細胞などの動物細胞内で発現させるためには、ベクターは、この種の細胞における発現のために必要なプロモーター、例えば、SV40初期プロモーター (Rigby in Williamson編、Genetic Engineering、第3巻、Academic Press、London、83-141 (1982)) 、MMLV-LTRプロモーター、EF1 プロモーター (Mizushimaら、Nucleic Acids Res 18: 5322 (1990); Kimら、Gene 91: 217-23 (1990)) 、CAGプロモーター (Niwaら、Gene 108: 193-200 (1991)) 、RSV LTRプロモーター (Cullen, Methods in Enzymology 152: 684-704 (1987)) 、SR プロモーター (Takebeら、Mol Cell Biol 8: 466 (1988)) 、CMV前初期プロモーター (SeedおよびAruffo、Proc Natl Acad Sci USA 84: 3365-9 (1987)) 、SV40後期プロモーター (GheysenおよびFiers、J Mol Appl Genet 1: 385-94 (1982)) 、アデノウイルス後期プロモーター (Kaufmanら、Mol Cell Biol 9: 946 (1989)) 、HSV TKプロモーターなどを有する必要があるほか、形質転換体を選択するためのマークー遺伝子（例えば、薬剤（例えば、ネオマイシン、G418）によって選択される薬剤抵抗性遺伝子）を有することが好ましい。これらの特徴を備えた既知のベクターの例には、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、およびpOP13が含まれる。外来遺伝子を発現させるための動物細胞への遺伝子導入は、例えばエレクトロポレーション法 (Chuら、Nucleic Acids Res 15: 1311-26 (1987)) 、リン酸カルシウム法 (ChenおよびOkayama、Mol Cell Biol 7: 2745-52 (1987)) 、DEAEデキストラン法 (Lopataら、Nucleic Acids Res 12: 5707-17 (1984); SussmanおよびMilman、Mol Cell Biol 4: 1642-3 (1985)) 、リポフェクチン法 (Derijard, B Cell 7: 1025-37 (1994); Lambら、Nature Genetics 5: 22-30 (1993); Rabindranら、Science 259: 230-4 (1993)) 等の任意の方法によって行うことができる。

【 0 0 4 4 】

さらに、本方法を、遺伝子を安定的に発現させるため、およびそれと同時に、細胞内の遺伝子のコピー数を増幅するために用いることができる。例えば、相補的DHFR遺伝子を含むベクター（例えば、pCHO I）を、核酸合成経路が欠失したCHO細胞に導入した後に、メトトレキサート (MTX) によって増幅することができる。さらに、遺伝子の一過性発現の場合には、SV40の複製起点を含むベクター（pcDなど）を、SV40T抗原を発現する遺伝子を染色体上に含むCOS細胞に形質転換導入する方法を用いることができる。

【 0 0 4 5 】

以上のようにして得られたMLXポリペプチドは、宿主細胞の内部または外部（培地など）から単離して、実質的に純粋な均一なポリペプチドとして精製することができる。所定のポリペプチドに言及して本明細書で用いられる「実質的に純粋な」とは、そのポリペプチドが他の生体高分子から実質的に遊離していることを意味する。実質的に純粋なポリペプチドは、乾燥重量にして純度が少なくとも75%（例えば、少なくとも80%、85%、95%または99%）である。純度は任意の適切な標準的方法により、例えばカラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはHPLC分析によって測定しうる。ポリペプチドの単離および精製のための方法は何らかの特定の方法には限定されない；実際には任意の標準的な方法を用いることができる。

【 0 0 4 6 】

例えば、カラムクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動、透析、お

10

20

30

40

50

より再結晶化を適切に選択し、組み合わせて、ポリペプチドの単離および精製を行ってもよい。

【0047】

クロマトグラフィーの例には、例えば、アフィニティーコロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィーなどが含まれる(「Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual」、Daniel R. Marshakら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。これらのクロマトグラフィーを、HPLCおよびFPLCなどの液体クロマトグラフィーによって行ってもよい。したがって、本発明は、以上 10 の方法によって調製された高純度のポリペプチドを提供する。

【0048】

同様に、MLXポリペプチドが宿主細胞(例えば、動物細胞および大腸菌)において、グルタチオン-S-トランスフェラーゼタンパク質との融合タンパク質として、または多数のヒスチジンを有する組み換え型タンパク質として発現される場合、発現された組み換え型タンパク質は、グルタチオンカラムまたはニッケルカラムを用いて精製されうる。または、MLXポリペプチドをc-myc、多数のヒスチジンまたはFLAGによってタグ付けされたタンパク質として発現する場合、これは、c-myc、HisまたはFLAGに対する抗体をそれぞれ用いて検出および精製することができる。

【0049】

融合タンパク質を精製した後、必要に応じてトロンビンまたは第Xa因子によって切断することによって、目的とするポリペプチド以外の領域を除外することも同様に可能である。
20

【0050】

当業者に既知の方法によって、例えば下記のMLXタンパク質に結合する抗体を結合させたアフィニティカラムを、MLXポリペプチドを発現する組織または細胞の抽出物に接触させることによって、天然のタンパク質を単離することができる。抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。

【0051】

被験化合物に接触させるMLXポリペプチドは、例えば、精製ポリペプチド、可溶性タンパク質、担体との結合型、または他のポリペプチドに融合した融合タンパク質でありうる。タンパク質を結合するために用いられる支持体の例には、アガロース、セルロース、およびデキストランのような不溶性多糖類、ならびにポリアクリルアミド、ポリスチレンおよびシリコンのような合成樹脂が含まれ、好ましくは上記の材料から調製した市販のビーズおよびプレート(例えば、多ウェルプレート、バイオセンサーチップ等)が用いられる。ビーズを用いる場合、それらをカラムに充填してもよい。
30

【0052】

化学結合および物理的吸着のような一般的な方法に従って、タンパク質を支持体に結合させてもよい。または、タンパク質を特異的に認識する抗体を介して、タンパク質を支持体に結合させてもよい。さらに、アビシンおよびビオチン結合によって、タンパク質を支持体に結合させることもできる。
40

【0053】

例えば、上記のMLXポリペプチドのいずれかを用いてMLXポリペプチドに結合するタンパク質をスクリーニングする方法として、当業者に周知の多くの方法を用いることができる。そのようなスクリーニングは、例えば免疫沈降法を、特に以下の様式で行うことができる。

【0054】

免疫沈降において、免疫複合体は、適当な界面活性剤(detergent)を用いて調製した細胞溶解物に抗体を加えることによって形成される。スクリーニングのための免疫沈降に用いられる抗体は、MLXタンパク質1~153のいずれかを認識する。または、認識部位(エピトープ)に融合したMLXタンパク質をスクリーニングに用いる場合、エピトープに対す
50

る抗体を免疫沈降のために用いてもよい。免疫複合体は、MLXタンパク質、MLXタンパク質との結合能を含むポリペプチド、および抗体からなる。

【0055】

免疫複合体は、抗体がマウス IgG 抗体であれば、例えばプロテインAセファロースまたはプロテインGセファロースによって沈降させることができる。MLXポリペプチドをGSTなどのエピトープとの融合蛋白質として作製する場合には、これらのエピトープと特異的に結合する基質、例えばグルタチオン-セファロース4Bを用いて、MLXポリペプチドに対する抗体を用いる時と同じ様式で免疫複合体を形成させることができる。

【0056】

免疫沈降は、例えば、文献中に記載された方法に倣ってまたは従って行うことができる (HarlowおよびLane、「Antibodies」、511-52、Cold Spring Harbor Laboratory publications、New York (1988))。 10

【0057】

SDS-PAGEは免疫沈降したタンパク質の分析に一般に用いられており、結合したタンパク質はゲルを適切な濃度で用いてタンパク質の分子量によって分析することができる。MLXポリペプチドと結合したタンパク質をクーマシー染色または銀染色などの一般的な染色法によって検出することは困難であるため、タンパク質に関する検出感度は、放射性同位体である³⁵S-メチオニンまたは³⁵S-システインを含む培養液中で細胞を培養し、細胞内のタンパク質を標識した上でタンパク質を検出することによって改善することができる。タンパク質の分子量がわかっている場合には、標的タンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲルから直接精製して、その配列を決定することができる。 20

【0058】

ポリペプチドを用いる、MLXポリペプチドと結合するタンパク質のスクリーニングのための方法として、例えば、ウエスト-ウエスタンプロット分析 (Skolnikら、Cell 65: 83-90 (1991)) を用いることができる。具体的には、細胞、組織、臓器、またはMLXポリペプチドと結合するタンパク質を発現すると予想される培養細胞から、ファージベクター（例えば、ZAP）を用いてcDNAライブラリを作製し、タンパク質をLB-アガロース上で発現させ、発現したタンパク質をフィルター上に固定し、精製および標識されたMLXポリペプチドを上記のフィルターと反応させ、かつ、標識によって、MLXポリペプチドと結合したタンパク質を発現するpla-queを検出することによって、MLXポリペプチドと結合するタンパク質を得ることができる。MLXポリペプチドは、ビオチンとアビジンとの結合を利用することにより、またはMLXポリペプチドと特異的に結合する抗体、もしくはMLXポリペプチドと融合したペプチドもしくはポリペプチド（例えば、GST）を利用することにより、標識しうる。本発明の方法における標識のために、放射性同位体（例えば³H、¹⁴C、³²P、³³P、³⁵S、¹²⁵I、¹³¹I）、酵素（例えばアルカリリフォスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、-ガラクトシダーゼ、-グルコシダーゼ）、蛍光物質（例えばフルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ローダミン）、およびビオチン/アビジンなどの標識物質を用いる方法を用いてもよい。MLXタンパク質を放射性同位体で標識する場合、液体シンチレーションにより、検出または測定を行うことが出来る。または、酵素基質を加えて、発色などの基質の酵素的变化を吸光光度計を用いて検出することによって、酵素で標識されたMLXタンパク質を検出または測定することができる。さらに、蛍光物質が標識として使用される場合、蛍光光度計を用いて結合タンパク質を検出または測定してもよい。 30 40

【0059】

または、本発明のスクリーニング方法のもう1つの態様において、細胞を利用するツーハイブリッド系を用いることもできる ("MATCHMAKER Two-Hybrid system" "Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit" および "MATCHMAKER one-Hybrid system" (Clontech) ; "HybriZAP Two-Hybrid Vector System" (Stratagene) ; 参考文献「DaltonおよびTreisman、Cell 68: 597-612 (1992)」「FieldsおよびSternglanz、Trends Genet 10: 286-92 (1994)」)。

【0060】

10

20

30

40

50

ツーハイブリッド系では、MLXポリペプチドをSRF結合領域またはGAL4結合領域と融合させて、酵母細胞で発現させる。ライプラリが発現したらVP16またはGAL4転写活性化領域と融合するように、MLXポリペプチドと結合するタンパク質を発現すると予想される細胞からcDNAライプラリを調製する。続いてcDNAライプラリを上記の酵母細胞に導入し、検出された陽性クローンからライプラリに由来するcDNAを単離する（MLXポリペプチドと結合するタンパク質を酵母細胞で発現させる場合には、この2つの結合によってレポーター遺伝子が活性化され、陽性クローンが検出されるようになる）。cDNAによってコードされるタンパク質は、以上のようにして単離したcDNAを大腸菌に導入してタンパク質を発現させることによって調製しうる。

【0061】

10

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

【0062】

MLXポリペプチドと結合する化合物を、アフィニティクロマトグラフィーを用いてスクリーニングすることもできる。例えば、MLXポリペプチドをアフィニティカラムの担体上に固定化し、MLXポリペプチドと結合しうるタンパク質を含む被験化合物をカラムに對して適用してもよい。本明細書における被験化合物は、例えば、細胞抽出物、細胞可溶化物などであってよい。被験化合物のローディング後に、カラムを洗浄し、MLXポリペプチドと結合した化合物を調製することができる。

