

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4982869号
(P4982869)

(45) 発行日 平成24年7月25日(2012.7.25)

(24) 登録日 平成24年5月11日(2012.5.11)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
G O 1 N	33/574	(2006.01)	G O 1 N 33/574 A
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/53 Y
G O 1 N	33/48	(2006.01)	G O 1 N 33/48 P
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 20 (全 48 頁)

(21) 出願番号 特願2007-548042 (P2007-548042)
 (86) (22) 出願日 平成18年11月30日(2006.11.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2006/324403
 (87) 国際公開番号 W02007/064038
 (87) 国際公開日 平成19年6月7日(2007.6.7)
 審査請求日 平成20年5月21日(2008.5.21)
 (31) 優先権主張番号 特願2005-347227 (P2005-347227)
 (32) 優先日 平成17年11月30日(2005.11.30)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 504180239
 国立大学法人信州大学
 長野県松本市旭三丁目1番1号
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100111741
 弁理士 田中 夏夫
 (72) 発明者 林 琢磨
 長野県松本市旭三丁目1番1号 信州大学
 大学院医学研究科内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 LMP2を用いた子宮平滑筋肉腫の検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現の程度を指標に子宮平滑筋肉腫の存在を評価する方法であって、採取した子宮平滑筋組織または細胞を用い、子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現を測定し、LMP2の転写または発現が正常子宮平滑筋組織と比較して少ない場合に子宮平滑筋肉腫が存在すると評価する方法。

【請求項2】

子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現の程度を指標に子宮平滑筋の腫瘍が子宮平滑筋腫であるかまたは子宮平滑筋肉腫であるかを評価する方法であって、採取した子宮平滑筋組織または細胞を用い、子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現を測定し、LMP2の転写または発現が正常子宮平滑筋組織と比較して少ない場合に子宮平滑筋腫であると評価する方法。

【請求項3】

子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現の程度を指標に子宮平滑筋肉腫の悪性度を評価する方法であって、採取した子宮平滑筋組織または細胞を用い、子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現を測定し、LMP2の転写または発現が正常子宮平滑筋組織と比較して少ない場合に悪性子宮平滑筋肉腫であると評価する方法。

【請求項4】

採取した子宮平滑筋組織または細胞を用いin situ ハイブリダイゼーションを行いLMP2の転写を測定する、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

採取した子宮平滑筋組織または細胞からLMP2のmRNAを抽出しRT-PCRまたはノーザンブロットを行いLMP2の転写を測定する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

採取した子宮平滑筋組織または細胞を用い免疫組織化学染色または免疫細胞化学染色を行いLMP2の発現を測定する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

採取した子宮平滑筋組織または細胞からLMP2タンパク質を抽出しイムノアッセイを行いLMP2の発現を測定する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

LMP2およびミオシンの転写または発現を指標に子宮平滑筋肉腫の存在を評価する方法であって、LMP2の転写または発現が正常子宮平滑筋組織に比較して少なく、かつミオシンの転写または発現が正常子宮平滑筋組織に比較して多い場合に子宮平滑筋肉腫が存在すると評価する請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 9】

少なくともLMP2遺伝子断片をプローブまたはプライマーとして含む、子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現の程度を指標に子宮平滑筋肉腫の存在を評価するための検出試薬であって、子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現を測定し、LMP2の転写または発現が正常子宮平滑筋組織に比較して少ない場合に子宮平滑筋肉腫が存在すると評価するための検出試薬。

20

【請求項 10】

少なくともLMP2遺伝子断片をプローブまたはプライマーとして含む、子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現の程度を指標に子宮平滑筋の腫瘍が子宮平滑筋腫であるかまたは子宮平滑筋肉腫であるかを評価するための検出試薬であって、子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現を測定し、LMP2の転写または発現が正常子宮平滑筋組織に比較して少ない場合に子宮平滑筋腫であると評価するための検出試薬。

【請求項 11】

少なくともLMP2遺伝子断片をプローブまたはプライマーとして含む、子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現の程度を指標に子宮平滑筋肉腫の悪性度を評価するための検出試薬であって、子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現を測定し、LMP2の転写または発現が正常子宮平滑筋組織に比較して少ない場合に悪性子宮平滑筋肉腫であると評価するための検出試薬。

30

【請求項 12】

in situ ハイブリダイゼーション用試薬である請求項 9 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の検出試薬。

【請求項 13】

さらに、ミオシン遺伝子断片をプローブまたはプライマーとして含む、LMP2およびミオシンの転写または発現を指標に子宮平滑筋肉腫の存在を評価するための検出試薬であって、LMP2の転写または発現が正常子宮平滑筋組織に比較して少なく、かつミオシンの転写または発現が正常子宮平滑筋組織に比較して多い場合に子宮平滑筋肉腫が存在すると評価するための、請求項 9 記載の検出試薬。

40

【請求項 14】

in situ ハイブリダイゼーション用試薬である請求項 13 記載の検出試薬。

【請求項 15】

少なくとも抗LMP2抗体を含む、子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現の程度を指標に子宮平滑筋肉腫の存在を評価するための検出試薬であって、子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現を測定し、LMP2の転写または発現が正常子宮平滑筋組織に比較して少ない場合に子宮平滑筋肉腫が存在すると評価するための検出試薬。

【請求項 16】

少なくとも抗LMP2抗体を含む、子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現の程度を

50

指標に子宮平滑筋の腫瘍が子宮平滑筋腫であるかまたは子宮平滑筋肉腫であるかを評価するための検出試薬であって、子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現を測定し、LMP2の転写または発現が正常子宮平滑筋組織と比較して少ない場合に子宮平滑筋肉腫であると評価するための検出試薬。

【請求項 17】

少なくとも抗LMP2抗体を含む、子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現の程度を指標に子宮平滑筋肉腫の悪性度を評価するための検出試薬であって、子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現を測定し、LMP2の転写または発現が正常子宮平滑筋組織と比較して少ない場合に悪性子宮平滑筋肉腫であると評価するための検出試薬。

【請求項 18】

免疫組織化学または免疫細胞染色用試薬である請求項 15 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の子宮平滑筋肉腫を検出するための検出試薬。

【請求項 19】

さらに、抗ミオシン抗体を含み、LMP2およびミオシンの転写または発現を指標に子宮平滑筋肉腫の存在を評価するための検出試薬であって、LMP2の転写または発現が正常子宮平滑筋組織と比較して少なく、かつミオシンの転写または発現が正常子宮平滑筋組織と比較して多い場合に子宮平滑筋肉腫が存在すると評価するための、請求項 15 記載の検出試薬。

【請求項 20】

免疫組織化学または免疫細胞染色用試薬である請求項 19 記載の子宮平滑筋肉腫を検出するための検出試薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、LMP2およびサイクリンE、ならびにインターフェロン（IFN- γ ）シグナル伝達カスケードに参与するJAK1キナーゼ遺伝子、STAT1遺伝子およびLMP2プロモーターにおける変異をマーカーとして用いる、子宮平滑筋肉腫の検出方法および子宮平滑筋腫と子宮平滑筋肉腫の鑑別検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

子宮癌は婦人科の癌で最も多いが、子宮平滑筋肉腫は発症頻度が低く子宮体部癌の2 ~ 5%である。子宮平滑筋肉腫は、子宮頸部よりも子宮体部の筋肉層から多く発生する。子宮筋層は平滑筋よりできており、子宮筋層の中にできる良性の腫瘍が子宮平滑筋腫であり、悪性の腫瘍が子宮平滑筋肉腫である。子宮平滑筋腫と子宮平滑筋肉腫を鑑別することは非常に難しく、通常手術をして組織を採取し、顕微鏡下での細胞検査により判断していた。子宮平滑筋肉腫は異型性が強く巨大化することもある腫瘍細胞が増殖していることが多い。しかし、ほとんど細胞異型性を示さない場合もあり、細胞異型性の有無は決定的な鑑別基準とはならない。子宮平滑筋腫と子宮平滑筋肉腫との鑑別は、専ら凝固壊死があるかどうか、および細胞分裂像が増大しているかどうかにより行う。原則的には、細胞密度が高い場合には10倍高視野で10個以上の細胞分裂がある場合、腫瘍細胞に異型性が認められる場合には10倍高視野で5個以上ある場合に、子宮平滑筋肉腫と診断される。現実的には、腫瘍細胞の細胞異型度、細胞密度、細胞分裂の数、腫瘍内の壊死、出血の有無等を参考に、主として顕微鏡および肉眼で組織の形態を観察して鑑別していた。しかしながら、このような鑑別を行うためには熟練を要し、必ずしも確実に鑑別できない場合もあった。

【0003】

本発明者は、先にイムノプロテアーゼの構成因子であるLMP2(low molecular mass polypeptide2)を欠損したマウスのメスにおいて、生後6ヶ月以降に子宮平滑筋肉腫(leiomyosarcoma)が認められ、生後12ヶ月までの発症率が全LMP2欠損マウスのメスの約35%にまでおよぶことを報告した(非特許文献1および2参照)。LMP2の機能は、組織特異的であり、CTLsによるMHCクラスI仲介腫瘍拒絶に不可欠の役割を持っている(非特許文献1参照)

10

20

30

40

50

【 0 0 0 4 】

このように、LMP2の欠損が何らかの機能で子宮平滑筋肉腫の発症のファクターになっていることは予測できた。しかしながら、LMP2が含まれる26Sプロテアソームは、転写調節因子や細胞周期調節因子等の活性化、MHCクラスI分子のペプチド抗原の産生等に複雑に関与しており、LMP2と子宮平滑筋肉腫の発症との直接の関係は不明であり、子宮平滑筋肉腫が発症した場合に、26Sプロテアソームの機能がどう変化し、またLMP2の転写発現がどう変化するかは不明であった。

【 0 0 0 5 】

【非特許文献1】Van Kaer L. et al. (1994) Immunity, 1, 533-541

10

【非特許文献2】Hayashi T. et al. (2002) Cancer Res., 62, 24-27

【発明の開示】

【 0 0 0 6 】

本発明は、子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現の程度を指標に子宮平滑筋肉腫の存在を検出する方法およびそのための検出試薬の提供を目的とする。

【 0 0 0 7 】

本発明者は、筋肉層におけるLMP2の発現を調べるためにマウスの生体を抗LMP2で染色してみた。その結果、平滑筋、横紋筋、心筋等の筋原性組織に特異的なLMP2の発現が認められることから、LMP2欠損マウスの子宮平滑筋層で認められた腫瘍細胞の起源が筋原性細胞（平滑筋細胞）であることを新たに見出した。

20

【 0 0 0 8 】

さらに、本発明者は正常子宮平滑筋層、ヒト子宮平滑筋腫およびヒト子宮平滑筋肉腫の生検組織または手術組織におけるLMP2の発現状況を調べた。その結果、悪性腫瘍である子宮平滑筋肉腫のみにおいて、顕著なLMP2の発現低下が認められることを見出した。

【 0 0 0 9 】

本発明者は、次いでLMP2の発現低下が、子宮平滑筋細胞において形質転換（癌化）に直接的に関与しているか検討するため、LMP2の発現が認められない子宮平滑筋肉腫細胞（SKN）に、遺伝子組換えによりLMP2を強制発現させ、SKN細胞の形態、細胞増殖速度およびSKN細胞におけるファイブロンクチンの発現変化について検討した。その結果、SKN細胞において、形態および細胞増殖速度が正常子宮平滑筋細胞に近づき、さらに有意なファイブロンクチンの発現誘導が起こることを見出した。

30

【 0 0 1 0 】

本発明者は上記の新知見から、LMP2の転写発現を指標に子宮平滑筋腫と子宮平滑筋肉腫の鑑別診断をし得ること、およびLMP2の発現により子宮平滑筋肉腫の治療を行い得ることを見出した。

【 0 0 1 1 】

本発明者らは、さらにサイクリンEの発現と子宮平滑筋肉腫との関係に着目し、子宮平滑筋組織において、子宮平滑筋肉腫の悪性度に依存してサイクリンEの転写・発現が著しく亢進することを見出した。

【 0 0 1 2 】

また、本発明者らは、LMP2の発現に関与するインターフェロン（IFN- γ ）シグナル伝達系に関与する遺伝子と子宮平滑筋肉腫との関係について検討を行なった。その結果、子宮平滑筋肉腫組織の細胞において同シグナル伝達因子であるJAK1キナーゼ、STAT1をコードする遺伝子およびLMP2プロモーターに変異が生じていることを見出し、該変異を検出することにより、子宮平滑筋肉腫に罹患しているか否か、および子宮平滑筋肉腫に罹患するリスクが高いか否かを判定することを見出した。

40

【 0 0 1 3 】

以上のようにして、本発明者らは本発明を完成させた。

【 0 0 1 4 】

すなわち、本発明は以下の通りである。

50

- [1] LMP2をマーカーとして用い、子宮平滑筋肉腫を検出する方法。
- [2] 子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現の程度を指標に子宮平滑筋肉腫の存在を検出する方法であって、子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現を測定し、LMP2の転写または発現が正常子宮平滑筋組織に比較して少ない場合に子宮平滑筋肉腫が存在すると判定する方法。
- [3] 子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現の程度を指標に子宮平滑筋の腫瘍が子宮平滑筋腫であるかまたは子宮平滑筋肉腫であるかを鑑別する方法であって、子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現を測定し、LMP2の転写または発現が正常子宮平滑筋組織に比較して少ない場合に子宮平滑筋肉腫であると判定する方法。
- [4] 子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現の程度を指標に子宮平滑筋肉腫の悪性度を判定する方法であって、子宮平滑筋組織におけるLMP2の転写または発現を測定し、LMP2の転写または発現が正常子宮平滑筋組織に比較して少ない場合に悪性子宮平滑筋肉腫であると判定する方法。 10
- [5] 採取した子宮平滑筋組織または細胞を用いin situ ハイブリダイゼーションを行いLMP2の転写を測定する、[1] ~ [4]のいずれかの方法。
- [6] 採取した子宮平滑筋組織または細胞からLMP2のmRNAを抽出しRT-PCRまたはノーザンブロットを行いLMP2の転写を測定する、[1] ~ [4]のいずれかの方法。
- [7] 採取した子宮平滑筋組織または細胞を用い免疫組織化学染色または免疫細胞化学染色を行いLMP2の発現を測定する、[1] ~ [4]のいずれかの方法。
- [8] 採取した子宮平滑筋組織または細胞からLMP2タンパク質を抽出しイムノアッセイを行いLMP2の発現を測定する、[1] ~ [4]のいずれかの方法。 20
- [9] さらに、ミオシンをマーカーとして用い、LMP2およびミオシンの転写または発現を指標に子宮平滑筋肉腫の存在を検出する方法であって、LMP2の転写または発現が正常子宮平滑筋組織に比較して少なく、かつミオシンの転写または発現が正常子宮平滑筋組織に比較して多い場合に子宮平滑筋肉腫が存在すると判定する[1]の方法。
- [1 0] LMP-2およびサイクリンEをマーカーとして用い、子宮平滑筋肉腫を検出する方法。
- [1 1] 子宮平滑筋組織におけるLMP2およびサイクリンEの転写または発現の程度を指標に子宮平滑筋肉腫の存在を検出する方法であって、子宮平滑筋組織におけるLMP2およびサイクリンEの転写または発現を測定し、LMP2の転写または発現が正常子宮平滑筋組織に比較して少なく、かつサイクリンEの転写または発現が正常子宮平滑筋組織に比較して多い場合に子宮平滑筋肉腫が存在すると判定する方法。 30
- [1 2] 子宮平滑筋組織におけるLMP2およびサイクリンEの転写または発現の程度を指標に子宮平滑筋の腫瘍が子宮平滑筋腫であるかまたは子宮平滑筋肉腫であるかを鑑別する方法であって、子宮平滑筋組織におけるLMP2およびサイクリンEの転写または発現を測定し、LMP2の転写または発現が正常子宮平滑筋組織に比較して少なく、かつサイクリンEの転写または発現が正常子宮平滑筋組織に比較して多い場合に子宮平滑筋肉腫であると判定する方法。
- [1 3] 子宮平滑筋組織におけるLMP2およびサイクリンEの転写または発現の程度を指標に子宮平滑筋肉腫の悪性度を判定する方法であって、子宮平滑筋組織におけるLMP2およびサイクリンEの転写または発現を測定し、LMP2の転写または発現が正常子宮平滑筋組織に比較して少なく、かつサイクリンEの転写または発現が正常子宮平滑筋組織に比較して多い場合に悪性子宮平滑筋肉腫であると判定する方法。 40
- [1 4] 採取した子宮平滑筋組織または細胞を用いin situ ハイブリダイゼーションを行いLMP2およびサイクリンEの転写を測定する、[1 0] ~ [1 3]のいずれかの方法。
- [1 5] 採取した子宮平滑筋組織または細胞からLMP2およびサイクリンEのmRNAを抽出しRT-PCRまたはノーザンブロットを行いLMP2およびサイクリンEの転写を測定する、[1 0] ~ [1 3]のいずれかの方法。
- [1 6] 採取した子宮平滑筋組織または細胞を用い免疫組織化学染色または免疫細胞化学染色を行いLMP2およびサイクリンEの発現を測定する、[1 0] ~ [1 3]のいずれかの方法 50

。

[1 7] 採取した子宮平滑筋組織または細胞からLMP2およびサイクリンEタンパク質を抽出し免疫アッセイを行いLMP2およびサイクリンEの発現を測定する、[1 0] ~ [1 3] のいずれかの方法。

[1 8] 少なくともLMP2遺伝子断片をプローブまたはプライマーとして含む、LMP2をマーカーとして用い子宮平滑筋肉腫を検出するための検出試薬。

[1 9] 少なくともLMP2遺伝子断片およびサイクリンE遺伝子断片をプローブまたはプライマーとして含む、LMP2およびサイクリンEをマーカーとして用い子宮平滑筋肉腫を検出するための検出試薬。

[2 0] in situ ハイブリダイゼーション用試薬である[1 8] または[1 9] の子宮平滑筋肉腫を検出するための検出試薬。

[2 1] さらに、ミオシン遺伝子断片をプローブまたはプライマーとして含み、LMP2およびミオシンをマーカーとして用い子宮平滑筋肉腫を検出するための[1 8] または[2 0] の検出試薬。

[2 2] さらに、ミオシン遺伝子断片をプローブまたはプライマーとして含み、LMP2、サイクリンEおよびミオシンをマーカーとして用い子宮平滑筋肉腫を検出するための[1 9] または[2 0] の検出試薬。

[2 3] 少なくとも抗LMP2抗体を含む、LMP2をマーカーとして用い子宮平滑筋肉腫を検出するための検出試薬。

[2 4] 少なくとも抗LMP2抗体および抗サイクリンE抗体を含む、LMP2およびサイクリンEをマーカーとして用い子宮平滑筋肉腫を検出するための検出試薬。

[2 5] 免疫組織化学または免疫細胞染色用試薬である[2 3] または[2 4] の子宮平滑筋肉腫を検出するための検出試薬。

[2 6] さらに、抗ミオシン抗体を含み、LMP2およびミオシンをマーカーとして用い子宮平滑筋肉腫を検出するための[2 3] または[2 5] の検出試薬。

[2 7] さらに、抗ミオシン抗体を含み、LMP2、サイクリンEおよびミオシンをマーカーとして用い子宮平滑筋肉腫を検出するための[2 4] または[2 5] の検出試薬。

[2 8] JAK1キナーゼ遺伝子の以下の(A1) ~ (A6)の変異部位の少なくとも1つを含むJAK1キナーゼ遺伝子の部分配列、およびLMP2プロモーターの以下の(B1) ~ (B5)の変異部位の少なくとも1つを含むLMP2プロモーターの部分配列からなる群から選択される部分配列からなるオリゴヌクレオチドまたはその標識物であって、10から30塩基からなる部分配列またはその部分配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドまたはその標識物：

(A 1) A2612A

(A 2) G2626A

(A 3) G2642T

(A 4) A2967C

(A 5) A2960C

(A 6) A2985T

(B 1) A210G

(B 2) C214T

(B 3) A216G

(B 4) A217G

(B 5) G219A。

[2 9] プローブとして用いられる[2 8] のオリゴヌクレオチドまたはその標識物。

[3 0] [2 8] のオリゴヌクレオチドまたはその標識物を固定化した固定化基板。

[3 1] JAK1キナーゼ遺伝子の以下の(A1) ~ (A6)の変異部位の少なくとも1つ、およびLMP2プロモーターの以下の(B1) ~ (B5)の変異部位の少なくとも1つからなる群から選択される変異部位を含むDNA断片の増幅に用いる少なくとも一対のプライマーセットであって、上記変異部位の3'側および5'側に存在する10から30塩基からなる部分配列からなる、DNA断片の増幅に用い得る一対のプライマーセット：

10

20

30

40

50

- (A1) A2612A
- (A2) G2626A
- (A3) G2642T
- (A4) A2967C
- (A5) A2960C
- (A6) A2985T
- (B1) A210G
- (B2) C214T
- (B3) A216G
- (B4) A217G
- (B5) G219A。

10

[32] [31]のプライマーセット、[28]もしくは[29]のオリゴヌクレオチドもしくはその標識物、または[30]の固定化基板を含む子宮平滑筋肉腫検出キット。

[33] 動物から採取した子宮平滑筋組織または細胞におけるJAK1キナーゼ遺伝子の以下の(A1)~(A6)の変異部位の少なくとも1つ、およびLMP2プロモーターの以下の(B1)~(B5)の変異部位の少なくとも1つからなる群から選択される変異部位の検出を行い、その結果に基づいて、上記変異が存在する場合に、前記動物が子宮平滑筋肉腫に罹患しているか、または罹患するリスクが高いと判断する、子宮平滑筋肉腫の検出方法：

- (A1) A2612A
- (A2) G2626A
- (A3) G2642T
- (A4) A2967C
- (A5) A2960C
- (A6) A2985T
- (B1) A210G
- (B2) C214T
- (B3) A216G
- (B4) A217G
- (B5) G219A。

20

[34] JAK1キナーゼ遺伝子、またはMP2プライマーの変異の検出を[31]のプライマーセット、[28]もしくは[29]のプローブまたは[30]の固定化基板を用いて行う[33]の方法。

30

【0015】

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2005-347227号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

【図面の簡単な説明】

【0016】

図1aは、SKN細胞の中でのIFN-誘導性TAP1およびLMP2発現の欠損を示す写真である。写真に示す時間250ユニット/mlのIFN-で処理したHeLa、HeLa.S3、SKN細胞およびヒト正常子宮平滑筋細胞(Hu.USMC)から細胞質抽出物を調製し、50μgの細胞質抽出物を10%のSDS-PAGEで分離した。TAP1、LMP2およびアクチンの発現レベルは適切な抗体を用いたイムノブロット分析で調べた。

40

【0017】

図1bは、SKN細胞の中でのIFN-誘導性TAP1およびLMP2発現の欠損を示す写真であり、RT-PCRによるHeLa、HeLa.S3、SKN細胞およびHu.USMC細胞中のTAP1、LMP2およびアクチンのmRNA発現の試験の結果を示す写真である。IFN-(250ユニット/ml)の非存在下または存在下で細胞を48時間培養した後に、プライマーを用いてRT-PCRを行った。RT-PCRにより増幅されたDNA製品をアガロース・ゲルにより分離した。DNAサイズマーカーは写真の左側に示す。

【0018】

50

図1cは、子宮平滑筋肉腫の中でのLMP2発現の欠損を示す写真であり、正常子宮平滑筋および子宮平滑筋腫中のLMP2の免疫組織化学の結果を示す写真である。組織標本の5 μmの切片を抗LMP2抗体およびペルオキシダーゼ結合抗ウサギのIgG抗体を用いて染色した。

【0019】

図2は、HeLaおよびSKN細胞中でのIFN-誘導TAP1とLMP2共有のwtおよびIRF-E mtプロモーターの示差活性を示す図である。TAP1とLMP2共有のプロモーターwt(TAP1 593-1/pGL3およびLMP2 1-593/pGL3)の図ならびにそれらのそれぞれのIRF-E変異体プロモーターを含んだルシフェラーゼレポーター遺伝子の構築物を示す。HeLaおよびSKN細胞に同レポーター遺伝子を移入し、IFN-を24時間後に添加しさらに回収の前24時間細胞をインキュベートした。レポーター遺伝子の移入効率の標準化のためにpSMV-GALとの同時に移入した。結果は、HeLaおよびSKN細胞について別々に測定されたルシフェラーゼ遺伝子発現に標準化され、相対的TAP1およびLMP2活性として示される。結果は3つの独立している実験の平均で示され、エラーバーはSEを表す。

10

【0020】

図3は、ヒト正常子宮平滑筋組織の顕微鏡写真である。

【0021】

図4は、ヒト子宮平滑筋腫およびヒト子宮平滑筋肉腫の顕微鏡写真である。

【0022】

図5は、ヒト子宮内膜間質肉腫の顕微鏡写真である。

【0023】

20

図6は、正常子宮平滑筋、子宮平滑筋腫および子宮平滑筋肉腫の免疫組織化学染色写真である。

【0024】

図7は、同一組織における子宮平滑筋肉腫部位と正常子宮平滑筋部位の免疫組織化学染色写真である。子宮平滑筋肉腫部位においてLMP2の発現低下が認められる。

【0025】

図8は、LMP2の発現が認められない子宮平滑筋肉腫細胞(SKN)に、遺伝子組換えによりLMP2を強制発現させ、SKN細胞の形態の変化を示す写真である(その1)。

【0026】

図9は、LMP2の発現が認められない子宮平滑筋肉腫細胞(SKN)に、遺伝子組換えによりLMP2を強制発現させ、SKN細胞の形態の変化を示す写真である(その2)。

30

【0027】

図10は、LMP2の発現が認められない子宮平滑筋肉腫細胞(SKN)に、遺伝子組換えによりLMP2を強制発現させ、SKN細胞のファイブロネクチンの発現変化を示す写真である。

【0028】

図11は、ヒト正常子宮平滑筋細胞(HuUSMC)におけるファイブロネクチンの発現変化を示す写真である。

【0029】

図12は、各細胞における形態の変化、細胞増殖速度、およびファイブロネクチンの発現状況のまとめを示す図である。

40

【0030】

図13は、マウス骨格筋組織、心筋組織および平滑筋組織におけるLMP2発現を示す写真である。

【0031】

図14は、子宮平滑筋肉腫、子宮平滑筋腫および他臓器で発症した平滑筋肉腫におけるLMP2の発現を示す図である。

【0032】

図15は、INFシグナル伝達経路とLMP2の発現の関係を示す図である。

【0033】

図16は、子宮平滑筋肉腫組織由来のJAK1キナーゼ遺伝子、STAT1遺伝子およびLMP2プ

50

ロモーターの変異を示す図である。

【0034】

図17は、子宮平滑筋肉腫組織由来のJAK1キナーゼ遺伝子、STAT1遺伝子およびLMP2プロモーターの変異を示す図である。

【0035】

図18は、各組織におけるLMP2の発現状況を示す図である。図18において、Nは、LMP2の発現を検査した組織の症例数を示す。

【0036】

図19は、pCEM9ベクター(LMP2遺伝子が含まれていない)またはpCEM9-LMP2ベクター(LMP2遺伝子がふくまれている)をヒト子宮平滑筋肉腫培養細胞(SKN細胞)に移入し、ネオマイシンにより選択された各ベクターを取り込んだ場合の、SKN細胞の増殖により形成されたコロニーの数を示す図である。1 μ gのpCEM9およびpLMP2 DNAを2 \times 10⁵細胞のDT細胞又はSKN細胞にトランスフェクトし、0.5または0.4mg/mlのG418を含む成長培地中でセレクトした。

10

【0037】

図20は、LMP2の発現が認められない子宮平滑筋肉腫細胞(SKN)に、遺伝子組換えによりLMP2を強制発現させ、SKN細胞の形態の変化を示す写真である。

【0038】

図21は、各細胞における形態の変化、細胞増殖速度、およびファイブロネクチンの発現状況のまとめを示す図である。

20

【0039】

図22は、LMP2を恒常的に発現させたSKN細胞が腫瘍形成能の指標であるコロニー形成を著しく低下していることを示す写真である。

【0040】

図23Aは、LMP2を恒常的に発現させたSKN細胞がヌードマウスへの移植実験により腫瘍形成能を著しく低下していることを示す写真である。

【0041】

図23Bは、LMP2を恒常的に発現させたSKN細胞がヌードマウスへの移植実験により腫瘍形成能を著しく低下していることを示す図である。

【0042】

30

図23Cは、pCEM9-LMP2ベクター(LMP2遺伝子が含まれている)を移入したヒト子宮平滑筋肉腫培養細胞(SKN細胞)のコロニー#121が、SKN細胞と比較してLMP2遺伝子を著しく発現していることを示す写真である。

【0043】

図24は、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の結果、LMP2を恒常的に発現させたSKN細胞(コロニー#121)では、細胞増殖を誘導するサイクリンEの発現が著しく低下していることを示す図である。

【0044】

図25は、サイクリンEプロモーターを含んだルシフェラーゼレポーター遺伝子の構造を示す図である。

40

【0045】

図26は、SKN細胞とLMP2を恒常的に発現しているSKN細胞(コロニー#121と#122)での、サイクリンEプロモーター活性を示す図である。子宮平滑筋肉腫培養細胞SKN細胞で認められた顕著なサイクリンEの発現は、LMP2の恒常的な発現により著しく低下した。

【0046】

図27は、ヒト子宮平滑筋肉腫組織におけるサイクリンEの顕著な発現を示す組織染色写真である。正常な子宮平滑筋層においては、サイクリンEの発現は認められないが、悪性腫瘍であるヒト子宮平滑筋肉腫組織では、サイクリンEの顕著な発現が認められる。

【0047】

図28は、ヒト子宮平滑筋肉腫組織における分裂期の核内でのサイクリンEの発現を示

50

す組織染色写真である。通常、細胞増殖を誘導するサイクリンEは、細胞増殖の開始期であるG1期に細胞質において過剰に発現し、速やかに核内へと移行しS期において染色体の合成を開始させる。その後、サイクリンEは、S期の後半から即座に分解される。したがって、正常な細胞のG2期とM期においては、サイクリンEの発現は認められない。しかし、ヒト子宮平滑筋肉腫組織において、分裂期の核内での顕著なサイクリンEの発現が認められる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0048】

本発明はLMP2をマーカーとして用いて、子宮平滑筋肉腫を検出する。ここで、検出とは、子宮平滑筋肉腫が存在するかどうかを判定すること、患者が子宮平滑筋肉腫に罹患しているかどうかを判定すること、子宮平滑筋の腫瘍が子宮平滑筋腫であるかまたは子宮平滑筋肉腫であるかを鑑別すること、子宮平滑筋肉腫の悪性度を判定すること等を含む。

10

【0049】

LMP2は、プロテアソームのサブユニットであり、本発明の方法においては、子宮平滑筋層において、LMP2が転写発現しているかどうかを検出する。ヒトの子宮平滑筋層の組織でのLMP2の転写発現を調べると、正常な子宮平滑筋層と子宮平滑筋腫では、LMP2の発現は陽性（中程度から強陽性）であるのに対して、子宮平滑筋肉腫では、LMP2の発現は陰性の部分が多く弱陽性の部分が若干認められる。従って、LMP2の転写発現を指標に子宮平滑筋腫に罹患しているかどうか、あるいは子宮平滑筋の腫瘍が子宮平滑筋腫か子宮平滑筋肉腫のいずれかであるかを鑑別診断することができる。また、良性腫瘍である子宮平滑筋腫ではLMP2の転写発現は強いものに対して、悪性化した腫瘍である子宮平滑筋肉腫ではLMP2の転写発現が著しく減弱する。このことは、LMP2の転写発現が子宮平滑筋細胞に認められる腫瘍に対して悪性度の指標になることを示す。

20

【0050】

さらに、本発明は、サイクリンE (CyclinE) をマーカーとして用いて、子宮平滑筋肉腫を検出する方法を包含する。サイクリンは、サイクリン依存性キナーゼの活性を調節する細胞周期で重要な役割を果たすタンパク質であり、サイクリンEは、ほ乳類細胞のG1期において作用するG1サイクリンの一つである。サイクリンEは、子宮平滑筋肉腫組織において、正常組織に比較して発現が著しく上昇するが、子宮平滑筋腫組織においては上昇しない。本発明においては、LMP2と同様に子宮平滑筋層において、サイクリンEが転写発現しているかどうかを検出する。サイクリンEの転写発現を指標に子宮平滑筋肉腫に罹患しているかどうか、あるいは子宮平滑筋の腫瘍が子宮平滑筋腫か子宮平滑筋肉腫のいずれかであるかを鑑別診断することができる。また、良性腫瘍である子宮平滑筋腫ではサイクリンEの転写発現は正常子宮平滑筋組織と比べて変化がないのに対して、悪性化した腫瘍である子宮平滑筋肉腫ではサイクリンEの転写発現が亢進する。さらに、通常、増殖期にある正常な細胞のG2期とM期においては、サイクリンEの発現は認められない。しかし、ヒト子宮平滑筋肉腫組織において、分裂期の核内での顕著なサイクリンEの発現が認められる。このことは、サイクリンEの転写発現が子宮平滑筋細胞に認められる腫瘍に対して悪性度の指標になることを示す。

30

【0051】

また、LMP2とサイクリンEを同時に検出してもよい。LMP2の転写発現が減弱し、かつサイクリンEの転写発現が亢進している場合、子宮平滑筋肉腫に罹患していると判断することができる。LMP2またはサイクリンE単独を指標とする場合よりも、LMP-2およびサイクリンEの両方を指標とした場合に、より正確に子宮平滑筋肉腫を検出することが可能である。

40

【0052】

本発明においては、子宮平滑筋肉腫に罹患しているかどうかの判断、子宮平滑筋の腫瘍が子宮平滑筋腫か子宮平滑筋肉腫のいずれかであるかの鑑別診断、および子宮平滑筋細胞に認められる腫瘍の悪性度の評価を含めて子宮平滑筋肉腫の検出と呼ぶ。

【0053】

50

本発明の方法においては、子宮平滑筋層におけるLMP2および/もしくはサイクリンEの転写もしくは発現のいずれかまたは両方を検出することにより、子宮平滑筋肉腫を検出することができる。LMP2またはサイクリンEの転写はLMP2またはサイクリンEをコードするmRNAを測定することにより検出することができ、LMP2またはサイクリンEの発現はLMP2またはサイクリンEタンパク質を測定することにより検出することができる。

【0054】

LMP2および/またはサイクリンEの転写を検出する場合、子宮平滑筋層の組織または細胞を生体試料として採取し、該試料中に含まれるLMP2および/またはサイクリンEをコードするmRNAを測定すればよい。mRNAの測定のためには、子宮平滑筋組織からバイオプシーにより組織の一部を採取し、また子宮平滑筋組織より綿棒等を用いて採取し、材料として用いる。組織の採取は、例えば通常の外来診察中に、子宮内腔にバイオプシー用のかん子を挿入し、1~2mm角程度の子宮組織片を採取すればよい。mRNAの測定は採取した組織または細胞からmRNAを抽出して行ってもよいし、組織切片標本を作製するか、または採取した細胞をスライドガラス上に固定し、*in situ* ハイブリダイゼーション法により染色して行ってもよい。あるいは、抽出したmRNAをノーザンブロット法やRT-PCR等の公知のRNA測定法により測定すればよい。mRNAの抽出は公知の方法、例えば、新化学実験講座2 核酸I 分離精製 東京化学同人 1991年7月10日や分子生物学実験プロトコールI 丸善株式会社 平成9年6月30日の記載に従って行うことができる。*in situ* ハイブリダイゼーションは、例えば分子生物学実験プロトコールIII 丸善株式会社 平成9年8月30日の記載に従って行うことができる。この際、LMP2および/またはサイクリンEをコードするmRNAを特異的に測定するために、LMP2および/またはサイクリンEをコードするmRNAの部分配列に相補的な部分配列からなるプローブまたはプライマーを用いる。LMP2の塩基配列は公知であり(例えば、GenBank アクセッション番号U01025、配列番号1、配列番号2はLMP2タンパク質のアミノ酸配列を示す)、公知の塩基配列情報に基づいて、プローブまたはプライマーを設計することができる。同様に、サイクリンEの塩基配列も公知であり(例えば、GenBank アクセッション番号M73812、配列番号8)該プライマーまたはプローブは、上記のLMP2および/またはサイクリンE遺伝子の断片であり、塩基の数は5~50、好ましくは10~30、さらに好ましくは15~25である。

【0055】

LMP2および/またはサイクリンEの発現を検出する場合、子宮平滑筋層の組織または細胞を生体試料として採取し、該試料中に含まれるLMP2および/またはサイクリンEタンパク質を測定すればよい。子宮平滑筋層の組織または細胞は上記のようにして採取すればよい。また、LMP2および/またはサイクリンEタンパク質の測定も、組織または細胞からタンパク質を抽出し、該抽出物中のLMP2および/またはサイクリンEタンパク質を測定してもよいし、免疫組織化学または免疫細胞化学の手法により行ってもよい。抽出したタンパク質の測定は、ELISA、ラジオイムノアッセイ等の公知の免疫測定法(イムノアッセイ)を用いればよい。この際、LMP2および/またはサイクリンEに対する抗体が必要であるが、抗LMP2抗体および/または抗サイクリンE抗体は公知の手法によりモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体として作製すればよい。また、市販の抗LMP2抗体および/または抗サイクリンE抗体を用いることもできる。抗体は必要に応じて、酵素、蛍光物質、放射性同位元素により標識して用いるが、抗体の標識は公知の方法により行うことができる。免疫組織化学または免疫細胞化学の手法による測定は、採取した子宮平滑筋組織切片標本を作製するか、採取した細胞をスライドガラス上に固定して行う。免疫組織化学の手法による測定のためには、組織を例えば、ホルマリンで固定し、パラフィン中に包埋し、ミクロトーム等の薄切装置で1~5 μ m程度の厚さの切片標本を作製し、測定時にキシレンやエタノール処理等によりパラフィンを除去し、生理食塩水または緩衝液に浸して親水化すればよい。染色は、酵素、蛍光物質、放射性同位元素等で標識した抗LMP2抗体および/または抗サイクリンE抗体を用いてもよいし、抗LMP2抗体を切片標本中のLMP2および/またはサイクリンEに結合させた後に、抗LMP2抗体および/または抗サイクリンE抗体に結合する2次抗体であって酵素、蛍光物質等で標識した2次抗体を用いてもよい。標識に用い

10

20

30

40

50

る酵素として、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等が挙げられ、蛍光物質として、例えばフルオレセイン、ローダミン等が挙げられる。また、公知のビオチン-アビジン複合体を利用して染色してもよい。免疫細胞化学は採取した細胞をホルマリン等によりスライドガラス上に固定し、免疫組織化学の手法と同様の方法で細胞中のLMP2および/またはサイクリンEを可視化すればよい。免疫組織化学または免疫細胞化学において、染色は顕微鏡や肉眼で判断することもできるし、適当な光学的測定装置を用いてもよい。免疫組織化学による染色は、例えば分子生物学実験プロトコールIII丸善株式会社平成9年8月30日刊行の記載に従って行うことができる。