【0063】

20

被験化合物がタンパク質である場合には、得られたタンパク質のアミノ酸配列を分析して、その配列に基づいてオリゴDNAを合成し、そのオリゴDNAを、タンパク質をコードするDNAを得るためにプローブとして用いて、cDNAライプラリをスクリーニングする。

【0064】

表面プラスモン共鳴現象を利用するバイオセンサーを、結合した化合物の検出または定量のための手段として本発明に用いることもできる。このようなバイオセンサーを用いると、ごく微量のポリペプチドのみを用いて、標識を行わずに、MLXポリペプチドと被験化合物との相互作用を表面プラスモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することができる（例えば、BIAcore、Pharmacia）。このため、BIAcoreなどのバイオセンサーを用いて、MLXポリペプチドと被験化合物との結合を評価することが可能である。

30

【0065】

固定化されたMLXポリペプチドを合成化合物、または天然物バンク、またはランダムなファージペプチドディスプレイライプラリに対して曝露させた場合に結合する分子をスクリーニングする方法、または、MLXタンパク質と結合するタンパク質だけでなく化合物（アンタゴニストを含む）も単離するための、コンビナトリアル化学に基づくハイスループット技法を用いたスクリーニング方法（Wrightonら、Science 273: 458-64 (1996); Verdin、Nature 384: 11-13 (1996)；Hogan、Nature 384: 17-9 (1996)）は当業者に周知である。

【0066】

40

スクリーニングによって単離された化合物は、結腸直腸癌の転移病変の治療用、または結腸直腸癌の転移の予防用に、MLXポリペプチドの活性を阻害する薬物の候補となる。MLXポリペプチドに結合する活性を有する本発明のスクリーニング法によって得られた化合物の構造の一部が、付加、欠失、および／または置換によって変換されている化合物は、本発明のスクリーニング法によって得られた化合物に含まれる。

【0067】

または、MLXポリペプチドの生物活性が本発明のスクリーニングにおいて検出される場合、本スクリーニングによって単離された化合物は、MLXポリペプチドのアンタゴニストの候補物質となる。「アンタゴニスト」という用語は、それに結合することによってMLXポリペプチドの機能を阻害する分子を指す。さらに、本スクリーニングによって単離された化合物は、MLXポリペプチドと分子（DNAおよびタンパク質を含む）とのインビボ相互作

50

用を阻害する化合物の候補物質となる。

【0068】

本発明の方法において検出対象となる生物活性が細胞増殖である場合、検出は、例えば、MLXポリペプチドを発現する細胞の調製、被験化合物の存在下での細胞の培養、および、細胞増殖の速度の決定、細胞周期の測定等、ならびに、コロニー形成活性の測定によって行われうる。

【0069】

上記のスクリーニングによって単離された化合物は、MLXポリペプチドの活性を阻害する薬物の候補物質であり、結腸直腸癌の転移病変の治療および結腸直腸癌の転移の予防のために適用されうる。その上、MLXタンパク質の活性を阻害する化合物の構造の一部が付加、欠失、および／または置換によって変換されている化合物も同様に、本発明のスクリーニング法によって得ることができる化合物に含まれる。

【0070】

さらなる態様において、本発明は、結腸直腸癌の転移病変の治療および結腸直腸癌の転移の予防において標的となる可能性がある候補物質をスクリーニングする方法を提供する。本方法は、候補治療物質が、結腸直腸癌の転移病変に特徴的なMLX1～MLX153の発現プロフィールを、結腸直腸癌の原発性病変を示すパターンに変換させるか否かを決定するための、候補治療物質のスクリーニングに基づく。上記において詳細に考察したように、MLX1～MLX153の発現レベルを制御することによって、結腸直腸癌の転移病変の成長または増殖および結腸直腸癌の転移を制御することができる。したがって、結腸直腸癌の転移病変の治療または結腸直腸癌の転移の予防において標的となる可能性がある候補物質は、指標としてMLXポリペプチドの発現レベルおよび活性を用いるスクリーニングによって同定することができる。本発明の文脈において、そのようなスクリーニングは、例えば以下の段階を含んでもよい：(a)一つまたは複数のマーカー遺伝子を発現する細胞に、被験化合物を接触させる段階；および(b)被験化合物の非存在下で検出される発現レベルと比較してマーカー遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する段階。

【0071】

マーカー遺伝子を少なくとも一つ発現する細胞には、例えば結腸直腸癌から確立された細胞株が含まれ、好ましくは結腸直腸癌の転移病変由来の細胞が含まれる。例えば、細胞は、結腸直腸癌の転移病変に由来する不死化細胞株である。スクリーニングのためのマーカー遺伝子は、MLX1～MLX153をコードする遺伝子の群から選択される。

【0072】

発現レベルは、当業者に周知の方法によって推定することができる。スクリーニング法において、少なくとも一つのMLX遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を、候補物質として選択することができる。対照レベルと比較して発現が低いことは、その物質が、結腸直腸癌関連アップレギュレート遺伝子の転移病変の成長または増殖の阻害剤であって、結腸直腸癌の転移病変の発症を阻害するために有用であることを示す。過剰発現された遺伝子の発現を抑制するために有効な物質は、臨床的恩典をもたらすと考えられ、そのような化合物を、転移、癌細胞成長、または癌細胞増殖を阻害する能力に関してさらに試験することができる。

【0073】

さらに、このスクリーニング法に基づいて、一つまたは複数のマーカー遺伝子を発現する細胞として、被験者由来の被験細胞集団を用いて、被験者すなわち特定の個体にとって適当な、結腸直腸癌の転移病変を治療するまたは結腸直腸癌の転移を予防する治療物質を選択することができる。

【0074】

個体の遺伝的構成の差によって、様々な薬物をそれぞれ代謝する能力に差が起こりうる。被験者中で、抗結腸直腸癌物質として作用するように代謝される物質は、転移状態の特徴から非転移状態の特徴である遺伝子発現パターンへの被験者の細胞における遺伝子発現パターン変化の誘導となって現れる。したがって、本明細書に開示された、差次的に発現

10

20

30

40

50

されたMLX配列によって、被験者において物質が適切な抗結腸直腸癌物質であるか否かを決定するために選択された被験者由来の被験細胞集団において治療的または予防的な抗結腸直腸癌性と推定される物質を試験することができる。

【0075】

特定の被験者にとって適当な抗結腸直腸癌物質を同定するために、被験者由来の被験細胞集団を被験化合物に曝露して、MLX1～MLX153配列の一つまたは複数の発現を決定する。

【0076】

被験細胞集団は、転移関連遺伝子を発現する結腸直腸癌細胞の転移病変を含む。好ましくは、被験細胞は上皮細胞である。例えば、被験細胞集団を被験化合物の存在下でインキュベートして、被験細胞集団における一つまたは複数のMLX1～MLX153配列の遺伝子発現パターンを測定して、一つまたは複数の参照プロフィール、例えば転移を伴う原発性結腸直腸癌の参照発現プロフィールまたは非転移性の結腸直腸癌参照発現プロフィールと比較する。結腸直腸癌の転移病変を含む参考細胞集団と比較して、被験細胞集団において一つまたは複数の配列MLX1～MLX153の発現が減少するならば、物質に治療効果があることが示される。10

【0077】

さらに、結腸直腸癌を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための化合物をスクリーニングする方法のもう一つの態様において、本方法はMLX遺伝子のプロモーター領域を利用する。結腸直腸癌細胞におけるMLX遺伝子の発現を阻害する化合物は、MLXポリペプチドに関連した疾患、例えば結腸直腸癌の治療に適用可能な候補薬物となると予想される。好ましくは、結腸直腸癌の転移病変を治療するためおよび結腸直腸癌の転移を予防するために、そのような化合物が用いられる。20

【0078】

本スクリーニング法には以下の段階が含まれる：(1) レポーター遺伝子の上流にMLX1～MLX153からなる群より選択される遺伝子の転写調節領域を含むベクターを構築する段階；(2) 細胞を段階(1)のベクターによって形質転換する段階；(3) 被験化合物を段階(2)の細胞に接触させる段階；(4) レポーター遺伝子の発現を検出する段階；および(5) 被験化合物の非存在下での発現と比較してレポーター遺伝子の発現を抑制する被験化合物を選択する段階。30

【0079】

MLX遺伝子の転写調節領域は、プローブとしてヒトMLX遺伝子(MLX1～MLX153；表1を参照されたい)の5'領域を用いて、ゲノムライブラリから得ることができる。その発現がスクリーニングにおいて検出できる限り、いずれのレポーター遺伝子をスクリーニングに用いてもよい。レポーター遺伝子の例には、-gal遺伝子、CAT遺伝子、およびルシフェラーゼ遺伝子が含まれる。レポーター遺伝子のタイプに対応したレポーター遺伝子の発現の検出を行うことができる。ベクター導入の対象となる細胞に特に制限はないが、好ましい例には、転移を伴う結腸直腸癌の原発性病変に由来する細胞が含まれる。30

【0080】

スクリーニングによって単離された化合物は、MLXタンパク質の発現を阻害する薬物の候補物質であり、結腸直腸癌の治療または結腸直腸癌の転移の予防に適用することができる。その上、MLXタンパク質の転写活性化を阻害する化合物の構造の一部が付加、欠失、置換、および/または挿入によって変換されている化合物も同様に、本発明のスクリーニング法によって得ることができる化合物に含まれる。40

【0081】

任意の被験化合物、例えば細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産物、海洋生物からの抽出物、植物抽出物、精製または粗タンパク質、ペプチド、非ペプチド化合物、合成低分子化合物、および天然化合物を、本発明のスクリーニング法において用いることができる。本発明の被験化合物はまた、以下を含む、当技術分野において既知の組み合わせライブラリにおける任意の多数のアプローチを用いて得られうる：生物学的ライブラリ；空間的に位置特定可能な平行固相または液相ライブラリ；脱重畳積分を必要とする合成ライブ50

ラリ法；「1ビーズ1化合物」ライプラリ法；およびアフィニティクロマトグラフィー選択を用いる合成ライプラリ法。生物学的ライプラリアプローチはペプチドライプラリに限定されるが、他の四つのアプローチは、ペプチドライプラリ、非ペプチドオリゴマーライプラリ、または化合物の低分子ライプラリに適用可能である (Lam, Anticancer Drug Des 12: 145 (1997))。分子ライプラリ合成法の例は、当技術分野において、例えば以下に記載されている : DeWittら、Proc Natl Acad Sci USA 90: 6909 (1993) ; Erbら、Proc Natl Acad Sci USA 91: 11422 (1994) ; Zuckermannら、J Med Chem 37: 2678 (1994) ; Choら、Science 261: 1303 (1993) ; Carrellら、Angew Chem Int Ed Engl 33: 2059 (1994) ; Carellら、Angew Chem Int Ed Engl 33: 2061 (1994) ; Gallopら、J Med Chem 37: 1233 (1994)。化合物のライプラリは、溶液中(例えば、Houghten、Bio Techniques 13: 412 (1992))、または、ビーズ上(Lam、Nature 354: 82 (1991))、チップ上(Fodor、Nature 364: 555 (1993))、細菌中(米国特許第5,223,409号)、胞子中(米国特許第5,571,698号；同第5,403,484号；および同第5,223,409号)、プラスミド中(Cullら、Proc Natl Acad Sci USA 89: 1865 (1992))、またはファージ中(ScottおよびSmith、Science 249: 386 (1990) ; Devlin、Science 249: 404 (1990) ; Cwirlaら、Proc Natl Acad Sci USA 87: 6378 (1990) ; Felici、J Mol Biol 222: 301 (1991)；米国特許出願第20020103360号)に提供されてもよい。

10

20

30

40

50

【0082】

キット

本発明にはまた、MLX検出試薬が含まれ、例えば、MLX核酸の一部と相補的であるオリゴヌクレオチド配列のような一つまたは複数のMLX核酸に特異的に結合するまたはこれを同定する核酸が含まれる。本試薬は、キットの形で共に包装される。試薬は、例えば核酸(固相マトリクスに結合されるか、またはそれらをマトリクスに結合させる試薬とは別に包装される)、対照試薬(陽性および/または陰性)、および/または検出標識は、別々の容器中に包装される。アッセイを行うための説明書(例えば、文書、テープ、VCR、CD-ROM等)をキットに含めてよい。キットのアッセイ形式は、例えば、ノザンハイブリダイゼーションである。

【0083】

例えば、MLX検出試薬は、少なくとも一つのMLX検出部位を形成するために、多孔性小片のような固相マトリクスに固定される。多孔性小片の測定または検出領域には、核酸を含む多数の部位が含まれてもよい。被験小片はまた、陰性および/または陽性の対照部位を含んでもよい。または、対照部位は被験小片とは異なる小片上に存在してもよい。任意で、異なる検出部位は、異なる量の、すなわち、第一の検出部位ではより多い量、かつ次の部位ではより少ない量の固定された核酸を含んでもよい。被験試料を加えると、検出可能なシグナルを示す部位の数により、試料中に存在するMLXの量の定量的指標が提供される。検出部位は、任意の適切な検出可能な形状で形成してもよく、典型的には、被験小片の幅まで及ぶバーまたはドットの形状である。

【0084】

または、本キットは、核酸配列の一つまたは複数を含む核酸基質アレイを含む。アレイ上の核酸は、MLX1～MLX153によって表される一つまたは複数の核酸を特異的に同定する。MLX1～MLX153によって表される配列の2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、15個、20個、25個、40個、もしくは50個またはそれ以上の発現は、アレイ被験小片またはチップに結合するレベルによって同定される。基質アレイは、例えば、固相基質上、例えば米国特許第5,744,305号に記載の「チップ」上に存在しうる。

【0085】

アレイおよび複数性

本発明にはまた、一つまたは複数の核酸配列を含む核酸基質アレイが含まれる。アレイ上の核酸は、MLX1～MLX153によって表される一つまたは複数の核酸配列に特異的に対応する。MLX1～MLX153によって表される配列の2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、15個、20個、25個、40個、もしくは50個またはそれ以上の発現レベルは、アレイに対

する核酸の結合を検出することによって同定される。

【0086】

本発明にはまた、単離された複数の核酸配列（すなわち、二つまたはそれ以上の核酸の混合物）が含まれる。本核酸配列は液相中または固相中にあってもよく、例えばニトロセルロース膜のような固相支持体に固定される。複数性には、MLX1～MLX153によって表される一つまたは複数の核酸配列が含まれる。様々な態様において、複数性には、MLX1～MLX153によって表される2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、15個、20個、25個、40個、もしくは50個またはそれ以上の配列が含まれる。

【0087】

チップ

10

DNAチップは、同時に多数の遺伝子の発現レベルを比較するのに便利な装置である。DNAチップに基づく発現プロファイリングは、例えば「Microarray Biochip Technology」（Mark Schena、イートンパブリッシング、2000）等に開示される方法によって行うことができる。

【0088】

DNAチップには、多数の遺伝子を検出するための固定化された高密度プローブが含まれる。したがって、多くの遺伝子の発現レベルを、1ラウンドの分析によって同時に推定することができる。すなわち、標本の発現プロフィールはDNAチップによって決定されうる。本発明のDNAチップに基づく方法は、以下の段階を含む：

- (1) マーカー遺伝子に対応するaRNAまたはcDNAを合成する段階；
- (2) aRNAまたはcDNAをマーカー遺伝子に関するプローブとハイブリダイズさせる段階；および
- (3) プローブとハイブリダイズしたaRNAまたはcDNAを検出して、そのmRNA量を定量する段階。

20

【0089】

aRNAとは、RNAポリメラーゼによって鑄型cDNAから転写されたRNAを指す。DNAチップに基づく発現プロファイリング用のaRNA転写キットが市販されている。そのようなキットによって、T7 RNAポリメラーゼを用いて鑄型としてのT7プロモーター結合cDNAからaRNAを合成することができる。一方、ランダムプライマーを用いたPCRによって、mRNAから合成したcDNAを鑄型として用いてcDNAを増幅することができる。

30

【0090】

一方、DNAチップは、本発明のマーカー遺伝子を検出するための、その上部にスポットされたプローブを含む。DNAチップ上にスポットされるマーカー遺伝子の数に制限はない。例えば、本発明のマーカー遺伝子の5%またはそれ以上、好ましくは20%またはそれ以上、より好ましくは50%またはそれ以上、なおより好ましくは70%またはそれ以上を選択することができる。マーカー遺伝子に加えて、他の遺伝子をDNA分子チップ上にスポットすることもできる。例えば、その発現レベルがほとんど変化しない遺伝子のプローブを、DNAチップ上にスポットしてもよい。複数のチップ間または異なるアッセイ間でアッセイ結果を比較することを意図している場合、そのような遺伝子を用いてアッセイ結果を標準化することができる。

40

【0091】

プローブは、選択されたそれぞれのマーカー遺伝子に関して設計され、DNAチップ上にスポットされる。そのようなプローブは、例えばヌクレオチド残基5個～50個を含むオリゴヌクレオチドであってもよい。DNAチップ上でそのようなオリゴヌクレオチドを合成する方法は、当業者に既知である。PCRによってまたは化学的に、より長いDNAを合成することができる。PCR等によって合成された長いDNAをスライドガラス上にスポットする方法も同様に、当業者に既知である。上記の方法によって得られるDNAチップを、結腸直腸癌の転移を診断するために用いることができる。

【0092】

調製されたDNAチップをaRNAに接触させた後、プローブとaRNAとのハイブリダイゼーシ

50

ヨンを検出する。aRNAは、蛍光色素によって予め標識することができる。Cy3(赤色)およびCy5(緑色)のような蛍光色素を用いてaRNAを標識することができる。被験者および対照由来のaRNAを、異なる蛍光色素によってそれぞれ標識する。両者の発現レベルの差を、シグナル強度の差に基づいて推定することができる。DNAチップ上の蛍光色素のシグナルをスキャナによって検出し、特殊なプログラムを用いて分析することができる。例えば、AffymetrixのSuiteは、DNAチップ分析のためのソフトウェアパッケージである。

【0093】

結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための方法

本発明は、被験者において、結腸直腸癌の転移の症状を軽減するため、転移の発生、すなわち結腸直腸癌の転移病変の腫瘍の成長もしくは増殖を阻害するため、または結腸直腸癌の転移を阻害するための方法を提供する。治療化合物は、結腸直腸癌の転移病変を有するまたは発生のリスクを有する(または感受性を有する)被験者に対して、予防的または治療的に投与される。そのような被験者は、標準的な臨床法を用いて、または転移関連遺伝子、例えばMLX1~MLX153の異常なレベルの発現もしくは活性を検出することによって同定される。予防的投与は、疾患もしくは障害が予防される、または代替的にはその進行が遅延するように、疾患の明白な臨床症状が現れる前に行われる。

【0094】

本方法には、発現が異常に増加した遺伝子(「過剰発現された遺伝子」)の一つまたは複数の遺伝子産物の、発現、機能、または双方を減少させることが含まれる。発現は、当技術分野で既知のいくつかの方法のいずれによても阻害される。例えば、本発明のスクリーニング法によってスクリーニングされた化合物を被験者に投与することによって、発現が阻害される。

【0095】

または、過剰発現された一つまたは複数の遺伝子の発現を阻害または拮抗する核酸、例えば過剰発現された一つまたは複数の遺伝子の発現を分解するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは低分子干渉RNA(siRNA)を被験者に投与することによって、発現が阻害される。

【0096】

そのような核酸には、ヒトMLXをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖と特異的にハイブリダイズし、かつ少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドが含まれる。本明細書において用いられる「特異的にハイブリダイズする」という句は、通常のハイブリダイゼーション条件で、好ましくはストリンジエントなハイブリダイゼーション条件で、他のタンパク質をコードするDNA分子との有意な交差ハイブリダイゼーションが起こらないことを意味する。

【0097】

過剰発現された遺伝子の一つまたは複数の遺伝子産物を阻害する好ましい核酸には、MLXタンパク質をコードするヌクレオチド配列内の任意の部位とハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくはMLXタンパク質をコードするヌクレオチド配列のうち連続した少なくとも15ヌクレオチドに対するものである。上記の連続した少なくとも15ヌクレオチドにおいて開始コドンを含む、上記のアンチセンスオリゴヌクレオチドが、さらにより好ましい。

【0098】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの誘導体または改変産物を、アンチセンスオリゴヌクレオチドとして用いることができる。そのような改変産物の例には、メチル-ホスホネート型またはエチル-ホスホネート型のような低級アルキルホスホネート改変産物、ホスホロチオエート改変産物、およびホスホロアミデート改変産物が含まれる。

【0099】

本明細書において用いられる「アンチセンスオリゴヌクレオチド」という用語は、DNAまたはmRNAの特定の領域を構成するものに対応するヌクレオチドが完全に相補的であるオリゴヌクレオチドのみならず、DNAまたはmRNAおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドがM

10

20

30

40

50

MLXタンパク質をコードするヌクレオチド配列と特異的にハイブリダイズできる限り、一つまたは複数のヌクレオチドのミスマッチを有するものも意味する。

【0100】

少なくとも70%またはそれ以上、好ましくは80%またはそれ以上、より好ましくは90%またはそれ以上、さらにより好ましくは95%またはそれ以上の相同性を有する場合、ポリヌクレオチドは、「連続した少なくとも15ヌクレオチド配列領域」に含まれる。本明細書において述べたアルゴリズムを用いて、相同性を決定することができる。

【0101】

アンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、MLXポリペプチドをコードするDNAまたはmRNAに結合して、その転写または翻訳を阻害し、mRNAの分解を促進して、MLXポリペプチドの発現を阻害し、それによってMLXポリペプチドの機能を阻害することによって、MLXポリペプチドを産生する細胞に作用する。10

【0102】

過剰発現された遺伝子の一つまたは複数の遺伝子産物を阻害する核酸にはまた、MLXタンパク質をコードするヌクレオチド配列のセンス鎖の核酸とアンチセンス鎖核酸の組み合わせを含む、低分子干渉RNA(siRNA)も含まれる。

【0103】

「siRNA」という用語は、標的mRNAの翻訳を妨害する二本鎖RNA分子を指す。siRNAを細胞に導入するために、RNAを転写するための錆型としてDNAが用いられる技術を含む、標準的な技術が用いられる。siRNAは、ヒトMLXタンパク質をコードするポリヌクレオチドのセンス核酸配列とアンチセンス核酸配列とを含む。一つの転写物(二本鎖RNA)が、標的遺伝子からのセンス配列と相補的アンチセンス配列の双方を有する(例えばヘアピン)ように、siRNAが構築される。20

【0104】

本方法は、MLX遺伝子の発現がアップレギュレートされている細胞の遺伝子発現を抑制するために用いられる。標的細胞においてMLX遺伝子転写物にsiRNAが結合すると、細胞によるMLXタンパク質産生の減少が起こる。オリゴヌクレオチドの長さは、少なくとも10ヌクレオチドであり、天然に存在する転写物と同じ長さであってもよい。好ましくは、オリゴヌクレオチドの長さは19ヌクレオチド～25ヌクレオチドである。最も好ましくは、オリゴヌクレオチドの長さは75ヌクレオチド未満、50ヌクレオチド未満、または25ヌクレオチド未満である。30

【0105】

アンビオン社(Ambion)のウェブサイト(http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)から入手可能なsiRNAデザインコンピュータープログラムを用いてsiRNAのヌクレオチド配列を設計してもよい。siRNAのヌクレオチド配列は、以下のプロトコルに基づくコンピュータープログラムによって選択される。