【0056】

上記のように、子宮平滑筋組織または細胞におけるLMP2の転写または発現を検出し、LMP2の転写または発現が喪失しているか、または低下している場合、子宮平滑筋肉腫に罹患していると判定することができる。また、子宮平滑筋組織または細胞におけるサイクリンEの転写または発現を検出し、サイクリンEの転写または発現が亢進している場合、子宮平滑筋肉腫に罹患していると判定することができる。さらに、LMP2とサイクリンEの両方の転写または発現を同時に検出してもよい。LMP2の転写または発現が喪失しているか、または低下しており、なおかつサイクリンEの転写または発現が亢進している場合、子宮平滑筋肉腫に罹患していると判定することができる。例えば、組織または細胞の抽出物中のLMP2 mRNAもしくはLMP2タンパク質またはサイクリンE mRNAもしくはサイクリンEタンパク質を測定する場合、あらかじめ子宮平滑筋肉腫に罹患していない正常人の単位重量組織または単位細胞数当りのLMP2 mRNAもしくはLMP2タンパク質またはサイクリンE mRNAもしくはサイクリンEタンパク質を測定する。正常人の値よりLMP2 mRNAまたはLMP2タンパク質が有意に低い場合、子宮平滑筋肉腫に罹患していると判定し得、正常人の値よりサイクリンE mRNAまたはサイクリンEタンパク質が有意に高い場合、子宮平滑筋肉腫に罹患していると判定し得る。

【0057】

また、組織または細胞のLMP2の転写または発現をin situ ハイブリダイゼーション、免疫組織化学、免疫細胞化学により検出する場合、組織または細胞が染色されず、LMP2の転写、発現が認められない場合は、その部分の組織または細胞は子宮平滑筋肉腫組織または細胞であり、組織または細胞を採取した患者は子宮平滑筋肉腫に罹患していると判定することができる。さらに、組織または細胞のサイクリンEの転写または発現をin situ ハイブリダイゼーション、免疫組織化学、免疫細胞化学により検出する場合、組織または細胞が強く染色され、サイクリンEの転写、発現が強く認められる場合は、その部分の組織または細胞は子宮平滑筋肉腫組織または細胞であり、組織または細胞を採取した患者は子宮平滑筋肉腫に罹患していると判定することができる。この際、子宮平滑筋肉腫でない正常組織および子宮平滑筋肉腫組織の染色組織切片標品または染色細胞標品をあらかじめ作製しておき、該標品と比較してもよい。

【0058】

LMP2の転写または発現の検出は、子宮平滑筋腫瘍に罹患した患者の腫瘍が悪性か良性か、すなわち、子宮平滑筋肉腫かそれとも子宮平滑筋腫かの鑑別に利用することもできる。この場合、LMP2の転写または発現が喪失しているか、正常組織に比較して有意に低下している部分の組織は、悪性の子宮平滑筋肉腫であると判定することができる。また、サイクリンEの転写または発現の検出は、子宮平滑筋腫瘍に罹患した患者の腫瘍が悪性か良性か、すなわち、子宮平滑筋肉腫かそれとも子宮平滑筋腫かの鑑別に利用することもできる。この場合、サイクリンEの転写または発現が、正常組織に比較して有意に亢進している部分の組織は、悪性の子宮平滑筋肉腫であると判定することができる。この際、LMP2およびサイクリンEの両方を検出することにより、悪性度についてより正確な判断が可能になり、また、より正確に鑑別を行なうことができる。さらに、組織を用いたin situ ハイブリダイゼーションまたは免疫組織化学の手法によれば、組織のどの部分が正常でどの部分が子宮平滑筋肉腫部分かを鑑別することもできる。さらに、例えば、組織切片の単位体積当り、または単位細胞数当りのLMP2および/またはサイクリンEの転写または発現が喪失し

10

20

30

40

50

ているかまたは低下している細胞の数を測定することにより、子宮平滑筋腫瘍の悪性度を判定することができる。

【0059】

さらに、従来の子宮平滑筋肉腫の診断方法と本発明のLMP2および/またはサイクリンEの転写または発現を指標に子宮平滑筋肉腫を診断する方法を組合せることにより、より精度の高い検出を行うことができる。従来法として、細胞の形態、密度等を観察する方法、またはミオシンの転写または発現を指標に子宮平滑筋肉腫を診断する方法が挙げられ、これらの方法は主に組織または細胞を固定して行われてきた。すなわち、組織切片標本または細胞スライドガラス標本を作製し、該標本の細胞の形態や密度を測定し、さらに、ミオシンの転写または発現を測定し、さらに、LMP2および/またはサイクリンEの転写または発現を測定すればよい。

10

【0060】

本発明は、さらにLMP2遺伝子を子宮平滑筋肉腫患者に投与することにより、子宮平滑筋肉腫を治療する方法、LMP2遺伝子を含む遺伝子治療のための遺伝子治療剤も包含する。遺伝子治療における目的の遺伝子の子宮平滑筋肉腫患者への導入は公知の方法により行うことができる。遺伝子を患者への導入する方法として、ウイルスベクターを用いる方法および非ウイルスベクターを用いる方法があり、種々の方法が公知である(別冊実験医学、遺伝子治療の基礎技術、羊土社、1996; 別冊実験医学、遺伝子導入&発現解析実験法、羊土社、1997; 日本遺伝子治療学会編、遺伝子治療開発研究ハンドブック、エヌ・ティー・エス、1999)。遺伝子導入のためのウイルスベクターとしては、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス等のウイルスベクターを用いた方法が代表的なものである。無毒化(ウイルス自身の複製が起こらない)したレトロウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンピスウイルス、センダイウイルス、SV40、免疫不全症ウイルス(HIV)等のDNAウイルスまたはRNAウイルスに目的とする遺伝子を導入し、細胞に組換えウイルスを感染させることによって、細胞内に遺伝子を導入することが可能である。また、プラスミドベクター等の遺伝子発現ベクターを用いて、LMP2遺伝子を細胞や組織に導入することができる。例えば、リポフェクション法、リン酸-カルシウム共沈法、DEAE-デキストラン法、微小ガラス管を用いたDNAの直接注入法などにより細胞内へ遺伝子を導入することができる。また、内包型リポソーム(internal liposome)による遺伝子導入法、静電気型リポソーム(electrostatic type liposome)による遺伝子導入法、HVJ-リポソーム法、改良型HVJ-リポソーム法(HVJ-AVEリポソーム法)、HVJ-E(エンベロープ)ベクターを用いた方法、レセプター介在性遺伝子導入法、パーティクル銃で担体(金属粒子)とともにDNA分子を細胞に移入する方法、naked-DNAの直接導入法、種々のポリマーによる導入法等によっても、組換え発現ベクターを細胞内に取り込ませることが可能である。この場合に用いる発現ベクターとしては、生体内で目的遺伝子を発現させることのできるベクターであれば如何なる発現ベクターも用いることができるが、例えばpCAGGS(Gene 108, 193-200(1991))や、pBK-CMV、pcDNA3、pZeoSV(インビトロゲン社、ストラタジーン社)、pVAX1などの発現ベクターが挙げられる。

20

30

【0061】

LMP2遺伝子を含むベクターは、遺伝子を転写するためのプロモーターやエンハンサー、ポリAシグナル、遺伝子が導入された細胞の標識および/または選別のためのマーカー遺伝子等を含んでいてもよい。この際のプロモーターとしては、公知のプロモーターを用いることができる。

40

【0062】

LMP2遺伝子を含む遺伝子治療剤は、LMP2遺伝子を含むベクターならびに薬理的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤を含む。担体、希釈剤、賦形剤としては、製剤分野において通常用いられるものを用いることができる。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、ステアリン酸マグネシウムなどが使用される。注射用の水性液としては、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが使用され、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール、プロピレングリコールなどのポリアルコール、非イオン界面活性剤

50

などと併用しても良い。油性液としては、ゴマ油、大豆油などが使用され、溶解補助剤としては安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用しても良い。本発明の遺伝子治療剤は、子宮平滑筋肉腫部位に局所投与することが好ましく、例えば子宮平滑筋肉腫部位に注射により投与すればよい。

【 0 0 6 3 】

投与量は、症状、年齢、体重などによって異なるが、子宮平滑筋肉腫患者体内でLMP2を発現する発現ベクター等に挿入されたLMP2遺伝子は、数日または数週間または数ヶ月おきに1回あたり、0.001mg~100mgを子宮平滑筋肉腫部位に注射等により直接投与すればよい。

【 0 0 6 4 】

本発明は、さらにインターフェロン (IFN-) シグナル伝達カスケードに關与する特定の因子における変異により子宮平滑筋肉腫に罹患しているか否か、または子宮平滑筋肉腫に罹患するリスクを有しているか否かを判定する方法をも包含する。

10

【 0 0 6 5 】

正常細胞においては、IFN- によりLMP2の遺伝子は活性化されるのに対して、子宮平滑筋肉腫細胞においては、IFN- によるLMP2の活性化はほとんど認められない。IFN- によるLMP2の活性化は、図15にメカニズムを示すようにJAK1キナーゼ、JAK2キナーゼ、STAT1などを介して、IRF-1が発現誘導され、LMP-2遺伝子のプロモーターに結合することにより生じる。IFN- シグナル伝達に關与する因子のうち、JAK1キナーゼ及びSTAT1遺伝子の変異、並びにLMP2のプロモーター領域の変異によりシグナル伝達が遮断され、LMP-2の発現が阻害される。

20

【 0 0 6 6 】

変異は以下のとおりである。以下、例えば遺伝子の変異をA210Gで表した場合、遺伝子の塩基配列の21番目のAがGに置換していることを示す。また、遺伝子のコードするタンパク質のアミノ酸配列の変異をG871Eで表した場合、アミノ酸配列中、871番目のグリシン(G)がグルタミン酸(E)に置換していることを示す。

【 0 0 6 7 】

JAK1キナーゼにおける変異

遺伝子変異	対応アミノ酸変異	変異の存在するドメイン
A2612A	G781E	ATP binding
G2626A	G876R	ATP binding
G2642T	C881F	ATP binding
A2967C	G986P	active site
A2960C	Y987S	active site
A2985T	R995S	active site

30

JAK1キナーゼ遺伝子の塩基配列を配列番号3に、JAK1キナーゼのアミノ酸配列を配列番号4に示す。

【 0 0 6 8 】

STAT1における変異

遺伝子変異	対応アミノ酸変異	変異の存在するドメイン
A2104C	I702L	non kinase active region
T2128G	S710A	non kinase active region
T2078G	L693R	non kinase active region
A2148C	R716S	non kinase active region

40

STAT1遺伝子の塩基配列を配列番号5に、STAT1のアミノ酸配列を配列番号6に示す。

【 0 0 6 9 】

LMP2プロモーター

遺伝子変異	対応アミノ酸変異	変異の存在するドメイン
A210G		IRF-E site
C214T		IRF-E site

50

A216G IRF-E site
 A217G IRF-E site
 G219A IRF-E site

LMP2プロモーターの遺伝子配列を配列番号7に示す。

【0070】

JAK1キナーゼ遺伝子、STAT1遺伝子およびLMP2プロモーターの全長DNAまたはその断片は塩基配列情報に基づいて容易に得ることができる。

【0071】

本発明は、上記のJAK1キナーゼ遺伝子、STAT1遺伝子またはLMP2プロモーターの塩基の変異を検出し、子宮平滑筋肉腫に罹患しているか否かを検出する方法若しくは子宮平滑筋肉腫に罹患するリスクが高いか否かを判定する方法、並びに上記のJAK1キナーゼまたはSTAT1のアミノ酸の変異を検出し、子宮平滑筋肉腫に罹患しているか否かを検出する方法若しくは子宮平滑筋肉腫に罹患するリスクが高いか否かを判定する方法を包含する。

10

【0072】

遺伝子における塩基の変異は、上記変異部位を含む遺伝子の断片をプローブとして、またはDNAチップ、DNAマイクロアレイ技術において固相化するDNAとして用いればよい。その場合の、断片の塩基長は全長でもよいが、通常は15bp~100bpが好ましく、さらに15bp~50bpが好ましく、特に18bp~30bpが好ましい。断片に含まれる変異部位は、1つだけでもよいし、複数、すなわち2個、3個、4個、5個または6個でもよい。

また、上記断片に相補的な配列を有するDNAも本発明の範囲である。相補的なDNAも本願明細書の開示に基づいて得ることができる。

20

【0073】

本発明のプローブは、検出のために蛍光物質、酵素、放射性同位体、化学発光物質等で標識されていてもよい。標識に用いる標識物質は、公知のものを用い、公知の方法で標識することができる。蛍光物質としては、例えば、Cy3、Cy5、ローダミン、フルオレセイン等が挙げられる。

【0074】

さらに、上記の遺伝子変異を検出するPCR-RFLP等のPCRに用いるプライマーも本発明の範囲である。すなわち、本発明は上記のJAK1キナーゼ遺伝子、STAT1遺伝子及びLMP2プロモーターの変異部位の3'側および5'側に存在する10から30塩基からなる部分配列からなる、DNA断片の増幅に用い得る一対のプライマーセットを包含する。

30

【0075】

変異は、本発明のDNAを用いてPCR法、サザンハイブリダイゼーション法、ノーザンハイブリダイゼーション法、定量的PCR法、in situ ハイブリダイゼーション法、FISH(Fluorescence In Situ Hybridization)、PCR-RFLP法、PCR-SSCP法等により、検出することができる。

【0076】

例えば、まずJAK1キナーゼ遺伝子、STAT1遺伝子またはLMP2プロモーターの変異塩基部分を含むヌクレオチド配列に相補的なプローブ、ならびに野生型遺伝子の該変異塩基部分に対応する部分を含むヌクレオチド配列に相補的なプローブを調製する。用いるプローブの長さに制限はなく、後述の核酸増幅法で増幅しようとする核酸断片の全長でもよいが、通常は15bp~100bpが好ましく、さらに15bp~50bpが好ましく、特に18bp~30bpが好ましい。プローブは、放射性同位元素、蛍光物質、酵素等で標識したものをを用いてもよい。次いで、子宮平滑筋組織から採取した組織または細胞検体試料中の変異塩基部分を含む遺伝子断片を核酸増幅法により増幅し、この増幅断片とプローブを反応させる。検体試料中のDNAが野生型、変異型のいずれのプローブとハイブリダイズするか調べることにより、上記遺伝子DNAに変異が生じているか否かを検出することができる。本発明のプローブは、1塩基のミスマッチを検出するため、そのハイブリダイゼーション条件は、ストリンジェントなものであることが必要である。ハイブリダイゼーション時の温度、塩濃度を調節することにより1塩基のミスマッチのみを検出し得るハイブリダイゼーション条件を選択す

40

50

ることが可能である。用いるプローブDNAの長さにも依存するが、例えば具体的には、ナトリウム濃度が150～900mM、好ましくは600～900mMであり、温度が60～68℃、好ましくは65℃での条件で行い得る。

【0077】

核酸増幅の際に用いるプライマーとしては、上記遺伝子の変異部位を挟み増幅しようとする領域の端部と相補的な配列を用いることができる。増幅する領域の塩基長に制限はないが、数十から数百塩基とすることができる。増幅領域に上記JAK1キナーゼ遺伝子、STAT1遺伝子またはLMP2プロモーターDNAの変異を1つだけ含むように増幅塩基長を設定してもよいし、複数の変異、すなわち、2個、3個、4個、5個または6個の変異を含むように設定してもよい。また、プライマーを変異部位を含む領域に設定することも可能である。

10

【0078】

さらに、本発明のJAK1キナーゼ遺伝子、STAT1遺伝子またはLMP2プロモーター部位の変異を含むDNA配列またはその断片に相補的なDNAを用いて、子宮平滑筋肉腫に罹患しているか否か、または子宮平滑筋肉腫患の罹患のリスクを決定するためのDNAチップを作製することもできる。この際、本発明のJAK1キナーゼ遺伝子、STAT1遺伝子またはLMP2プロモーター部位の変異を含む部分に相補的なDNA断片をニトロセルロース、ナイロン等のメンブレン、スライドガラス等に固相化すればよい。この際、固相化するDNA断片の塩基長は、通常は15bp～100bpが好ましく、さらに15bp～50bpが好ましく、特に15bp～25bpが好ましい。

20

次いで、該DNAチップを放射性同位元素、酵素、蛍光色素等で標識した被験体由来のDNAまたはRNAと接触させ、ハイブリダイズを形成するか否かにより検体中に変異を有する核酸が含まれているかどうかを調べる。

【0079】

変異の検出は子宮平滑筋肉組織から採取した組織片、細胞から核酸を抽出して行なえばよい。

【0080】

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0081】

実施例1 ヒト子宮平滑筋肉腫におけるLMP2の転写および発現

30

本実施例においては、以下に記載する材料及び方法を用いて検討を行った。

【0082】

細胞株および培地

ヒト子宮平滑筋肉腫細胞株であるSKN細胞(RCB0513)は、理化学研究所セルバンクから購入し、0.6%のL-グルタミン(Invitrogen社)および15%の牛胎児血清(シグマ-オルドリッチ社)を補足したF-12Nutrient Mixture(Ham)培地(Invitrogen社)で維持した。HeLa細胞およびHeLa.S3細胞は0.6%のL-グルタミンおよび10%の牛胎児血清を補足したダルベッコのMEMで維持した。ヒト子宮平滑筋細胞はCambrex BioScience Wailersville社から購入し、メーカーのプロトコルに従って維持した。

40

【0083】

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)分析

TAP1、LMP2、 β -actinおよびアクチンの転写物をRT-PCRにより調べた。細胞を250ユニット/mlのヒトIFN- γ (Pepro Tech社)で処理しないかまたは48時間処理し、RNAを回収した。トータルRNAはTRIzol試薬(Invitrogen社)を用いメーカーのプロトコルに従って 5×10^6 細胞から調製した。RNAは、Superscript II enzyme(Invitrogen社)を用いて逆転写し、1本鎖cDNAをTAP1、LMP2、 β -actinおよびアクチン転写物を増幅するのに用いた。PCRは適切なプライマーを用いて、30秒94℃、35サイクル、30秒60℃、1.5分72℃および追加の5分のプログラムで行い、転写物を伸長させた(Cabrera CM. et al. (2003) Tissue Antigens, 61,211-219; Miyagi T. et al. (2003) J.Gastroenterol.Hepatol., 18, 32-40)。

50

【 0 0 8 4 】

免疫組織化学(Immunohistochemistry = IHC)

IHCは、Hsu SM. et al. (1981) J.Histochem.Cytochem. 29, 577-580に記載の方法によりアビジン-ビオチン複合体を用いて行った。すなわち、子宮平滑筋肉腫患者から得られた子宮摘出標本のパラフィン包埋サンプルから代表的な6つの5 μm組織切片を作製した。切片はパラフィン除去しアルコール中で再水和し、正常マウス血清を用いて20分間インキュベートした。次いで、切片を抗LMP2抗体(Affinity Res. Products社、希釈1/100)を用いて1時間室温でインキュベートした。その後、切片をビオチン化2次抗体(Dako社)とともにインキュベートした。反応を3、3'-ジアミノベンジジンを用いて完了し、スライドをヘマトキシリンで対比染色した。標本中の正常子宮平滑筋組織を陽性対照として用いた。組織切片からなる陰性対照も、1次抗体の代わりに正常ウサギIgGとともにインキュベ

10

【 0 0 8 5 】

免疫沈降反応およびイムノプロット

細胞質抽出物および核抽出物は250ユニット/mlのヒトIFN- γ で処理したか、または処理しない 5×10^6 細胞から調製した(Brucet M. et al. (2004) Genes Immun., 5, 26-35)。細胞を1200rpm、10分間の遠心分離により回収し、5mlの氷冷PBSで洗浄し、5分間、12000rpm、4℃で遠心分離した。細胞をペレット化し、0.4mlのバッファ-A(10mM Hepes、pH7.8; 10mM KCl; 2mM MgCl₂; 1mM DTT; 0.1mM EDTA; およびコンプリートプロテアーゼインヒビターカクテル(Kirkegaard&Perr Lab社)中で一度洗浄し、2時間、4℃でインキュベ

20

【 0 0 8 6 】

STAT1、リン酸化状態のSTAT1、JAK1、JAK2、TAP1およびLMP2発現を検出するために、細胞可溶化液または細胞質抽出物を10%SDS-ポリアクリルアミドゲル(SDS-PAGE)で分離し、抗STAT1抗体、抗リン酸化STAT1抗体(Santa-Cruz Biotechnol.社)、抗JAK1、抗JAK2抗体(C