【0106】

siRNA標的部位の選択：

1. 転写物のAUG開始コドンから開始して、AAジヌクレオチド配列に関して下流にスキヤンする。各AAおよび3'に隣接する19ヌクレオチドの発生を、可能性があるsiRNA標的部位として記録する。Tuschlらは、5'および3'非翻訳領域(UTRs)ならびに開始コドン近傍の領域(75塩基以内)は、調節タンパク質結合部位に富む可能性があり、このため、これらの領域に対して設計されたsiRNAとエンドヌクレアーゼとの複合体が、UTR結合タンパク質および/または翻訳開始複合体の結合を妨害する可能性があることから、これらに対するsiRNAを設計しないように推奨している。40

2. ヒトゲノムデータベースに対して可能性がある標的部位を比較して、他のコード配列と有意な相同性を有する全ての標的配列を、検討から除外する。相同性検索はBLASTを用いて行うことができ、これは、NCBIのサーバー(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)上で認められうる。

3. 合成に適した標的配列を選択する。アンビオン社のウェブサイト上で、評価用の遺

10

20

30

40

50

伝子の長さに沿って、いくつかの好ましい標的配列を選択することができる。

【0107】

または、過剰発現された遺伝子の一つまたは複数の遺伝子産物の機能は、遺伝子産物に結合する、またはさもなくばその機能を阻害する化合物を投与することによって阻害される。例えば、本化合物は、過剰発現された一つまたは複数の遺伝子産物に結合する抗体である。

【0108】

MLXポリペプチドと結合する抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体などの任意の形態であってよく、これにはウサギなどの動物をMLXポリペプチドで免疫することによって得られる抗血清、すべてのクラスのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、ヒト抗体、ならびに遺伝子組換えによって作製されたヒト化抗体が含まれる。

【0109】

抗体を得るために抗原として用いられるMLXポリペプチドは、任意の動物種に由来するものでよいが、好ましくはヒト、マウス、またはラットなどの哺乳動物、より好ましくはヒトに由来する。ヒト由来のポリペプチドは、本明細書に開示するヌクレオチドまたはアミノ酸配列から入手しうる(表1を参照されたい)。

【0110】

本発明によれば、免疫化抗原として用いるポリペプチドは、完全タンパク質でもよく、またはタンパク質の部分ペプチドでもよい。部分ペプチドは、例えば、MLXポリペプチドのアミノ(N)末端またはカルボキシ(C)末端断片を含みうる。本明細書において、抗体とは、MLXポリペプチドの完全長または断片のいずれかと反応するタンパク質として定義される。

【0111】

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

【0112】

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

【0113】

動物を抗原で免疫するための方法は当技術分野で周知である。抗原の腹腔内注射または皮下注射は、哺乳動物の免疫化のための標準的な方法である。より具体的に述べると、抗原を希釀して適切な量のリン酸緩衝食塩水(PBS)、生理食塩水などの中に懸濁させる。必要に応じて、抗原懸濁液を、フロイント完全アジュバントなどの適切な量の標準的アジュバントと混合して乳濁液とした上で哺乳動物に対して投与してもよい。その後に、適切な量のフロイント不完全アジュバントと混合した抗原の投与を4~21日毎に数回行うことが好ましい。適切な担体を免疫化のために用いてもよい。上記のような免疫化の後に、血清を、所望の抗体の量の増加に関して標準的方法によって検討する。

【0114】

MLXポリペプチドに対するポリクローナル抗体を、血清中の所望の抗体の増加に関して検討した免疫後の哺乳動物から血液を採取し、従来の任意の方法によって血液から血清を分離することによって調製することもできる。ポリクローナル抗体にはポリクローナル抗体を含む血清が含まれ、ポリクローナル抗体を含む画分を血清から単離することもできる

10

20

30

40

50

。免疫グロブリンGまたはMは、MLXポリペプチドのみを認識する画分から、例えば、MLXポリペプチドを結合させたアフィニティーカラムを用いた上で、この画分をプロテインAカラムまたはプロテインGカラムを用いてさらに精製して、調製することができる。

【0115】

モノクローナル抗体を調製するためには、抗原で免疫した哺乳動物から免疫細胞を収集し、上記の通りに血清中の所望の抗体のレベル上昇について確かめた上で、細胞融合に供する。細胞融合に用いる免疫細胞は脾臓から入手することが好ましい。上記の免疫細胞と融合させるためのその他の好ましい親細胞には、例えば、哺乳動物の骨髄腫細胞、より好ましくは、薬剤による融合細胞の選択のための獲得特性を有する骨髄腫細胞が含まれる。

【0116】

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

【0117】

細胞融合によって得られたハイブリドーマは、それらをHAT培地（ヒポキサンチン、アミノブテリン、およびチミジンを含む培地）などの標準的な選択培地中で培養することによって選択しうる。細胞培養は通常、HAT培地中で、所望のハイブリドーマを除く他のすべての細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な期間である、数日間から数週間にわたって続けられる。その後に、所望の抗体を產生するハイブリドーマ細胞のスクリーニングおよびクローニングのために標準的な限界希釈を行う。

【0118】

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

【0119】

得られたハイブリドーマを続いてマウスの腹腔内に移植し、腹水を抽出する。得られたモノクローナル抗体は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、プロテインAもしくはプロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、またはMLXポリペプチドを結合させたアフィニティーカラムによって精製しうる。抗体は、MLXポリペプチドのアンタゴニストの候補としてはたらき、かつ、この抗体を、MLXポリペプチドと関連のある疾患に対する抗体療法に適用することもできる。得られた抗体を人体に対して投与する場合には（抗体療法）、免疫原性を抑えるためにヒト抗体またはヒト化抗体が好ましい。

【0120】

例えば、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物は、ポリペプチド、ポリペプチド発現細胞、またはそれらの可溶化物から選択される抗原で免疫することができる。続いて、抗体產生細胞を動物から採取し、骨髄腫細胞と融合させてハイブリドーマを得、そのハイブリドーマからポリペプチドに対するヒト抗体を調製することができる（国際公開公報第92-03918号、国際公開公報第93-2227号、国際公開公報第94-02602号、国際公開公報第94-25585号、国際公開公報第96-33735号、および国際公開公報第96-34096号を参照のこと）。

【0121】

または、免疫したリンパ球のような、抗体を產生する免疫細胞を、癌遺伝子によって不死化させ、モノクローナル抗体の調製に用いることもできる。

【0122】

このようにして得られるモノクローナル抗体は、遺伝子操作技術を用いて組換えにより調製してもよい（例えば、BorrebaeckおよびLarrick、「Therapeutic Monoclonal Antibodies」、MacMillan Publishers LTD（英国）より刊行（1990）、を参照）。例えば、抗体を

10

20

30

40

50

コードするDNAを、抗体を產生するハイブリドーマまたは免疫リンパ球などの免疫細胞からクローニングして適切なベクターに挿入した上で、宿主細胞に導入し、組換え抗体を調製することができる。

【0123】

さらに、結腸直腸癌の転移病変を治療するためのまたは結腸直腸癌転移を予防するための本発明の方法に使用される抗体は、MLXポリペプチドの1つまたは複数と結合する限り、抗体の断片または修飾抗体であってもよい。例えば、抗体断片は、Fab、F(ab')₂、Fv、またはH鎖およびL鎖由来のFv断片を適切なリンカーによって連結した一本鎖Fv(scFv)であってもよい(Hustonら、Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83 (1988))。より具体的に述べると、パパインまたはペプシンなどの酵素で抗体を処理することによって抗体断片を作製することもできる。または、抗体断片をコードする遺伝子を構築して発現ベクターに挿入した上で、適切な宿主細胞において発現させてもよい(例えば、Coら、J Immunol 152: 2968-76 (1994); BetterおよびHorwitz、Methods Enzymol 178: 476-96 (1989); PluckthunおよびSkerra、Methods Enzymol 178: 497-515 (1989); Lamoyi、Methods Enzymol 121: 652-63 (1986); Rousseauxら、Methods Enzymol 121: 663-9 (1986); BirdおよびWalker、Trends Biotechnol 9: 132-7 (1991)を参照されたい)。

【0124】

抗体を、ポリエチレンジリコール(PEG)などの種々の分子と結合させることによって修飾することもできる。修飾抗体は抗体を化学的に修飾することによって得ることができる。これらの修飾方法は当技術分野で慣例的である。

【0125】

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

【0126】

以上のようにして得られた抗体を均一になるまで精製してもよい。例えば、抗体を、一般的なタンパク質に対して用いられる分離法および精製法に従って分離および精製することができる。例えば、アフィニティーコロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動など(しかし、これらには限定されない)を適切に選択・組み合わせることにより、抗体を分離および単離することができる(「A Laboratory Manual」、HarlowおよびDavid Lane編、Cold Spring Harbor Laboratory (1988))。プロテインAカラムおよびプロテインGカラムはアフィニティーカラムとして用いられる。用いられるプロテインAカラムの例には、例えば、ハイパーD、POROSおよびセファロースF.F.(Pharmacia)が含まれる。

【0127】

クロマトグラフィーの例には、アフィニティーコロマトグラフィーを除いて、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィーなどが含まれる(「Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual」、Daniel R. Marshakら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。クロマトグラフィーの手順を、HPLCおよびFPLCなどの液相クロマトグラフィーによって行うこともできる。

【0128】

例えば、吸光度測定、酵素結合免疫吸着アッセイ法(ELISA)、酵素免疫アッセイ法(EIA)、放射免疫アッセイ法(RIA)および/または免疫蛍光検査法を用いて、MLXタンパク質に対する抗体の抗原結合活性を測定することができる。ELISAにおいては、抗体をプレート上に固定化し、MLXポリペプチドをプレートに添加した後に、抗体産生細胞の培養上清または精製抗体といった所望の抗体を含む試料を添加する。続いて、一次抗体を認識し、アルカリホスファターゼなどの酵素で標識された二次抗体を添加し、プレートをインキ

10

20

20

30

40

40

50

ュベートする。次に、洗浄の後に、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質をプレートに添加して、試料の抗原結合活性を評価するために吸光度を測定する。C末端断片またはN末端断片といったポリペプチドの断片を、抗体の結合活性を評価するための抗原として用いてもよい。BIAcore (Pharmacia) を、MLXタンパク質に対する抗体の活性の評価に用いてもよい。

【0129】

本発明は、MLXポリペプチドに対する抗体を用いて、結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための方法を提供する。本方法によると、MLXポリペプチドに対する抗体の薬学的有効量が投与される。MLXタンパク質の発現は結腸直腸癌の転移病変においてアップレギュレートされており、かつこれらのタンパク質の発現の抑制により、転移病変の成長または増殖が抑制されると予想されるので、抗体とこれらのタンパク質とを結合させることによって、結腸直腸癌の転移病変を治療することができる予想され、または結腸直腸癌の転移を抑制もしくは予防することができると予想される。したがって、MLXポリペプチドに対する抗体は、MLXタンパク質の活性を減少させるために十分な用量で投与される。または、腫瘍細胞に対して特異的な細胞表面マーカーに結合する抗体を、薬物送達のためのツールとして用いることができる。したがって、例えば、細胞障害物質に結合させたMLXポリペプチドに対する抗体を、腫瘍細胞を障害するために十分な用量で投与してもよい。

【0130】

さらに、本発明は、MLXポリペプチド、そのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはそのポリヌクレオチドを含むベクターを投与することによって、結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための方法を提供する。MLXタンパク質およびその免疫学的活性断片は、結腸直腸癌の転移病変または結腸直腸癌の転移に対するワクチンとして有用である。したがって、本発明はまた、MLXタンパク質もしくはその免疫学的活性断片、そのタンパク質もしくはその断片をコードするポリヌクレオチド、またはそのポリヌクレオチドを含むベクターを投与する段階を含む、抗腫瘍免疫を誘導する方法にも関する。いくつかの場合において、タンパク質またはその断片は、T細胞受容体 (TCR) に結合した形で、または、マクロファージ、樹状細胞 (DC) もしくはB細胞のような抗原提示細胞 (APC) によって提示された形で投与されうる。DCは強い抗原提示能を有するので、APCの中でDCを用いることが最も好ましい。