30

【 0 0 8 7 】

図に示す時間250ユニット/mlのIFN- γ で処理するか処理しなかった 5×10^6 細胞からの細胞全体の抽出物を、50mM Tris-HCl、0.1mM EDTA、200mM NaCl、10%グリセロール、0.5%NP-40、1mM DTTおよびコンプリートプロテアーゼインヒビターカクテル(Kirkegaard&Perr Lab.社)を含むバッファで溶解した。細胞可溶化液は、正常ウサギの血清(Santa-Cruz Biotechnol.社)および20mlのプロテインG Sepharose(Amersham Biosciences社)であらかじめ清澄化し、次に、2 μgの抗JAK1または抗JAK2抗体を用いて免疫沈降を行った。サンプルを10%のSDS-PAGEで分離し、Immobilon-Pメンブランにトランスファーした。リン酸化タンパク質は、抗チロシンリン酸化抗体を1次抗体として反応させた後アルカリフォスファターゼを結合した2次抗体を用いてアルカリフォスファターゼ発色をメーカーのプロトコールに従って行うことで、可視化して検討された。IFN- γ R1鎖発現を検出するために、細胞全体のライセートは上述のように分離した。プロットは抗IFN- γ R1鎖抗体(PBL Biomedical研究所)を用いて行った。SKN細胞をpRK5コントロール(2 μg)またはJAK1発現ベクタ

40

50

ー (2 μ g) (St. Jude Children Research Hospital (テネシー州メンフィスのJ. Ihle博士から提供された)でトランスフェクトした。IFN- γ をトランスフェクト24時間後に添加し、細胞を回収の前さらに24時間インキュベートした。pCMV β -Galとの同時トランスフェクトをトランスフェクト効率を標準化するために行った。

【0088】

トランスフェクトおよびレポーターアッセイ

TAP1およびLMP2wt(TAP1 593-1/pGL3およびLMP2 1-593/pLG3)の構造ならびにそれらのIRF-E変異体プロモーター構築物の構造を図2に示す。トータル2 μ gのこれらのプラスミドDNA(University of South FloridaのK.L. Wright博士から提供を受けた)を、メーカーの推奨に従って、FuGENE 6 Transfection Reagent(Roche社)によりHeLaまたはSKN細胞中に移入した。すべての移入されたDNAには200ngのpCMV β -Gal(Tropix社)を内部トランスフェクト効率コントロールとして含んでいた。IFN- γ (最終濃度250ユニット/ml)をトランスフェクト24時間後に添加し、細胞をさらに24時間インキュベートした。最終的に、細胞を洗浄し、500 μ lの溶解バッファーで溶解し、Dual-Luciferase Reporter Assay System(Promega社)を用いてメーカーの指示に従って分析した。LMP2またはTAP1/pGL3の代わりにpGL3ベースで移入した細胞のルシフェラーゼ活性をバックグラウンドとして差し引いた。

【0089】

上記材料および方法を用いた検討により以下の結果が得られた。

【0090】

ヒト子宮平滑筋肉腫細胞中におけるIFN- γ によるTAP1およびLMP2発現の非誘導

LMP2欠損マウスは子宮平滑筋肉腫を発症した(Hayashi T. et al. (2002) Cancer Res., 62, 24-27)。次いで、ヒト子宮平滑筋肉腫がTAP1およびLMP2の弱い発現を示すか否かを示す必要がある。TAP1およびLMP2発現に対するIFN- γ の効果は、4種の細胞株を用いたイムノプロットにより調べた。IFN- γ 処理に続くHeLa、HeLa.S3、およびHu.USMC(対照)はTAP1およびLMP2の強い誘導を受けたが、ヒト平滑筋肉腫細胞株SKNにおけるIFN- γ 処理ではTAP1およびLMP2発現はそれほど誘導されなかった(図1a)。SKN細胞は、HeLa、HeLa.S3細胞の両方とHu.USMC(対照)と比べると、同じようなアクチン発現が認められたので、抽出物の調製工程はIFN- γ 処理に続くTAP1およびLMP2発現の非誘導に影響しなかった。このIFN- γ の量は、HeLa、HeLa.S3細胞の両方とHu.USMC中(図1a)のTAP1およびLMP2遺伝子の両方に共有されている双方向プロモーターを最大限に誘導するのに十分であった(図1a)。IFN- γ 量を500ユニット/mlまで増加させても、SKN細胞中でTAP1およびLMP2発現を顕著に誘導することはなかった。従って、SKN細胞はIFN- γ 処理によりTAP1およびLMP2発現を増強する能力を失っていた。

【0091】

IFN- γ 処理に続くTAP1およびLMP2発現の非誘導を立証するために、4種の細胞株を用いてRT-PCR分析を行った。IFN- γ 処理により誘導されたTAP1またはLMP2のいずれかのmRNA発現はHeLa、HeLa.S3細胞およびHu.USMCにおいて明確に検出されたが、IFN- γ 処理はSKN細胞中でTAP1およびLMP2のmRNA発現をそれほど誘導しなかった(図1b)。アクチン対照のmRNA発現は試験したすべての細胞中で同様の高いレベルで検出された。このことはRNA調製ステップがIFN- γ 処理に続くTAP1およびLMP2発現の非誘導に影響しなかったことを示す(図1b)。IHC実験により、正常子宮平滑筋細胞が6ケースにおいてLMP2を著しく発現したが、子宮平滑筋肉腫細胞では発現しなかったことが示された(図1c)。IHCの結果は、SKN細胞中でのTAP1およびLMP2の非誘導を立証した。

【0092】

TAP1およびLMP2遺伝子のIFN- γ に誘導される共通の双方向性プロモーター活性化の喪失

IRF-1はTAP1およびLMP2遺伝子に共有される双方向プロモーター中のIRF-Eと呼ばれるシスエレメントに直接結合する(Wright KL. et al. (1995) J.Exp.Med., 181, 1459-1471; White LC. et al. (1996) Immunity, 5, 365-376; Dovhey SE. et al. (2000) Cancer Res., 60, 5789-5796; Bruet M. et al. (2004) Genes Immun., 5, 26-35)。IRF-Eは図2に表されるように、NF κ B様結合部位およびGC1ボックスの上流に位置する。IFN- γ 処理

10

20

30

40

50

によるTAP1およびLMP2の発現増強にIRF-Eが必要であることが示された(Wright KL. et al . (1995) J.Exp.Med., 181, 1459-1471; White LC. et al. (1996) Immunity, 5, 365-376; Dovhey SE. et al. (2000) Cancer Res., 60, 5789-5796; Brucet M. et al. (2004) Genes Immun., 5, 26-35)。IFN- γ がSKN細胞においてTAP1/LMP2の共有された双方向のプロモーターを確実に活性化するかどうかを調べるために、SKN細胞およびHeLa細胞にTAP1またはLMP2の発現を誘導すべくIRF-Eがwtもしくはmutであるプロモーター-ルシフェラーゼコンストラクトDNAを移入した。HeLa細胞の場合、IFN- γ 処理により11倍のLMP2プロモーター活性が誘導され、さらに10倍のTAP1プロモーター活性が誘導された(図2)。しかしながら、SKN細胞中では、IFN- γ 処理の結果、TAP1/LMP2の共有された双方向のプロモーターの活性化誘導は認められなかった。IRF-Eの変異により、HeLa細胞中で認められたIFN- γ のTAP1/LMP2遺伝子発現を誘導する能力が失われた(図2)。これらの結果は内在性のmRNAレベルと一致しており、HeLa細胞中でのTAP1およびLMP2遺伝子の活性が強調しているが、SKN細胞では強調していないことを示す。IRF-E部位の変異はHeLa細胞およびSKN細胞の両方でベースとなる発現レベルをいくらか減少させた。このことはこの部位がLMP-2の発現において一定の役割を果たすことを示す。これらの結果は、IFN- γ 処理が、HeLa細胞中でTAP1/LMP2の共有されたプロモーター活性を強く誘導し得るが、SKN細胞中では誘導しないことを示す(図2)。

10

【0093】

実施例2 免疫組織化学によるヒト正常子宮平滑筋層、ヒト子宮平滑筋腫およびヒト子宮平滑筋肉腫の生検組織または手術摘出組織におけるLMP2の発現状況

20

ヒト正常子宮平滑筋層、ヒト子宮平滑筋腫およびヒト子宮平滑筋肉腫の顕微鏡観察
ヒト子宮平滑筋組織をバイオプシーまたは手術により採取し、顕微鏡観察した。

【0094】

図3はヒト正常子宮平滑筋組織を、図4は、ヒト子宮平滑筋腫およびヒト子宮平滑筋肉腫を、図5はヒト子宮内膜間質肉腫の顕微鏡写真を示す。

【0095】

上記顕微鏡観察により判定した、正常子宮平滑筋10例、子宮平滑筋腫6例、子宮内膜肉腫6例および子宮平滑筋肉腫(悪性度低)3例、子宮平滑筋肉腫(悪性度高)4例を用いて、免疫組織化学により各組織のLMP2発現を調べた。

【0096】

免疫組織化学は、前記の方法で行った。

30

【0097】

図6に、正常子宮平滑筋、子宮平滑筋腫および子宮平滑筋肉腫の免疫組織化学染色写真を示す。図に示すように、正常子宮平滑筋および子宮平滑筋腫は染色され、LMP2が発現されていることが確認された。しかし、子宮平滑筋肉腫では染色されなかったため、LMP2の発現が確認されなかった。

【0098】

図7に、子宮平滑筋肉腫の免疫組織化学染色写真を示す。図に示すように、同じ組織内で染色された部分と染色されない部分が存在した。

【0099】

各組織におけるLMP2の発現状況は以下のとおりであった。+は陽性、-は陰性、-/+はグレーゾーンであることを示す。

40

	LMP2発現
正常子宮平滑筋組織	++++
子宮平滑筋腫組織	++++
子宮内膜肉腫組織	-/+
子宮平滑筋肉腫(悪性度低)組織	-/+
子宮平滑筋肉腫(悪性度高)組織	-

【0100】

上記表に示されるように、悪性腫瘍である子宮平滑筋肉腫のみにおいて、顕著なLMP2の

50

発現低下が認められた。また、子宮平滑筋肉腫の組織でのLMP2の発現低下度は、悪性度に依存しており、LMP2の発現低下度合いは、子宮平滑筋肉腫の悪性度の指標と成りうるということが明らかとされた。

【0101】

実施例3 SKN細胞におけるLMP2の強制発現

1. SKN細胞におけるLMP2の強制発現による細胞形態の変化

LMP2の発現低下が、子宮平滑筋細胞において形質転換(癌化)に直接的に関与しているかについて検討を行った。LMP2の発現が認められない子宮平滑筋肉腫細胞(SK N)に、遺伝子組換えによりLMP2を強制発現させ、SKN細胞の形態を観察した。

【0102】

方法

LMP2発現プラスミドベクター(2 μ g)をSKN細胞(5 x 10⁵)内にFuGene6 (Roche, Indianapolis, IN)を用いメーカーのプロトコールに従って導入した。同プラスミドベクターを細胞に導入した3日後に、G418(ネオマイシン)を培養液に加えて(最終濃度200 μ g/ml)、LMP2発現プラスミドベクターが導入されたSKN細胞のみを選択した。LMP2の強制発現されたSKN細胞の細胞増殖能、細胞形態能について検討を行った。結果を図8、図9および図21に示す。図8、図9および図21に示すように、SKN細胞の増殖能は、倍加時間15.2時間だったのに対して、LMP2の強制発現されたSKN細胞の細胞増殖能は、倍加時間17.5時間となった。LMP2の発現により、SKN細胞の増殖速度が、倍加時間2時間遅くなった。また、細長い斜方形の細胞形態を持っているSKN細胞が、LMP2の強制発現により繊維芽細胞様(菱形)の細胞形態に変化したことが認められた。

【0103】

2. SKN細胞におけるLMP2の強制発現によるファイブロネクチンの発現の変化

一般的に転移能を有する悪性度の高い癌細胞は、細胞と細胞との接着因子(ファイブロネクチン)の著しい発現低下が認められる。LMP2の発現が認められない子宮平滑筋肉腫細胞(SK N)に、遺伝子組換えによりLMP2を強制発現させ、ファイブロネクチンの発現変化について検討を行った。

【0104】

LMP2の強制発現は実施例3と同様の方法で行った。ファイブロネクチンの発現は、抗ファイブロネクチン抗体(Rockland社)を用いた免疫染色法により検討した。また、コントロールとして、ヒト正常子宮平滑筋細胞:HuUSMCを用いた。

【0105】

SKN細胞における結果を図10に、ヒトHuUSMCにおける結果を図11に示す。また、図12には各細胞における形態の変化、細胞増殖速度、およびファイブロネクチンの発現状況のまとめを示す。

【0106】

図に示すように、SKN細胞にLMP2を強制発現させた場合、SKN細胞の形態と増殖速度が、正常の子宮平滑筋細胞に近づいた。また、SKN細胞にLMP2を強制発現させた場合、有意なファイブロネクチンの発現誘導が認められた。つまり、LMP2の強制発現により誘導されたファイブロネクチンの発現は、SKN細胞の持つ転移能の減弱の可能性を示唆している。

【0107】

実施例4 各組織におけるLMP2の発現

LMP2の発現は、子宮平滑筋組織のみならず、本来骨格筋組織および心筋組織においても認められる。ところが、LMP2の欠損により、平滑筋肉腫が発症するのは子宮平滑筋組織のみである。そこで、骨格筋、心筋および平滑筋におけるLMP2発現を調べた。また、免疫機構に必須であるRag1遺伝子を欠損させたマウスの骨格筋、心筋および平滑筋におけるLMP2発現を調べた。

【0108】

免疫組織化学は、生後1日目のマウス新生児のパラフィン包埋サンプルを用いて、前記の方法で行った。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 9 】

図 1 3 に免疫組織化学染色写真を示す。

【 0 1 1 0 】

実施例 5 子宮及び他の器官での平滑筋肉腫におけるLMP2の発現

ヒト子宮平滑筋肉腫の組織においてLMP2の発現の著しい消失が確認された。平滑筋肉腫は、子宮以外にも種々の臓器においても発症するが、LMP2の発現の消失は子宮平滑筋肉腫に特異的に認められるものが検討した。

【 0 1 1 1 】

方法

病理ファイルより、子宮平滑筋肉腫(悪性度高い)4症例、子宮平滑筋肉腫(悪性度低い)4症例、子宮上皮平滑筋肉腫1症例、子宮内膜間質肉腫1症例、子宮平滑筋腫1症例、正常子宮平滑筋1症例、後腹膜原発平滑筋肉腫1症例、大網原発平滑筋肉腫1症例、小腸原発平滑筋肉腫1症例、腸管膜原発平滑筋肉腫1症例を選び、各疾患の組織におけるLMP2の発現を抗ヒトLMP2抗体を用いた免疫組織染色により検討した。

10

【 0 1 1 2 】

図 1 4 に示されるように、正常な子宮平滑筋組織や子宮平滑筋腫(良性腫瘍)において認められた顕著なLMP2の発現が、子宮平滑筋肉腫(悪性腫瘍)では著しく減弱していることを再確認した。子宮内膜間質肉腫1症例ではLMP2の発現が認められなかったが、子宮上皮平滑筋肉腫1症例においてはLMP2の発現が有意に認められた。腹部・消化器系組織に発症した平滑筋肉腫においては、顕著なLMP2の発現が認められる場合もあるが、著しいLMP2の発現の減弱が認められる場合もある。これまでのGene Copy Number Profilingのゲノム解析より、子宮平滑筋肉腫の発症機序は、他の臓器における平滑筋肉腫の発症機序とは大きく異なっている可能性が示されている。実施例 5 の結果より、LMP2の発現の消失は子宮平滑筋肉腫に特異的に認められる現象と思われる。

20

【 0 1 1 3 】

実施例 6 IFN- γ シグナル伝達因子の変異と子宮平滑筋肉腫の関係

「子宮平滑筋肉腫において特異的に認められるLMP2発現の著しい減弱」について再検討し、その特異性を確立した。具体的には、ヒト正常子宮平滑筋組織21症例、子宮平滑筋腫24症例、子宮内膜間質肉腫6症例、子宮平滑筋肉腫29症例についてLMP2の発現を抗ヒトLMP2抗体を用いた免疫組織染色により検討した。図 1 8 に示されるように、子宮平滑筋肉腫において特異的に認められるLMP2発現の著しい減弱性を確認した。

30

【 0 1 1 4 】

LMP2の発現は、図 1 5 に示される様にIFN- γ の刺激により顕著に誘導される。子宮平滑筋肉腫において特異的に認められるLMP2発現の著しい減弱は、IFN- γ のシグナル伝達因子：JAK1、JAK2、STAT1、PKC δ 、PI3K、LMP2のpromoter領域の変異や欠損による不活性化に起因している可能性が考えられる。そこで、IFN- γ のシグナル伝達因子：JAK1、JAK2、STAT1、LMP2のpromoter領域の変異について検討した。

【 0 1 1 5 】

方法

手術により摘出されたヒト子宮体部組織13症例から平滑筋肉腫組織部位のみと正常な平滑筋組織部位のみをレーザーマイクロダイセクションにより切り取り回収した。正常な子宮平滑筋組織13検体にヒト正常子宮平滑筋培養細胞1検体を加えた合計14検体、子宮平滑筋肉腫組織13検体にヒト子宮平滑筋肉腫培養細胞1検体を加えた合計14検体を用いてJAK1、JAK2、STAT1、LMP2のpromoter領域の変異について検討した。各検体をHMW溶液(10mM Tris-HCl pH8.0、150mM NaCl、10mMEDTA-NaOH pH8.0、0.1% SDS)-proteinase K (100mg/ml)に加えて55℃で24時間保温し、フェノール/クロロホルムにより不純物を取り除きゲノムDNAを精製した。JAK1分子内のATP結合領域をコードする遺伝子領域(A)とチロシンリン酸化酵素活性化領域をコードする遺伝子領域(B)の塩基配列を決定するために、遺伝子領域(A)と遺伝子領域(B)の各領域に対するPCR-primerを用いてそれぞれの領域を含むDNA断片を各検体より得られたゲノムDNAを用いてPCRにより増幅させた。PCRにより増幅されたDNA断片

40

50

をアガロースゲル電気泳動法により抽出し精製し、シーケンサー(ABI Prism3100 Genetic Analyzer)により塩基配列を決定した。さらに、JAK1の塩基配列を決定した方法と同様の手法を用いて、JAK2分子内のATP結合領域をコードする遺伝子領域(C)とチロシンリン酸化酵素活性化領域をコードする遺伝子領域(D)の塩基配列、STAT1分子内における転写因子活性化領域(701番目のチロシンと727番目のセリン)コードする遺伝子領域(E)の塩基配列、LMP2のpromoter領域をコードする遺伝子領域(F)の塩基配列を決定した。子宮平滑筋肉腫における特異的な変異を検出するために、同一子宮体部における子宮平滑筋肉腫組織部位と正常子宮平滑筋組織部位での塩基配列(AからE領域)を比較検討した。

【0116】

IFN- のシグナル伝達因子：JAK1、JAK2、STAT1、各因子におけるリン酸化酵素あるいは転写因子の活性化領域、LMP2のpromoter領域の変異解析の結果は、図16(変異を各検体ごとにまとめた図)と図17(変異を各因子ごとにまとめた図)に示している。

10

【0117】

実施例7 ヒト子宮平滑筋肉腫細胞における、LMP-2の恒常的発現による細胞形態と細胞増殖への影響

ヒト子宮平滑筋肉腫の組織において顕著なLMP2の発現低下が認められるが、LMP2の発現低下が、子宮平滑筋肉腫の発症に関与しているのか検討した。

【0118】

方法

SKN細胞を6穴プレートにおいて培養し、70%コンフルエントの際、HamF-12-15%Fcs培養液2mlを交換した。培養液を交換した次ぎの日、Roche社のプロトコールに従って、1穴に対して2 μ gのpCEM9ベクター(LMP2の遺伝子を含まない)またはpCEM-LMP2ベクター(LMP2の遺伝子を含んでいる)をFuGENE6(Roche社)によりSKN細胞に移入した。各ベクターの移入を行ったSKN細胞をCO₂インキュベーター内において37 $^{\circ}$ Cで48時間培養した後、SKN細胞をトリプシン処理によって剥がして100mm培養シャーレでCO₂インキュベーター内において37 $^{\circ}$ Cで48時間培養した。その後、G418(ネオマイシン)100 μ g/mlを含んだHamF-12-15%Fcs培養液で培養を行った。CO₂インキュベーター内において37 $^{\circ}$ Cで2週間培養すると、pCEM9ベクターまたはpCEM-LMP2ベクターが移入されたSKN細胞のみがG418によって選択的に生き残り増殖しコロニーを形成しているのが確認された。G418(ネオマイシン)含有培養液にて選択培養の3週間後、100mm培養シャーレ内における各ベクターが移入されたSKN細胞により形成されたコロニー数を数え、かつSKN細胞の細胞形態を観察した。

20

30

【0119】

図9および図20に示される様に、pCEM-LMP2ベクターが移入されたSKN細胞の形態が、線維芽細胞様(Flat revertant)に変化していることが確認された。全般的に、(A)SKN細胞のもともとの形態を維持している細胞のみで形成されているコロニー、(B)線維芽細胞様(Flat revertant)に形態が変化している細胞が一部存在しているコロニー、(C)線維芽細胞様(Flat revertant)に形態が変化している細胞のみで形成されているコロニーが確認された。(A)(B)(C)の各カテゴリーに属するコロニーの数は、図19に示している。また、(A)(B)(C)の各カテゴリーに属する細胞の増殖速度をトリパンプルーにより染色法により検討を行ったところ、(A)カテゴリーでは、P.D.T.(Population doubling time = 倍加時間)15.2時間、(B)カテゴリーでは、P.D.T.=16.8時間、(C)カテゴリーでは、P.D.T.=17.8時間となった。ヒト子宮平滑筋肉腫培養細胞SKN細胞において、恒常的なLMP2の発現は、細胞形態が線維芽細胞様(Flat revertant)に変化させ、細胞速度が遅くなることが確認された(図9、図20および図21)。

40

【0120】

通常、転移能を有する悪性度の高い癌細胞は、細胞と細胞との繋がりが粗になり1つの細胞のみでも増殖が可能となる。特に、細胞間のマトリックス構造を形成するファイブロネクチンの発現が、転移能を有する悪性度の高い癌細胞において著しく低下することが知られている。SKN細胞は、転移能を有する悪性度の高い平滑筋肉腫細胞であるため、ファイブロネクチンの発現が著しく低いと思われる。そこで、(A)(B)(C)の各カテゴリーに属

50

するSKN細胞をLabtech Chamber Slide (IWAKI社)において培養し、顕微鏡下において80%コンフルエントの状況を確認した後、公知の方法に従って抗ヒト-ファイブロネクチン抗体(Rockland社)によりファイブロネクチンの発現状況を確認した。図10と図11で示されている様に、正常なヒト子宮平滑筋培養細胞:N.HuUSMCでは、ファイブロネクチンが顕著に発現しマトリックス構造を形成していることが確認されたが、ヒト子宮平滑筋肉腫培養細胞:SKN細胞では、ファイブロネクチンの発現は僅かでありマトリックス構造の形成が認められなかった。しかし、線維芽細胞様(Flatrevertant)のSKN細胞において、LMP2の恒常的な発現によりファイブロネクチンの発現が認められたが、ファイブロネクチンのマトリックス構造の形成は確認されなかった(図10)。SKN細胞におけるLMP2の恒常的な発現による細胞形態、細胞増殖とファイブロネクチンの発現状況への影響に関する結果が、

10

【0121】

図21に示されているように、SKN細胞が本来有する腫瘍形成能が、LMP2の発現により有意に低下すると予測される。そこで、Low Attachment Flat Chamber 24穴(Costar社)を用いて、線維芽細胞様(Flatrevertant)のSKN細胞(SKN-Imp2細胞)とSKN細胞(SKN-pCEM9細胞)における腫瘍形成能の指標となるコロニー形成能を検討した。Low Attachment Flat Chamber 24穴(Costar社)の1穴あたりSKN-Imp2細胞(#121)(1×10^4 個)あるいはSKN-pCEM9細胞(1×10^4 個)を培養して、コロニー形成を顕微鏡下で観察した。図22で認められる様に、培養開始3週間目において、SKN-pCEM9細胞が大きなコロニーを形成して増殖しているのを確認出来たが、一方、SKN-Imp2細胞はコロニーを形成しているが、SKN-pCEM9細胞と比較すると明らかにコロニーは小さく増殖能が低いことが認められた。Low Attachment Flat Chamberを用いた実験では、SKN-Imp2細胞(コロニー#121)は、コロニー形成能が低いことから、腫瘍形成能が著しく低下していることが認められた。そこで、免疫が欠損しているヌードマウス(日本クレア社)を用いて、SKN-pCEM9細胞とSKN-Imp2細胞(コロニー#121)における腫瘍形成能の検討を行った。ヌードマウス(日本クレア社)メス(6週齢)5匹を購入し、SKN-pCEM9細胞(1×10^6 個)をマウスの背中の右側に皮内接種し、SKN-Imp2細胞(#121)(1×10^5 個)をマウスの背中の左側に皮内接種し計時的に腫瘍形成を観察した。皮内接種4週間後、SKN-pCEM9細胞(1×10^6 個)はヌードマウスの皮内において増殖し顕著な腫瘍形成(腫瘍体積 980mm^3)が認められた。一方、SKN-Imp2細胞(コロニー#121)(1×10^5 個)はヌードマウスの皮内において増殖せず、顕著な腫瘍形成(腫瘍体積 90mm^3)が認められなかった(図23Aおよび23B)。ヒト子宮平滑筋培養細胞SKN細胞において、LMP2の恒常的な発現は、腫瘍形成能を顕著に低下させることを認めた(図23A~23C)。

20

30

【0122】

実施例8 子宮平滑筋肉腫における顕著なサイクリンEの発現

ヒト子宮平滑筋培養細胞SKN細胞において、LMP2の恒常的な発現は、(1)SKNの細胞形態を線維芽細胞様(Flatrevertant)に変化させる、(2)SKN細胞の増殖速度を有意に低下させる、(3)SKN細胞の有する腫瘍形成能を顕著に低下させる、以上3つの生物学的特長を認めた。そこで、SKN細胞において、LMP2の恒常的な発現によりどのような因子の発現に顕著な変化が認められるのか、SKN-pCEM9細胞とSKN-Imp2細胞間において遺伝子発現のプロファイリングを行った。

40

【0123】

方法

SKN-pCEM9細胞とSKN-Imp2細胞とを100mmディッシュ4枚ずつでCO₂インキュベーター内において37℃で、80%コンフルエントの状況まで(シャーレ1枚あたり 2×10^6 個の細胞が増殖)培養した。各細胞をトリプシンによって剥がして回収し、1XPBSによって細胞を洗った。シャーレ1枚あたりTRIzol(インビトロジェン社)2mlの割合で、各細胞をTRIzolに溶かした(細胞が完全にTRIzolに溶けるように10分間穏やかに振揺させる)。TRIzol 1mlあたりクロロホルム200μlの割合で、TRIzol溶液にクロロホルムを加えて10分間穏やかに振揺させる。10分間の振揺後、7000rpm、室温、20分間の条件で遠心を行い、水層と有機層に分離して中間層を採取しない様に水層を採取した。水層に含まれているトータルRNA

50

を公知の方法を精製した。上記の手法により、SKN-pCEM9細胞よりトータルRNA 152.3 μg 、SKN-1mp2細胞よりトータルRNA 128.8 μg 得られた。各トータルRNA 100 μg を調整して、遺伝子発現のプロファイリングを行った。

【 0 1 2 4 】

マイクロアレイ遺伝子発現のプロファイリングの結果の一部を図 2 4 に示す。SKN-pCEM9細胞において顕著な発現が認められたサイクリンEが、SKN-1mp2細胞においては殆ど発現が認められない。つまり、SKN細胞では、LMP2を恒常的に発現により細胞増殖を誘導するサイクリンEの発現が著しく低下された。

【 0 1 2 5 】

トランスフェクトおよびレポーターアッセイ

サイクリンEのプロモーター領域の活性化によりルシフェラーゼ遺伝子が発現誘導されるレポータープラスミド(p10-4-Luc) (Department of Cancer Biology, Mayo Clinic Comprehensive Cancer CenterのE. A. Thompson博士から提供を受けた)の構造を図 2 5 に示す。p10-4-LucレポータープラスミドとLMP2発現プラスミドpCEM9-Lmp2とを図に示した内容にしたがって、トータル 2 μg のプラスミドをメーカーの推奨に従って、FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche)によりSKN細胞、SKN-1mp2細胞(クローン#121と#122)中に移入した。すべての移入されたDNAには200ngのpCMV -Gal (Tropix社)を内部トランスフェクト効率コントロールとして含んでいた。トランスフェクト後、各細胞をCO₂インキュベーター内において37 °Cで48時間培養した。最終的に、細胞を洗浄し、500 μl の溶解バッファーで溶解し、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega社)を用いてメーカーの指示に従って分析した。

【 0 1 2 6 】

上記材料および方法を用いた検討により以下の結果が得られた。

【 0 1 2 7 】

ヒト子宮平滑筋肉腫培養SKN細胞において、LMP2の恒常的発現によりサイクリンEのプロモーター活性が顕著に低下された。

【 0 1 2 8 】

マイクロアレイ遺伝子発現のプロファイリングの結果の一部を図 2 4 に示す。SKN-pCEM9細胞において顕著な発現が認められたサイクリンEが、SKN-1mp2細胞においては殆ど発現が認められない。つまり、SKN細胞では、LMP2を恒常的に発現により細胞増殖を誘導するサイクリンEの発現が著しく低下された。次いで、SKN細胞において、LMP2の恒常的発現がサイクリンEのプロモーター活性を有意に抑えることを確認する必要がある。サイクリンEのプロモーター活性に対するLMP2の恒常的発現の効果は、3種のSKN細胞株(SKN-pCEM9, SKN-1mp2#121, SKN-1mp2#122)を用いたレポーターアッセイにより検討された。SKN細胞において、LMP2の発現の無い環境では、顕著に活性化されたサイクリンEのプロモーターが認められた(図 2 6)。しかし、LMP2が発現している環境では、サイクリンEのプロモーターの著しい活性化が認められなかった(図 2 6)。また、SKN-pCEM9細胞においては、サイクリンEのプロモーターの著しい活性化が認められたが、SKN-1mp2細胞においては、サイクリンEのプロモーターの著しい活性化が認められなかった(図 2 6)。ヒト子宮平滑筋肉腫培養SKN細胞において、LMP2の恒常的発現によりサイクリンEのプロモーター活性が顕著に低下されることが確認された。

【 0 1 2 9 】

図 2 6 は、SKN細胞とLMP2を恒常的に発現しているSKN細胞(クローン#121と#122)での、サイクリンEプロモーター活性を示す図である。子宮平滑筋肉腫培養細胞SKN細胞で認められた顕著なサイクリンEの発現は、LMP2の恒常的な発現により著しく低下した。つまり、SKN細胞では、LMP2の発現誘導が起こらないため、細胞増殖誘導因子であるサイクリンEの発現抑制が認められないと思われる。サイクリンEの遺伝子を欠損させた細胞は、通常に細胞増殖するが、外部からの刺激等による形質転換には耐性であることが明らかである。したがって、顕著なLMP2の発現誘導が起こらないためサイクリンEの発現制御が起こらないことが、ヒト子宮平滑筋肉腫の発症に関与していると考えられる。そこで、ヒト子宮

10

20

30

40

50

平滑筋肉腫の組織でのサイクリンEの発現状況を、抗ヒトサイクリンE抗体を用いた免疫組織染色法によって検討した。図27で示されている様に、同一切片内にて、正常なヒト子宮平滑筋組織部位では認められないサイクリンEの発現が、ヒト子宮平滑筋肉腫組織部位に鮮明に認められた。ヒト子宮平滑筋肉腫14症例において検討した結果、正常な子宮平滑筋層においては、サイクリンEの発現は認められないが、悪性腫瘍であるヒト子宮平滑筋肉腫組織では、サイクリンEの顕著な発現が認められることが明かとなった。

【0130】

図28は、ヒト子宮平滑筋肉腫組織における分裂期の核内でのサイクリンEの発現を示す組織染色写真である。通常、細胞増殖を誘導するサイクリンEは、細胞増殖の開始期であるG1期に細胞質において過剰に発現し、速やかに核内へと移行しS期において染色体の合成を開始させる。その後、サイクリンEは、S期の後半から即座に分解される。したがって、正常な細胞のG2期とM期においては、サイクリンEの発現は認められない。しかし、ヒト子宮平滑筋肉腫組織において、分裂期の核内での顕著なサイクリンEの発現が認められる。つまり、サイクリンEの発現は、ヒト子宮平滑筋肉腫の鑑別マーカーとして有用である。

10

【産業上の利用可能性】

【0131】

子宮平滑筋におけるLMP2および/またはサイクリンEの転写または発現を調べることで、子宮平滑筋組織に子宮平滑筋肉腫が存在するかどうかを検出することができ、LMP2の転写または発現が著しく低い場合および/またはサイクリンEの転写または発現が高い場合に平滑筋肉腫が存在すると判定することができる。従来は、細胞の形態、密度、増殖速度等を指標に子宮平滑筋肉腫を検出していたが、本発明の方法によれば、容易にかつ確実に子宮平滑筋肉腫を検出することができる。さらに、本発明の方法によれば、子宮平滑筋の腫瘍が子宮平滑筋腫であるか子宮平滑筋肉腫であるか鑑別することができ、さらに、子宮平滑筋肉腫の悪性度を判定することができる。

20

【0132】

また、本発明のLMP2および/またはサイクリンEをマーカーとして用いる方法と、従来から用いられていた細胞の形態、密度等を指標にする方法および/またはミオシンをマーカーとして用いる方法を組合せることにより、確実に子宮平滑筋肉腫を検出することができる。

30

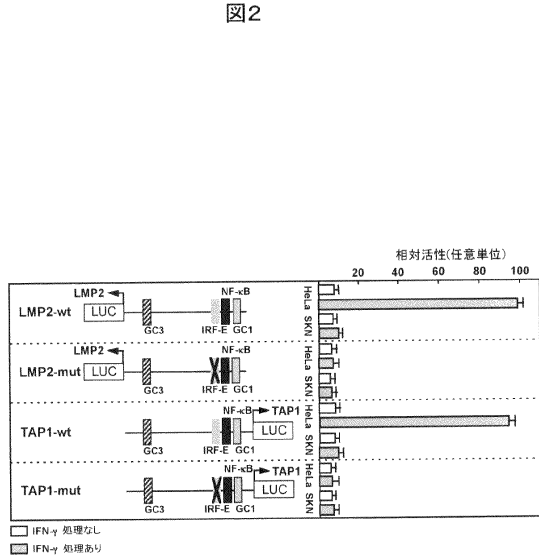
【0133】

さらに、IFN-シグナル伝達因子であるJAK1キナーゼ遺伝子、STAT1遺伝子およびLMP2プロモーターの変異と子宮平滑筋肉腫の発症が密接に関連しており、上記遺伝子またはプロモーターの変異を検出することにより、子宮平滑筋肉腫に罹患しているか否か、および子宮平滑筋肉腫に罹患するリスクがあるか否かを判定することができる。

【0134】

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

【 図 2 】



【 図 1 2 】

図 1 2

LMP2遺伝子発現細胞での生物学的および増殖性における特性			
細胞株	形態	倍加時間 (時)	ファイブプロネクチン 発現
オリジナルSKN	形質転換	15.2	(-/+)
SKN-LMP2 (-/+)	形質転換	15.4	(+)
SKN-LMP2 (+++)	線維芽細胞様形態	17.3	(+++)
UISMC (正常ヒト子宮平滑筋細胞)	線維芽細胞様形態	19.4	(++++)

【 図 1 4 】

図 1 4

患者	診断	LMP2	
子宮	086823	平滑筋肉腫	-
	02010255	平滑筋肉腫	-
	04001622	平滑筋肉腫	-/+
	05001052	平滑筋肉腫	-
	900092	低悪性度子宮平滑筋肉腫	-
	92003523	低悪性度子宮平滑筋肉腫	-
	93006520	低悪性度子宮平滑筋肉腫	-/+
	97001517	低悪性度子宮平滑筋肉腫	-
	03011251	子宮上皮平滑筋肉腫	-
	04004486	子宮内膜間質肉腫	-
他の腫瘍	0503533	平滑筋腫	++
	01009296	正常平滑筋細胞	++
他の腫瘍	95002965	後腹膜原発 eiomyosarcoma	-
	99007593	大網原発 eiomyosarcoma	++
	01011511	小腸原発(GIST) eiomyosarcoma	-
	04009854	腸間膜原発 eiomyosarcoma	-

【 図 1 6 】

図 1 6

患者	JAK1キナーゼ	LMP2プロモーター領域	STAT1(701Y,727S) ⁴	JAK2キナーゼ	LMP2
SKN cells #1	G781E(ATP) ¹	A210G	(I702L) ⁵	wt	Neg.
#2	wt	C214T(IRF-E) ³	wt	wt	Neg.
#3	wt	C214T, G219A(IRF-E)	(S710A) ⁵	wt	Neg.
#4	Q86P(活性) R86S(活性) ²	wt	wt	wt	P.Posi.
#5	G876P(ATP)	wt	wt	wt	Neg.
#6	C881F(ATP)	wt	wt	wt	Neg.
#7	wt	A216G(IRF-E)	(L693R) ⁵	wt	Neg.
#8	wt	wt	wt	wt	Neg.
#9	Y987S(活性)	A217G(IRF-E)	(R716S) ⁵	wt	P.Posi.
#10	wt	wt	(I702L) ⁵	wt	Neg.
#11	wt	wt	wt	wt	P.Posi
#12	wt	wt	wt	wt	Neg.
#13	Y987S(活性)	A216G(IRF-E)	wt	wt	Neg.