【0131】

本発明において、結腸直腸癌の転移病変または結腸直腸癌の転移に対するワクチンとは、動物に接種された場合に抗腫瘍免疫または転移もしくは転移病変の成長や増殖を抑制する免疫を誘導する機能を有する基質を指す。一般に、抗腫瘍免疫には以下のような免疫応答が含まれる：

腫瘍に対する細胞障害性リンパ球の誘導

腫瘍を認識する抗体の誘導、および

抗腫瘍サイトカイン産生の誘導。

【0132】

このため、ある特定のタンパク質が、動物に接種した時にこれらの免疫応答を誘導する場合には、そのタンパク質は抗腫瘍免疫誘導作用を有すると判定される。タンパク質による抗腫瘍免疫の誘導は、宿主におけるタンパク質に対する免疫系の応答をインビボまたはインビトロで観察することによって検出しうる。

【0133】

例えば、細胞障害性Tリンパ球の誘導を検出するための方法はよく知られている。生体の内部に進入する外来物質は、抗原提示細胞 (APC) の作用によってT細胞およびB細胞に対して提示される。APCにより提示された抗原に対して抗原特異的な様式で応答したT細胞は、抗原による刺激のために細胞障害性T細胞（または細胞障害性Tリンパ球；CTL）に分化した後に増殖する（これはT細胞の活性化と呼ばれる）。したがって、特定のペプチドによるCTL誘導は、そのペプチドをAPCによりT細胞に対して提示させ、CTLの誘導を検出す

10

20

30

40

50

ることによって評価することができる。さらに、APCにはCD4+ T細胞、CD8+細胞、マクロファージ、好酸球およびNK細胞を活性化する作用もある。CD4+ T細胞およびCD8+細胞も抗腫瘍免疫において重要であるため、これらの細胞の活性化作用を指標として用いてペプチドの抗腫瘍免疫誘導作用を評価することができる。

【0134】

樹状細胞 (DC) をAPCとして用いてCTLの誘導作用を評価するための方法は当技術分野で周知である。DCはAPCの中でも最も強いCTL誘導作用を有する代表的なAPCである。この方法では、まず被験ポリペプチドをDCと接触させ、続いてこのDCをT細胞と接触させる。DCとの接触後に目的の細胞に対する細胞障害作用を有するT細胞が検出されれば、被験ポリペプチドが細胞障害性T細胞を誘導する活性を持つことが示される。腫瘍に対するCTLの活性は、例えば、⁵¹Cr標識した腫瘍細胞の溶解を指標として用いて検出することができる。または、³H-チミジン取り込み活性またはLDH(ラクトースデヒドロゲナーゼ)放出を指標として用いて腫瘍細胞の損傷の程度を評価する方法もよく知られている。10

【0135】

DC以外に、末梢血単核細胞 (PBMC) をAPCとして用いてもよい。CTLの誘導は、PBMCをGM-CSFおよびIL-4の存在下で培養することによって増強されうることが報告されている。同様に、CTLは、PBMCをキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) およびIL-7の存在下で培養することによっても誘導されることが示されている。20

【0136】

これらの方法によってCTL誘導活性を有することが確認された被験ポリペプチドは、DC活性化作用とそれに続くCTL誘導活性とを有するポリペプチドである。このため、腫瘍細胞に対するCTLを誘導するポリペプチドは腫瘍に対するワクチンとして有用である。さらに、ポリペプチドとの接触によって腫瘍に対するCTLを誘導する能力を獲得したAPCも腫瘍に対するワクチンとして有用である。さらに、APCによるポリペプチド抗原の提示によって細胞障害性を獲得したCTLを腫瘍に対するワクチンとして用いることもできる。APCおよびCTLに起因する抗腫瘍免疫を用いた、腫瘍に対するこのような治療方法は、細胞免疫療法と呼ばれる。20

【0137】

一般に、細胞免疫療法のためにポリペプチドを用いる場合には、構造の異なる複数のポリペプチドを併用し、それらをDCと接触させることによってCTL誘導の効率が高まることが知られている。このため、DCをタンパク質断片で刺激する場合には、多くの種類の断片の混合物を用いることが有利である。30

【0138】

または、ポリペプチドによる抗腫瘍免疫の誘導を、腫瘍に対する抗体産生の誘導を観察することによって確認することもできる。例えば、ポリペプチドに対する抗体が、ポリペプチドで免疫した実験動物において誘導された場合、および腫瘍細胞の成長、増殖、または転移がこのような抗体によって抑制された場合には、そのポリペプチドは抗腫瘍免疫を誘導する能力があると判定することができる。

【0139】

抗腫瘍免疫は本発明のワクチンを投与することによって誘導され、抗腫瘍免疫の誘導により、結腸直腸癌の転移病変の治療および結腸直腸癌転移の予防が可能になる。癌に対する治療法または癌の発症もしくは癌の転移の予防は、癌性細胞（原発性癌細胞および転移病変細胞を含む）の増殖の阻害、癌の退縮、ならびに癌の発症および癌の転移の抑制といった段階のいずれかを含む。癌を有する個体の死亡率の低下、血液中の腫瘍マーカーの減少、癌に付随する検出可能な症状の緩和なども癌の治療または予防に含まれる。このような治療効果および予防効果は統計学的に有意であることが好ましい。例えば、観測値で、細胞増殖性疾患に対するワクチンの治療効果または予防効果をワクチン投与を行わない対照と比較して、5%またはそれ未満は有意水準である。統計分析には、例えば、スチューデントのt検定、マン-ホイットニーのU検定またはANOVAが用いられる。40

【0140】

10

20

30

40

50

免疫学的活性を有する上記のタンパク質、またはタンパク質をコードするポリヌクレオチドもしくはベクターを、アジュバントと併用してもよい。アジュバントとは、免疫学的活性を有するタンパク質と同時に（または連続して）投与した場合に、そのタンパク質に対する免疫応答を増強する化合物を指す。アジュバントの例には、コレラ毒素、サルモネラ毒素、ミヨウバンなどが含まれるが、これらには限定されない。さらに、本発明のワクチンを薬学的に許容される担体と適宜配合してもよい。このような担体の例には、滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液などが含まれる。さらに、ワクチンが必要に応じて、安定剤、懸濁剤、保存料、界面活性剤などを含んでもよい。ワクチンは全身的または局所的に投与される。ワクチン投与は単回投与によって行っててもよく、または多回投与による追加刺激を行ってもよい。

10

【0141】

APCまたはCTLを本発明のワクチンとして用いる場合に、腫瘍を、例えばエクスピボの方法によって治療または予防することができる。より具体的に述べると、治療または予防を受ける対象のPBMCを採取し、細胞をエクスピボでポリペプチドと接触させ、APCまたはCTLの誘導後に、細胞を対象に対して投与することができる。ポリペプチドをコードするベクターをPBMC中にエクスピボで導入することによってAPCを誘導することもできる。インビトロで誘導されたAPCまたはCTLは投与前にクローニングすることができる。標的細胞を障害する活性の高い細胞のクローニングおよび増殖を行うことにより、細胞免疫療法をさらに効率的に行うことができる。さらに、このようにして単離されたAPCおよびCTLは、細胞が由来する個体における細胞免疫療法のみならず、他の個体の同様の種類の腫瘍にも用いられる。

20

【0142】

結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための組成物

結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するために、本発明のスクリーニング法によって単離された化合物を、ヒトおよび、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、ヒヒ、またはチンパンジーなどの他の哺乳類に対する薬剤として投与する場合、単離された化合物を直接投与してもよく、または、既知の薬学的調製法を用いて投与剤形へと処方することもできる。

30

【0143】

薬学的製剤には、経口投与、直腸内投与、鼻腔内投与、局所（口腔内および舌下を含む）投与、腹内投与、もしくは非経口（筋肉内、皮下、および静脈内を含む）投与に適した製剤、または吸入もしくは吹き込みによる投与に適した製剤が含まれる。製剤は、任意で、個々の用量単位に包装される。

40

【0144】

経口投与に適した薬学的製剤には、それぞれ既定量の活性成分を含む、カプセル剤、カシェ剤、または錠剤が含まれる。製剤にはまた、粉剤、顆粒剤、または溶液、懸濁液もしくは乳剤が含まれる。活性成分は任意で、ボーラス舐剤 (bolus electuary) または軟膏として投与される。経口投与のための錠剤およびカプセル剤は、結合剤、增量剤、潤滑剤、崩壊剤、または湿潤剤のような通常の賦形剤を含んでもよい。錠剤は、任意で、一つまたは複数の製剤成分と共に、圧縮または成形によって調製されうる。圧縮錠は、任意で、結合剤、潤滑剤、不活性希釈剤、潤滑剤、界面活性剤、または分散剤と混合された、粉剤または顆粒剤のような自由に流動する形状の活性成分を適切な機械で圧縮することによって調製されうる。成形された錠剤は、不活性液体希釈剤によって湿らせた粉末化合物の混合物を適切な機械で成形することによって調製されうる。錠剤を、当技術分野で周知の方法に従ってコーティングしてもよい。経口液体調製物は、例えば、水性もしくは油性の懸濁液、溶液、乳液、シロップ剤、もしくはエリキシル剤の形であってもよく、または、使用前に水もしくは他の適切な溶媒によって溶解するための乾燥産物として提供されてもよい。そのような液体調製物は、懸濁剤、乳化剤、非水性溶媒（食用油が含まれてもよい）、または保存剤のような通常の添加剤を含んでもよい。任意で、その中の活性成分が遅延型または制御型放出されるように、錠剤を調製してもよい。錠剤の包装は、毎月摂取され

50

る錠剤1個を含んでもよい。

【0145】

非経口投与のための製剤には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および、製剤を意図するレシピエントの血液と等張にする溶質を含んでもよい、水性および非水性の滅菌注射用溶液、ならびに、懸濁剤および濃化剤を含んでもよい、水性および非水性の滅菌懸濁液が含まれる。製剤は、単位用量または多用量容器、例えば密封アンプルおよびバイアルに入れててもよく、使用直前に滅菌液体担体、例えば生理食塩液、注射用水を加えるだけでよい、凍結乾燥状態で保存してもよい。または、製剤は、連続注入の形であってもよい。即時調合注射用溶液および懸濁液を、既に記載した種類の滅菌粉末、顆粒剤および錠剤から調製してもよい。

10

【0146】

直腸投与のための製剤には、カカオバターまたはポリエチレングリコールのような標準的な担体による坐剤が含まれる。口における局所投与、例えば口腔内投与または舌下投与のための製剤には、ショ糖およびアラビアゴムまたはトラガカントのような芳香性基剤に活性成分を含むロゼンジ、ゼラチンおよびグリセリンまたはショ糖およびアラビアゴムのような基剤に活性成分を含む香錠が含まれる。鼻腔内投与の場合、本発明の化合物を、液体スプレーもしくは分散粉末として、または点鼻液の形で用いてもよい。点鼻液は、一つまたは複数の分散剤、溶解剤、または懸濁剤も含む水性または非水性の基剤によって調製してもよい。

20

【0147】

吸入投与の場合、本化合物を、吹き込み器、ネブライザー、加圧パック、またはエアロゾルスプレーを送達するための他の簡単な手段から送達するのが好適である。加圧パックは、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、または他の適切なガスのような適切な噴射剤を含んでもよい。加圧エアロゾルの場合、用量単位は、一定量を送達するための弁を提供することによって決定されうる。