¹JAK1のATP結合領域
²JAK1のキナーゼ活性化部位
³インターフェロンγ(IFN-γ)受容体チロシンキナーゼ部分
⁴STAT1におけるTyr701またはSer727リン酸化
⁵STAT1の機能部位に実質は認められない
 Neg.=陰性
 P.Posi.=部分的陽性

【 図 17 】

子宮平滑筋肉腫におけるインターフェロニンβシグナル伝達経路の変異							
遺伝子 部位	座位	GenBank アクセッション No.	カウんティング	腫瘍	ヌクレオチド	アミノ酸 ドメイン	
JAK1	HUMFTKJAK1	M64174	NT_086582	ULMS	G2612A G2626A G2642T A2967C A2960C A2985T	G781E G878R C881F G986P Y987S R995S	ATP結合 ATP結合 ATP結合 活性化部位 活性化部位 活性化部位
JAK2	AF005216	AF005216	NT_008413.17	ULMS	ND ²	ND	ND
STAT1	NM_007315	NM_007315	NT_005403.16	ULMS	A2104C T2128G T2078G A2148C	I702L S710A L693R R716S	NA ³ NA NA NA
LMP2 ¹			NT_086680	ULMS	A210G C214T A216G A217G G219A		IRF-E部位 IRF-E部位 IRF-E部位 IRF-E部位 IRF-E部位

¹LMP2プロモーター領域
²未検出
³非キナーゼ活性化領域

図 17

【 図 18 】

図 18

	N	LMP2
正常	21	++++
平滑筋腫	24	++++
子宮内膜間質肉腫	6	+/-
平滑筋肉腫	29	-

【 図 19 】

図 19

ベクターDNA	コロニー数 ^a		
	pCEM9	pCEM9-LMP2	
G418 ^R (トータル)	59.2	54.3	(A)
部分的線維芽細胞様形態 ^b	0	26.3 (48.4%)	(B)
線維芽細胞様形態 ^c	0	16.0 (29.5%)	(C)

^a 観察されたトータルコロニー数。
かつこの数字はG418耐性コロニーのトータルの数を示す。
^b G418を用いた選択の1週間後に観察されたもの。
^c G418を用いた選択の3週間後に観察されたもの。

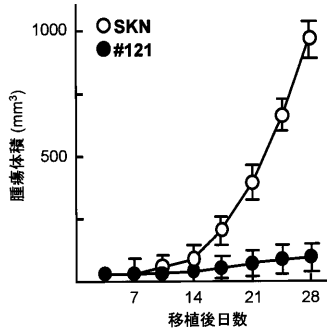
【 図 21 】

図 21

トランスフェクタントの生物学的/生長特性			
細胞株	形態	倍加時間(時間)	フィブロネクチンの発現
オリジナルSKN	形質転換	15.2	(-/+)
pCEM9 SKN	形質転換	15.3	(-/+)
SKN-LMP2(-/+)	形質転換	15.4	(+)
SKN-LMP2(+++)	線維芽細胞様形態	17.3	(++)
Cryo UHSMC (正常ヒト子宮平滑筋細胞)	線維芽細胞様形態	19.4	(++++)

【 図 2 3 B 】

図 2 3 B



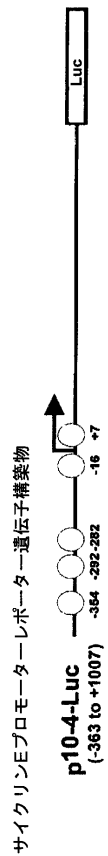
【 図 2 4 】

図 2 4

	SKN	#121	倍数
LMP2	P 63.0	P 348.2	5.53
サイクリンE	P 368.0	A 10.8	0.03
ERa	A 6.4	P 500.7	78.23
ERb	A 20.1	P 52.2	2.60
ミオシンVB	A 26.2	P 393.9	15.03

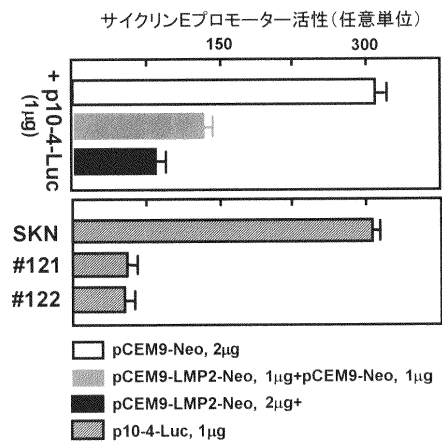
【 図 2 5 】

図 2 5



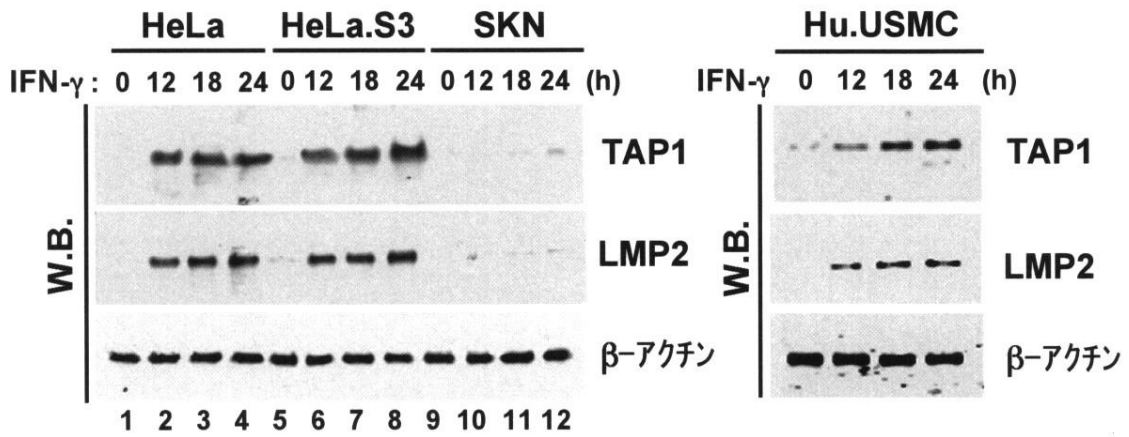
【 図 2 6 】

図 2 6



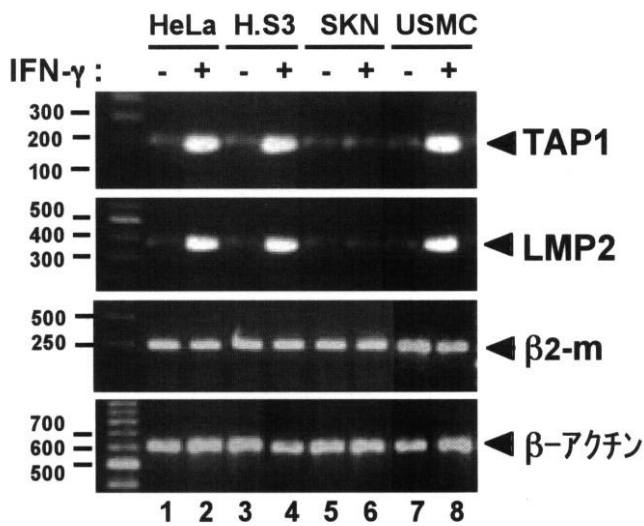
【 図 1 a 】

図 1 a



【 図 1 b 】

図 1 b



【図1c】

図1c

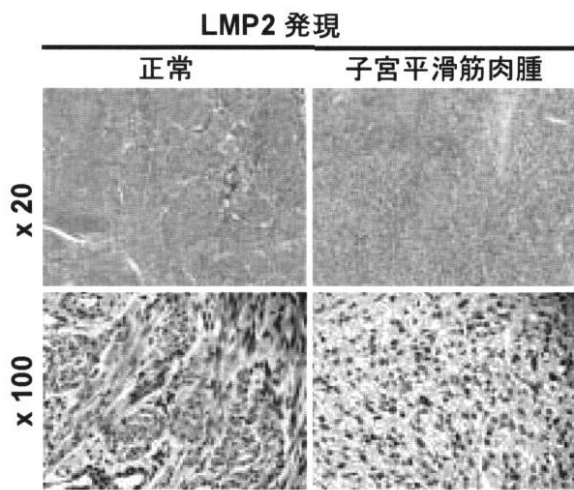
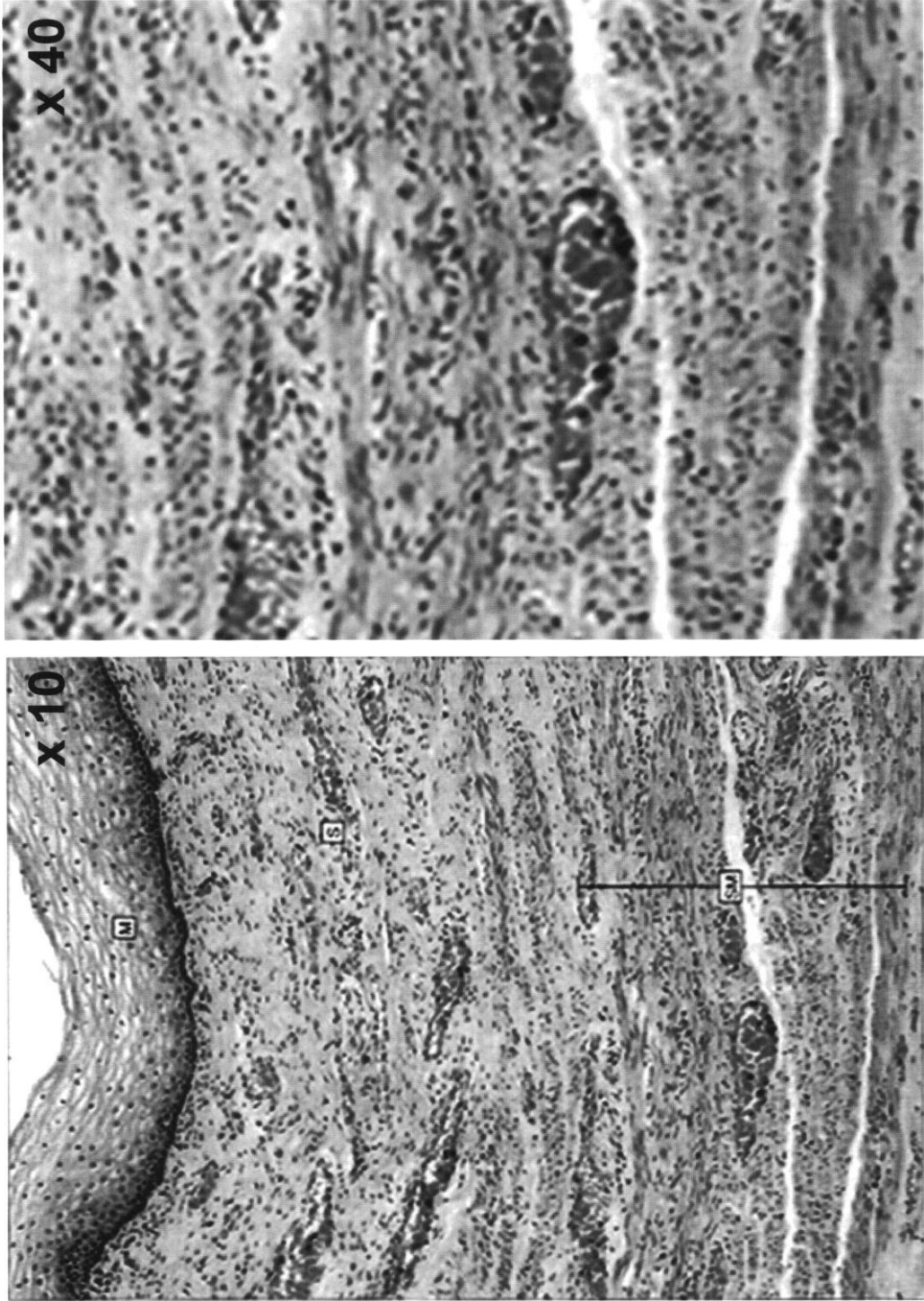


図 3

正常の子宮平滑筋組織

【 図 3 】



【 图 4 】

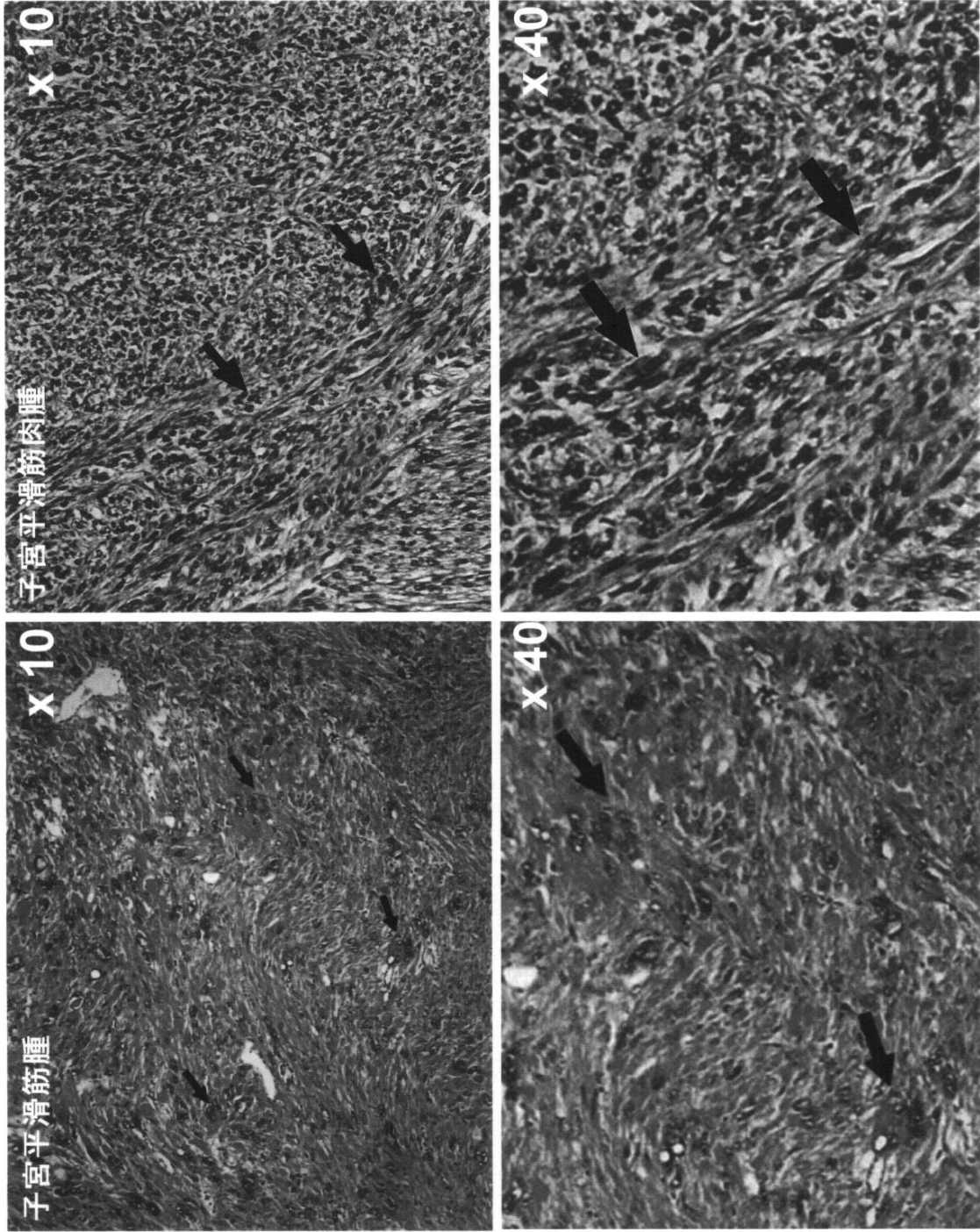
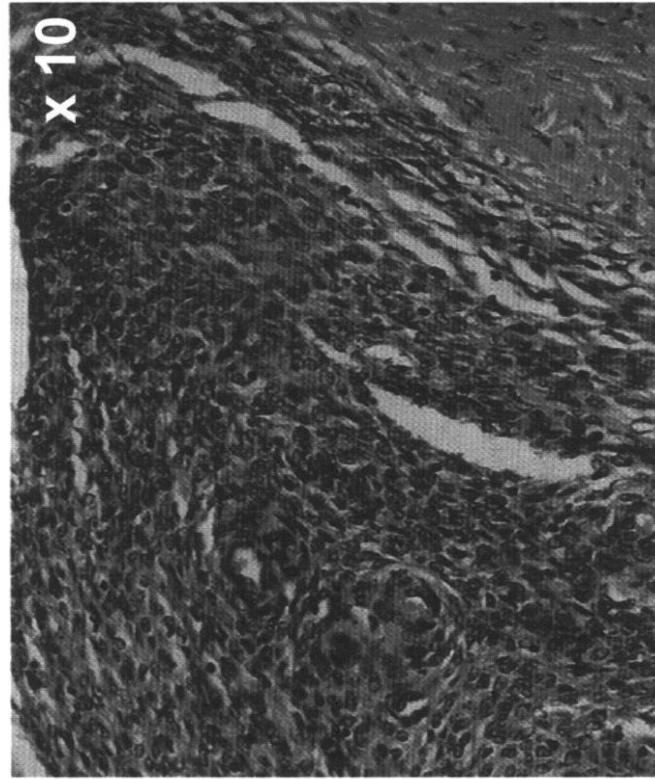


图 4

図5

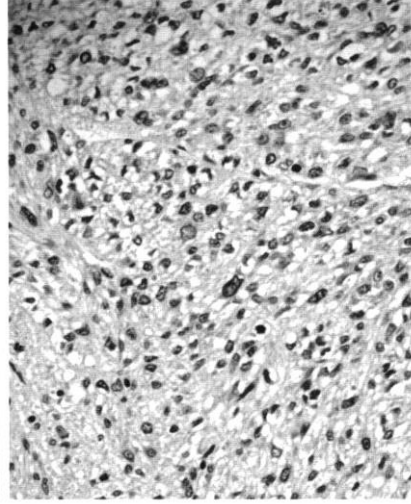
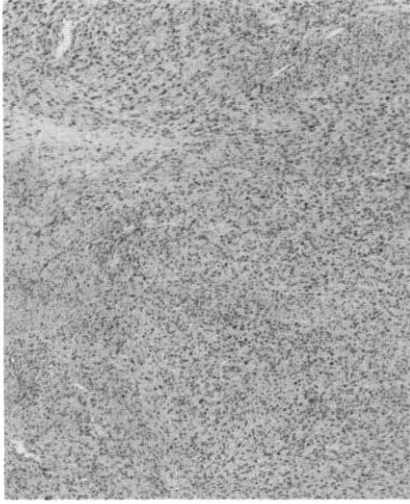
【図5】

子宮内膜間質肉腫

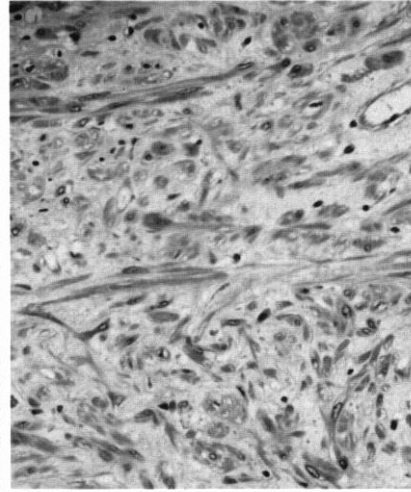
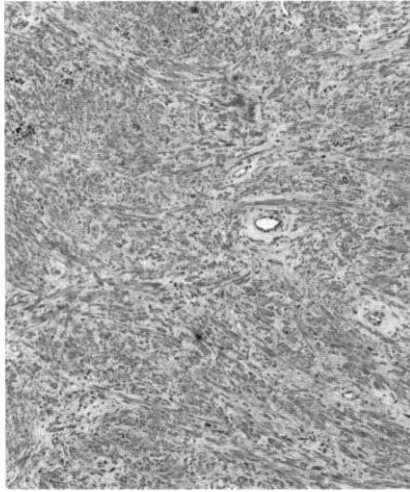


【图6】

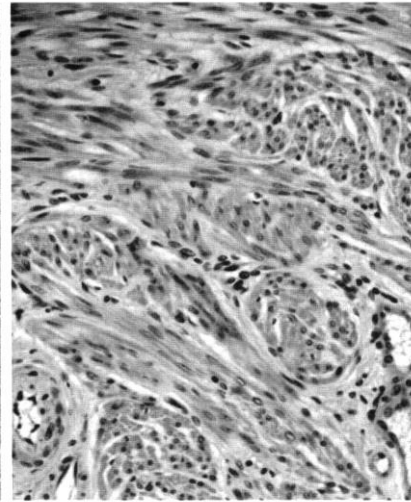
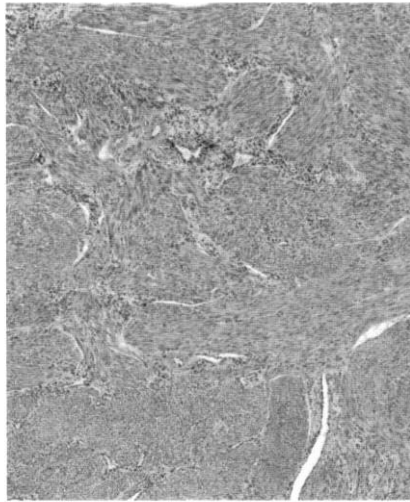
子宫平滑筋肉腫