【0148】

または、吸入または吹き込みによる投与の場合、化合物は、乾燥粉末組成物の形状、例えば、乳糖またはデンプンのような適切な粉末基剤と化合物との粉末混合物であってもよい。粉末組成物は、単位投与剤形で、例えばカプセル剤、カートリッジ、ゼラチン、または、吸入器または吹き込み器の助けを借りて粉末がそこから投与される、ブリストパック(blister pack)の形で提供されてもよい。

30

【0149】

他の製剤には、治療物質を放出する埋め込み型装置および粘着小片が含まれる。

【0150】

望ましいならば、活性成分を持続的に放出するように適合させた上記の製剤を用いてもよい。薬学的組成物はまた、抗菌剤、免疫抑制剤、または保存剤のような他の活性成分を含んでもよい。

【0151】

特に上述した成分の他に、本発明の製剤には、当該製剤のタイプに関して当技術分野で一般的である他の物質が含まれてもよく、例えば経口投与に適した製剤には、一般的に容認される薬学的実践にとって必要な単位投与剤形において、芳香剤、界面活性剤、安定化剤、賦形剤、溶媒、保存剤、結合剤等が含まれてもよいことを理解すべきである。

40

【0152】

当業者に周知の方法を用いて、例えば動脈内、静脈内、経皮注射として、同様に鼻腔内、気管支内、筋肉内または経口投与として、本発明の薬学的組成物を患者に投与してもよい。投与量および投与法は、患者の体重および年齢ならびに投与法に従って変化するが、当業者はそれらを一般的に選択することができる。化合物がDNAによってコード可能な場合、DNAを遺伝子治療のためのベクターに挿入して、ベクターを投与して治療を行うことができる。投与量および投与法は、患者の体重、年齢および症状に応じて異なるが、当業

50

者はそれらを適切に選択することができる。

【0153】

例えば、症状に応じていくつか違いはあるが、本発明のポリペプチドに結合してその活性を調節する化合物の用量は、健常な成人（体重60 kg）に経口投与する場合、約0.1 mg ~ 約100 mg/日、好ましくは約1.0 mg ~ 約50 mg/日、およびより好ましくは約1.0 mg ~ 約20 mg/日である。

【0154】

健常な成人（体重60 kg）に注射剤の形で非経口投与する場合、患者、標的臓器、症状および投与法に応じていくつか違いはあるが、約0.01 mg ~ 約30 mg/日、好ましくは約0.1 ~ 約20 mg/日、およびより好ましくは約0.1 ~ 約10 mg/日の用量を静脈内注射することが好適である。同様に、他の動物の場合においても、体重60 kgに換算した量を投与することが可能である。10

【0155】

本発明は、活性成分として一つまたは複数のMLX遺伝子に対してアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体またはsiRNA誘導体を用いて、結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための組成物を提供する。誘導体に対して不活性である適切な基剤と混合することによって、誘導体を、リニメントまたは湿布のような外用調製剤に調製してもよい。

【0156】

同様に、賦形剤、等張剤、溶解剤、安定化剤、保存剤、鎮痛剤等を加えることによって、誘導体を、必要に応じて、錠剤、粉剤、顆粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル、注射剤、溶液、点鼻液、および凍結乾燥剤に調製することができる。これらは、以下の通常の方法によって調製されうる。20

【0157】

疾患部位に直接塗布することによって、または疾患部位に達するように血管内に注射することによって、アンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体またはsiRNA誘導体は患者に投与される。持続性および膜透過性を増加させるために、封入剤（mounting medium）も同様に用いてもよい。例としては、リポソーム、ポリ-L-リジン、脂質、コレステロール、リポフェクチン、またはこれらの誘導体が挙げられる。

【0158】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体またはsiRNA誘導体の用量を、患者の病状に応じて適切に調節し、所望の量で用いることができる。例えば、0.1 mg/kg ~ 100 mg/kg、好ましくは0.1 mg/kg ~ 50 mg/kgの用量範囲を投与することができる。30

【0159】

本発明はさらに、MLXタンパク質またはその断片に対する抗体を被験者に投与することによって、結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための組成物を提供する。

【0160】

さらに、薬学的有効量のMLXポリペプチドを含む、結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための組成物を提供する。MLXタンパク質を含む組成物は、抗腫瘍免疫性を高めるために用いることができる。その上、結腸直腸癌を治療するためおよび結腸直腸癌の転移を予防するために、MLXタンパク質の代わりに、MLXタンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはベクターを被験者に投与してもよい。MLXタンパク質をコードするポリヌクレオチドおよびベクターの形状は、それらが被験者においてMLXタンパク質またはその断片を発現し、被験者において抗腫瘍免疫を誘導する限り、如何なるようにも制限されない。40

【0161】

例えば、症状に応じていくつか違いはあるが、結腸直腸癌の転移病変を治療するためまたは結腸直腸癌の転移を予防するための抗体またはポリペプチドの用量は、健常な成人（体重60 kg）に経口投与する場合、約0.1 mg ~ 約100 mg/日、好ましくは約1.0 mg ~ 約50 mg/日である。50

g/日、およびより好ましくは約1.0 mg～約20 mg/日である。

【0162】

健常な成人（体重60 kg）に対する注射剤の形で非経口投与する場合、患者、標的臓器、症状および投与法に応じていくつか違いはあるが、約0.01 mg～約30 mg/日、好ましくは約0.1～約20 mg/日、およびより好ましくは約0.1～約10 mg/日の用量を静脈内注射することが好適である。同様に、他の動物の場合においても、体重60 kgに換算した量を投与することが可能である。

【0163】

以下の実施例は、本発明を例示するとともに、当業者によるその作成および使用を補助する目的で提示される。実施例はいかなる形でも本発明の範囲を限定することは意図していない。10

【0164】

別に定義する場合を除き、本明細書で用いるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者が一般的に理解しているものと同じ意味を持つ。本発明の実施または検討においては本明細書に記載したものと同様または同等の方法および材料を用いることができるが、好ましい方法および材料は以下に説明するものである。本明細書中に引用するいかなる特許、特許出願および刊行物も参照として本明細書に組み入れられる。

【0165】

発明を実施するための最良の形態

本発明は以下の実施例によって詳細に例示されるが、これらの実施例には限定されない。20

【0166】

1. 材料および方法

(1) 組織試料およびレーザー捕捉型顕微解剖 (LCM)

インフォームドコンセントを得たうえで、同じ手術において結腸切除と肝切除とを受けた患者15人から、原発性CRC組織および対応する肝臓由来の転移病巣を得た。試料は全て、TissueTek OCT培地（Sakura、Tokyo、日本）に抱埋して、-80°で凍結した。後に、凍結切片を70%エタノール中で45秒間固定して、ヘマトキシリソ-エオジンによって染色し、70:30、50:50、および30:70のエタノール：キシレン混合液中で各段階30秒間脱水した後、最後に100%キシレン中で2分間脱水した。空気乾燥させた後、染色した組織をPixel LCMシステム（Arcturus Engineering、Mountain View、CA）を用いて製造元のプロトコルに従って顕微解剖した。原発性病変由来の癌性細胞を選択的に顕微解剖した（各試料から、細胞約 2×10^4 個）。

【0167】

(2) RNA抽出およびT7に基づくRNA増幅

総RNAを各試料のレーザー捕捉型細胞からRLT溶解緩衝液350 μlを用いて抽出した（Qia gen、Hilden、德国）。抽出したRNAを、1UのRNase阻害剤（東洋紡、大阪、日本）存在下で、DNaseI（Roche、Basel、スイス）10単位によって37°で1時間処理して、混入している全てのゲノムDNAを除去した。70°で10分間不活化した後、RNAをRNeasy Miniキット（Qiagen）によって製造元の推奨に従って精製した。全てのDNaseI処置RNAを、既に記載されたT7に基づく増幅に供した（Onoら、Cancer Res. 60: 5007～11 (2000)）。2ラウンドの増幅によって、各試料由来の増幅RNA（aRNA）15 μg～80 μgが得られた。

【0168】

(3) cDNAマイクロアレイの構築と分析

国立バイオテクノロジー情報センター（National Center for Biotechnology Information）のUniGeneデータベースから、いくつかのESTを含む23040個の別々のcDNAを選択した。マイクロアレイスライドガラス上にスポットされたDNAは、遺伝子特異的プライマー組および、鑄型としての市販のポリA RNA（Clontech、Palo Alto、カリフォルニア州）の混合物を用いたRT-PCRによって調製された（Onoら、Cancer Res. 60: 5007～11 (2000)）。産物をアガロースゲル上で電気泳動に適用して、予想される大きさの単一のバンドを40

示す産物をスポットティングのために利用した。遺伝子23040個に由来する、無作為に選択した産物2485個のさらなる配列分析から、そのcDNA配列の完全な一致が示された。

【0169】

実験による変動を減少させるために、2組のcDNAスポットを発現プロフィールの分析に用いた。各原発性腫瘍および正常上皮由来のaRNAのアリコート3 µgをそれぞれ、Cy3-dCTPおよびCy5-dCTP (Amersham Pharmacia Biotech)によって標識して、原発性病変と非癌性粘膜との発現を比較した。等量のCy3標識プローブおよびCy5標識プローブをマイクロアレイスライドガラス上で同時にハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション、洗浄、およびスキャニングは、既に記載されているとおりに行つた (Onoら、Cancer Res. 60: 5007~11 (2000))。

10

【0170】

(4) データ分析

それぞれ二通りのシグナルの強度を、Array Visionコンピュータープログラム (Imaging Research Inc.、St. Catharines、オンタリオ州、カナダ) による光度測定によって評価して、マイクロアレイスライドガラスにスポットしたハウスキーピング遺伝子52個のCy3/Cy5比の平均値が1.0となるように標準化した (Kitaharaら、Cancer Res. 61: 3544~9 (2001)；Onoら、Cancer Res. 60: 5007~11 (2000))。低いシグナル強度に由来するデータは信頼性が低いため、シグナル強度のカットオフ値がそれぞれのスライドガラスについて決定され、遺伝子全てのCy3またはCy5のS/N (シグナル対ノイズ) 比が3より大きくなるようにふるい分けし、Cy3およびCy5の色素がいずれもカットオフ値より低いシグナル強度を生じた場合、その遺伝子をさらなる分析から除外した。各遺伝子のCy3/Cy5比は、二つのスポットを平均することによって計算した (Kitaharaら、Cancer Res. 61: 3544~9 (2001)；Onoら、Cancer Res. 60: 5007~11 (2000))。原発性病変と転移病変との比較に関しては、2を上回るCy3/Cy5比を有する遺伝子が、転移組織中でアップレギュレートされたと考えられた。最後に、強度が有意である場合の半数またはそれ以上において発現がアップレギュレートされた遺伝子を、「頻繁にアップレギュレートされた」遺伝子として選択した。非癌性粘膜と原発性腫瘍との比較に関して、遺伝子をその発現比 (Cy3/Cy5) に従って三つの群に分類した：アップレギュレート (比は2.0に等しいまたはそれ以上)、ダウンレギュレート (比は0.5に等しいまたはそれ未満)、および発現変化なし (比は0.5と2.0のあいだ)。50%を超える被験症例において、2.0を上回るまたは0.5未満のCy3/Cy5比を有する遺伝子は、それぞれ頻繁にアップレギュレートまたはダウンレギュレートされた遺伝子であると定義された。

20

【0171】

2. 結果

(1) LCMによる原発性CRCおよび対応する転移病変の単離

原発性癌細胞と転移癌細胞の正確な発現プロフィールを得るために、レーザー捕捉型顕微解剖 (LCM) を用いて各種類の純粋な集団を収集した。この技法によって選択された癌細胞の比率は、顕微鏡による可視化によって測定され、> 95%と推定された (データは示していない)。への幹細胞の混入は、以前、0.3%未満と推定されている (Yamagawa、Neoplasia 3: 395-401 (2001))。

30

【0172】

(2) 肝転移を伴う原発性CRCにおいて頻繁にアップレギュレートされるが転移を伴わないまたは前悪性腫瘍を有さない原発性CRCではアップレギュレートされない遺伝子の同定

発現が肝転移に関する遺伝子を同定するために、まず、発現レベルが原発性病変と転移病変とのあいだで変化している遺伝子を選択した。薬理学的な観点から、転移抑制作用を活性化するよりも、転移シグナルを抑制することの方が実際に容易である。したがって、本発明においては、発現が転移病変においてアップレギュレートされている遺伝子に注目した。個々の腫瘍につきものの多様性および遺伝子発現に影響を及ぼしうる様々な要因のために、それぞれの症例において、転移癌組織に対する原発性癌組織のシグナル強度比によって判断され選択された遺伝子は変化した。したがって、シグナル強度が有意な症例

40

50

の半数またはそれ以上において、転移組織における発現が2倍を上回って上昇している遺伝子を、さらなる試験のために選択した。この基準によって、EST 37個を含む、頻繁にアップレギュレートされた遺伝子153個が同定された（表1）。これらの遺伝子には、遊走、組織浸潤、および／または肝臓における血管への付着のような転移過程に直接関連する遺伝子のみならず、転移した環境において癌性病変の成長に関連する遺伝子も含まれうる。

【 0 1 7 3 】

（表1）転移病変において頻繁にアップレギュレートされた遺伝子

MLX 割付番号	LMM ID	記号	タイトル	アクセシシ ョン番号	ユニジーン ID
1	A0775	CUTL1	切断型(ショウジョウバエ)様1 (CCAAT置換タンパク質)	L12579	147049
2	A2906	RAB31	RAB31、メンバーRAS癌遺伝子ファミリー	U59877	223025
3	A2888	KLK1	カリクレイン1、腎臓/肺臓/唾液	M25629	123107
4	A4841	SCAM	ビネキシンβ(SH3含有アダプター分子)	AF037261	33787
5	A3990	STK29	セリン/トレオニンキナーゼ29	AJ006701	170819
6	A4428	CD86	CD86抗原(CD28抗原リガンド2、B7-2抗原)	U04343	27954
7	A2983	ARL1	ADPリボシル化因子様1	L28997	242894
8	A3138	LHX2	LIMホメオボックスタンパク質2	U11701	1569
9	A0158	PECAM1	血小板/内皮細胞接着分子(CD31抗原)	M28526	78146
10	A4390	TGFB1II1	トランスフォーミング増殖因子β1誘導転写物1	AB007836	25511
11	A1527	CD6	CD6抗原	U34623	81226
12	A0236	CDC27	細胞分裂サイクル27	U00001	297170
13	A6267	PSMD9	プロテアソーム(プロソーム、マクロペイン)26Sサブユニット、非ATPase、9	AB003177	5648
14	A0348	TYK2	チロシンキナーゼ2	X54637	75516
15	A2398	MAP3K11	マイトゲン活性化タンパク質キナーゼキナーゼキナーゼ11	L32976	89449
16	A5363		DKFZP586J1624タンパク質	AI027554	4964
17	A3524	PTPNS1	タンパク質チロシンホスファターゼ、非受容体型基質1	D86043	156114
18	A5514	ASMTL	アセチルセロトニンO-メチルトランスフェラーゼ様	AA669799	6315
19	A5533	HTATIP	HIV Tat相互作用タンパク質、60kDa	U40989	6364
20	A2790	PRM2	プロタミン2	X07862	2324
21	A4812	NTE	神経障害標的エステラーゼ	AJ004832	5038
22	A4027	HDAC1	ヒストンデアセチラーゼ1	D50405	88556
23	A4300	ZNF198	zincフィンガータンパク質198	Y13472	109526
24	A5984	YF13H12	甲状腺において発現されるタンパク質	AI246770	7486
25	A5469	ILK	インテグリン結合キナーゼ	U40282	6196
26	A1329	DTX1	デルテックス(ショウジョウバエ)相同体1	AF053700	124024
27	A6404		EST	AA292973	7739
28	A4388	EVPL	エンボプラキン	U53786	25482

29	A2117	PFN1	プロフィリン1	J03191	75721	
30	A5949	TCTA	T 細胞白血病転座改变遺伝子	AA148963	250894	
31	A3653	CHES1	チェックポイント抑制物質1	U68723	211773	
32	A2800	GPX4	グルタチオンペルオキシダーゼ4 (リン脂質ヒドロペルオキシダーゼ)	X71973	2706	
33	A6118	C6orf4	チトクローム6 オープンリーディングフレーム4	AA678713	7446	
34	A1673	NDRG1	N-myc 下流調節	D87953	75789	10
35	A6043	KRT19	ケラチン19	H63283	182265	
36	D0491	SLC6A8	溶質担体ファミリー6(神経伝達物質輸送体、クレアチン)、メンバ→8	AA815427	187958	
37	A5680		ヒト mRNA; cDNA DKFZp434M245(クローン DKFZp434M245由来)	W55926	5288	
38	A6074	DUSP16	二重特異性ホスファターゼ16	AA341957	20281	
39	B7824		ヒト cDNA: FLJ21175 fis、クローン CAS11071	AA236315	22283	
40	C3979		ヒト cDNA: FLJ23270 fis、クローン COL10309、HSU33271 ヒト正常ケラチノサイト mRNA と非常に類似	AA543086	126759	20
41	A6056		仮定的タンパク質 FLJ10587	AA039992	7296	
42	B8316		HSPC023 タンパク質	AI268685	279945	
43	B2484	SORT1	ソーチリン1	AI271791	281706	
44	C7756		KIAA0914 遺伝子産物	H03641	177664	
45	C6135		上皮細胞増殖因子受容体関連タンパク質と類似した仮定的タンパク質 FLJ22357	AI128203	57988	
46	A2216	PPM1G	タンパク質ホスファターゼ1G(以前の2C)、マグネシウム依存性 γイソ型	Y13936	17883	30
47	A6234	ADH1	アルコールデヒドログナーゼ1(クラスI)、αポリペプチド	M12963	73843	
48	A2557	DF	補体のD成分(アジプシン)	M84526	155597	
49	A3705	BMPR1B	骨形態形成タンパク質受容体、IB型	U89326	87223	
50	A5309	MP1	メタロプロテアーゼ1(ピトリリシンファミリー)	AI140756	260116	
51	A0190	MCC	結腸直腸癌において変異	M62397	1345	40
52	A0875	NR4A1	核受容体サブファミリー4、A群、メンバー1	L13740	1119	
53	A0831	KRT5	ケラチン5(単純性表皮水疱症、Dowling-Meara型/Kobner型/Weber-Cockayne型)	M21389	195850	
54	A7566		EST	W58209	103118	

55	B7703		仮定的タンパク質 FLJ10432	U69190	143187	
56	B0544		EST	T92887	115826	
57	B1913		KIAA1138 タンパク質	AI312123	115726	
58	B0994		仮定的タンパク質 FLJ20500	AA522530	111244	
59	D8848		ヒト cDNA FLJ13458 fis、クローン PLACE1003361	AA724079	131798	
60	A0378	ADM	アドレノメジュリン	D14874	394	
61	A2074	SERPINA1	セリン（またはシステイン）プロ テイナーゼ阻害剤、クレード 1 (a アンチプロテイナーゼ、アンチト リプシン)、メンバー1	K01396	75621	10
62	A5355	JCL	肝細胞癌関連タンパク質；乳癌関 連遺伝子 1	AA478499	4943	
63	A4401	DSCR3	ダウン症候群必須領域遺伝子 3	D87343	26146	
64	A5700	MG61	ヤマアラシ (porcupine)	AA305489	5326	
65	A1593	SNRP70	低分子リボ核タンパク質 70 kD ポ リペプチド (RNP 抗原)	X04654	174051	
66	A6283	ITPA	イノシン三リン酸	AF026816	6817	
67	A4718	LMAN1	レクチン、マンノース結合、1	U09716	287912	20
68	A1030	CKB	クレアチンキナーゼ、脳	L47647	173724	
69	A4366	SR-BP1	シグマ受容体 (SR31747 結合タン パク質 1)	U75283	24447	
70	B3732		EST	AA583350	30701	
71	B5359N	DXS1357E	アクセサリタンパク質 BAP31/BAP29	U36341	291904	
72	C7658		EST、I38945 黒色腫汎在変異タン パク質 [ヒト] と非常に類似	AA143060	71741	
73	C4163	VE-JAM	血管内皮接合部位関連分子	AA912674	54650	30
74	E1428		仮定的タンパク質 FLJ11252	BE614190	23495	
75	A2219	CSNK2A1	カゼインキナーゼ 2、α1 ポリペプ チド	M55265	155140	
76	A0182	TNFRSF1A	腫瘍壊死因子受容体スーパーファ ミリー、メンバー1A	M58286	159	
77	A7124	DRIL1	デッドリングー型 (ショウジョウ バエ) 様 1	U88047	198515	
78	D9015		仮定的タンパク質 LOC57822	AI041354	132127	
79	B7655		EST	T74135	13233	
80	A5442	KLF4	Kruppel 様因子 4 (腸管)	AI290876	7934	40
81	A3349	EMS1	ems1 配列 (乳腺腫瘍および扁平上 皮癌関連 (p80/85 src 基質))	M98343	119257	
82	A4792	TSPAN-5	テトラスパン 5	AF065389	20709	
83	A5177	E4F1	E4F 転写因子 1	U87269	154196	
84	A2775	VSNL1	ビシニン様 1	AA774776	2288	

85	A3320	POLD1	ポリメラーゼ (DNA 指向性) 、 デルタ 1、触媒サブユニット (125 kD)	M80397	99890	
86	A1522	SEMA3B	sema ドメイン、免疫グロブリンドメイン (Ig) 、短塩基性ドメイン、分泌、(セマフォリン) 3B	U28369	82222	
87	A2976	HSGP25L2G	gp25L2 タンパク質	X90872	279929	
88	B4464	NTPBP	XPA 結合タンパク質 1; 推定 ATP (GTP) 結合タンパク質	AA075627	18259	
89	B0065	MAGEB1	黒色腫抗原、ファミリーB、1	U93163	73021	
90	B3907	PEPP3	ホスホイノシトール 3-ホスフェート結合タンパク質-3	AA913298	241161	10
91	B4446N	SDR1	短鎖デヒドロゲナーゼ/レダクターゼ 1	W21543	17144	
92	C3741		ヒト cDNA FLJ12150 fis、クローン MAMMA1000422	AK022212	118983	
93	C0663	TRPM4	一過性受容体潜在的陽イオンチャネル、サブファミリーM、メンバ-4	AA708532	31608	
94	D6953	ZFD25	zinc フィンガータンパク質 (ZFD25)	AA909999	50216	
95	A3874	LILRA3	白血球免疫グロブリン様受容体、サブファミリーA (TM ドメインを有しない) 、メンバ-3	AF014923	113277	20
96	A3527	VILL	ビリン様	D88154	103665	
97	A5547	RAP1	TRF2 相互作用テロメア RAP1 タンパク質	AA434343	274428	
98	A2622	MMP14	マトリクスマタロプロテイナーゼ 14 (膜挿入)	U41078	2399	
99	A4086	CKTSF1B1	システインノット (knot) スーパーファミリー1、BMP アンタゴニスト 1	AI037867	40098	
100	C7949	PPP2R1A	タンパク質ホスファターゼ 2 (以前の 2A) 、調節サブユニット A (PR65) 、a イソ型	H49233	173902	30
101	E1852		EST	AA258620		
102	A5673	C11orf2	第 11 染色体オープンリーディングフレーム 2	N24911	5258	
103	A3692	TP53BPL	腫瘍タンパク質 p53 結合タンパク質	U82939	179982	
104	B8696	TP53INP1	腫瘍タンパク質 p53 誘導型核タンパク質 1	AA576089	75497	
105	C0318	CKB	クレアチンキナーゼ、脳	M16451	173724	40
106	A0441	FABP1	脂肪酸結合タンパク質 1、肝臓	M10617	5241	
107	A4035	E1B-AP5	E1B-55 kDa 関連タンパク質 5	AA479010	155218	
108	A2490	PLOD3	プロコラーゲン-リジン、2-オキソグルタル酸 5-ジオキシゲナーゼ 3	AF046889	153357	
109	B4906	RPS15	リボソームタンパク質 S15	AA526377	133230	
110	A4624	CRA	シスプラチン耐性関連	U78556	166066	

111	A0373	ADFP	脂肪分化関連タンパク質	X97324	3416	
112	A3276	PTMS	パラサイモシン	M24398	171814	
113	B1939		EST	AA663323	116897	
114	C6486	HMGCS2	3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-コエンザイムA合成酵素2(ミトコンドリア)	X83618	59889	
115	E1825	HSPB1	熱ショック27kDタンパク質1	AW084318	76067	
116	A2805	MRPL23	ミトコンドリアリボソームタンパク質L23	Z49254	3254	10
117	A1575	NPAS1	神経PASドメインタンパク質1	U77968	79564	
118	A2373	LMNA	ラミンA/C	X03444	77886	
119	A0567	CSK	c-srcチロシンキナーゼ	X59932	77793	
120	A5563	C19orf3	第19染色体オープンリーディングフレーム3	AF028824	6454	
121	A4786	EZH1	ゼステ(ショウジョウバエ)相同体1のエンハンサー	AB002386	194669	
122	A9040	SLC2A1	溶質担体ファミリー2(促進されたグルコース輸送体)、メンバー1	K03195	169902	
123	A9125	CRYL1	結晶ラムダ1	N78171	108896	20
124	E0502		EST	AI240520	305172	
125	A4716	HDAC3	ヒストンデアセチラーゼ3	U66914	279789	
126	A2582	FUT4	フコシルトランスクレラーゼ4(a(1,3)フコシルトランスクレラーゼ、骨髄特異的)	M58596	2173	
127	C4276	CELSR3	カドヘリン、EGF LAG7回貫通G型受容体3、フラミング(ショウジョウバエ)相同体	AB011536	55173	
128	A8182	DPYS	ジヒドロピリミジナーゼ	D78011	10755	30
129	C4970	ALDH1	アルデヒドデヒドログナーゼ1、可溶性	K03000	76392	
130	C3752	OGDH	オキソグルタル酸デヒドログナーゼ(リポアミド)	D10523	168669	
131	E1606		EST、エキソン13A[ヒト]を用いた代替的スプライシング産物と中等度に類似	AW779971	150073	
132	A0840	MYH7	ミオシン、重鎖ポリペプチド7、心筋、 β	M17712	929	
133	A3945	ESR2	エストロゲン受容体2(ER β)	AF051427	103504	
134	A4556	PSMB9	プロテアソーム(プロソーム、マクロペイン)サブユニット、 β 型、9(高分子量多機能プロテアーゼ2)	Z14977	9280	40
135	A5510	AXIN1	アキシン	AA725563	184434	
136	A2644	ADH3	アルコールデヒドログナーゼ3(クラスI)、 γ ポリペプチド	X04299	2523	

137	A5284	GPAA1	アンカー接着タンパク質1(Gaa1p、酵母)相同体	AB006969	4742	
138	A0094	LAMC1	ラミニン、γ1(以前のLAMB2)	J03202	214982	
139	A0897	FASTK	Fas活性化セリン/トレオニンキナーゼ	X86779	75087	
140	A5377	TSSC1	腫瘍抑制亜伝達性(subtransferable)候補物質1	AA339976	4992	
141	A7226	RAGE	腎腫瘍抗原	U46191	104119	
142	A9371		仮定的タンパク質FLJ23399	W45464	299883	10
143	C4885	KIP2	DNA依存的タンパク質キナーゼ触媒サブユニット相互作用タンパク質2	AA252866	129867	
144	A9482		脳特異的タンパク質LOC51673	AI160184	279772	
145	B1902	CXorf10	X染色体オープンリーディングフレーム10	AA503892	288512	
146	A9975		EST	AA621665	208957	
147	A6635		ヒトcDNAFLJ13048fis、クローンNT2RP3001399、SSU72タンパク質と弱く類似	AI041186	7932	
148	A9233		ヒトmRNA;cDNA DKFZp434P228(クローンDKFZp434P228由来)	W23958	108972	20
149	B9544		KIAA0459タンパク質	AB007928	28169	
150	A1460	H2BFQ	H2Bヒストンファミリー、メンバーアーQ	M60756	2178	
151	C7451		CGI-96タンパク質	AA306027	239934	
152	D1418	PGLS	6-ホスホグルコノラクトナーゼ	AA661636	100071	
153	D7200		EST	AI268231	130829	

【0174】

30

産業上の利用可能性

本発明のMLX核酸の発現は、対応する原発性病変と比較して、転移病変において頻繁に増大した。これらのMLX核酸は、遊走、血管浸潤、肝臓における血管への付着、および/または転移環境における癌性病変の成長のような転移過程に直接関連すると予想される。これらの遺伝子には、癌細胞の特性を示す遺伝子のみならず、例えば局所環境(肝臓対結腸)における変化に反応することによって、二次事象としての転移によって影響を受ける遺伝子が含まれてもよい。これら機能に関するさらなる研究によって、転移に加えて、転移環境における増殖に関与する遺伝子が同定され、転移の抑制および/または治療のための手がかりが提供されるであろう。

【0175】

40

本発明を、特定の態様を参照して詳細に記載してきたが、本発明の目的および範囲から逸脱することなく様々な変更および改変を行ってもよいことが、当業者には明らかである。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT					International Application No PCT/JP 03/10339												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/574 C12Q1/68 C12N15/11 C07K14/47 A61K39/00 A61P35/04 C07K16/30																	
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) IPC 7 G01N C12Q C07K A61K																	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;"> ZEMBUTSU H ET AL: "Genome-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profiles with sensitivity of 85 human cancer xenografts to anticancer drugs" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 62, no. 2, 15 January 2002 (2002-01-15), pages 518-527, XP002224797 ISSN: 0008-5472 Abstract; Table 2-Continuation at p. 523. </td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;">1-5,11, 17</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;"> WO 02/21996 A (EOS BIOTECHNOLOGY INC ;GISH KURT C (US); MACK DAVID H (US); WILSON) 21 March 2002 (2002-03-21) Paragraph 6, 7, 24 and 25; Tables 1 and 2; Claims 1-31. </td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;">1-5,11, 17</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center; padding: 2px;">-/-</td> </tr> </tbody> </table>						Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	ZEMBUTSU H ET AL: "Genome-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profiles with sensitivity of 85 human cancer xenografts to anticancer drugs" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 62, no. 2, 15 January 2002 (2002-01-15), pages 518-527, XP002224797 ISSN: 0008-5472 Abstract; Table 2-Continuation at p. 523.	1-5,11, 17	X	WO 02/21996 A (EOS BIOTECHNOLOGY INC ;GISH KURT C (US); MACK DAVID H (US); WILSON) 21 March 2002 (2002-03-21) Paragraph 6, 7, 24 and 25; Tables 1 and 2; Claims 1-31.	1-5,11, 17	-/-		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	ZEMBUTSU H ET AL: "Genome-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profiles with sensitivity of 85 human cancer xenografts to anticancer drugs" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 62, no. 2, 15 January 2002 (2002-01-15), pages 518-527, XP002224797 ISSN: 0008-5472 Abstract; Table 2-Continuation at p. 523.	1-5,11, 17															
X	WO 02/21996 A (EOS BIOTECHNOLOGY INC ;GISH KURT C (US); MACK DAVID H (US); WILSON) 21 March 2002 (2002-03-21) Paragraph 6, 7, 24 and 25; Tables 1 and 2; Claims 1-31.	1-5,11, 17															
-/-																	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.			<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.														
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the International filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																	
T later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family																	
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report															
17 March 2004		13.08.04															
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patenlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016			Authorized officer Lopez Garcia, F														

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/JP 03/10339

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SNYDER STEVEN R ET AL: "Identification of CCAAT displacement protein (CDP/cut) as a locus-specific repressor of major histocompatibility complex gene expression in human tumor cells" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 276, no. 7, 16 February 2001 (2001-02-16), pages 5323-5330, XP002273064 ISSN: 0021-9258 Abstract; p. 5329, last paragraph.	1-5, 11, 17
X	YANAGAWA R ET AL: "IDENTIFICATION OF GENES ASSOCIATED WITH LIVER METASTASIS OF COLORECTAL CANCER BY MEANS OF CDNA MICROARRAY" PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, NEW YORK, NY, US, vol. 42, 24 March 2001 (2001-03-24), page 59, XP001157334 ISSN: 0197-016X the whole document	1-5, 11, 17
X	YANAGAWA R ET AL: "GENOME-WIDE SCREENING OF GENES SHOWING ALTERED EXPRESSION IN LIVER METASTASES OF HUMAN COLORECTAL CANCERS BY CDNA MICROARRAY" NEOPLASIA, DOYMA, BARCELONA,, ES, vol. 3, no. 5, September 2001 (2001-09), pages 395-401, XP009024057 ISSN: 0212-9787 cited in the application abstract	1-5, 11, 17
A	NIRODI C ET AL: "The role of CDP in the negative regulation of CXCL1 gene expression" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 276, no. 28, 13 July 2001 (2001-07-13), pages 26122-26131, XP002221614 ISSN: 0021-9258 abstract	1-5, 11, 17
T	LI MEIHUA ET AL: "Genes associated with liver metastasis of colon cancer, identified by genome-wide cDNA microarray." INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY. GREECE FEB 2004, vol. 24, no. 2, February 2004 (2004-02), pages 305-312, XP009027443 ISSN: 1019-6439	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/JP 03/10339

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0221996	A 21-03-2002	US 2003077568 A1		24-04-2003
		AU 9090201 A		26-03-2002
		CA 2422278 A1		21-03-2002
		EP 1317669 A2		11-06-2003
		JP 2004515225 T		27-05-2004
		WO 0221996 A2		21-03-2002
		US 2002102544 A1		01-08-2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP 03/10339

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 8-13 (PARTIALLY)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 8-13 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: 6, 8, 12, 13, 14
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-5, 11 and 17 (partially)

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ JP 03/10339

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**Continuation of Box I.1**

Although claims 8-13 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 8-13 (PARTIALLY)

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 6, 8, 12, 13, 14

Present claims 6 refers to reagents that bind to the nucleic acids MLXs 1-153 without giving a true technical characterization. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is not found in the application. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, no search can be carried out for such purely speculative claims whose wording is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved.

Present claims 8 and 14 refer to methods of treatment using "compounds obtained by the methods according to any of the claims 1-5" and to compositions comprising the "compounds obtained by the methods according to any of the claims 1-5" without giving a true technical characterization. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is not found in the application. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, no search can be carried out for such purely speculative claims whose wording is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved.

Present claims 12-13 which do not contain any technical feature to characterize a "method for inducing an anti-tumor immunity" so lack clarity (Art. 6 PCT) and support in the description (Art. 5 PCT) that no meaningful search can be carried out (Art. 6 PCT).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary

International Application No. PCT/ JP 03/10339

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 2
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
	C 1 2 M 1/00	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,M X,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM ,ZW

(72)発明者 古川 洋一

神奈川県川崎市宮前区宮崎3丁目10番40

F ターム(参考) 2G045 AA40 DA12 DA13 DA14 DA36 DA78 FB03 HA16
 4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 DA03 FA10 GA11 HA12
 4B029 AA23 BB20 CC03 FA02
 4B063 QA18 QQ08 QQ43 QQ79 QQ91 QR32 QR48 QR55 QR77 QR82
 QS24 QS32 QX01
 4C084 AA13 AA17 ZB262
 4C085 AA03 AA13 AA14 BB01 CC02 DD62 DD63 DD88 FF24
 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 ZB26