子宫平滑筋腫



正常



X 20

X 100

图6

【 図 7 】

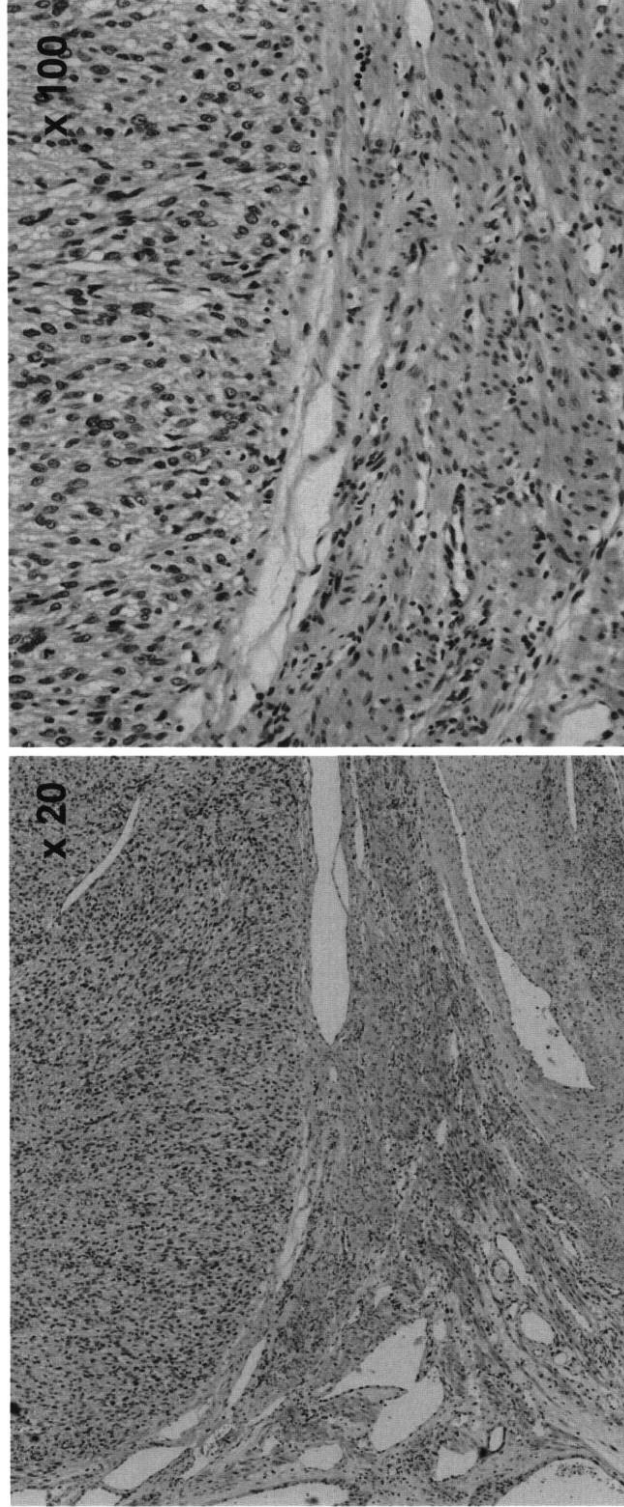
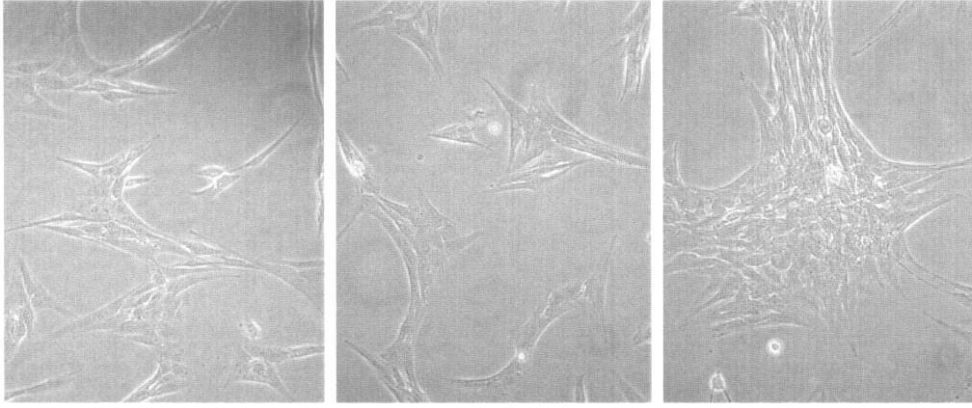


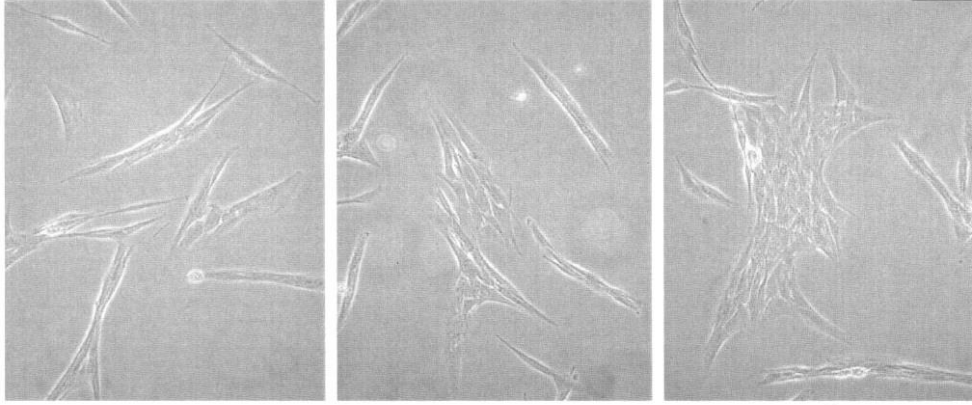
図 7

【 8 】

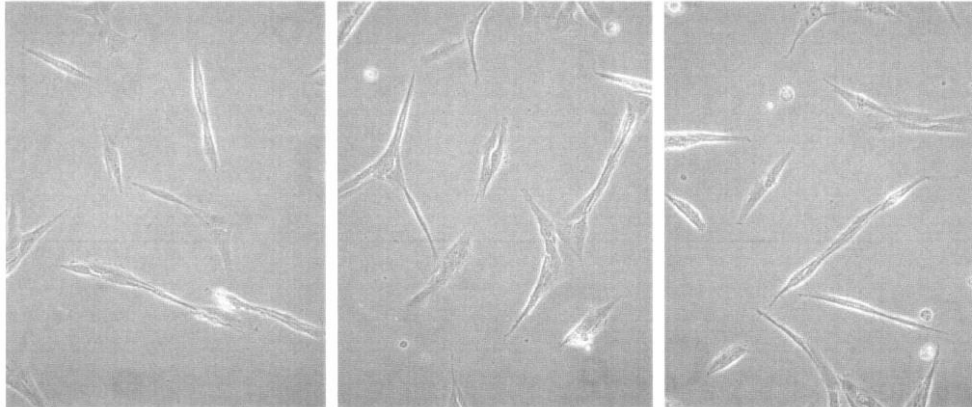
6日



3日



0



LMP2 (+)
G418 (+)

LMP2 (+)
G418 (-)

LMP2 (-)
G418 (-)

8

【 図 9 】

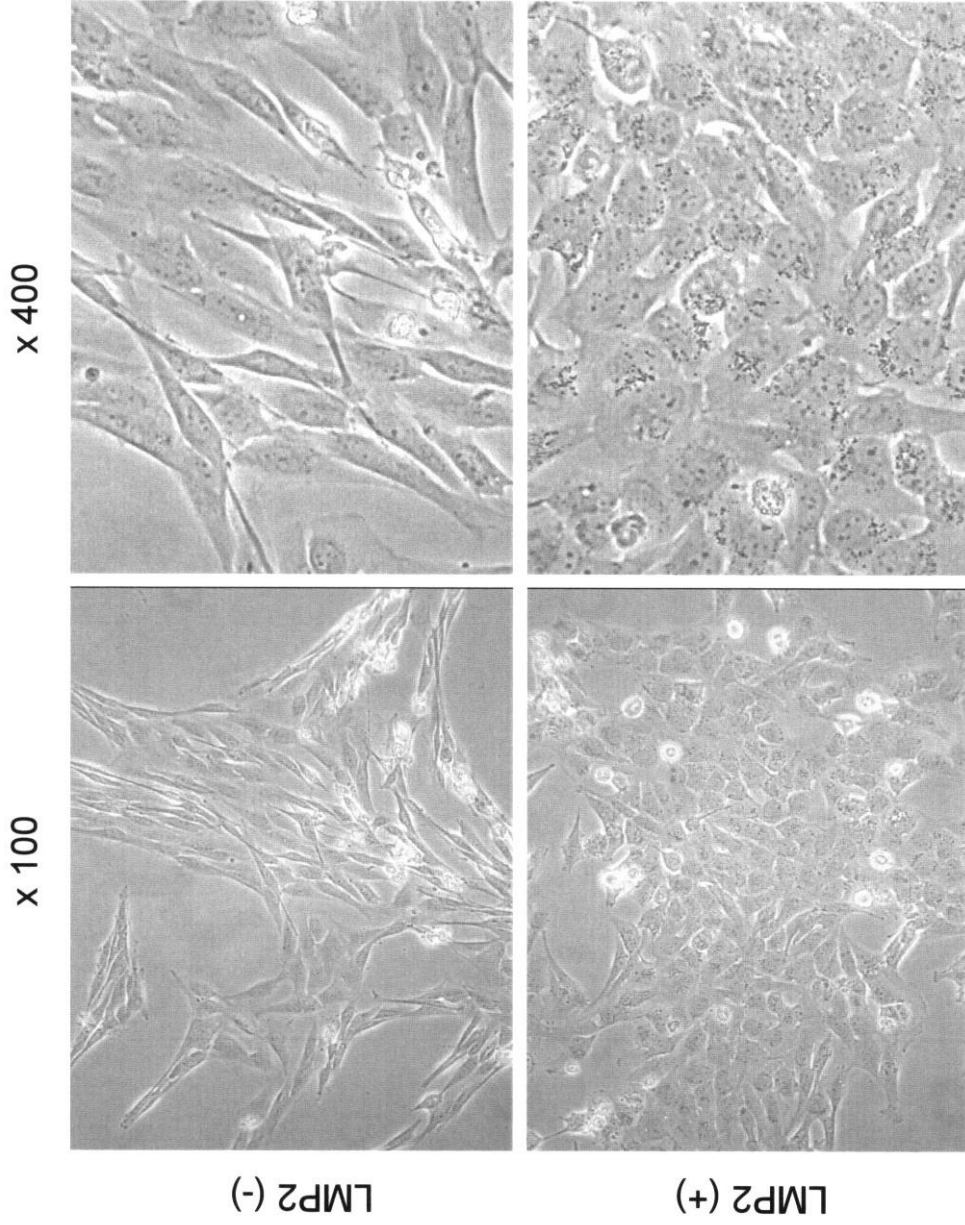
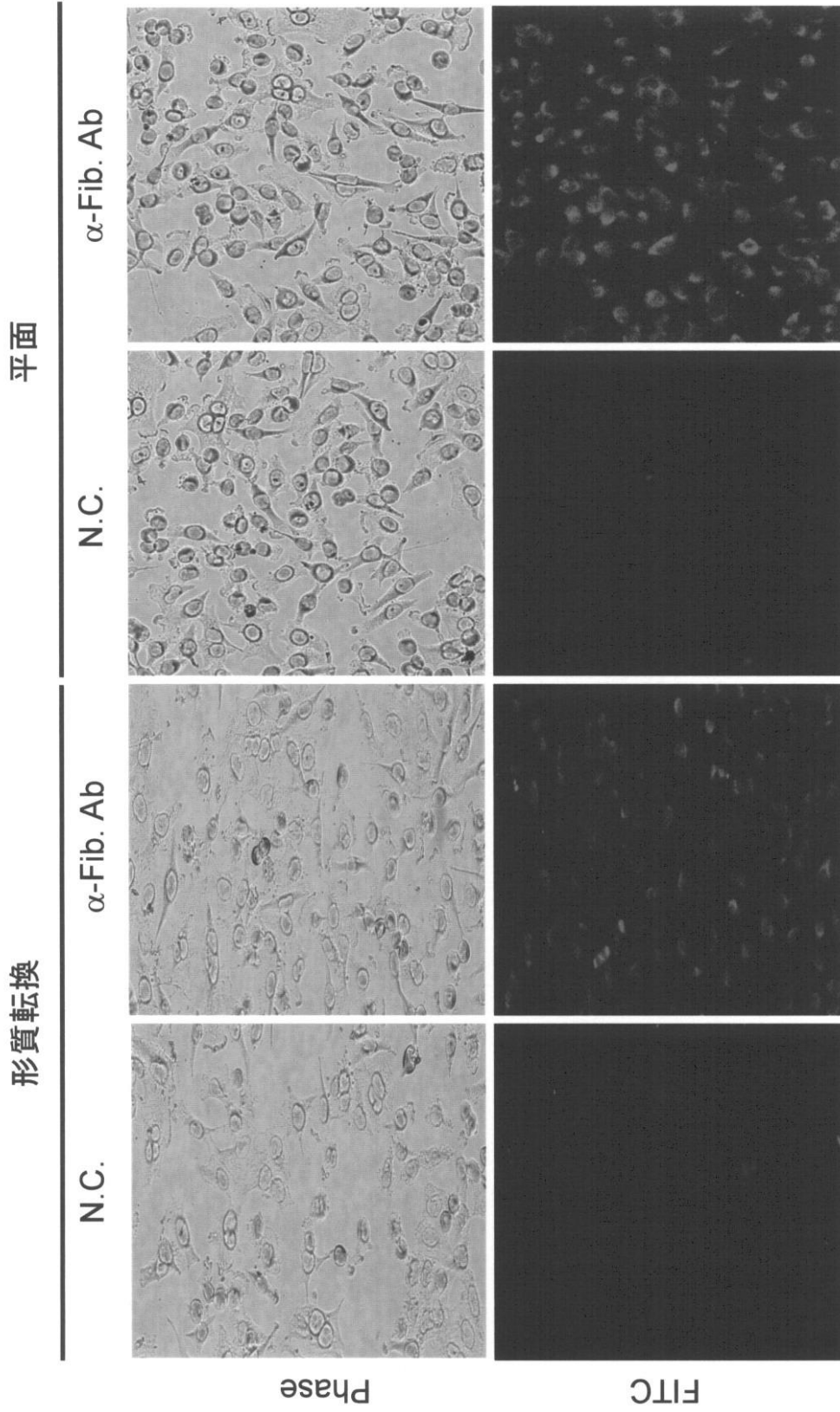


図 9

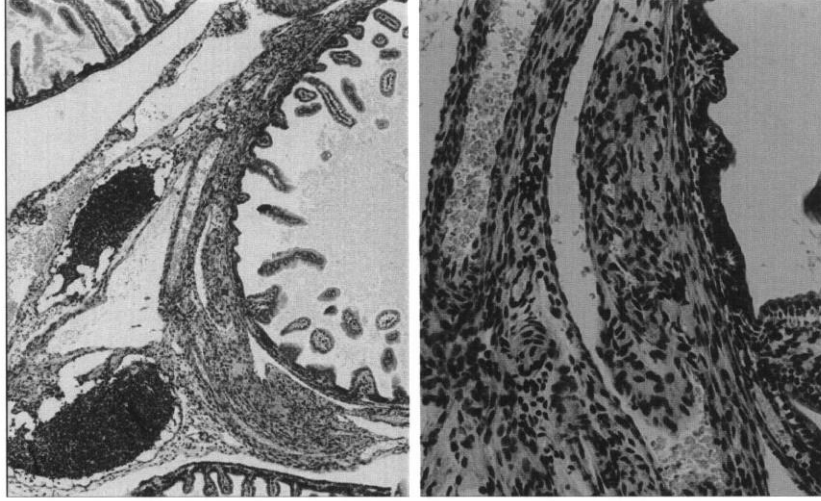
【 図 1 0 】

図10

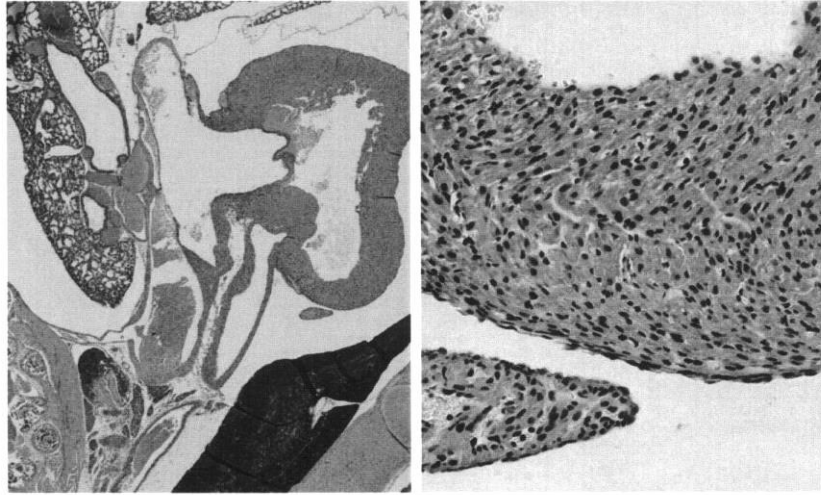


【图 13】

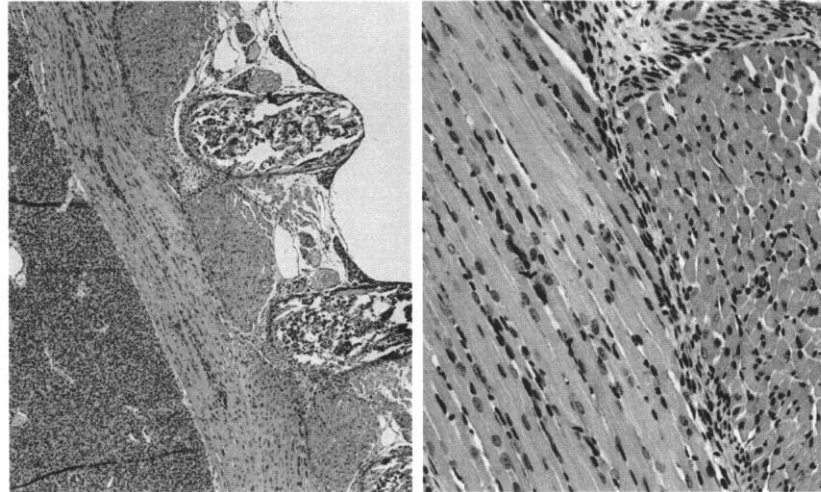
平滑筋



心筋



骨格筋



X 20

X 100

图 13

【 図 1 5 】

図 1 5

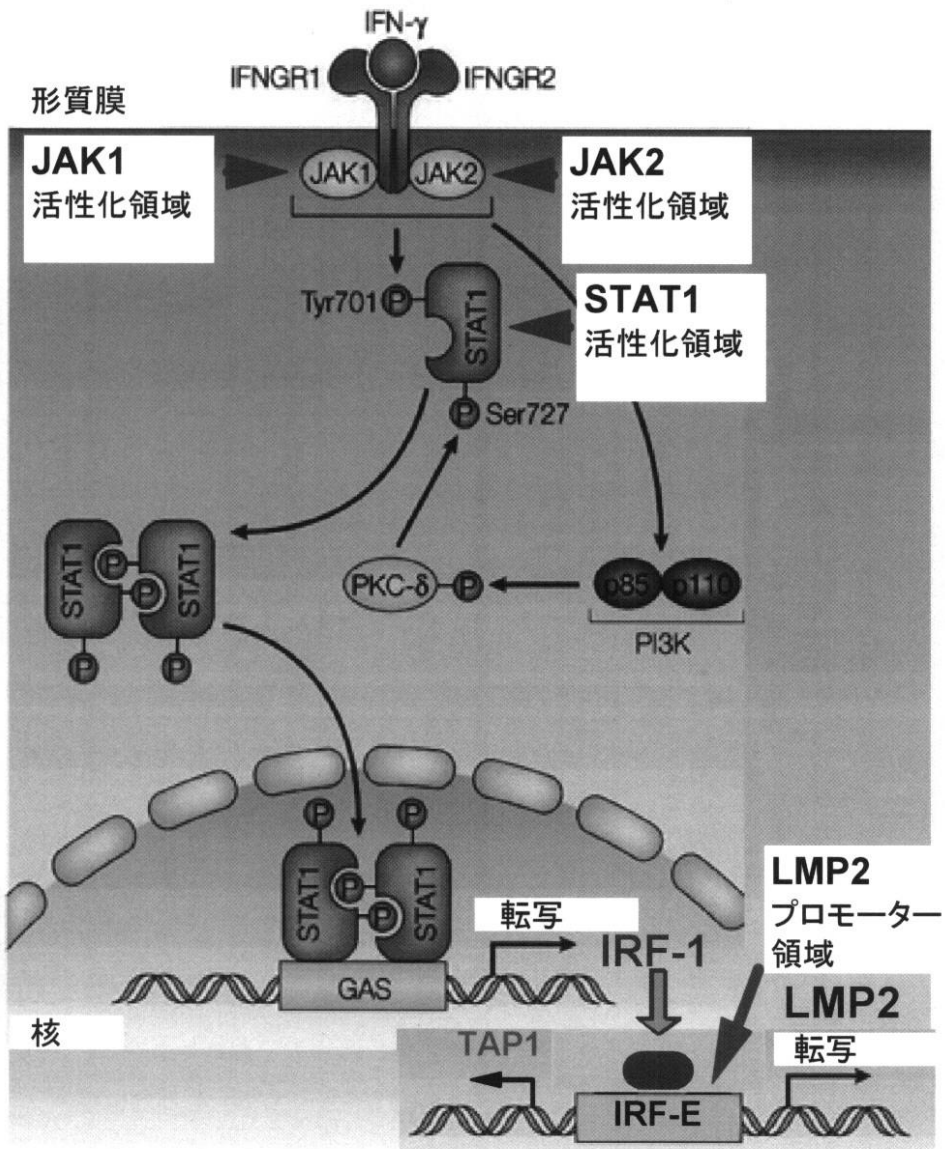
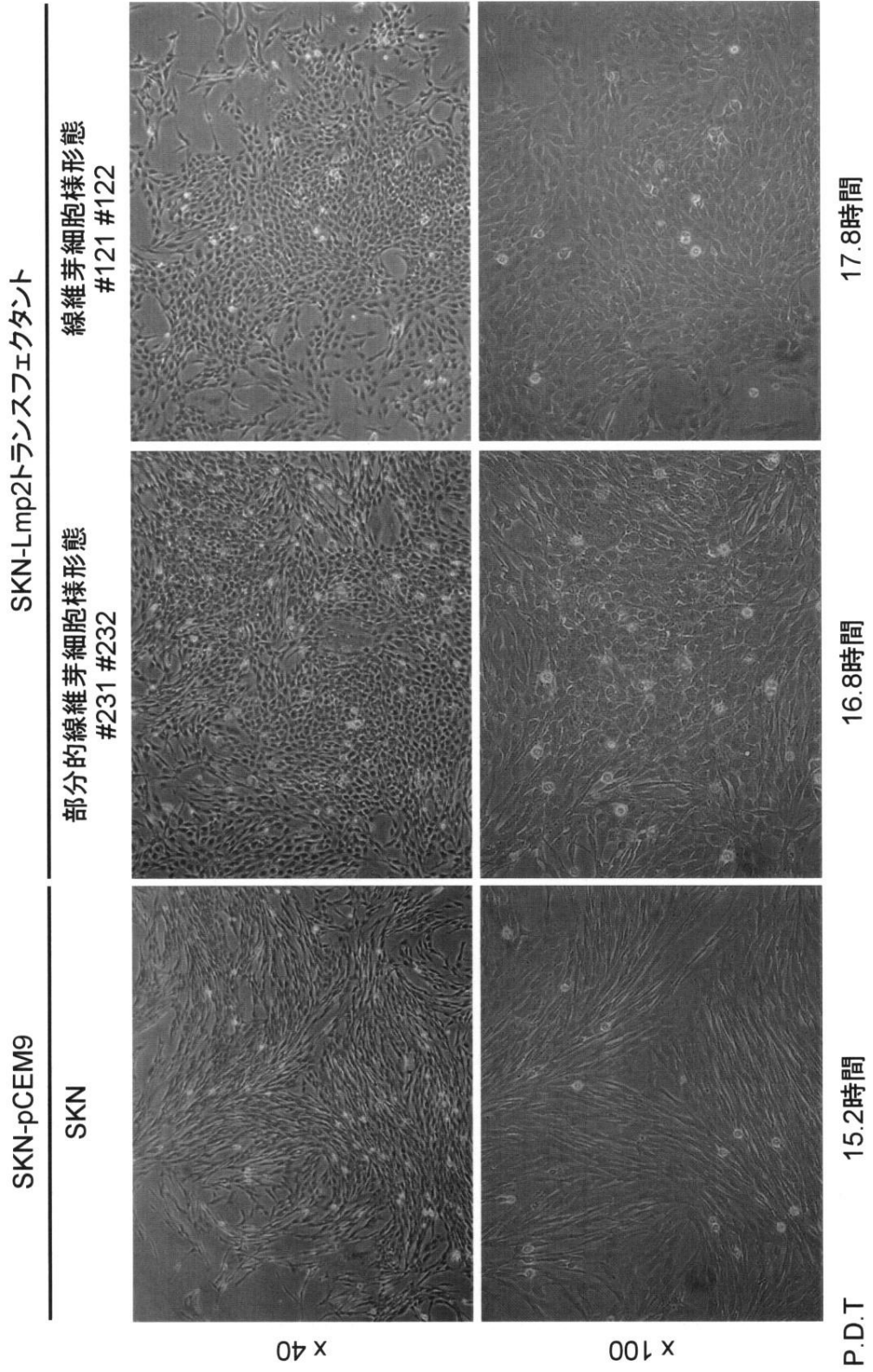


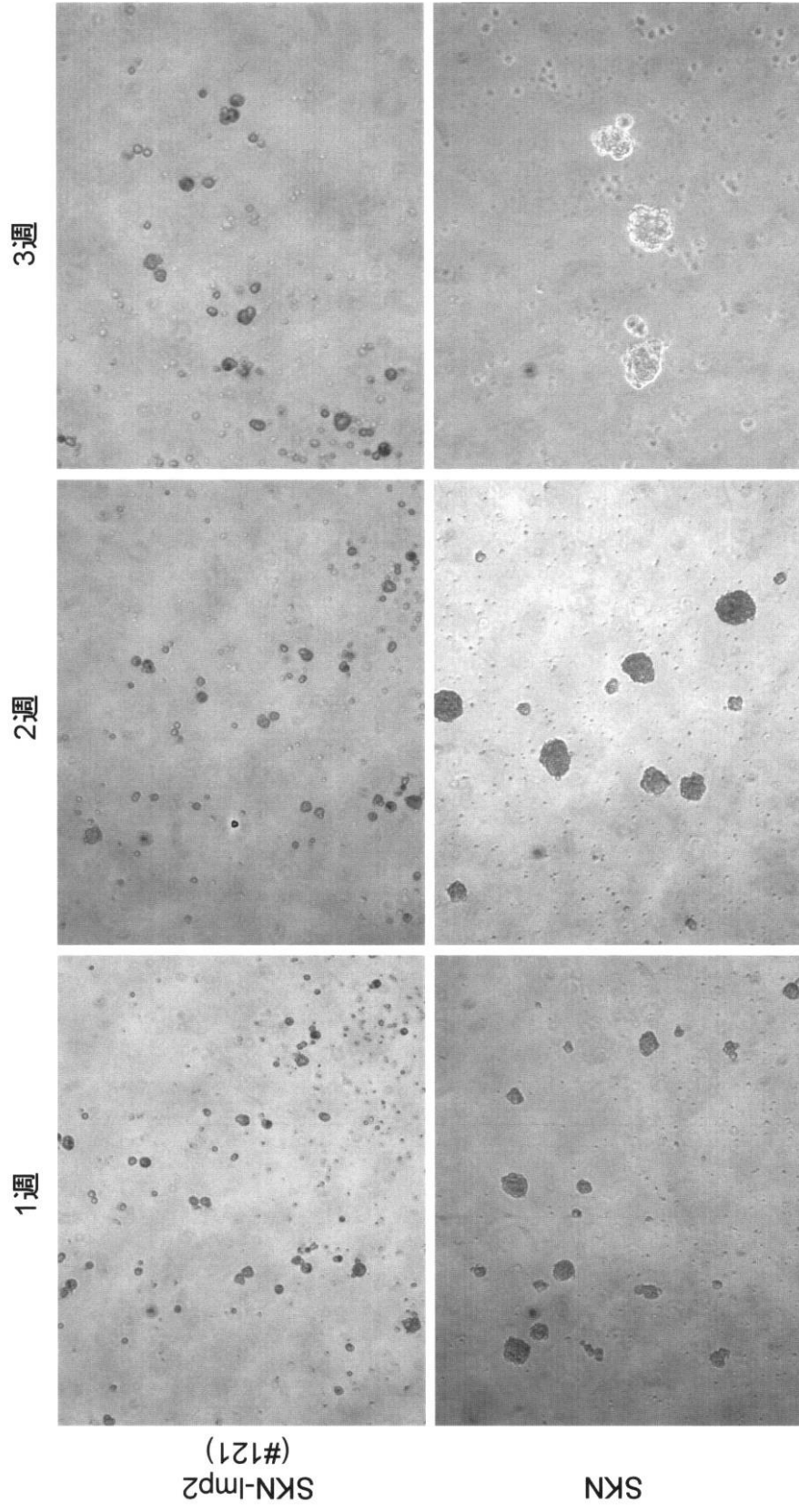
図 20

【 図 2 0 】



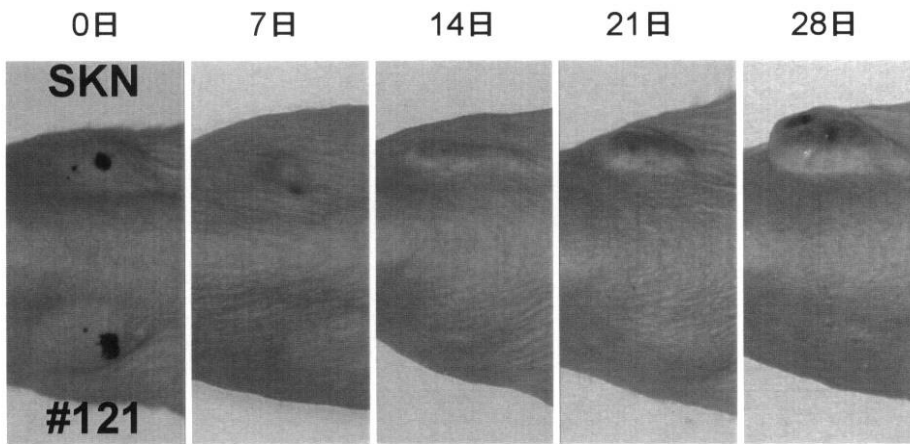
【 図 2 2 】

図 2 2



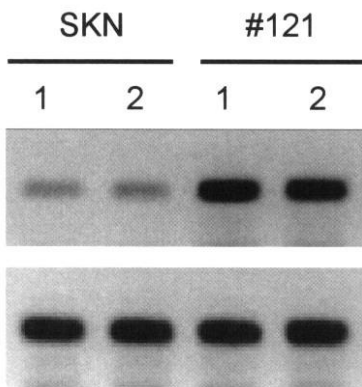
【 2 3 A】

2 3 A



【 2 3 C】

2 3 C



【 図 27 】

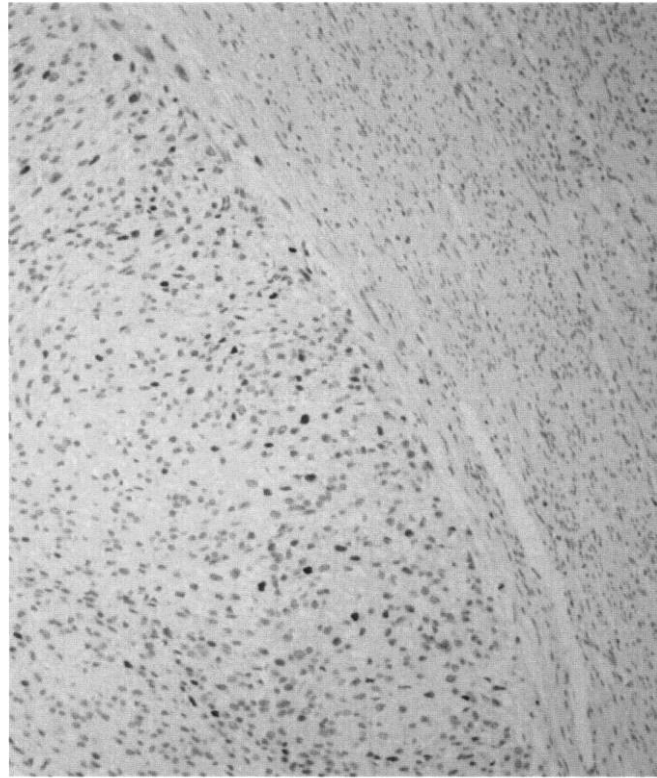
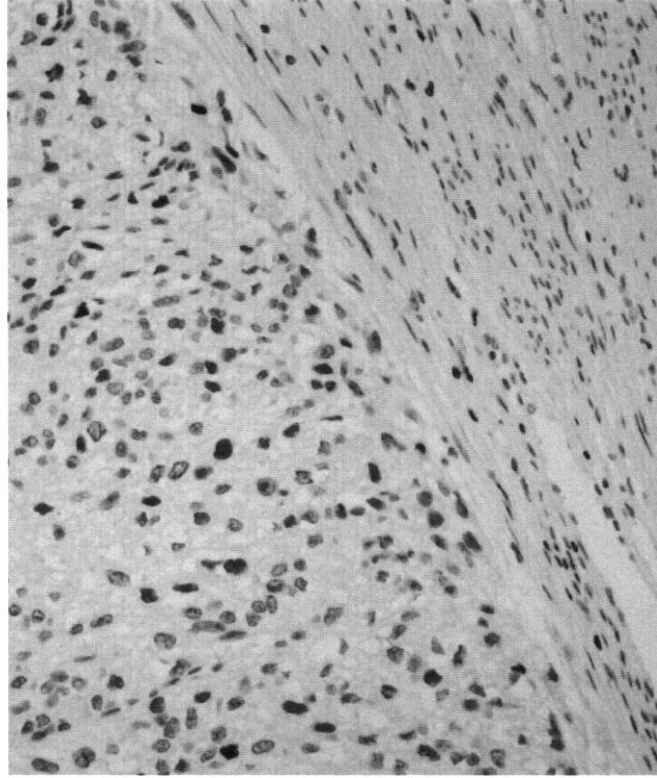

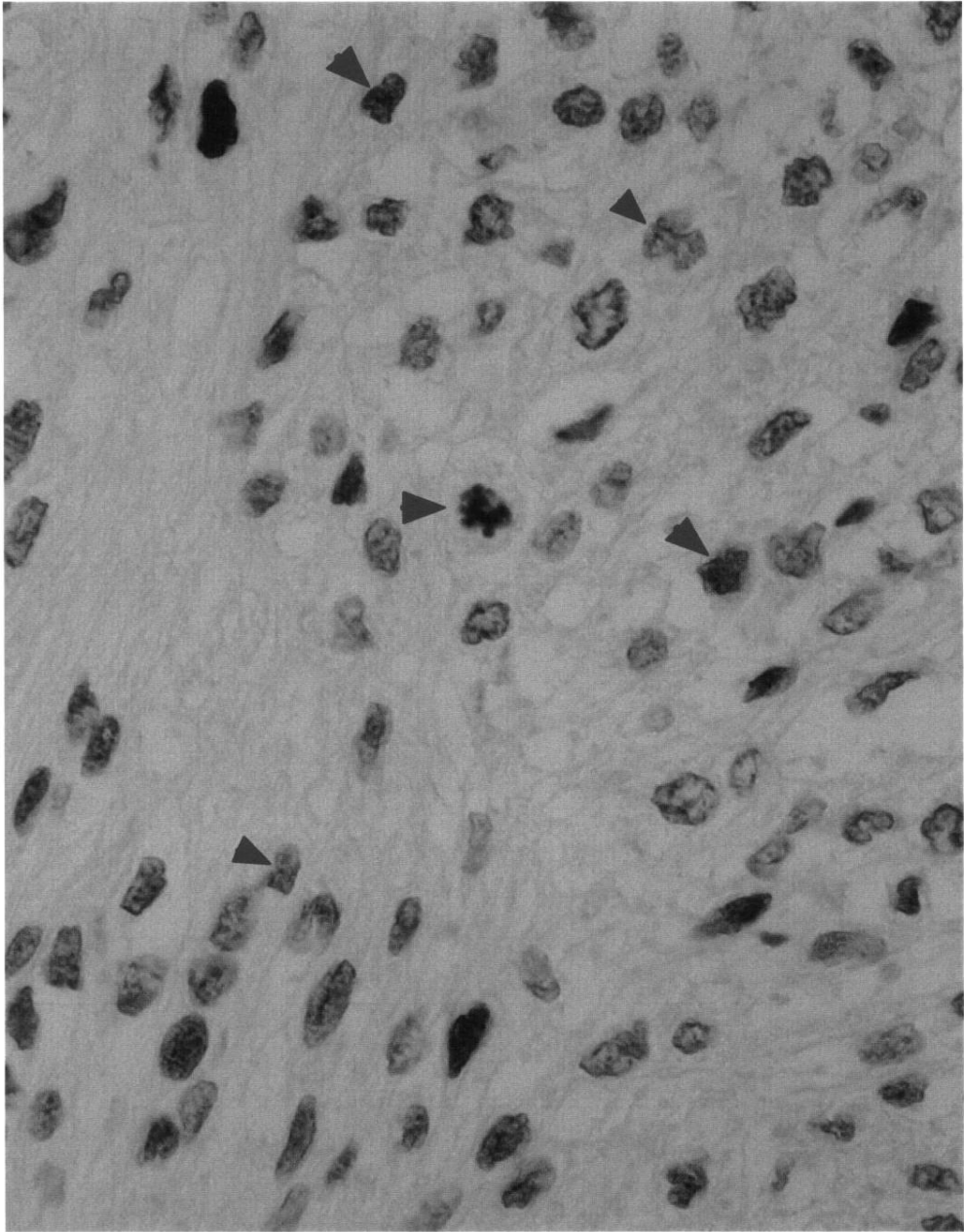


図 27

【 2 8】



8
2


【配列表】

0004982869000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 小林 幸弘
長野県松本市旭三丁目1番1号 信州大学医学部附属病院内
- (72)発明者 佐野 健司
長野県松本市旭三丁目1番1号 信州大学医学部附属病院内
- (72)発明者 堀内 晶子
長野県松本市旭三丁目1番1号 信州大学医学部内
- (72)発明者 小西 郁生
長野県松本市旭三丁目1番1号 信州大学医学部内

審査官 佐藤 巖

- (56)参考文献 WRIGHT, K.L. et al., J. Exp. Med, 1995年, Vol.181, pp.1459-1471
NIESPOREK, S. et al., Int. J. Immunogenet., 2005年, Vol.32, pp.7-11
SATO, E. et al., J. Neurosurg., 2006年 2月, Vol.104, pp.264-271
HAYASHI, T. et al., Oncogene, 2006年 2月, Vol.25, pp.4016-4026
ZHAI, Y-L. et al., Int. J. Cancer, 1999年, Vol.84, pp.244-250
NIESPOREK, S. et al., "Homo sapiens transporter 1 (TAP1) gene, promoter region, 5' UTR and partial cds", GenBank accession AY349134, 2005年 2月 7日, [retrieved on 13-01-2011], retrieved from theInternet <URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sviewer/girevhist.cgi?val=AY349134>>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68
G01N 33/48
G01N 33/53
G01N 33/574
C12N 15/09
MEDLINE/CAPIus/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPIus/JMEDPIus(JDreamII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq