

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4938451号
(P4938451)

(45) 発行日 平成24年5月23日 (2012. 5. 23)

(24) 登録日 平成24年3月2日 (2012. 3. 2)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/02
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 A
C 1 2 N 15/113 (2010. 01)	C 1 2 N 15/00 F
C 1 2 M 1/00 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 G
請求項の数 31 (全 82 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2006-526453 (P2006-526453)	(73) 特許権者	502240113
(86) (22) 出願日	平成17年3月18日 (2005. 3. 18)		オンコセラピー・サイエンス株式会社
(65) 公表番号	特表2007-530006 (P2007-530006A)		神奈川県川崎市高津区坂戸 3 丁目 2 - 1
(43) 公表日	平成19年11月1日 (2007. 11. 1)	(74) 代理人	100102978
(86) 国際出願番号	PCT/JP2005/005613		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開番号	W02005/090603	(74) 代理人	100128048
(87) 国際公開日	平成17年9月29日 (2005. 9. 29)		弁理士 新見 浩一
審査請求日	平成19年12月18日 (2007. 12. 18)	(72) 発明者	中村 祐輔
(31) 優先権主張番号	60/555, 789		東京都港区白金台 4 丁目 6 - 1
(32) 優先日	平成16年3月23日 (2004. 3. 23)	(72) 発明者	醍醐 弥太郎
(33) 優先権主張国	米国 (US)		東京都港区白金台 4 丁目 6 - 1
		(72) 発明者	中鶴 修一
			神奈川県川崎市高津区坂戸 3 丁目 2 - 1
		審査官	福岡 信子
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非小細胞肺癌の診断のための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象から採取された肺細胞を含む組織における非小細胞肺癌 (NSCLC) 細胞を検出する方法であって、対象由来の組織試料におけるKIF11遺伝子の発現レベルを決定する段階を含む方法であり、ここで該遺伝子の正常対照レベルと比較した該発現レベルの上昇がNSCLC細胞の存在を示す方法。

【請求項 2】

上昇が正常対照レベルを少なくとも10%上回るものである、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

複数のNSCLC関連遺伝子の発現レベルを決定する段階をさらに含む、請求項1または2記載の方法。

【請求項 4】

発現レベルが、以下のものからなる群より選択される任意の1つの方法によって決定される、請求項1～請求項3のいずれかに記載の方法：

- (1) KIF11遺伝子のmRNAを検出すること；
- (2) KIF11遺伝子によってコードされるタンパク質を検出すること；および
- (3) KIF11遺伝子によってコードされるタンパク質の細胞増殖活性を検出すること。

【請求項 5】

発現レベルが、KIF11遺伝子プローブと、患者由来の生物試料の遺伝子転写物とのハイブリダイゼーションを検出することによって決定される、請求項1～請求項4のいずれか

10

20

に記載の方法。

【請求項 6】

ハイブリダイゼーションの段階がDNAアレイ上で行われる、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

KIF11遺伝子の発現を検出する検出用試薬を含むNSCLC検出のためのキット。

【請求項 8】

KIF11遺伝子と結合するポリヌクレオチドを含むNSCLC検出のためのアレイ。

【請求項 9】

NSCLC治療薬の候補化合物を同定する方法であって、

(1) KIF11遺伝子を発現する精製された試験細胞を試験化合物と接触させる段階； 10

(2) KIF11遺伝子の発現レベルを検出する段階；および

(3) KIF11遺伝子の正常対照レベルと比較して該発現レベルを抑制する化合物を該NSCLC治療薬の候補化合物として選択する段階

を含む方法。

【請求項 10】

試験細胞がNSCLC細胞である、請求項9記載の方法。

【請求項 11】

試験細胞がNSCLC細胞から樹立された細胞系統である、請求項9記載の方法。

【請求項 12】

NSCLCの治療または予防のための候補化合物のスクリーニングの方法であって、 20

(1) 試験化合物を、精製されたKIF11ポリペプチドと接触させる段階；

(2) ポリペプチドと試験化合物との結合活性を検出する段階；ならびに

(3) ポリペプチドと結合する化合物を選択する段階

を含む方法。

【請求項 13】

NSCLCの治療または予防のための候補化合物のスクリーニングの方法であって、

(a) 試験化合物を、KIF11ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを発現する培養細胞と接触させる段階；

(b) 段階(a)のポリペプチドの細胞増殖活性を検出する段階；ならびに

(c) KIF11ポリペプチドの細胞増殖活性を、試験化合物の非存在下で検出される細胞増殖活性と比較して抑制する化合物を選択する段階 30

を含む方法。

【請求項 14】

NSCLCの治療または予防のための候補化合物のスクリーニングの方法であって、

(1) 試験化合物をKIF11遺伝子の転写調節領域およびその転写調節領域の制御下で発現されるレポーター遺伝子を含むベクターが導入された、精製された細胞と接触させる段階；

(2) 該レポーター遺伝子の活性または発現レベルを測定する段階；および

(3) 対照と比較して該レポーター遺伝子の活性または発現レベルを低下させる化合物を選択する段階 40

を含む方法。

【請求項 15】

NSCLCの治療または予防のための候補化合物のインビトロにおけるスクリーニングの方法であって、

(1) KIF11ポリペプチドを、試験化合物の存在下で、KOC1ポリペプチドまたはその2つのRRM領域からなるKIF11結合ドメインを含み、かつKIF11と結合するポリペプチドと接触させる段階；

(2) ポリペプチド間の結合を検出する段階；および

(3) ポリペプチド間の結合を阻害する試験化合物を選択する段階を含む方法。 50

【請求項 16】

ポリペプチドのRNA輸送活性を測定する方法であって、

a.

i. SEQ ID NO:2 (KIF11) のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

ii. 1つまたは複数のアミノ酸が置換、除去、または挿入されたSEQ ID NO:2のアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、KOC1と結合してRNA輸送活性を有する複合体を形成するポリペプチド；および

iii. SEQ ID NO:1のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、KOC1と結合してRNA輸送活性を有する複合体を形成するポリペプチド；
からなる群より選択されるポリペプチドを、輸送されるRNAと、RNA輸送体の形成が可能な条件下で接触させる段階；

b. 輸送されたRNAのレベルを検出する段階；ならびに

c. 段階 (b) の輸送されたRNAのレベルをRNA輸送活性と相関づけることによってRNA輸送活性を測定する段階

を含み、かつ前記RNA輸送体の形成が可能な条件が、(1)から(4)までの成分を発現する単離された細胞によって与えられる方法；

(1).

i. SEQ ID NO:2 (KIF11) のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

ii. 1つまたは複数のアミノ酸が置換、除去、または挿入されたSEQ ID NO:2のアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、KOC1と結合してRNA輸送活性を有する複合体を形成するポリペプチド；および

iii. SEQ ID NO:1のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、KOC1と結合してRNA輸送活性を有する複合体を形成するポリペプチド；

からなる群より選択されるポリペプチド；

(2).

i. SEQ ID NO:105 (KOC1) のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

ii. 1つまたは複数のアミノ酸が置換、除去、または挿入されたSEQ ID NO:105のアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、KIF11と結合してRNA輸送活性を有する複合体を形成するポリペプチド；および

iii. SEQ ID NO:104のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、KIF11と結合してRNA輸送活性を有する複合体を形成するポリペプチド；

からなる群より選択されるポリペプチド；

(3). 輸送されるRNA；ならびに

(4). DCTN1。

【請求項 17】

RNA輸送体の形成が可能な条件が、KOC1ポリペプチドまたはその2つのRRM領域からなるKIF11結合ドメインを含み、かつKIF11と結合してRNA輸送活性を有する複合体を形成するポリペプチドの存在下で与えられる、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

KOC1ポリペプチドの2つのRRM領域からなるKIF11結合ドメインを含み、かつKIF11と結合してRNA輸送活性を有する複合体を形成するポリペプチドが、

i. SEQ ID NO:105 (KOC1) のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

ii. 1つまたは複数のアミノ酸が置換、除去、または挿入されたSEQ ID NO:105のアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、KIF11と結合してRNA輸送活性を有する複合体を形成するポリペプチド；および

iii. SEQ ID NO:104のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドで

あって、KIF11と結合してRNA輸送活性を有する複合体を形成するポリペプチドからなる群より選択されるポリペプチドである、請求項17記載の方法。

【請求項19】

RNA輸送活性を調節する作用因子 (agent) を同定する方法であって、

a. 作用因子を、

i. SEQ ID NO: 2 (KIF11) のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

ii. 1つまたは複数のアミノ酸が置換、除去、または挿入されたSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、KOC1と結合してRNA輸送活性を有する複合体を形成するポリペプチド；および

iii. SEQ ID NO: 1のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、KOC1と結合してRNA輸送活性を有する複合体を形成するポリペプチド；
からなる群より選択されるポリペプチドを、輸送されるRNAと、RNA輸送体の形成が可能な条件下で接触させる段階；

b. 輸送されたRNAのレベルを検出する段階；ならびに

c. 輸送されたRNAのレベルを作用因子の非存在下での対照レベルと比較する段階であって、対照レベルと比較した、輸送されたRNAのレベルの上昇または低下が、試験化合物がRNA輸送活性を調節することを示す段階

を含み、かつ前記RNA輸送体の形成が可能な条件が、(1)から(4)までの成分を発現する単離された細胞によって与えられる方法；

(1).

i. SEQ ID NO: 2 (KIF11) のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

ii. 1つまたは複数のアミノ酸が置換、除去、または挿入されたSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、KOC1と結合してRNA輸送活性を有する複合体を形成するポリペプチド；および

iii. SEQ ID NO: 1のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、KOC1と結合してRNA輸送活性を有する複合体を形成するポリペプチド；

からなる群より選択されるポリペプチド；

(2).

i. SEQ ID NO: 105 (KOC1) のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

ii. 1つまたは複数のアミノ酸が置換、除去、または挿入されたSEQ ID NO: 105のアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、KIF11と結合してRNA輸送活性を有する複合体を形成するポリペプチド；および

iii. SEQ ID NO: 104のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、KIF11と結合してRNA輸送活性を有する複合体を形成するポリペプチド；

からなる群より選択されるポリペプチド；

(3). 輸送されるRNA；ならびに

(4). DCTN1。

【請求項20】

試験化合物がRNA輸送活性を調節する活性を検出するためのキットであって、以下のaからdまでの成分を発現する単離された細胞、および細胞増殖を支える培養液を含むキット；

a.

i. SEQ ID NO: 2 (KIF11) のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

ii. 1つまたは複数のアミノ酸が置換、除去、または挿入されたSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、KOC1と結合してRNA輸送活性を有する複合体を形成するポリペプチド；および

iii. SEQ ID NO: 1のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェン

トな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、KOC1と結合してRNA輸送活性を有する複合体を形成するポリペプチド；
からなる群より選択されるポリペプチド；

b.

i. SEQ ID NO：105（KOC1）のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

ii. 1つまたは複数のアミノ酸が置換、除去、または挿入されたSEQ ID NO：105のアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、KIF11と結合してRNA輸送活性を有する複合体を形成するポリペプチド；および

iii. SEQ ID NO：104のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、KIF11と結合してRNA輸送活性を有する複合体を形成するポリペプチド；
からなる群より選択されるポリペプチド；

10

c. 輸送されるRNA；ならびに

d. DCTN1。

【請求項 2 1】

センス鎖およびアンチセンス鎖を含む二本鎖分子であって、センス鎖がKIF11標的配列に対応するリボヌクレオチド配列を含み、アンチセンス鎖が該センス鎖に対して相補的なリボヌクレオチド配列を含み、該センス鎖および該アンチセンス鎖が互いにハイブリダイズして該二本鎖分子を形成し、かつKIF11遺伝子を発現する細胞にそれが導入された場合に該遺伝子の発現を阻害する二本鎖分子であって、前記標的配列がSEQ ID NO：1のヌクレオチド配列から選択された19～25個の連続したヌクレオチドを含み、かつSEQ ID NO：32、33、および34からなる群より選択される塩基配列を含む二本鎖分子。

20

【請求項 2 2】

一本鎖リボヌクレオチド配列を介して結びついているセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む単一のリボヌクレオチド転写物である、請求項 2 1 記載の二本鎖分子。

【請求項 2 3】

二本鎖分子が一般式

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

を有し、

式中、[A]がSEQ ID NO：32、33、および34からなる群より選択される塩基配列に対応するヌクレオチド配列であり；[B]が3～23ヌクレオチドからなるヌクレオチド配列であり；かつ[A']が[A]に対して相補的なヌクレオチド配列である、請求項 2 1 または 2 2 に記載の二本鎖分子。

30

【請求項 2 4】

請求項 2 1 ～ 2 3 のいずれかに記載の二本鎖分子をコードするベクター。

【請求項 2 5】

NSCLCの治療または予防のための組成物であって、KIF11遺伝子に対するsiRNAであって、siRNAの標的配列が、SEQ ID NO：32、33、および34のヌクレオチド配列から選択される、KIF11遺伝子の発現レベルを減少させるsiRNAの薬学的有効量を含む組成物。

40

【請求項 2 6】

NSCLCの治療または予防のための組成物であって、KIF11遺伝子によってコードされるポリペプチドと結合する抗体またはその断片の薬学的有効量を含む組成物。

【請求項 2 7】

NSCLCの予後因子の検出方法であって、NSCLCの予後を予測しようとする対象から採取した標本におけるKIF11遺伝子の発現レベルを検出する段階を含み、前記予後因子は、KIF11遺伝子の発現レベルの上昇が検出された場合に予後不良と関連付けられる方法。

【請求項 2 8】

発現レベルが、以下のものからなる群より選択される方法の任意の1つによって検出される、請求項 2 7 記載の方法：

(a) SEQ ID NO：2（KIF11）のアミノ酸配列をコードするmRNAを検出すること、

50

(b) SEQ ID NO:2 (KIF11) のアミノ酸配列を含むタンパク質を検出すること、および
(c) SEQ ID NO:2 (KIF11) のアミノ酸配列を含むタンパク質の細胞増殖活性を検出すること。

【請求項 29】

NSCLCの予後因子を検出するためのキットであって、以下のものからなる群より選択される任意の1つの成分を含むキット：

(a) SEQ ID NO:2 (KIF11) のアミノ酸配列をコードするmRNAを検出するための試薬、
(b) SEQ ID NO:2 (KIF11) のアミノ酸配列を含むタンパク質を検出するための試薬、
および

(c) SEQ ID NO:2 (KIF11) のアミノ酸配列を含むタンパク質の細胞増殖活性を検出するための試薬。

10

【請求項 30】

SEQ ID NO:2 (KIF11) のアミノ酸配列をコードするmRNAを検出するための試薬が、SEQ ID NO:1 (KIF11) の塩基配列からなるポリヌクレオチドに特異的に結合するオリゴヌクレオチドである請求項 29 に記載の試薬。

【請求項 31】

SEQ ID NO:2 (KIF11) のアミノ酸配列を含むタンパク質を検出するための試薬が、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合する抗体である請求項 29 に記載の試薬。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

技術分野

本発明は生物科学の分野に関し、より詳細には癌の治療および診断の分野に関する。特に、本発明は、このような癌細胞において増加した発現を示すKIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXMI遺伝子を利用した、非小細胞肺癌の診断方法に関する。

【0002】

本出願は、2004年3月23日に提出された米国特許仮出願第60/555,789号の恩典を主張し、この出願の内容は参照として本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

30

【0003】

発明の背景

肺癌は、最も一般的な致命的ヒト腫瘍の一つである。肺癌の発症および進行に付随してみられる多くの遺伝子変化が報告されている。遺伝子変化は、予後の取り組みおよび転移リスクまたは特定の治療に対する応答の予測の一助となりうるが、単一または限られた数の分子マーカーに関する情報では非小細胞肺癌 (NSCLC) の臨床的診断を下すのに十分な結果が得られないことが一般的である (Mitsudomiら、Clin Cancer Res 6: 4055-63 (2000); Niklinskiら、Lung Cancer. 34 Suppl 2: S53-8 (2001); Watine, BMJ 320: 379-80 (2000))。NSCLCは最も一般的な病型であり、肺腫瘍の80%近くを占める (Society, A. C. Cancer Facts and Figures 2001 (2001))。集学的治療法の最近の進歩にもかかわらず10年全生存率は10%程度と低いが、これはNSCLCの大多数が進行病期になるまで診断されないためである (Fry, W.A.ら、Cancer. 86: 1867-76 (1999))。プラチナを用いた化学療法措置がNSCLCの治療に関して基準となる標準治療法と見なされているが、これらの薬剤は進行したNSCLC患者の生存期間を約6週間しか延長させることができない (Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group, BMJ. 311: 899-909 (1995))。チロシンキナーゼ阻害薬を含むさまざまな標的指向性療法がこの疾患に対して研究中であるが、これまでに有望な成績が得られたのはごく限られた数の患者のみであり、幾人かのレシピエントには重篤な副作用が生じている (Kris M, N.R, Herbst R.S., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 21: 292a(A1166) (2002))。

40

【0004】

50

肺癌の発生および進行に関連性のある遺伝的変化は数多く報告されているが、その明確な分子機序は依然として不明である (Sozzi, G. Eur. J. Cancer 37: 63-73 (2001))。この10年間で、パクリタキセル、ドセタキセル、ゲムシタビン、およびビノレルビンを含む、新たに開発された細胞毒性薬剤が登場し、進行期NSCLCの患者に対して多くの治療上の選択肢がもたらされた。しかしながら、シスプラチンを用いる治療プログラムと比較して、新たなレジメンのそれぞれが付与しうる延命効果はわずかに過ぎない (Schiller, J. H.ら、N. Engl. J. Med. 346: 92-98 (2002); Kelly, K.ら、J. Clin. Oncol. 19: 3210-3218 (2001))。このため、分子標的薬の開発といった新たな治療方法が臨床医に強く待ち望まれている。

【0005】

cDNAマイクロアレイを用いた数千もの遺伝子の発現レベルの系統的解析は、発癌の経路にかかわる未知の分子を同定するための有効なアプローチの一つであり (Kikuchi, T.ら、Oncogene 22: 2192-2205 (2003); Kakiuchi, S.ら、Mol. Cancer Res. 1: 485-499 (2003); Zembutsu, H.ら、Int. J. Oncol. 23: 29-39 (2003); Suzuki, C.ら、Cancer Res. 63: 7038-7041 (2003))、新たな抗癌薬および腫瘍マーカーの開発のための標的候補を明らかにすることができる。NSCLCの診断、治療、および予防のための新規な分子標的を単離するために、純粋な腫瘍細胞の集団をレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法によって37例の癌組織から調製し、23,040個の遺伝子を含むcDNAマイクロアレイ上でのNSCLC細胞のゲノム全域に渡る発現プロファイルを解析した (Kikuchi, T.ら、Oncogene 22: 2192-2205 (2003))。それらの実験の過程で、KOC1 (GenBankアクセッション番号NM_006547) およびニューロメジンU (NMU; GenBankアクセッション番号NM_006681) が、肺腫瘍において高頻度で過剰発現され、かつNSCLC細胞の増殖のために必須の遺伝子として同定された。

【0006】

細胞間コミュニケーションは多細胞生物の発生および維持のために不可欠である。化学シナプス、ギャップ結合、および植物細胞における原形質連絡といったいくつかの細胞間情報交換システムが以前から観察されているが、非常に感度の高いナノチューブ構造である細胞間のトンネルナノチューブ (tunneling nanotube) (TNT) を含む新たな輸送システムがごく最近、哺乳動物細胞において報告された (Rustom, A.ら、Science 303, 1007-1010 (2004))。このような構造は、膜小胞およびオルガネラの選択的移行を容易にすると考えられ; このため、哺乳動物の体細胞におけるTNTは、植物におけるように、転写因子またはリボ核粒子 (RNP) を運ぶことによって細胞間輸送システムに寄与している可能性がある (Nakajima, K.ら、Nature 413, 307-311 (2001); Lucas, W.J.ら、Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2, 849-857 (2001))。複数の研究者らが、哺乳動物の体細胞内部でのいくつかのRNA結合タンパク質とキネシンおよびダイニンのようなモータータンパク質との相互作用、ならびに哺乳動物生殖細胞における細胞間mRNA輸送を報告している (Brendza, R. P.ら、Science 289, 2120-2122 (2000); Chennathukuzhi, V.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 15566-15571 (2003); Villace, P.ら、Nucleic Acids Res. 32, 2411-2420 (2004); Morales, C.R.ら、Dev. Biol. 246, 480-494 (2002))。しかしながら、RNA結合タンパク質とモータータンパク質との複合体が関与する、哺乳動物体細胞における細胞間mRNA輸送システムを記載した報告はない。

【0007】

mRNAの局在という現象は、ショウジョウバエおよびアフリカツメガエルの卵母細胞および発生中の胚、ならびに線維芽細胞およびニューロンなどの体細胞で報告されている (King, M.L.ら、Bioessays 21: 546-557 (1999); Mowry, K.L., Cote, C.A. FASEB J. 13: 435-445 (1999); Lasko, P. J. Cell Biol. 150: F51-56 (2000); Steward, O. Neuron 18: 9-12 (1997))。β-アクチン (ACTB) のmRNAは、ニワトリ胚線維芽細胞 (CEF) の先行ラメラ (leading lamellae) (Lawrence, J.B., Singer, R.H. Cell 45: 407-415 (1986)) および発生中のニューロンの成長円錐に局在している (Bassell, G.J.ら、J. Neurosci. 18: 251-265 (1998))。ACTB mRNAの局在は、mRNAの3'UTRに位置するシス作用性エレメ

10

20

30

40

50

ントであるジップコード (zipcode) に依存する (Kislauskis, E.H.ら、J. Cell Biol. 123: 165-172 (1993))。トランス作用性因子であるジップコード結合タンパク質1 (ZBP1) が、ACTB mRNAのジップコードを用いてアフィニティー精製されている (Ross, A.F.ら、Mol. Cell Biol. 17, 2158-2165 (1997))。ZBP1の同定後に、そのほかの相同体が、アフリカツメガエル、ショウジョウバエ、ヒト、およびマウスを含む、広範囲にわたる生物において同定されている (Mueller-Pillasch, F.ら、Oncogene 14: 2729-2733 (1997); Deshler, J.O.ら、Science 276: 1128-1131 (1997); Doyle, G.A.ら、Nucleic Acids Res. 26: 5036-5044 (1998))。ZBP1ファミリーのメンバーは、胚生殖線維芽細胞およびいくつかの種類の癌で発現される (Mueller-Pillasch, F.ら、Oncogene 14: 2729-2733 (1997); Mueller, F.ら、Br. J. Cancer 88: 699-701 (2003))。ZBP1様タンパク質は、タンパク質のNH2末端部分にRNA認識モチーフ (RRM) を2つを含み、COOH末端にhnRNP K相同 (KH) ドメインを4つ含む。

10

【0008】

KOC1 (別名IGF-II mRNA結合タンパク質3: IMP-3) は、IMP (IMP-1、IMP-2、およびIMP-3) の一つであり、これはZBP1ファミリーのメンバーに属し、IGF-IIリーダー3 mRNAおよび相反的インプリンティングを受けたH19 RNAに対して複数の付着を示す (Mueller-Pillasch, F.ら、Oncogene 14: 2729-2733 (1997))。KOC1は当初、肝癌で過剰発現されることが報告されたが (Mueller-Pillasch, F.ら、Oncogene 14: 2729-2733 (1997); Mueller, F.ら、Br. J. Cancer 88: 699-701 (2003))、癌細胞における、または正常哺乳動物体細胞においてさえ、その明確な機能は依然として不明である。

20

【0009】

KOC1は、卵母細胞の成熟期における卵母細胞の植物極へのVg1 mRNAの局在を媒介するアフリカツメガエルVg1RNA結合タンパク質 (Vg1RBP/Vera) に対してオーソログスであり、IMP-1はZBP1に対してオーソログスである。IMPは主として細胞質に位置し、その細胞内分布は、核周辺領域およびラメリポジウムへの明確な集中から完全に非局在的なパターンまでさまざまである。H19 RNAはIMPと共局在化し、高親和性付着部位を除去すると切断型RNAの非局在化を招いたが (Runge, S.ら、J. Biol. Chem. 275: 29562-29569 (2000))、このことはIMPがRNAの細胞質内輸送に関与することを示唆した。IMP-1は微小管と会合可能であり (Nielsen, F.C.ら、J. Cell Sci. 115: 2087-2097 (2002); Havin, L.ら、Genes Dev. 12: 1593-1598 (1998))、これにはキネシン、ミオシン、およびダイニンなどのモータータンパク質が関係している可能性が高い。一方、Oskar mRNAの後極への局在にはキネシンIが必要である (Palacios, I.M., St. Johnston D. Development 129: 5473-5485 (2002); Brendza, R.P.ら、Science 289: 2120-2102 (2000))。

30

【0010】

KIF11 (別名EG5) はキネシンファミリーのメンバーであり、細胞分裂期に形成される特殊な微小管アレイの安定性の確立および／または決定に役割を果たす。この役割には、細胞分裂に関連する他のタンパク質成分の分布に影響を及ぼすというKIF11の能力が含まれる (Whitehead, C.M., Rattner, J.B. J. Cell Sci. 111: 2551-2561 (1998); Mayer, T.U.ら、Science 286: 971-974 (1999))。

【0011】

40

NMUはブタ脊髄から最初に単離された神経ペプチドである。これは平滑筋上での強い活性を有し (Minamino, N.ら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 130: 1078-1085 (1985); Domin, J.ら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 140: 1127-1134 (1986); Conlon, J.M.ら、J. Neurochem. 51: 988-991 (1988); Minamino, N.ら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 156: 355-360 (1988); Domin, J.ら、J. Biol. Chem. 264: 20881-20885 (1989)、O'Harte, F.ら、Peptides 12: 809-812 (1991); Kage, R.ら、Regul. Pept. 33: 191-198 (1991); Austin, C.ら、J. Mol. Endocrinol. 12: 257-263 (1994); Fujii, R.ら、J. Biol. Chem. 275: 21068-21074 (2000))、および哺乳動物種においてNMUは胃腸管および中枢神経系に主に分布している (Howard, A.D.ら、Nature 406: 70-74 (2000); Funes, S.ら、Peptides 23: 1607-1615 (2002))。NMUの末梢活性には、平滑筋の刺激、血圧の上昇

50

、腸管におけるイオン輸送の変化、および摂食の調節が含まれる (Minamino, N.ら、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130: 1078-1085 (1985))。しかしながら、発癌期におけるNMUの役割は検討されていない。神経ペプチドは、パラクリン因子およびオートクリン因子として末梢的に機能して多様な生理的プロセスを調節するとともに、神経系において神経伝達物質または神経調節物質として作用する。一般に、神経ペプチドの結合によるシグナル伝達を媒介する受容体は、7回膜貫通ドメインを有するGタンパク質共役型受容体 (GPCR) のスーパーファミリーのメンバーである。NMUの既知の2種類の受容体であるNMU1RおよびNMU2Rは、対応する既知のリガンドがそれぞれグレリン (GHRL) およびニューロテンシン (NTS) であることが判明しているGHSRおよびNTSR1といった他の神経ペプチド受容体に対して高度の相同性を示す。NMU1R (FM3/GPR66) およびNMU2R (FM4) は、ロドプシニングPCRファミリーの他のメンバーと同じように、高度に保存されたモチーフを含む α ヘリックス膜貫通ドメインと予想されるものを7つ有する (Fujii, R.ら、*J. Biol. Chem.* 275: 21068-21074 (2000); Howard, A.D.ら、*Nature* 406: 70-74 (2000); Funes, S.ら、*Peptides* 23: 1607-1615 (2002))。

【0012】

NMUタンパク質のC末端アスパラギンアミド構造およびC末端ヘプタペプチドコアは、平滑筋細胞におけるその収縮活性のために必須である (Westfall, T.D.ら、*J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301: 987-992 (2002); Austin, C. J. *Mol. Endocrinol.* 14: 157-169 (1995))。最近の諸研究により、NMUが食物摂取を視床下部レベルで抑制するという証拠が得られており、このため、このタンパク質は摂食および体重の生理的調節因子である可能性がある (Howard, A.D.ら、*Nature* 406: 70-74 (2000); Maggi, C.A.ら、*Br. J. Pharmacol.* 99: 186-188 (1990); Wren, A.M.ら、*Endocrinology* 143: 227-234 (2002); Ivanov, T. R.ら、*Endocrinology* 143: 3813-3821 (2002))。しかしながら、これまでのところ、発癌におけるNMU過剰発現の関与を示唆した報告はない。

【0013】

発癌の機序を明らかにする目的で計画された研究により、抗腫瘍薬の分子標的を同定することは既に容易である。例えば、Ras (その活性化は翻訳後ファルネシル化に依存する) が関係する増殖シグナル伝達経路を阻害するために当初開発されたファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤 (FTI) は、動物モデルにおけるRas依存性腫瘍の治療に有効であった (Heら、*Cell* 99: 335-45 (1999))。抗癌剤と、原癌遺伝子受容体HER2/neuに拮抗するための抗HER-2モノクローナル抗体トラスツズマブ (trastuzumab) を併用したヒトに対する臨床試験が実施されており、乳癌患者の臨床効果および全般的な生存率の改善が達成されている (Linら、*Cancer Res* 61: 6345-9 (2001))。bcr-abl融合タンパク質を選択的に不活性化するチロシンキナーゼ阻害剤STI-571は、bcr-ablチロシンキナーゼの構成的活性化が白血球のトランスフォーメーションに決定的な役割を果たす、慢性骨髄性白血病の治療を目的として開発された。これらの種類の薬剤は、特定の遺伝子産物の発癌活性を抑制する目的で設計されている (Fujitaら、*Cancer Res* 61: 7722-6 (2001))。このため、癌細胞で高頻度に上方制御される遺伝子産物は、新規抗癌剤を開発するための標的候補として役立つ可能性がある。

【0014】

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ることが示されている。このような遺伝子産物には、p53 (Umamora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。

【0015】

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、Nature Med 4: 321-7 (1998); Mukherjiら、Proc Natl Acad Sci USA 92: 8078-82 (1995); Huら、Cancer Res 56: 2479-83 (1996))、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))。

【0016】

ある一定の健常ドナー由来の末梢血単核細胞 (PBMC) がペプチド刺激を受けると、ペプチドに反応して著しいレベルのIFN- γ を産生するが、 ^{51}Cr 放出アッセイによるとHLA-A24またはHLA-A0201拘束的な様式で腫瘍細胞に対して細胞障害性を及ぼすことはほとんどないと繰り返し報告されている (Kawanoら、Cancer Res. 60: 3550-8 (2000); Nishizakaら、Cancer Res. 60: 4830-7 (2000); Tamuraら、Jpn. J. Cancer Res. 92: 762-7 (2001))。しかし、HLA-A24およびHLA-A0201はどちらも日本人に多いHLAアレルであり、白人でも同様である (Dateら、Tissue Antigens 47: 93-101 (1996); Kondoら、J Immunol 155: 4307-12 (1995); Kuboら、J Immunol 152: 3913-24 (1994); Imanishiら、Proceeding of the eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference Oxford University Press, Oxford, 1065 (1992); Williamsら、Tissue Antigens 49: 129 (1997))。このため、これらのHLAによって提示される癌の抗原ペプチドは、日本人および白人の癌の治療に特に有用な可能性がある。さらに、インビトロでの低親和性CTLの誘導は通常、ペプチドを高濃度で用いて、抗原提示細胞 (APC) の表面に、これらのCTLを効果的に活性化すると考えられる特異的ペプチド/MHC複合体を高レベルに生じさせることによって起こることが知られている (Alexander-Millerら、Proc Natl Acad Sci USA 93: 4102-7 (1996))。

【0017】

癌治療法のための分子標的薬の開発に進展はみられるものの、反応する腫瘍の種類範囲ならびに治療の有効性は依然として極めて限定的である。このため、悪性細胞を高度に特異的に標的とし、かつ副作用をほとんどまたは全く引き起こさない可能性の高い新たな抗癌薬を開発することが急務である。この目標を達成するためには、その生理的機序が十分に明確にされた分子を同定する必要がある。これらの目的に対する強力な戦略は、cDNAマイクロアレイで得られた遺伝子情報に基づいた癌細胞における上方制御された遺伝子のスクリーニングと、RNAiシステムを用いた機能喪失表現型の誘導による細胞増殖に対するそれらの影響に関する高処理スクリーニングとを組み合わせることであると考えられる (Kikuchi, T.ら、Oncogene 22: 2192-2205 (2003))。

【発明の開示】

【0018】

発明の概要

本発明は、患者由来の生物試料におけるKIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXMIの群より選択される非小細胞肺癌関連遺伝子の発現レベルを決定することによる、対象における非小細胞肺癌（NSCLC）に対する素因の診断または判定する方法を特徴とする。遺伝子の正常対照レベルと比較した、これらの遺伝子の任意の発現レベルの上昇が、対象がNSCLCに罹患しているかまたはNSCLCを発症するリスクを有することが示される。

【0019】

本発明はまた、NSCLCと診断された患者の予後判定を提供する方法も提供する。特に、本方法は、KOC1、KIF11、またはKOC1とKIF11との組み合わせの発現を検出する段階を含む。

10

【0020】

「正常対照レベル」とは、正常で健康な個体において、またはNSCLCに罹患していないことが判明している個体の集団において検出される遺伝子のうちの任意の遺伝子の発現レベルを示す。対照レベルとは、単一の参照集団または複数の発現パターンに由来する、単一の発現パターンのことである。「正常対照レベル」とは対照的に、「対照レベル」とは、罹患状態のバックグラウンド（すなわち、癌であるか癌でないか）が判明している個体または個体の集団において検出される遺伝子の発現レベルである。このため、対照レベルは、正常で健康な個体、NSCLCに罹患していないことが判明している個体の集団、NSCLCの患者、または患者の集団のいずれにおける遺伝子の発現レベルに基づいて決定してもよい。非小細胞肺癌の患者または患者の集団における遺伝子の発現レベルに対応する対照レベルは「NSCLC対照レベル」と呼ばれる。さらに、対照レベルが、以前に検査した細胞の発現パターンのデータベースであってもよい。

20

【0021】

試験生物試料で検出されるKIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXMIの遺伝子のうちの任意の遺伝子の発現レベルの正常対照レベルと比較した増加により、（試料を採取した）対象がNSCLCに罹患していることが示される。あるいは、生物試料における非小細胞肺癌関連遺伝子の任意の1つまたは全ての発現レベルを、同じ遺伝子のNSCLC対照レベルと比較してもよい。

【0022】

遺伝子発現は、対照レベルと比較して10%、25%、50%、またはそれ以上増加または低下する。または、遺伝子発現は対照レベルと比較して1倍、2倍、5倍、またはそれ以上増加または低下する。発現は、NSCLC遺伝子プローブと患者由来の生物試料の遺伝子転写物とのハイブリダイゼーションを、例えばチップ上またはアレイ上で検出することによって測定される。患者由来の生物試料は、例えばNSCLCを有することが判明しているかその疑いのある患者に由来する、任意の試料であってよい。例えば、生物試料は、痰、血液、血清、血漿、または肺細胞を含む組織でもよい。

30

【0023】

本発明はまた、KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXMIからなる群より選択される遺伝子のうち2つまたはそれ以上の遺伝子の遺伝子発現レベルパターンを含む、非小細胞肺癌の参照発現プロファイル（reference expression profile）も提供する。

40

【0024】

本発明はまた、KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXMIの群より選択される遺伝子のうち1つまたは複数の発現を検出する（例えば、mRNAおよびポリペプチドを検出することによる）、2つまたはそれ以上の検出用試薬を含むキットも提供する。また、KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXMIの群より選択される遺伝子のうちの1つまたは複数と結合するポリヌクレオチドのアレイも提供される。本発明のキットはまた、NSCLCの予後判定のために用いられるKIF11およびKOC1の発現を検出するために用いられる試薬も含みうる。本発明はまた、RNA輸送活性を調節する化合物の検出のためのキットも提供する。本キットは、KIF11ポリペプチドまたは機能的等価物、KOC1ポリペプチドまたは機能的等価物、および輸送されるRNA、およびDCTN1を発現する細胞を含みうる。また、本発明のキットを、NSCLCの治

50

療または予防のための化合物のスクリーニングのために用いることもできる。本キットは、KOC1ポリペプチドまたは機能的等価物、および、KOC1ポリペプチドまたは機能的等価物によって結合されるRNAを含みうる。

【0025】

本発明はさらに、NSCLC関連遺伝子を発現する試験細胞を試験化合物と接触させること、およびNSCLC関連遺伝子の発現レベルを決定することにより、NSCLC関連遺伝子（KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1）の発現レベルを抑制する化合物を同定する方法も提供する。試験細胞はNSCLC細胞であってよい。遺伝子の正常対照レベルと比較した発現レベルの低下により、試験化合物がNSCLC関連遺伝子の発現または機能の阻害因子であることが示される。このため、ある化合物が対照レベルと比較してKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1の発現レベルを抑制するならば、その化合物はNSCLCの症状を軽減することが期待される。

10

【0026】

あるいは、本発明は、NSCLCの治療または予防のための化合物のスクリーニングの方法を提供する。本方法は、KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXM1の群より選択されるポリペプチドを試験化合物と接触させる段階、およびそのポリペプチドと結合するかまたはその生物活性を抑制する試験化合物を選択する段階を含む。本発明はさらに、NSCLCの治療または予防のための化合物のスクリーニングの方法であって、試験化合物を、KIF11、GHSR1b、NTSR1、もしくはFOXM1タンパク質を発現する細胞、またはレポーター遺伝子上流にKIF11、GHSR1b、NTSR1、もしくはFOXM1遺伝子の転写調節領域を含むベクターが導入された細胞と接触させる段階、および続いてKIF11、GHSR1b、NTSR1、もしくはFOXM1タンパク質またはレポーター遺伝子によってコードされるタンパク質の発現レベルを低下させる試験化合物を選択する段階を含む方法も提供する。これらのスクリーニング方法によれば、正常対照レベルと比較して生物活性または発現レベルを抑制する試験化合物は、NSCLCの症状を軽減することが期待される。さらに、本発明は、NSCLCの治療または予防のための化合物のスクリーニングの方法であって、KIF11とKOC1との結合、またはGHSR1bもしくはNTSR1とNMUとの結合を検出する方法も提供する。KIF11とKOC1との結合、またはGHSR1bもしくはNTSR1とNMUとの結合を阻害する化合物は、NSCLCの症状を軽減することが期待される。

20

【0027】

本発明者らは、KOC1およびKIF11のトランス活性化を伴う、肺癌腫における新規な細胞内および細胞間RNA輸送システムを検出した。肺腫瘍におけるこれらの2つの分子の複合体は、細胞間接着、癌細胞の発達および発癌に作用することが知られているタンパク質をコードするmRNAと結合して、それらを超微細な細胞間構造を通して近隣細胞に輸送することができた。特に、本明細書中に提示した証拠は、KOC1が、KOC1のN末端領域内にあるRRMドメインでKIF11と結合することを示している。さらに、本明細書中に提示した証拠は、ドミナントネガティブKOC1変異体によるそれらの結合の阻害が、インビトロでのNSCLC細胞の増殖を効果的に抑制することを示している。例えば、KOC1のRRMドメインを含むKOC1断片（またはそれらをコードする核酸）は、細胞増殖を抑制し、それ故に癌を治療するためのドミナントネガティブ断片として用いることができる。または、KOC1断片がリボ核タンパク質K相同（KH）ドメインを含んでもよい。

30

40

【0028】

本発明はまた、RNA輸送活性を調節するポリペプチドおよびその他の化合物を同定する方法も提供する。例えば、ポリペプチドをKIF11ポリペプチドまたはその機能的等価物と、KIF11によって輸送されうるRNAとともに、RNAの輸送のために適した条件下で接触させることにより、ポリペプチドをRNA輸送活性に関して試験することができる。または、RNA輸送活性を調節する作用因子を、試験作用因子をKIF11ポリペプチドまたはその機能的等価物と、KIF11によって輸送されうるRNAとともに、RNAの輸送のために適した条件下で接触させることによって試験することもできる。NSCLCを治療するために有用な試験作用因子は、作用因子を、KOC1ポリペプチドまたは機能的等価物と、KOC1またはKOC1とKIF11との複合体と結合しているRNAとの結合を阻害する能力に関して試験することによる。

50

【0029】

肺癌組織マイクロアレイの免疫組織化学解析により、KOC1およびKIF11のトランス活性化は、肺癌患者の予後不良と有意な関連性があることが示された。

【0030】

NSCLCの治療または予防のための方法、およびこのような方法のために用いるための組成物も提供される。治療方法には、KIF11、GHSR1b、NTSR1、もしくはFOXM1遺伝子の発現を低下させるアンチセンス、低分子干渉RNA (siRNA) もしくはリボザイムの組成物、またはその遺伝子によってコードされるポリペプチドと結合してその機能を抑制する抗体もしくはその断片を含む組成物を対象に投与することにより対象におけるNSCLCを治療または予防する方法が含まれる。また、本発明の組成物が、KOC1の1つまたは複数のRRMドメインおよび／またはKHドメインを含むKOC1断片を含むドミナントネガティブKOC1変異体（またはそれをコードする核酸）を含んでもよい。

10

【0031】

本発明はまた、ワクチンおよびワクチン接種法も含む。例えば、対象におけるNSCLCを治療または予防する方法は、KIF11、GHSR1b、NTSR1、FOXM1遺伝子によってコードされるポリペプチドまたはこのポリペプチドの免疫活性断片を含むワクチンを対象に投与することによって行われる。免疫活性断片とは、完全長の天然のタンパク質よりも長さが短く、体内に導入されると免疫応答を誘導するポリペプチドのことである。例えば、免疫活性断片には、T細胞またはB細胞などの免疫細胞をインビボで刺激する、少なくとも8残基長のポリペプチドが含まれる。免疫細胞の刺激は、細胞増殖、サイトカイン（例えば、IL-2）の生成、または抗体の産生を検出することによって測定しうる。

20

【0032】

その他の治療方法には、本発明のスクリーニング方法によって選択された化合物を投与する方法が含まれる。

【0033】

同じく本発明に含まれるものには、センス鎖およびアンチセンス鎖を含む二本鎖分子がある。センス鎖は、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子のmRNA内部に含まれる標的配列に対応するリボヌクレオチド配列を含み、アンチセンス鎖は、センス鎖に対する相補的配列である。本発明のこのような二本鎖分子は、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子に対するsiRNAとして用いることができる。さらに、本発明は、本発明の二本鎖分子をコードするベクターにも関する。

30

【0034】

本出願はまた、KIF11、GHSR1b、NTSR1、もしくはFOXM1遺伝子に対するアンチセンスポリヌクレオチドもしくはsiRNA、またはKIF11、GHSR1b、NTSR1、もしくはFOXM1遺伝子によってコードされるポリペプチドと結合する抗体のうちの任意の抗体を用いる、NSCLCの治療および／または予防のための組成物も提供する。その他の組成物には、本発明のスクリーニング方法によって選択された化合物を有効成分として含む組成物が含まれる。

【0035】

本発明の前記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のものであって、本発明または本発明のその他の代替的な態様を制限するものではないことが理解されるべきである。

40

【0036】

発明の詳細な説明

本明細書で用いる「1つの(a)」 「1つの(an)」、および「その(the)」という単語は、別に特記する場合を除き、「少なくとも1つの」を意味する。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は互換的に用いられる。さらに、「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」、および「核酸」という用語も、別に特記する場合を除き、互換的に用いられる。

【0037】

肺癌発生の機序を調べるため、および新たな分子的治療法の開発のための診断マーカー

50

または標的として有用である遺伝子を同定するために、非小細胞肺癌（NSCLC）において特異的に上方制御される遺伝子をcDNAマイクロアレイを用いて検索した。この分析により、治療標的遺伝子の候補が2つ同定された。癌において過剰発現されるKHドメイン含有タンパク質（KOC1）およびニューロメジンU（NMU）という2つの遺伝子が、検討したNSCLC臨床試料およびNSCLC細胞株において大量に発現されていた。しかしながら、対応する非癌性肺組織においてはそれらの発現はほとんど検出不能であった。内因性NMUを過剰発現するNSCLC細胞の増殖は抗NMU抗体によって有意に阻害された。さらに、KOC1および／またはNMUに対するsiRNAでNSCLC細胞を処理することにより、その遺伝子の発現は抑制され、NSCLC細胞の増殖阻害が起こった。さらに、KOC1は癌細胞のキネシンファミリーメンバー11（KIF11）と結合し、一方、NMUはニューロペプチドGタンパク質共役型受容体（GPCR）、成長ホルモン分泌促進物質受容体1b（GHSR1b）、およびニューロテンシン受容体1（NTSR1）と結合することが確認された。NMUリガンド-受容体系はヒトフォークヘッドボックスM1（FOXO1）を活性化することが確認された。興味深いことに、GHSR1b、NTSR1、FOXO1、およびKIF11は全てNSCLC細胞において特異的に過剰発現された。

【0038】

RNA結合タンパク質KOC1および微小管モータータンパク質KIF11は、胚形成および発癌に必要なある種のmRNAの局在のために必要である（図12）。本発明者らによって以前に報告されているように、KOC1の発現を低下させるためにNSCLC細胞を特異的siRNAで処理すると増殖抑制が引き起こされた。この検討では、KIF11がNSCLC細胞においてKOC1と結合すること、および肺腫瘍におけるKOC1の増殖促進作用の標的となることが示された。本発明者らは、KOC1がヒト正常組織、NSCLC、および細胞株においてKIF11と共局在するだけでなく、インビトロでNSCLC細胞においてKIF11と直接相互作用すること、ならびにNSCLC細胞をKIF11に対するsiRNAで処理するとその発現が低下して増殖抑制がもたらされることも明らかにした。これらの結果は、KOC1-KIF11シグナル伝達がNSCLC細胞の増殖に影響を及ぼすことを示している。以下に示すように、KOC1のドミナントネガティブ断片（例えば、RRMドメインを含むもの）は、癌細胞の増殖を阻害するために用いることができる。発現解析により、大多数のNSCLC試料においてKOC1およびKIF11の発現の増加が検出されたが、正常肺組織では検出されなかった。本解析に用いたNSCLC臨床試料のほとんどは早期の手術可能な段階にあったため、KOC1およびKIF11は、ファイバースコープ経気管支生検（TBB）または喀痰細胞診と併用して、早期肺癌の診断のためのバイオマーカーとして好都合に用いることが可能である。

【0039】

以上からみて、KOC1およびKIF11はNSCLCにおける発癌経路にとって必須である。本明細書中に報告したデータは、KOC1-KIF11経路を標的とする、肺癌に対して特異的な新たな抗癌薬を設計するための根拠を提供する。それらはまた、siRNAを化学療法抵抗性の進行肺癌の治療のために使用することができることも示している。

【0040】

siRNA-NMUをトランスフェクトしたNSCLC細胞のG1細胞画分の顕著な増加により、オートクリン性NMUシグナル伝達経路を阻止することでアポトーシスを誘導しうることが示唆された。本発明者らは、発癌におけるこの経路の重要性を裏づける他の証拠も見いだした。例えば、培地へのNMUの添加は、COS-7細胞の増殖を用量依存的な様式で促進し、培地への抗NMU抗体の添加は、おそらくはNMU活性を中和することにより、NMUにより増強される細胞増殖を阻害した。さらに、NMUを内因的に過剰発現するNSCLC細胞の増殖は、抗NMU抗体によって有意に阻害された。インビトロアッセイにおいてNMUの発現はCOS-7細胞の浸潤性を著しく促進した。これらの結果は、NMUが、NSCLCに対する重要な増殖因子であり、かつ癌細胞の浸潤と関連性があり、オートクリン様式で機能しており、NMU-受容体増殖促進経路を標的とする分子のスクリーニングがNSCLCを治療するための有用な治療アプローチであることを示している。免疫組織化学解析法では、NMUタンパク質の発現の増加は大多数のNSCLC（SCC、ADC、LCCおよびBAC）およびSCLC試料で検出されたが、正常肺組織では検出されなかった。NMUは分泌性タンパク質であり、本分析のために用いたNSCLC臨床試料のほと

んどは早期の手術可能な段階にあったため、NMUは、ファイバースコープ経気管支生検（TBB）、喀痰細胞診、または血液検査と併用して、早期肺癌の診断のためのバイオマーカーとして好都合に用いることができる。

【0041】

2つの受容体、NMU1R（FM3/GPR66）およびNMU2R（FM4）が、NMUと相互作用することが知られている。しかしながら、本明細書に提示した結果からは、これらの2つの既知の受容体は、NSCLCにおけるオートクリン性NMUシグナル伝達経路の標的ではないことが示された。その代わりに、GHSR1bおよびNTSR1が肺腫瘍におけるNMUの増殖促進作用の標的であることが実証された。本発明者らは、NMU-25が細胞表面でこれらの受容体と結合すること、およびNSCLC細胞をGHSR1bまたはNTSR1に対するsiRNAで処理すると受容体の発現が低下してアポトーシスがもたらされることを明らかにした。これらの結果は、NMUが、GHSR1bおよび／またはNTSR1を介して作用することによってNSCLC細胞の増殖に影響を及ぼすことを示している（図14）。GHSRは、ヒトにおける下垂体成長ホルモンの放出および食欲を刺激しうる最近同定された28アミノ酸ペプチドであるグレリン（GHRH）の既知の受容体である（Lambert, P.D.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 4652-4657 (2001); Petersenn, S.ら、Endocrinology 142: 2649-2659 (2001); Kim K.ら、Clin. Endocrinol. 54: 705-860 (2001); Kojima, M.ら、Nature 402: 656-660 (1999)）。GHRHの受容体であることが知られている2つの転写物、GHSR1aおよびGHSR1bのうち、NSCLCの組織および細胞株ではGHSR1bのみの過剰発現が検出された。GHRHは検討したNSCLCでは発現されなかったため、GHSR1bは、GHRHではなくNMUとの結合を介して、肺腫瘍において増殖促進作用を有すると推測された。

【0042】

NTSR1は、多くの中枢性および末梢性の機能を果たす脳および胃腸のペプチドであるニューロテンシン（NTS）の3種類の受容体の1つである（Heasley, L.E. Oncogene 20: 1563-1569 (2001)）。NTSはドーパミン伝達および下垂体ホルモンの分泌を調節し、かつ脳においては体温低下効果および鎮痛効果を発揮する一方で、消化管および心血管系においては末梢性ホルモンとして機能する。NTSが小細胞肺癌（SCLC）を含むいくつかのヒト癌において産生および分泌されることも報告されている（Heasley, L.E. Oncogene 20: 1563-1569 (2001)）。NTSの発現は、本発明において調べた15のNSCLC細胞株のうち4つにおいて検出されたが（図13a）、NTSの発現パターンはNMUまたはNTSR1の発現パターンと必ずしも一致しなかった。このため、NTSは、NSCLCのほんの一部において、NMUとともに、NTSR1またはその他の受容体を介してNSCLCの増殖に寄与する可能性がある。本実験では、NMUを発現した癌細胞株および臨床的NSCLCの大多数がGHSR1bおよび／またはNTSR1も発現しており、このことは、これらのリガンド-受容体相互作用が、NSCLCにおけるNMUの増殖促進活性にとって中心的な経路に関与する可能性を示している。

【0043】

NMUシグナル伝達経路は、FOXO1を含む下流遺伝子のセットをトランス活性化することにより、肺癌細胞の増殖促進に影響を及ぼす。FOXO1はいくつかの種類のヒト癌において過剰発現されることが知られている（Teh, M.T.ら、Cancer Res. 62, 4773-4780.; van den Boom, J.ら、(2003)。Am. J. Pathol. 163, 1033-1043.; Kalinichenko, V.V.ら、(2004)）。Genes. Dev. 18, 830-850）。ショウジョウバエにおいて最初に同定された「フォークヘッド」遺伝子ファミリーは保存された100アミノ酸のDNA結合モチーフを有する転写因子を含み、細胞の成長、増殖、分化、寿命、および形質転換に関与する遺伝子の発現の調節において重要な役割を果たすことが示されてきた。ヒト肝癌HepG2細胞株における同時トランスフェクションアッセイにより、FOXO1タンパク質がサイクリンB1（CCNB1）およびサイクリンD1（CCND1）のいずれの発現も刺激することが示されており（Wang, X.ら、(2002)）。Proc. Natl. Acad. Sci. 99, 16881-16886）、このことは、これらのサイクリン遺伝子が直接的なFOXO1の転写標的であること、ならびにFOXO1が細胞分裂のため、および有糸分裂からの脱出のために必須な遺伝子の転写ネットワークを制御することを示唆している。本発明者らが大多数のNSCLCにおけるCCNB1の活性化、およびFOXO1とCCNB1の発現の良好な

一致を観察したことを記す（データ非提示）。NMUによるNSCLC細胞における細胞増殖の促進は、FOXM1のトランス活性化を反映している可能性があり、これは結果としてそれらの分子経路の機能に影響を及ぼすと考えられる。以上から考えて、NMU、この分子に関する新たに判明した2つの受容体であるGHSR1bおよびNTSR1、ならびにそれらの下流遺伝子であるFOXM1は、NSCLCにおけるオートクリン性増殖促進経路に関与している。本明細書に報告したデータは、NMU-GHSR1b/NTSR1-FOXM1経路を標的とする、肺癌に対して特異的な新たな抗癌薬を設計するための基盤を提供する。それらはまた、この経路を妨げるsiRNAを、化学療法抵抗性の進行肺癌の治療のために用いることができることも示している。

【0044】

これらのデータは、KOC1-KIF11シグナル伝達経路が肺癌の発生において高頻度に上方制御されること、および、NSCLCにとって重要なオートクリン増殖因子であるNMUがGHSR1bおよびNTSR1受容体分子を介して作用することを示している。したがって、これらの複合体の成分の選択的抑制によって肺癌の発生および／または進行を抑制することが可能であり、これらの経路を標的とすることは肺癌患者の治療のための治療および診断方法において最適である。

【0045】

非小細胞肺癌（NSCLC）の診断

対象由来の生体試料におけるKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子の発現レベルを測定することにより、対象におけるNSCLCの発生、またはNSCLCを発症する素因を判定することができる。本発明は、生物試料におけるKIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXM1遺伝子の少なくとも1つ、最大で全ての発現レベルを決定すること（例えば、測定すること）を含む。

【0046】

本発明によれば、NSCLC関連遺伝子であるKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1の遺伝子転写物を、その遺伝子の発現レベルを決定するために検出する。遺伝子の発現レベルは、mRNAおよびタンパク質等の転写産物および翻訳産物の両方を含む、その遺伝子の発現産物を検出することによって検出することができる。既知の配列に関するGenBank（商標）データベースの項目によって提供される配列情報に基づき、当業者に周知の技法を用いて、KIF11遺伝子（NM_004523）、GHSR1b遺伝子（NM_004122）、NTSR1遺伝子（NM_002531）、およびFOXM1遺伝子（No.NM_202003）の検出および測定を行うことができる。KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXM1遺伝子のヌクレオチド配列はそれぞれSEQ ID NO：1、3、5、および106に記載されており、それらの遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列はSEQ ID NO：2、4、6、および107に記載されている。

【0047】

例えば、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子に対応する配列データベース項目中の配列を、例えばそれらのmRNAを検出するためのノーザンブロットハイブリダイゼーション分析に用いられるプローブの構築のために用いることができる。プローブと対象の生物試料中の遺伝子転写物とのハイブリダイゼーションをDNAアレイ上で行うこともできる。複数のNSC遺伝子（KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXM1）の発現レベルを検出するにはアレイを用いることが好ましい。もう1つの例として、これらの配列を、例えば、逆転写に基づくポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）などの増幅に基づく検出方法においてKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子の特異的に増幅するためのプライマーの構築のために用いることもできる。さらに、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子の発現レベルを、その遺伝子によってコードされる発現されたタンパク質の量に基づいて分析することもできる。発現タンパク質の量を決定するための方法にはイムノアッセイ法が含まれる。または、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子の発現レベルを、その遺伝子によってコードされる発現タンパク質の生物活性に基づいて決定することもできる。例えば、KIF11遺伝子によってコードされるタンパク質はKOC1に結合することが知られており、したがってその遺伝子の発現レベルは、発現されたタンパク質によるKOC1との結合能を測定することによって検出することができる。さらに、KIF11タンパク質は細胞増殖活性を有す

ることが知られている。このため、KIF11遺伝子の発現レベルを、このような細胞増殖活性を指標として用いて決定することが可能である。一方、GHSR1bタンパク質およびNTSR1タンパク質はNMUに結合することが知られており、これらも細胞増殖活性を有する。したがって、KIF11と同様に、GHSR1bおよびNTSR1遺伝子の発現レベルは、発現されたタンパク質によるNMUに対するそれらの結合能または細胞増殖活性を測定することによって検出することができる。

【0048】

発現レベルを決定するための生物試料として、試料中のKIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXM1遺伝子を検出する限り、任意の生物材料を用いることができ、これには試験細胞集団（すなわち、対象由来の組織試料）が含まれる。生物試料は肺細胞（肺から得られた細胞）を含むことが好ましい。血液、血清、または他の体液（痰など）における遺伝子発現を測定することもできる。さらに、試験試料は、組織から精製された細胞であってもよい。

10

【0049】

本方法に従ってNSCLCについて診断される対象は好ましくは哺乳動物であり、これにはヒト、非ヒト霊長動物、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、およびウシが含まれる。

【0050】

生物試料における1つまたは複数のKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子遺伝子の発現レベルが、参照試料における同じ遺伝子の発現レベルと比較される。参照試料は、パラメーター、すなわち癌であるか癌でないかが判明している、1つまたは複数の細胞を含む。参照試料は試験試料のものと類似した組織型から得る必要がある。または、対照発現レベルを、アッセイされるパラメーターまたは条件が判明している細胞から得られた分子情報のデータベースに基づいて決定することもできる。

20

【0051】

生物試料における遺伝子発現レベルのパターンがNSCLCの存在を示すか否かは、参照細胞集団の組成に依存する。例えば、参照細胞集団が非癌性細胞から構成される場合には、試験生物試料における遺伝子発現レベルが参照試料のものと同程度であることにより、試験生物試料が非癌性であることが示される。これに対して、参照細胞集団が癌細胞から構成される場合には、生物試料における遺伝子発現プロファイルが参照試料のものと同程度であることにより、試験生物試料が癌細胞を含むことが示される。

30

【0052】

試験生物試料を多数の参照試料と比較することもできる。多数の参照試料のそれぞれは既知のパラメーターが異なっていてよい。このため、試験試料を、例えばNSCLC細胞を含むことが判明している参照試料と比較し、これと同時に、例えばNSCLC細胞ではない細胞（正常細胞）を含むことが判明している第2の参照試料と比較することもできる。

【0053】

本発明によれば、生物試料におけるNSCLC関連遺伝子、KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXM1のうち1つまたは複数の発現を決定して、同じ遺伝子の正常対照レベルと比較する。

「正常対照レベル」という語句は、NSCLCに罹患していない集団に由来する生物試料で通常認められるKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子の発現プロファイルのことを指す。対照および試験対象からの生物試料におけるKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子の発現レベルを同時に決定してもよく、または正常対照レベルを、対照群から以前に採取した試料における遺伝子の発現レベルを分析することによって得た結果に基づいて統計学的方法によって決定してもよい。患者由来の組織試料から得られた生物試料におけるKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子の発現レベルが高いことにより、対象がNSCLCに罹患していること、または非小細胞肺癌を発症するリスクを有することが示される。

40

【0054】

試験生物試料におけるKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子の発現レベルは、その発現レベルが参照物のものよりも1.0、1.5、2.0、5.0、10.0倍、またはそれ以上異なる場合に変化しているとみなしうる。または、試験生物試料におけるKIF11、GHSR1b、NTSR1

50

、またはFOXM1遺伝子の発現レベルは、その発現レベルが参照物のものよりも少なくとも50%、60%、80%、90%、またはそれ以上高いまたは低い場合、変化しているとみなしうる。

【0055】

試験試料と参照試料との間の遺伝子発現の差異は、対照、例えばハウスキーピング遺伝子に対して標準化することができる。例えば、対照ポリヌクレオチドには、癌細胞と非癌性細胞との間でその発現レベルに差がないことが知られているものが含まれる。試験試料および参照試料における対照ポリヌクレオチドの発現レベルを、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子に関して検出された発現レベルの標準化のために用いることができる。本発明に用いられる対照遺伝子には、 β -アクチン、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼおよびリボソームタンパク質P1が含まれる。

10

【0056】

本明細書で同定された、差次的に発現されるKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子は、NSCLCの治療の経過のモニタリングも可能にする。この方法では、NSCLCに対する治療を受けている対象から試験生物試料を得る。必要に応じて、多数の試験生物試料を処理前、処理中、処理後のさまざまな時点で対象から採取する。続いて、試料における1つまたは複数のKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子の発現を測定し、治療を受けていないNSCLCに関する状態が判明している参照試料と比較する。

【0057】

参照試料がNSCLC細胞を含まない場合には、試験生物試料および参照試料におけるKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子の発現レベルが同程度であることは治療の有効性を意味する。しかし、試験試料および参照試料におけるKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子の発現レベルに差があることは、臨床的成果または予後があまり好ましくないことを意味する。特に、KIF11とKOC1の組み合わせの発現、KIF11、またはKOC1の発現の増加は、予後不良と有意な関連性を有する。

20

【0058】

「有効な (efficacious)」という用語は、治療が、対象における、本指標遺伝子、KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXM1遺伝子を含む病的に上方制御された遺伝子の発現の低下、またはNSCLCのサイズ、有病率、もしくは転移能の低下をもたらすことを指す。治療が予防的に適用される場合には、「有効な」とは、治療がNSCLCの発症を遅延もしくは防止すること、またはNSCLCの臨床症状を軽減することを示す。NSCLCの評価は標準的な臨床的プロトコルを用いて行うことができる。さらに、治療の有効性は、NSCLCの診断または治療のための任意の既知の方法に用いて判定される。例えば、NSCLCは病理組織学的に、または慢性的な咳、喘声、咯血、体重減少、食欲不振、息切れ、喘鳴、気管支炎もしくは肺炎の反復発作、および胸痛などの症候性異常を特定することによって診断される。

30

【0059】

さらに、NSCLCの本診断方法を、患者由来の生物試料におけるKIF11、KOC1、GHSR1b、NTSR1、FOXM1遺伝子、またはこれらの組み合わせ（例えばKOC1およびKIF11）の発現レベルを比較することによる、この癌を有する患者の予後の評価に適用することもできる。または、患者の予後を評価するために、生物試料における遺伝子の発現レベルを疾患の諸病期の全体にわたって測定することもできる。

40

【0060】

正常対照レベルと比較して、KIF11、KOC1、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子の発現レベルが高いことは、予後があまり好ましくないことを意味する。KIF11、KOC1、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1の発現レベルが正常対照レベルとの比較で同程度であることは、患者の予後がより好ましいことを意味する。対象の予後を、KIF11、KOC1、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子の発現プロファイルと比較することによって評価しうるのが好ましい。いくつかの態様において、KIF11およびKOC1の発現レベルが決定される。

【0061】

発現プロファイル

50

本発明はまた、KIF11、KOC1、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子のうち2つまたはそれ以上の遺伝子発現レベルのパターンを含む、NSCLCの参照発現プロファイルも提供する。この発現プロファイルは、NSCLCまたは本疾患を発症する素因の診断のための対照として、本疾患を有する対象の治療の経過のモニタリング、および予後の評価のために用いることができる。

【0062】

本発明のキット

本発明はまた、2つまたはそれ以上の検出用試薬、例えば、KIF11、KOC1、GHSR1b、NTSR1、およびFOXM1遺伝子のうち1つまたは複数と特異的に結合するかまたはそれらを同定する核酸を含むキットも提供する。KIF11、KOC1、GHSR1b、NTSR1、およびFOXM1遺伝子のうち1つまたは複数と特異的に結合するかまたはそれらを同定する、このような核酸は典型的に、KIF11、KOC1、GHSR1b、NTSR1、もしくはFOXM1ポリヌクレオチドの一部に対して相補的なオリゴヌクレオチド配列、またはKIF11、KOC1、GHSR1b、NTSR1、もしくはFOXM1遺伝子によってコードされるポリペプチドと結合する抗体により示される。試薬はキットの形態で合わせてパッケージングされる。試薬、例えば、核酸もしくは抗体（固体マトリックスと結合した状態、またはそれらをマトリックスに結合させるための試薬と別々にパッケージ化された状態にある）、対照試薬（陽性および／または陰性）、および／または核酸もしくは抗体の検出のための手段は、別々の容器内にパッケージングされることが好ましい。アッセイ法を実施するための指示（例えば、文書、テープ、VCR、CD-ROM、その他）をキットに含めてもよい。キットのアッセイ形式は、当技術分野で公知のノーザンハイブリダイゼーションまたはサンドイッチELISAであってよい。

【0063】

例えば、検出用試薬を多孔性ストリップ（strip）などの固体マトリックス上に固定化して、少なくとも1つの検出部位を形成させる。多孔性ストリップの測定領域または検出領域は、それぞれの検出部位が1つの検出用試薬を含む、複数の検出部位を含んでもよい。検査ストリップが陰性対照および／または陽性対照用の部位を含んでもよい。または、対照部位を検査ストリップとは別のストリップ上に配置される。任意で、異なる検出部位が異なる量の固定化された試薬を含んでもよく、すなわち、第1の検出部位はより大量に、以後の部位はより少量に含んでもよい。試験生物試料を添加すると、検出可能なシグナルを呈している部位の数により、試料中に存在するKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子の量または試料中に存在するその遺伝子によってコードされるポリペプチドの量に関する定量的指標が得られる。検出部位は任意の適した検出可能な形状で構成することができ、通常は検査ストリップの幅全体にわたる棒状またはドット状の形状にある。

【0064】

または、キットが、KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXM1遺伝子の配列のうち2つまたはそれ以上を含む、核酸基質アレイを含んでもよい。KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXM1遺伝子によって表される遺伝子のうち2つまたは3つの発現を、アレイ検査ストリップまたはチップに対する結合レベルによって同定する。基質アレイは、例えば、米国特許第5,744,305号に記載されるように「チップ」などの、固体基質上にあってもよい。

【0065】

いくつかの態様において、キットはNSCLCの予後を予測するために用いることができる。これらの態様におけるキットは、KIF11もしくはKOC1のアミノ酸配列をコードするmRNAを検出するための試薬、タンパク質を検出するための試薬、またはKIF11もしくはKOC1タンパク質の生物活性を検出するための試薬を含みうる。

【0066】

本発明はまた、RNA輸送活性を調節する化合物の検出のためのキットも提供する。本キットは、KIF11ポリペプチドまたは機能的等価物、KOC1ポリペプチドまたは機能的等価物、および輸送されるRNA、ならびにDCTN1を発現する細胞を含みうる。

【0067】

また、本発明のキットを、NSCLCの治療または予防のための化合物のスクリーニングの

ために用いることもできる。本キットは、KOC1ポリペプチドまたは機能的等価物、およびKOC1ポリペプチドまたは機能的等価物によって結合されるRNAを含みうる。本発明では、KOC1-KIF11複合体のRNA輸送体活性によって輸送可能な任意のRNAを、輸送されるRNAとして用いることができる。好ましいRNAは、表2に示された遺伝子の転写物またはそれらの断片から選択することができる。輸送されるRNAを、RNA輸送体活性を検出するために標識することもできる。さらに、本発明において、KOC1およびKIF11ポリペプチドまたはそれらの機能的等価物は、顕微鏡検査または細胞画像化システムによる観察のためにシグナル生成タンパク質との融合タンパク質として発現される。例えば、ECFP、EYFP、およびEGFPをシグナル生成タンパク質として用いることができる。

【0068】

10

アレイおよび複数性

本発明は、1つもしくは複数のKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子を含む核酸基質アレイも含む。アレイ上の核酸は、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子で表される1つもしくは複数のポリヌクレオチド配列に特異的に対応する。KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXM1遺伝子の2、3、または4個の発現レベルが、核酸のアレイへの結合を検出することで同定される。

【0069】

本発明は、単離された複数の核酸（すなわち、2つまたはそれ以上の核酸の混合物）も含む。核酸は液相または固相中に存在し、例えばニトロセルロース膜などの固相支持体上に固定されている。この複数の核酸は、KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXM1遺伝子によって示される、1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む。本発明の別の態様によれば、この複数の核酸は、KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXM1遺伝子で表される2、3、または4個のポリヌクレオチドを含む。

20

【0070】

チップ

DNAチップは、数多くの遺伝子の発現レベルを同時に比較するのに便利な装置である。DNAチップに基づいた発現プロファイリングは、例えば、「Microarray Biochip Technology」(Mark Schena、Eaton Publishing、2000年)等に開示されている方法によって実施することができる。

【0071】

30

DNAチップは、数多く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を含む。したがって、多数の遺伝子の発現レベルを1回の分析で同時に推定することができる。すなわち、試料の発現プロファイルを1つのDNAチップを用いて測定することができる。本発明のDNAチップに基づいた方法は、以下の段階：

- (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にマーカー遺伝子のプローブをハイブリダイズさせる段階；および
- (3) プローブをハイブリダイズさせたaRNAまたはcDNAを検出し、mRNAの量を定量する段階を含む。

【0072】

「aRNA」という用語は、RNAポリメラーゼを用いて鋳型cDNAから転写されるRNAをいう。DNAチップに基づいた発現プロファイリングのaRNA転写キットは市販されている。このようなキットを用いて、T7 RNAポリメラーゼを使用して、鋳型としてT7プロモーターが結合した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使用するPCRによって、mRNAから合成したcDNAを鋳型として使用してcDNAを増幅することができる。

40

【0073】

あるいは、DNAチップは、本発明のマーカー遺伝子（KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子）を検出するために、その上にスポット化されているプローブを含む。DNAチップにスポット化されるマーカー遺伝子の数に制限はなく、KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXM1遺伝子の1、2、3個、またはこれらの遺伝子全てを使用してもよい。例えば、本発明のマーカー遺伝子の5%以上、好ましくは20%以上、より好ましくは50%以上、さらにより好

50

ましくは70%以上を選択することができる。任意の他の遺伝子およびマーカー遺伝子をDNAチップ上にスポット化することができる。例えば、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チップにスポット化することができる。アッセイ結果を複数のチップ間または異なるアッセイ間で比較することが目的である場合には、このような遺伝子はアッセイ結果を正規化するために使用することができる。

【0074】

DNAチップにスポット化される各マーカー遺伝子に対して、プローブは、選択され、設計される。このようなプローブは、例えば、5～50のヌクレオチド残基を含むオリゴヌクレオチドであってもよい。DNAチップ上にこ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。さらに長いDNAをPCRによってまたは化学的に合成することができる。PCR等によって合成された長いDNAをガラススライド上にスポット化する方法も当業者に公知である。上記の方法によって得られるDNAチップは、本発明によりNSCLCを診断するために使用することができる。

10

【0075】

調製したDNAチップにaRNAを接触させ、次にプローブとaRNAの間のハイブリダイゼーションを検出する。aRNAは、従来のように、蛍光色素で標識することができる。aRNAを標識するためにCy3(赤)およびCy5(緑)などの蛍光色素を使用することができる。対象および対照に由来するaRNAを、それぞれ異なる蛍光色素で標識する。両者の発現レベルの差は、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はスキャナーで検出され、特殊なプログラムを使用して解析することができる。例えば、Affymetrix社製のSuiteは、DNAチップ解析のためのソフトウェアパッケージである。

20

【0076】

NSCLC関連遺伝子の発現を阻害する化合物の同定

標的NSCLC関連遺伝子(KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子)の発現または活性を阻害する化合物は、NSCLC関連遺伝子を発現する試験細胞を試験化合物と接触させること、およびNSCLC関連遺伝子の発現レベルまたは活性を決定することによって同定される。対照レベルと比較して発現が低いことは、その化合物がNSCLC関連遺伝子の阻害因子であることを意味する。本方法によって同定されるような化合物はNSCLCを抑制するために有用である。

【0077】

試験細胞は細胞の集団であってもよく、これには、その細胞が標的となるNSCLC関連遺伝子を発現する限り、任意の細胞が含まれる。例えば、試験細胞はNSCLC細胞に由来する不死化細胞株であってもよい。あるいは、試験細胞は、KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXM1遺伝子のうちの任意の遺伝子が導入された細胞、または本遺伝子のうちの任意の遺伝子の調節配列(例えば、プロモーター)が機能的に結合したレポーター遺伝子と導入された細胞であってもよい。

30

【0078】

化合物のスクリーニング

KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子、この遺伝子によってコードされるタンパク質、またはこの遺伝子の転写調節領域を用いて、遺伝子の発現または遺伝子によってコードされるポリペプチドの生物学的活性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。このような化合物はNSCLCの治療または予防のための薬物として役立つことが期待される。

40

【0079】

したがって、本発明は、本発明のポリペプチドを用いる、NSCLCの治療または予防のための化合物に関するスクリーニングの方法を提供する。このスクリーニング方法の1つの態様は以下の段階を含む：(a) 試験化合物をKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子によってコードされるポリペプチドと接触させる段階；(b) 本発明のポリペプチドと試験化合物との結合活性を検出する段階；および(c) 本ポリペプチドと結合する化合物を選択する段階。

50

【0080】

以下にさらに詳細に説明しているように、KOC1およびKIF11はRNA輸送活性を有する複合体を形成する。したがって、本発明はまた、RNA輸送活性を調節するポリペプチドおよびその他の化合物の同定方法も提供する。例えば、KIF11ポリペプチド (SEQ ID NO: 2) またはその機能的等価物を、KIF11によって輸送されうるRNAと、RNAの輸送のために適した条件下で接触させることにより、ポリペプチドをRNA輸送活性に関して試験することができる。輸送されたRNAのレベルは、以下に詳細に述べるように、RNA免疫沈降などの、周知の技法を用いて測定することができる。

【0081】

KIF11ポリペプチドの機能的等価物とは、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列からなるポリペプチドと等価な生物活性を有するポリペプチドのことであり、これには例えば、1つまたは複数のアミノ酸 (通常は5個未満) が置換、除去、または挿入されたSEQ ID NO: 2 (KIF11) のアミノ酸配列が含まれる。または、ポリペプチドは、SEQ ID NO: 2に対して少なくとも約80%の相同性 (配列同一性とも呼ばれる) を有するアミノ酸配列を含むものであってもよい。また別の態様において、ポリペプチドは、ストリンジェントな条件 (例えば以下に定義) 下で、SEQ ID NO: 1のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと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うる。

【0082】

いくつかの態様においては、KIF11ポリペプチドまたは機能的等価物を、KOC1ポリペプチドまたはその機能的等価物と接触させる。KOC1ポリペプチドの機能的等価物とは、SEQ ID NO: 105のアミノ酸配列からなるポリペプチドと等価な生物活性を有するポリペプチドのことであり、これには例えば、1つまたは複数のアミノ酸 (通常は5個未満) が置換、除去、または挿入されたSEQ ID NO: 105のアミノ酸配列が含まれる。または、ポリペプチドが、SEQ ID NO: 105に対して少なくとも約80%の相同性 (配列同一性とも呼ばれる) を有するアミノ酸配列を含むものであってもよい。また別の態様において、ポリペプチドは、ストリンジェントな条件 (例えば以下に定義) 下で、SEQ ID NO: 104のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと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うる。いくつかの態様において、機能的等価物はRRMまたはKHドメインを少なくとも1つ含む。

【0083】

本発明はまた、RNA輸送活性を調節する作用因子の同定方法も提供する。これらの方法においては、RNA輸送活性を調節すると推測される作用因子を、KIF11ポリペプチドまたは機能的等価物と接触させる。輸送されたRNAのレベルを検出し、作用因子の非存在下での対照におけるレベルと比較する。

【0084】

スクリーニングに用いるポリペプチドは、組換えポリペプチドもしくは天然物に由来するタンパク質でもよく、またはそれらの部分ペプチドでもよい。試験化合物と接触させるポリペプチドは、例えば、精製ポリペプチド、可溶性タンパク質、担体と結合した形態、または他のポリペプチドと融合した融合タンパク質でありうる。

【0085】

KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXO1ポリペプチドに結合するタンパク質のスクリーニング方法として、当業者に既知の多数の方法を使用することができる。このようなスクリーニングは、例えば、当技術分野において周知の方法を用いる免疫沈降法によって実施することができる。例えば、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXO1ポリペプチドのいずれかをコードする遺伝子は、pSV2neo、pcDNA 1、pcDNA3.1、pCAGGS、およびpCD8などの外来遺伝子の発現ベクターに遺伝子を挿入することによって動物細胞において発現される。発現に使用されるプロモーターは、通常使用することができる任意のプロモーターであってもよく、例えば、SV40初期プロモーター (Rigby、Williamson (編)、Genetic Engineering、3巻、Academic Press、London、83-141 (1982))、EF- α プロモーター (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

10

20

30

40

50

ー(Cullen、Methods in Enzymology 152: 684-704(1987))、SR α 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プロモーター等を含む。外来遺伝子を発現させるために動物細胞に遺伝子を導入することは、任意の方法、例えば、電気穿孔法(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))等により実施することができる。NSCポリペプチドは、その特異性が明らかにされているモノクローナル抗体のエピトープをポリペプチドのN末端またはC末端に導入することによって、モノクローナル抗体の認識部位(エピトープ)を含む融合タンパク質として発現されてもよい。市販のエピトープ-抗体系を使用することができる(Experimental Medicine 13: 85-90(1995))。マルチクローニングサイトを使用することによって、例えば、 β -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することができるベクターは市販されている。

【0086】

融合によって本来のポリペプチドの特性を変化させないように、数個から1ダースのアミノ酸からなる小型エピトープだけを導入することによって調製される融合タンパク質も報告されている。ポリヒスチジン(His-tag)、インフルエンザ凝集素HA、ヒトc-myc、FLAG、水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質(VSV-GP)、T7遺伝子10タンパク質(T7-tag)、ヒト単純ヘルペスウイルス糖タンパク質(HSV-tag)、E-tag(モノクローナルファージ上のエピトープ)等などのエピトープおよびこれらを認識するモノクローナル抗体を、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドへのタンパク質結合をスクリーニングするためのエピトープ-抗体系として使用することができる(Experimental Medicine 13: 85-90(1995))。

【0087】

免疫沈降法では、適切な界面活性剤を使用して調製した細胞溶解物にこれらの抗体を添加することによって免疫複合体が形成される。免疫複合体は、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチド、ポリペプチドとの結合能力を含むポリペプチド、および抗体からなる。免疫沈降法は、上記エピトープに対して従来の方法に従って調製された抗体の加え、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドに対する抗体を使用しても実施することができ、この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もよく、ウサギなどの動物をポリペプチドで免疫して得られた抗血清、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の全てのクラス、ならびに組換え抗体(例えばヒト化抗体)を含む。

【0088】

具体的には、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドに対する抗体は当技術分野において周知の方法により調製することができる。例えば、抗体を得るための抗原として用いられるKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1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。抗原として使用されるポリペプチドは組換えにより作製するか天然起源から単離する。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、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドの完全タンパク質または部分ペプチドでもよい。部分ペプチドは、例えば、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドののアミノ(N)末端またはカルボキシ(C)末端断片を含みうる。

【0089】

任意の哺乳動物に対して抗原による免疫処置を行いうるが、細胞融合のため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

10

20

30

40

50

(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、狹鼻類 (旧世界サル) のサル、カニクイザル (*Macaca fascicularis*)、アカゲザル、マントヒヒ、およびチンパンジーが含まれる。

【0090】

動物に対して抗原による免疫処置を行う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、哺乳動物の免疫処置のための標準的な方法である。より詳細には、抗原を適切な量のリン酸緩衝食塩水 (PBS)、生理食塩水などの中に希釈および懸濁する。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、適切な量の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。適切な担体を免疫処置のために用いてもよい。上記のような免疫処置の後に、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した。

【0091】

KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1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試験した免疫処置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。免疫グロブリンGまたはMは、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドのみを認識する画分から、例えば、本ポリペプチドを結合させたアフィニティークラムを用い、さらにこの画分をプロテインAカラムまたはプロテインGカラムを用いて精製することにより、調製することができる。

【0092】

モノクローナル抗体を調製するためには、抗原による免疫処置を行っ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の増加を確かめた上で、細胞融合に供する。細胞融合のために用いる免疫細胞は脾臓から採取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、哺乳動物の骨髓腫細胞、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髓腫細胞が含まれる。

【0093】

上記の免疫細胞および骨髓腫細胞は、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。

【0094】

細胞融合によって結果とし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、アミノプテリン、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、所望の抗体を産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。

【0095】

ハイブリドーマを調製するために非ヒト動物に抗原による免疫処置を行う上記の方法に加えて、EBウイルスに感染したヒトリンパ球などのヒトリンパ球に対して、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチド、本ポリペプチドの発現細胞、またはそれらの溶解産物によるインビトロでの免疫処置を行うこともできる。続いて、免疫処置したリンパ球を、無限に分裂しうるU266などのヒト由来の骨髓腫細胞と融合させ、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドと結合しうる所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる (未審査の公開された日本特許出願 特開昭 63-17688号)。

【0096】

続いて得られたハイブリドーマを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、または本発明の標的タンパク質（KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXMIポリペプチド）のうち任意のタンパク質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。本抗体は、本スクリーニング法において使用されるだけでなく、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXMIポリペプチドの精製および検出のために使用され、本ペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストの候補として用いることができる。さらに、この抗体を、以下に記載されるように、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXMIポリペプチドと関連がありNSCLCを含む疾患に対する抗体療法に適用することもできる。

【0097】

10

このようにして得られるモノクローナル抗体を、遺伝子操作技術を用いて組換え体として調製することもできる（例えば、BorrebaeckおよびLarrick、「Therapeutic Monoclonal Antibodies」、英国でMacMillan Publishers LTD (1990)により刊行、を参照）。例えば、抗体をコードするDNAを、抗体を産生するハイブリドーマまたは免疫処置した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、組換え抗体を調製するために宿主細胞に導入することができる。本発明はまた、上記のようにして調製した組換え抗体も提供する。このような組換え抗体を本スクリーニング法に使用することもできる。

【0098】

さらに、スクリーニングなどに用いられる抗体は、KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXMI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)）。より詳細には、抗体断片は、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作製することができる。または、抗体断片をコードする遺伝子を構築し、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 and Horwitz, Methods Enzymol 178: 476-96 (1989)；Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol 178: 497-515 (1989)；Lamoyi, Methods Enzymol 121: 652-63 (1986)；Rousseauxら、Methods Enzymol 121: 663-9 (1986)；Bird and Walker, Trends Biotechnol 9: 132-7 (1991)を参照されたい）。

20

30

【0099】

抗体を、ポリエチレングリコール（PEG）などの種々の分子との結合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入手しうる。これらの修飾方法は当技術分野で慣例的である。

【0100】

あるいは、本発明の抗体を、非ヒト抗体由来の可変領域およびヒト抗体の定常領域間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。

40

【0101】

ヒト化は、ヒト抗体の対応する配列の代わりに、齧歯類のCDRまたはCDR配列を用いることによって行うことができる（例えば、Verhoeyenら、Science 239: 1534-1536 (1988)を参照のこと）。したがって、このようなヒト化抗体は、ヒト可変ドメインの全長より狭い領域が非ヒト種由来の対応する配列によって置き換えられたキメラ抗体である。

【0102】

ヒトフレームワーク領域および定常領域に加えてヒト可変領域をも含む完全ヒト抗体を用いることもできる。このような抗体は、当技術分野において公知の様々な技法を用いて作製することができる。例えば、インビトロの方法は、バクテリオファージ表面に提示されたヒト抗体断片の組換えライブラリーの使用を含む（例えば、Hoogenboom & Winter, J

50

. Mol. Biol. 227:381 (1991))。同様に、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されたトランスジェニック動物、例えばマウスへのヒト免疫グロブリン座位の導入によってヒト抗体を作製することもできる。このアプローチは例えば、米国特許第6,150,584号、第5,545,807号；第5,545,806号；第5,569,825号；第5,625,126号；第5,633,425号；第5,661,016号に記載されている。

【0103】

上記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、抗体の分離および精製を、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行うことができる。例えば、アフィニティークロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィー、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）を適切に選択して組み合わせることにより、抗体の分離および単離を行うことができる（「抗体：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クラムとして用いうる。用いられるプロテインAカラムの例には、例えば、Hyper D、POROS、およびSephacrose F.F. (Pharmacia) が含まれる。

10

【0104】

クロマトグラフィーの例には、アフィニティークロマトグラフィー以外の、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手順を、HPLCおよびFPLCなどの液体クロマトグラフィーによって行うこともできる。

20

【0105】

免疫複合体は例えば、抗体がマウスのIgG抗体の場合は、プロテインAセファロース、またはプロテインGセファロースを用いて沈殿させることができる。KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXMIポリペプチドを、GSTなどのエピトープとの融合タンパク質として調製するのであれば、これらのエピトープに特異的に結合する物質（グルタチオン-セファロース4Bなど）を用いて、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXMIポリペプチドに対する抗体を使用する場合と同じように免疫複合体を形成させることができる。

30

【0106】

免疫沈降は、例えば文献に記載された方法にしたがって、またはその通りに実施することができる（HarlowおよびLane、Antibodies, 511-52、Cold Spring Harbor Laboratory publications、New York (1988)）。

【0107】

SDS-PAGEは一般に、免疫沈降されたタンパク質の解析に使用されており、結合状態のタンパク質を、適切な濃度のゲルを用いて、タンパク質の分子量によって解析することができる。KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXMIポリペプチドに結合した状態のタンパク質は、クーマシー染色または銀染色などの一般的な染色法による検出が困難なので、タンパク質の検出感度は、放射性同位元素の³⁵S-メチオニンまたは³⁵S-システインを含む培地で細胞を培養し、細胞内でタンパク質を標識して、タンパク質を検出することで改善することができる。標的タンパク質は、タンパク質の分子量が明らかになった時点で、SDS-ポリアクリルアミドゲルから直接精製し、その配列を決定することができる。

40

【0108】

任意のKIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXMIポリペプチドに結合するタンパク質を、本ポリペプチドを用いてスクリーニングする方法には、例えばウエスト-ウエスタンブロッティング解析（Skolnikら、Cell 65: 83-90 (1991)）を使用することができる。具体的には、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXMIポリペプチドに結合するタンパク質は、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXMIポリペプチドに結合するタンパク質を発現することが予想される細胞、組織、器官（例えば肺細胞などの組織）、または培養細胞（特にNSCLC細胞

50

に由来する細胞)に由来するcDNAライブラリーをファージベクター(例えばZAP)を用いて調製し、タンパク質をLBアガロース上で発現させ、発現されたタンパク質をフィルター上に固定し、精製および標識されたKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドを上記フィルターと反応させ、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドに結合したタンパク質を発現するプラークを、標識に従って検出することによって得ることができる。KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドは、ビオチンとアビジン間の結合を利用するか、あるいはKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドに特異的に結合する抗体、またはKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドに融合するペプチドもしくはポリペプチド(例えばGST)を利用して標識することができる。放射性同位元素または蛍光などを使用する方法を使用してもよい。

10

【0109】

あるいは、本発明のスクリーニング法の別の態様では、細胞を利用するツーハイブリッド系を使用することができる(「MATCHMAKER Two-Hybrid system」、「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」、「MATCHMAKER one-Hybrid system」(Clontech);「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」(Stratagene);「DaltonおよびTreisman, Cell 68:597-612(1992)」,「FieldsおよびSternglanz, Trends Genet 10:286-92(1994)」を参照)。

【0110】

ツーハイブリッド系では、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドを、SRF結合領域またはGAL4結合領域に融合させ、酵母細胞で発現させる。KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドに結合するタンパク質を発現することが予想される細胞から、ライブラリーが発現した場合にVP16またはGAL4の転写活性化領域と融合するように、cDNAライブラリーを調製する。次にcDNAライブラリーを上記の酵母細胞に導入し、ライブラリーに由来するcDNAを、検出された陽性クローンから単離する(本発明のポリペプチドに結合するタンパク質を酵母細胞で発現させると、両者の結合がレポーター遺伝子を活性化させ、陽性クローンを検出可能にする)。cDNAにコードされたタンパク質は、上記のように単離されたcDNAを大腸菌(E. coli)に導入し、タンパク質を発現させることで調製できる。

20

【0111】

レポーター遺伝子として、HIS3遺伝子に加え、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使用することができる。

30

【0112】

KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドに結合する化合物は、アフィニティクロマトグラフィーでもスクリーニングすることができる。例えば、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドをアフィニティカラムの担体表面に固定することが可能であり、またKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドに結合可能なタンパク質を含む試験化合物をカラムに添加する。本明細書における試験化合物には例えば、細胞抽出物や細胞溶解物などがある。試験化合物をロードした後にカラムを洗浄し、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドに結合した化合物を調製することができる。

【0113】

試験化合物がタンパク質の場合は、得られたタンパク質のアミノ酸配列を解析し、この配列を元にオリゴDNAを合成し、オリゴDNAをプローブとして用いてcDNAライブラリーをスクリーニングすることで、対象タンパク質をコードするDNAを得る。

40

【0114】

表面プラズモン共鳴現象を用いるバイオセンサーを、本発明の結合化合物を検出または定量する手段として用いることができる。このようなバイオセンサーを使用する場合、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドと試験化合物間の相互作用を、微量のポリペプチドを用いて、標識することなく、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムで観察することができる(例えばBIAcore、Pharmacia)。したがって、BIAcoreなどのバイオセンサーを用いることで、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドと試

50

験化合物間の結合を評価することが可能である。

【0115】

固定されたKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドを、合成化合物、もしくは天然物質バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーに曝露したときに結合する分子をスクリーニングする方法、およびタンパク質だけでなくKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1タンパク質に結合する化合物（アゴニストおよびアンタゴニストを含む）も単離するためのコンビナトリアルケミストリー技術をベースとする高処理能を利用したスクリーニング法（Wrightonら、Science 273:458-64（1996）；Verdine、Nature 384:11-13（1996）；Hogan、Nature 384:17-9（1996））は当技術分野で周知である。

10

【0116】

あるいは、本発明は、

(a)試験化合物にKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドを接触させる段階；

(b)段階(a)のKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドの生物学的活性を検出する段階；および

(c)試験化合物の非存在下で検出される生物学的活性と比較して、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドの生物学的活性を抑制する化合物を選択する段階

を含む、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドを使用してNSCLCを治療または予防するための化合物をスクリーニングする方法を提供する。

【0117】

20

KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXM1の遺伝子のいずれかによってコードされるタンパク質は、NSCLC細胞の細胞増殖を促進する活性を有するので、これらのタンパク質の1つのこの活性を阻害する化合物を、この活性を指標として使用してスクリーニングすることができる。

【0118】

KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1タンパク質の生物学的活性を含む限り、任意のポリペプチドをスクリーニングに使用することができる。このような生物学的活性には、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1の遺伝子によってコードされるタンパク質の細胞増殖活性および他のタンパク質に対する結合活性が含まれる。例えば、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子によってコードされるヒトタンパク質を使用することができ、これらのタンパク質に機能的に同等のポリペプチドも使用することができる。このようなポリペプチドは細胞によって内因的または外因的に発現されてもよい。

30

【0119】

本スクリーニングで単離された化合物は、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドのアンタゴニストの候補となる。「アンタゴニスト」という用語は、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドに結合することで、その機能を阻害する分子を意味する。さらに、このスクリーニングで単離された化合物は、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドと分子（DNAおよびタンパク質を含む）のインビボでの相互作用を阻害する化合物の候補となる。

【0120】

40

本発明の方法において検出対象の生物学的活性が細胞増殖の場合、これは例えば、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドを発現する細胞を調製し、試験化合物の存在下で細胞を培養し、また細胞増殖の速度を決定し、細胞周期などを測定することで検出できるほか、コロニー形成活性を測定することで検出できる。

【0121】

上記に詳細に考察するように、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子の発現レベルを制御することによって、NSCLCの発症および進行を制御することができる。したがって、NSCLCの治療または予防に使用することができる化合物は、KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXM1遺伝子の1つまたは複数の発現レベルを指標として使用するスクリーニングにより同定することができる。本発明に関連して、このようなスクリーニングは、例えば、

50

以下の段階：

(a)試験化合物を、KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXMI遺伝子の1つまたは複数を発現する細胞に接触させる段階；および

(b)試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、本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を含んでもよい。

【0122】

KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXMI遺伝子の少なくとも1つを発現する細胞には、例えば、NSCLC細胞から樹立された細胞系統が含まれ、このような細胞を本発明の上記スクリーニングに使用することができる(例えば、A549、NCI-H226、NCI-H522、LC319)。発現レベルは、当業者に既知の方法によって推定することができる。スクリーニング方法において、本遺伝子の少なくとも1つの発現レベルを低下させる化合物を、NSCLCの治療または予防に使用する候補薬剤として選択することができる。

10

【0123】

あるいは、本発明のスクリーニング方法は、以下の段階を含んでもよい：

(a) マーカー遺伝子の1つまたは複数の転写調節領域および転写調節領域の制御下で発現されるレポーター遺伝子を含むベクターが導入されている細胞に試験化合物を接触させる段階であって、マーカー遺伝子がKIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXMIからなる群より選択されるものである段階；

(b)上記レポーター遺伝子の活性を測定する段階；および

20

(c)対照と比較して上記レポータ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。

【0124】

好適なレポーター遺伝子および宿主細胞は当技術分野において周知である。スクリーニングに必要なレポーター構築物は、マーカー遺伝子の転写調節領域を使用して調製することができる。マーカー遺伝子の転写調節領域が当業者に公知である場合に、レポーター構築物は以前の配列情報を使用して調製することができる。マーカー遺伝子の転写調節領域が同定されていない場合には、転写調節領域を含有するヌクレオチドセグメントを、マーカー遺伝子のヌクレオチド配列情報に基づいて(例えば5'末端の上流配列の情報に基づいて)ゲノムライブラリーから単離することができる。

30

【0125】

本発明のNSCLCの治療または予防のための化合物に関するスクリーニング方法のさらにもう1つの態様において、本方法は、KIF11とKOC1との結合能、またはGHSR1bもしくはNTSR1とNMUとの結合能を利用する。

【0126】

上記のように、本発明者らは、KOC1がヒト正常組織、NSCLC、および細胞株においてKIF11と共局在することだけではなく、これがインビトロのNSCLC細胞においてKIF11と直接相互作用すること、およびKIF11に対するsiRNAでNSCLC細胞を処理するとその発現が低下して増殖抑制を招くことも明らかにした。これらの結果は、KOC1-KIF11シグナル伝達がNSCLC細胞の増殖に影響を及ぼすことを示唆している。このため、KOC1とKIF11との結合の阻害は細胞増殖の抑制を招くこと、およびこの結合を阻害する化合物はNSCLCの治療または予防のための薬物として役立つことが期待される。このスクリーニング方法は以下の段階を含む：(a) KIF11ポリペプチドまたはその機能的等価物を、試験化合物の存在下でKOC1またはその機能的等価物と接触させる段階；(b) ポリペプチドとKOC1との結合を検出する段階；および(c) ポリペプチドとKOC1との結合を阻害する試験化合物を選択する段階。

40

【0127】

さらに、上記のように、本発明者らは、GHSR1bおよびNTSR1が肺腫瘍におけるNMUの増殖促進作用の標的である可能性が高いことも明らかにした。本発明者らは、NMU-25が細胞表面にあるこれらの受容体と結合すること、およびGHSR1またはNTSR1に対するsiRNAでNSCLC細胞を処理するとこれらの受容体の発現が低下してアポトーシスを招くことを明らかにし

50

た。これらの結果は、NMUがGHSR1bおよび／またはNTSR1を介して作用することによってNSCLC細胞の増殖に影響を及ぼすことを示唆している（図14）。このため、GHSR1bまたはNTSR1とNMUとの結合の阻害は細胞増殖の抑制を招くこと、およびこの結合を阻害する化合物はNSCLCの治療または予防のための薬物として役立つことが期待される。このスクリーニング方法は以下の段階を含む：（a）GHSR1bポリペプチドもしくはNTSR1ポリペプチドまたはその機能的等価物を、試験化合物の存在下でNMUと接触させる段階；（b）ポリペプチドとNMUとの結合を検出する段階；および（c）ポリペプチドとNMUとの結合を阻害する試験化合物を選択する段階。

【0128】

スクリーニングのために用いる、KOC1およびKIF11ポリペプチド、またはGHSR1bもしくはNTSR1およびNMUポリペプチドは、組換えポリペプチドでもまたは天然物に由来するタンパク質でもよく、または、互いに対する結合能を保っている限り、その部分的ペプチドでもよい。結合能を保っているこのような部分的ペプチドは、本明細書において「機能的等価物」と呼ばれる。スクリーニングに用いる、KOC1およびKIF11ポリペプチド、またはGHSR1bもしくはNTSR1およびNMUポリペプチドは、例えば、精製されたポリペプチド、可溶性タンパク質、担体と結合した形態、または他のポリペプチドと融合させた融合タンパク質でありうる。

【0129】

KOC1とKIF11との結合、またはGHSR1bもしくはNTSR1とNMUとの結合を阻害する化合物のスクリーニングの方法としては、当業者に周知の多くの方法を用いてもよい。このようなスクリーニングは、インビトロアッセイ系、例えば細胞系において行うことができる。より具体的には、まず、KOC1もしくはKIF11、またはGHSR1bもしくはNTSR1もしくはNMUのいずれかを支持体に対して結合させ、それに対して、他のタンパク質を試験試料とともに添加する。次にこの混合物をインキュベートし、洗浄した上で、支持体と結合した他のタンパク質を検出および／または測定する。

【0130】

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

【0131】

支持体に対するタンパク質の結合は、化学的結合および物理的吸着などの慣例的な方法に従って行ってもよい。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、タンパク質の支持体に対する結合を、アビジンおよびビオチンを用いて行うこともできる。

【0132】

タンパク質同士の結合は、緩衝液がタンパク質間の結合を阻害しない限り、例えばリン酸緩衝液およびTris緩衝液といった、しかしこれらには限定されない緩衝液中で行われる。

【0133】

本発明において、表面プラスモン共鳴現象を利用するバイオセンサーを、タンパク質の結合を検出または定量するための手段として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、タンパク質間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、KOC1とKIF11との結合、またはGHSR1bもしくはNTSR1とNMUとの結合を評価することが可能である。

【0134】

あるいは、KOC1もしくはKIF11、またはGHSR1bもしくはNTSR1、またはNMUのいずれかを標識し、結合したタンパク質の標識を利用して、タンパク質の結合を検出または測定を行うこともできる。具体的には、タンパク質の一つをあらかじめ標識した後に、標識したタンパク質を試験化合物の存在下で他のタンパク質と接触させ、その後に、結合したタンパク質を洗浄後に標識によって検出または測定する。

【0135】

本方法におけるタンパク質の標識のためには、放射性同位体（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{131}I ）、酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -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ことができる。タンパク質を放射性同位体で標識する場合には、検出または測定を液体シンチレーションによって行うことができる。または、酵素で標識したタンパク質は、酵素の基質を添加し、吸光光度計で呈色などの基質の酵素的変化を検出することで検出または測定することもできる。さらに、蛍光物質を標識として用いる場合には、結合したタンパク質を蛍光光度計を用いて検出または測定することもできる。

【0136】

さらに、KOC1とKIF11との結合、またはGHSR1bもしくはNTSR1とNMUとの結合を、KOC1およびKIF11、またはGHSR1bもしくはNTSR1およびNMUに対する抗体を用いて検出または測定することもできる。例えば、支持体上に固定化したKOC1ポリペプチドを試験化合物およびKIF11と接触させた後に、混合物をインキュベートして洗浄した上で、KIF11に対する抗体を用いて検出または測定を行うことができる。または、KIF11を支持体上に固定化し、KOC1に対する抗体を用いてもよい。GHSR1bまたはNTSR1とNMUとの組み合わせを用いる場合には、GHSR1bまたはNTSR1ポリペプチドを支持体上に固定化し、試験化合物およびNMUとともに、混合物をインキュベートし、洗浄した上で、NMUに対する抗体を用いて検出または測定を行うことができる。または、NMUを支持体上に固定化し、GHSR1bまたはNTSR1に対する抗体を用いてもよい。

【0137】

抗体を本スクリーニングに用いる場合には、抗体を上述した標識物質の一つによって標識し、標識物質に基づいて検出または測定を行うことが好ましい。または、KOC1もしくはKIF11、またはGHSR1bもしくはNTSR1、またはNMUに対する抗体を、標識物質で標識した二次抗体によって検出するための一次抗体として用いることもできる。さらに、本発明のスクリーニングにおいてタンパク質と結合した抗体を、プロテインGカラムまたはプロテインAカラムを用いて検出または測定することもできる。

【0138】

あるいは、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システムを用いることもできる（「MATCHMAKER Two-Hybrid system」、「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」、「MATCHMAKER one-Hybrid system」（Clontech）；「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」（Stratagene）；参考文献「Dalton and Treisman, Cell 68: 597-612 (1992)」、「Fields and Sternglanz, Trends Genet 10: 286-92 (1994)」）。

【0139】

ツーハイブリッドシステムでは、例えば、KOC1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、酵母細胞において発現させる。KOC1ポリペプチドと結合するKIF11ポリペプチドをVP16またはGAL4転写活性化領域と融合させ、試験化合物の存在下で同じく酵母細胞において発現させる。または、KIF11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、KOC1ポリペプチドをVP16またはGAL4転写活性化領域と融合させてもよい。GHSR1bまたはNTSR1とNMUとの組み合わせをツーハイブリッドシステムに用いる場合には、例えば、GHSR1bまたはNTSR1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、酵母細胞において発現させる。GHSR1bまたはNTSR1ポリペプチドと結合するNMUポリペプチドをVP16またはGAL4転写活性化領域と融合させ、試験化合物の存在下で酵母細胞において同様に発現させる。または、NMU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、GHSR1bまたはNTSR1ポリペプチドをVP16またはGAL4転写活性化領域と融合させてもよい。試験化合物がKOC1とKIF11との結合、またはGHSR1bもしくはNTSR1とNMUとの結合を阻害しなければ、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可能となる。

【0140】

レポーター遺伝子としては、HIS3遺伝子の他に、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。

10

【0141】

さらに、GHSR1bまたはNTSR1とNMUとの組み合わせをスクリーニング方法に用いる場合、GHSR1bおよびNTSR1は細胞表面に自然に発現されるポリペプチドであるため、本スクリーニング方法の1つの好ましい態様において、ポリペプチドは生細胞の表面に発現される。ポリペプチドが生細胞の表面に発現される場合には、ポリペプチドとNMUとの結合を、腫瘍細胞の増殖の刺激を招くオートクリン性およびパラクリン性シグナル伝達を検出する方法によって検出することができる(Heasley, *Oncogene* 20: 1563-1569 (2001))。例えば、GHSR1ポリペプチドまたはNTSR1ポリペプチドとNMUとの結合を、以下によって検出することができる:

(1) 細胞内のカルシウムまたはcAMPの濃度を検出すること(例えば、FLIPRアッセイ、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276: 435-438, 2000; *Nature* 406: 70-74, 2000; *J. Biol. Chem.* 275: 21068-21074, 2000);

20

(2) ポリペプチドの活性化を検出すること;

(3) ポリペプチドとGタンパク質との相互作用を検出すること(例えば、FLIPRアッセイ、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276: 435-438, 2000; *Nature* 406: 70-74, 2000; *J. Biol. Chem.* 275: 21068-21074, 2000、または¹²⁵I標識ペプチドを用いる結合アッセイ);

(4) ホスホリパーゼCまたはその下流経路の活性化を検出すること(*Oncogene* 20: 1563-1569, 2001);

(5) プロテインキナーゼカスケードのキナーゼ、例えばRaf、MEK、ERK、およびプロテインキナーゼD(PKD)などの活性化を検出すること(*Oncogene* 20: 1563-1569, 2001);

30

(6) チロシンキナーゼのSrcファミリー/Tecファミリー/Bmxファミリーのメンバーの活性化を検出すること(*Oncogene* 20: 1563-1569, 2001);

(7) RasおよびRhoファミリーのメンバーの活性化、MAPファミリーのJNKメンバーの調節、またはアクチン細胞骨格の再構成を検出すること(*Oncogene* 20: 1563-1569, 2001);

(8) ポリペプチド活性化によって媒介される任意のシグナル複合体の活性化を検出すること;

(9) リガンドにより誘発されるポリペプチドの内在化/エンドサイトーシスを含む、ポリペプチドの細胞内局在の変化を検出すること(*J. Cell Sci.*, 113: 2963-2975, 2000; *J. Histochem. Cytochem.* 48: 1553-1563, 2000; *Endocrinology* October 23, 2003. as doi: 10. 1210/en. 2003-0974);

40

(10) ポリペプチドの下流にある任意の転写因子の活性化、またはそれらの下流遺伝子の活性化を検出すること; ならびに

(11) 細胞増殖、形質転換、または細胞のその他の任意の癌性表現型を検出すること。

【0142】

任意の試験化合物(例えば細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物の産物、海洋生物の抽出物、植物抽出物、精製タンパク質もしくは未精製タンパク質、ペプチド、非ペプチド化合物、合成微小分子化合物、および天然化合物)を、本発明のスクリーニング法に使用することができる。本発明の試験化合物は、(1) 生物学的ライブラリー、(2) 空間的に

50

位置指定可能な (spatially addressable) 平行固相もしくは液相ライブラリー、(3) 逆重畳積分を用いた解析 (deconvolution) を必要とする合成ライブラリー法、(4) 「1ビーズ-1化合物 (one-bead one-compound)」ライブラリー法、ならびに (5) アフィニティークロマトグラフィー選択を利用した合成ライブラリー法などの、当技術分野で既知のコンビナトリアルライブラリー法を含む任意の多くの方法でも得られる。アフィニティークロマトグラフィー選択を利用する生物学的ライブラリー法はペプチドライブラリーに限定されるが、他の4つの方法は、ペプチド、非ペプチドのオリゴマー、または化合物の小分子ライブラリーに応用することができる (Lam, *Anticancer Drug Des.* 12:145 (1997))。分子ライブラリーの合成法の例は当技術分野において見出すことができる (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) ; Carell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))。化合物のライブラリーは、溶液中 (Houghten, *Bio/Techniques* 13:412 (1992) を参照)、またはビーズ表面上 (Lam, *Nature* 354:82 (1991))、チップ (Fodor, *Nature* 364:555 (1993))、細菌 (米国特許第5,223,409号)、孢子 (米国特許第5,571,698号; 第5,403,484号、および第5,223,409号)、プラスミド (Cullら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865 (1992))、もしくはファージ (ScottおよびSmith, *Science* 249:386 (1990) ; Delvin, *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2002103360号) に提示することができる。本発明のスクリーニング方法により、細胞またはタンパク質に曝露される試験化合物は単一の化合物または化合物の組み合わせであってもよい。本発明のスクリーニング方法に化合物の組み合わせを使用する場合には、化合物は連続的または同時に接触されてもよい。

【0143】

本発明のスクリーニング方法で単離した化合物は、例えば、細胞増殖性疾患によって生じるNSCLCなどの疾患を治療または予防するための、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXMIポリペプチドの活性を阻害する薬物の候補である。本発明のスクリーニング方法によって得られる化合物の構造の一部が付加、除去、および／または置換によって変換された化合物は、本発明のスクリーニング法によって得られる化合物に含まれる。過剰発現遺伝子、すなわちKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXMI遺伝子の発現の抑制に効果的な化合物は、臨床的有用性を有すると思われ、動物モデルまたは対象において癌細胞増殖を防止する能力についてさらに試験することができる。

【0144】

特定の個体に適したNSCLCを治療および／または予防する治療薬剤の選択

個体の遺伝子構成には差があるので、さまざまな薬剤を代謝する相対的能力には差があることになる。対象内で代謝されて抗NSCLC薬剤として作用する化合物は、対象の細胞における、癌性の状態に特徴的であった遺伝子発現パターンから、非癌性状態に特徴的な遺伝子発現パターンに至る変化を誘導することで顕在化する場合がある。したがって、本明細書に開示された、発現差のあるKIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXMI遺伝子は、選択された対象に由来する試験細胞 (または試験細胞集団) 中で候補化合物を試験することによって、対象に特に適すると推定される治療用または予防用のNSCLC阻害剤の選択を可能とする。

【0145】

特定の個体に適切な抗NSCLC薬剤を同定するために、対象に由来する試験細胞または試験細胞集団を治療薬に曝露し、1つもしくは複数のKIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXMI遺伝子の発現を決定する。

【0146】

試験細胞は、NSCLC関連遺伝子を発現するNSCLC細胞であるか、または試験細胞集団は、非小細胞肺癌関連遺伝子を発現する非小細胞肺癌細胞を含む。好ましくは、試験細胞は肺

細胞であるか、または試験細胞集団は上皮細胞を含む。例えば、試験細胞または試験細胞集団を、候補薬剤の存在下でインキュベートし、試験細胞または細胞集団の遺伝子発現パターンを測定し、1つまたは複数の標準プロファイル、例えばNSCLC標準発現プロファイル、もしくは非NSCLC標準発現プロファイルと比較する。

【0147】

NSCLCを含む標準細胞集団に対する、試験細胞または試験細胞集団における、KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXM1のうち1つもしくは複数の発現の減少は、対象薬剤が治療効果を持つことを意味する。

【0148】

試験薬剤は、任意の化合物または組成物の場合がある。例えば試験薬剤は免疫調節剤である。

【0149】

NSCLCを治療または予防する方法

本発明は、対象のNSCLCを治療、軽減、または予防する方法を提供する。治療用化合物を、非小細胞肺癌の対象、またはNSCLCを発症する危険性のある（すなわち発症しやすい）対象に、予防的または治療的に投与する。このような対象は、標準的な臨床的方法を用いて、またはKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1の遺伝子またはポリペプチドの異常な発現レベルもしくは活性を検出することで同定される。予防的投与は、疾患または障害の出現が妨げられるか、またはその進行が遅れるように、疾患の明瞭な臨床症状が現れる前に行う。

【0150】

本方法は、NSCLC細胞が由来する同じ種類の組織の正常な細胞と比較して、NSCLC細胞において発現が異常に増加されている遺伝子（「過剰発現遺伝子」；KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子）の1つまたは複数の遺伝子産物の発現もしくは機能、またはその両方を低下させる段階を含む。発現は、当技術分野において公知の任意の方法によって阻害してもよい。例えば、対象におけるKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子の1つまたは複数の量を低下させる有効な量の化合物で対象を治療してもよい。化合物の投与は全身的であっても、局所的であってもよい。このような治療作用のある化合物には、NSCLC細胞に内因的に存在するこのような遺伝子の発現レベルを低下させる化合物（すなわち、過剰発現遺伝子、KIF11、GHSR1b、および／またはNTSR1遺伝子の発現を下方制御する化合物）が含まれる。このような治療作用のある化合物の投与は、対象のNSCLC細胞において異常に過剰発現された遺伝子の影響を相殺し、対象の臨床状態を改善することが期待される。このような化合物は、上記の本発明のスクリーニング方法によって得ることができる。

【0151】

KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子によりコードされるタンパク質の活性を調節し、本発明のNSCLCを治療または予防するために使用することができる化合物には、タンパク質以外に、これらのタンパク質の天然の同族のリガンド、ペプチド、ペプチド模倣物、および他の小分子が含まれる。

【0152】

あるいは、過剰に発現した遺伝子（KIF11、GHSR1b、NTSR1、および／またはFOXM1）の発現は、過剰発現遺伝子の発現を阻害するかまたはそれに拮抗する核酸を対象に投与することにより阻害することができる。過剰発現遺伝子の発現を乱すアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、またはリボザイムを、過剰発現遺伝子の発現を阻害するために使用することができる。

【0153】

上述したように、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子の任意のヌクレオチド配列に対応するアンチセンスオリゴヌクレオチドを、本遺伝子の発現レベルを減少させるために使用できる。NSCLCで上方制御される、KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXM1遺伝子に対応するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、NSCLCの治療または予防に有用である。具体的には、本遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、本遺伝子にコードされ

た任意の対応するポリペプチド、またはこれに対応するmRNAに結合することで、遺伝子の転写または翻訳を阻害するか、mRNAの分解を促進するか、および/またはKIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXMIヌクレオチドにコードされたタンパク質の発現を阻害し、最終的にタンパク質の機能を阻害することによって作用しうる。本明細書で用いる、「アンチセンスオリゴヌクレオチド」という表現は、アンチセンスオリゴヌクレオチドが標的配列と特異的にハイブリダイズ可能な限りにおいて、標的配列の全体に相補的なヌクレオチドと、1つもしくは複数のヌクレオチドのミスマッチを有するヌクレオチドの両方を含む。例えば、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXMI遺伝子の任意のヌクレオチド配列に対して、少なくとも15残基の連続ヌクレオチドから最大完全長配列の範囲にわたって少なくとも70%またはこれ以上、好ましくは80%またはこれ以上、より好ましくは90%またはこれ以上、さらにより好ましくは95%またはこれ以上の相同性を有するポリヌクレオチドを含む。当技術分野で周知のアルゴリズムを、相同性（配列同一性としても言及）の決定に使用することができる。また、アンチセンスオリゴヌクレオチドの誘導体または修飾産物を、アンチセンスオリゴヌクレオチドとして本発明で使用することもできる。このような修飾産物の例には、メチルホスホネート型またはエチルホスホネート型などの低級アルキルホスホネート修飾、ホスホロチオエート修飾、およびホスホロアミデート修飾がある。

【0154】

また、本発明のsiRNA分子を、本明細書に開示した遺伝子からのmRNAまたはcDNAと特異的にハイブリダイズする能力によって定義することもできる。本発明の目的において、「ハイブリダイズする」または「特異的にハイブリダイズする」という用語は、2つの核酸分子が「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」下でハイブリダイズする能力を指して用いられる。「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」という語句は、核酸分子が、典型的には核酸の複合的な混合物中において、その標的配列とはハイブリダイズするが、他の配列とは検出しうる程度にはハイブリダイズしないと考えられる条件のことを指す。ストリンジェントな条件は配列依存的であり、状況が異なれば異なると考えられる。配列が長いほど高い温度で特異的にハイブリダイズすると考えられる。核酸のハイブリダイゼーションに関する幅広い手引きは、Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Probes、「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays」(1993)に見ることができる。一般に、ストリンジェントな条件は、規定のイオン強度、pHでの特定の配列の融解温度(T_m)よりも約5~10℃低くなるように選択される。 T_m は、標的に対して相補的なプローブの50%が平衡状態で標的配列とハイブリダイズする温度（規定されたイオン強度、pH、および核酸濃度下）である（標的配列が過剰に存在するため、 T_m では平衡状態でプローブの50%が占有される）。ストリンジェントな条件を、ホルムアミドなどの脱安定剤の添加によって得ることもできる。選択的または特異的なハイブリダイゼーションの場合、陽性シグナルはバックグラウンド値の少なくとも2倍、好ましくはバックグラウンドでのハイブリダイゼーションの10倍である。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例としては以下のようなものでありうる：50%ホルムアミド、5×SSC、および1%SDS、42℃でインキュベート、または5×SSC、1%SDS、65℃でインキュベートを行い、0.2×SSCおよび0.1%SDS、50℃で洗浄する。アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびそれらの誘導体は、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXMI遺伝子によってコードされるタンパク質を産生する細胞に対して、これらのタンパク質をコードするDNAまたはmRNAと結合し、その転写または翻訳を阻害し、mRNAの分解を促進し、タンパク質の発現を阻害し、それによりタンパク質の機能を阻害することによって作用する。

【0155】

アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびこの誘導体は、誘導体に対して不活性な適切な基剤と混合することにより、塗布剤またはパップ剤などの外用剤になりうる。

【0156】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXMI遺

伝子の任意の1つにコードされた少なくとも1つのタンパク質の発現を阻害するので、タンパク質の生物学的活性を抑制するのに有用である。

【0157】

過剰発現遺伝子の1つもしくは複数の遺伝子産物を阻害するポリヌクレオチドには、KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXM1遺伝子によりコードされる、過剰発現される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、アンチセンス鎖の核酸の組み合わせを含む低分子干渉RNA (siRNA) も含まれる。「siRNA」という用語は、標的mRNAの翻訳を妨げる2本鎖RNA分子を意味する。siRNAを細胞に導入する標準的な手法は、DNAがRNAを転写するテンプレートである手法を含め、本発明の治療または予防に使用可能である。このようなsiRNAは、1つの転写物が、標的遺伝子に由来するセンス配列と相補的なアンチセンス配列の両方を有するように構築される（例えばヘアピン型）。

10

【0158】

この方法を用いて、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子の発現が上方制御された細胞の遺伝子発現を抑制する。標的細胞でsiRNAとKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子転写物が結合すると、細胞によるKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1タンパク質の産生が減少する。オリゴヌクレオチドの長さは少なくとも約10ヌクレオチドであり、天然の転写物と同じ長さでもよい。好ましくは、オリゴヌクレオチドの長さは約19～約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約75ヌクレオチド、約50ヌクレオチド、または約25ヌクレオチド未満である。本発明の好ましいsiRNAは、そのすべてにおいてNSCLC細胞株の生存性を低下させるために有効であることが明らかとなっている、SEQ ID NO: 32、33、34、35、36、37、または108のヌクレオチド配列を有するポリペプチドを標的配列として含む。具体的には、本発明に用いられる好ましいsiRNAは、一般式：

20

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

を有し、式中、[A]は、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1の標的配列に対応するリボヌクレオチド配列であり；[B]は、約3～約23ヌクレオチドからなるリボヌクレオチド配列であり；かつ[A']は、[A]に対して相補的なリボヌクレオチド配列である。本明細書において、「KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子の標的配列」という語句は、NSCLC細胞株に導入された場合に、細胞の生存能力を抑制するのに有効な配列のことを指す。KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子の好ましい標的配列には、以下のものを含むヌクレオチド配列が含まれる：SEQ ID NO: 32、33、34、35、36、37、および108。相補的配列[A'] および [A] は互いにハイブリダイズして二本鎖を形成し、一般式が 5'-[A]-[B]-[A']-3'であるこのsiRNA分子全体がヘアピンループ構造を形成する。本明細書で用いる場合、「相補的な」という用語は、ポリヌクレオチドのヌクレオチド単位間のワトソン-クリック型またはフグスティーン型の塩基対合のことを指し、ヌクレオチド単位のハイブリダイゼーションまたは結合は、ミスマッチを少数しかまたは全く含まない安定な二重鎖（二本鎖構造）を形成する適切な条件下での、単位間の物理的または化学的な相互作用のことを示す。1つの好ましい態様において、このような二重鎖が10塩基対毎に含むミスマッチは1個を上回ることではない。特に好ましい二重鎖は完全に相補的であり、ミスマッチを全く含まない。本発明で用いる、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子のmRNAに対するsiRNAには、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子のmRNA全体よりは短く、かつ全長として500、200、または75ヌクレオチドの配列を有する標的配列が含まれる。同じく本発明に含まれるものには、本明細書に記載の核酸の1つまたは複数を含むベクター、およびベクターを含む細胞がある。本発明の単離された核酸は、KIF11、GHSR1b、NTSR1、もしくはFOXM1に対するsiRNAのため、またはsiRNAをコードするDNAのために有用である。核酸をsiRNAまたはそれをコードするDNAのために用いる場合には、センス鎖は約19ヌクレオチドよりも長いことが好ましく、約21ヌクレオチドよりも長いことがより好ましい。

30

40

【0159】

さらに、siRNAのヌクレオチド配列は、Ambion社のウェブサイト (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) から利用可能なsiRNA設計コンピュータプログラム

50

を用いて設計することができる。siRNAのヌクレオチド配列は、以下のプロトコルを元にコンピュータプログラムによって選択される：

siRNA標的部位の選択：

1. 転写物の開始コドンAUGを出発点として、AAジヌクレオチド配列を求めて下流をスキャンする。siRNA標的候補部位として、個々のAAおよび3'側に隣接する19ヌクレオチドの出現を記録する。Tuschlら、Genes Dev 13(24)：3191-7 (1999) は、5'および3'側の非翻訳領域（UTR）、および開始コドンに近い領域（75塩基以内）に対するsiRNAの設計を推奨していない。というのは、これらの領域は、調節タンパク質結合部位に富む可能性があり、そのために、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に干渉する恐れがあるからである。
2. 標的候補部位をヒトゲノムデータベースと比較し、他のコード配列に対して有意な相同性をもついかなる標的配列も検討対象から除く。相同性検索は、NCBIのサーバー上（www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/）にあるBLASTを用いて実施することができる。
3. 合成に適した標的配列を選択する。Ambion社のウェブサイト上で、複数の好ましい標的配列を、評価対象遺伝子の全体に沿って選択することができる。

【0160】

本siRNAは、過剰発現されるKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1タンパク質の発現を阻害するので、タンパク質の生物学的活性の抑制に有用である。したがって、siRNAを含む組成物は、非小細胞肺癌の治療または予防に有用である。

【0161】

過剰発現遺伝子、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1の1つもしくは複数の遺伝子産物を阻害する核酸には、本遺伝子に対するリボザイムも含まれる。

【0162】

本リボザイムは過剰発現したKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1タンパク質の発現を阻害し、これによりタンパク質の生物学的活性の抑制に有効である。したがって、本リボザイムを含む組成物はNSCLCの治療または予防に有用である。

【0163】

一般にリボザイムは、大型リボザイムと小型リボザイムに分けられる。大型リボザイムは、核酸のリン酸エステル結合を切断する酵素として知られる。大型リボザイムとの反応後、反応部位は5'-リン酸基および3'-ヒドロキシル基からなる。大型リボザイムはさらに、（1）グアノシンによる5'-スプライス部位におけるエステル転移反応を触媒するグループIイントロンRNA；（2）投げ縄構造を介した2段階反応による自己スプライシングを触媒するグループIIイントロンRNA；ならびに（3）tRNA前駆体を5'部位で加水分解によって切断するリボヌクレアーゼPのRNA成分に分類される。一方、小型リボザイムは、大型リボザイムと比べて大きさが小さく（約40 bp）、RNAを切断して、5'-ヒドロキシル基および2'-3'環状リン酸を生じる。ハンマーヘッド型リボザイム（Koizumiら、FEBS Lett. 228：225（1988））、およびヘアピン型リボザイム（Buzayan、Nature 323：349（1986）；KikuchiおよびSasaki、Nucleic Acids Res. 19：6751（1992））は小型リボザイムに含まれる。リボザイムの設計および構築の方法は当技術分野で周知であり（Koizumiら、FEBS Lett. 228：225（1988）；Koizumiら、Nucleic Acids Res. 17：7059（1989）；KikuchiおよびSasaki（1992）Nucleic Acids Res. 19：6751を参照）、過剰発現されるNSCタンパク質の発現を阻害するリボザイムは、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1タンパク質をコードするヌクレオチド配列の配列情報を元に、リボザイムを作製する従来の方法に従い構築することができる。

【0164】

リボザイムは、過剰発現されるKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1タンパク質の発現を阻害するので、タンパク質の生物学的活性を抑制するのに有用である。したがって、リボザイムを含む組成物は、NSCLCの治療または予防に有用である。

【0165】

あるいは、過剰発現遺伝子の1つもしくは複数の遺伝子産物の機能を、遺伝子産物に結合するか、さもなくば遺伝子産物の機能を阻害する化合物を投与することで阻害する。例えば、このような化合物は、過剰発現された遺伝子産物または複数の遺伝子産物に結合する抗体である。

【0166】

本発明は、抗体の使用、特に、発現が上方制御された遺伝子、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1のうちの任意の遺伝子にコードされたタンパク質に対する抗体、または抗体断片の使用に関する。本明細書で用いる「抗体」という用語は、抗体合成に使用される抗原を含む分子（すなわち、上方制御される遺伝子産物）、またはこれにごく近縁の抗原と特異的に相互作用する（結合する）、特異的な構造をとる免疫グロブリン分子を意味する。過剰発現されるKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ヌクレオチドに結合する抗体は、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状をとる場合があり、これにはウサギなどの動物をポリペプチドで免疫処置することで得られる抗血清、全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、ならびに遺伝的組換えによって作製されたヒト化抗体が含まれる。さらに、本発明のNSCLCを治療または予防する方法で使用される抗体は、マーカー遺伝子（KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子）にコードされた1つもしくは複数のタンパク質と結合する限りにおいて、抗体または修飾抗体の断片の場合がある。NSCLCを治療または予防する本方法において使用される抗体および抗体断片は修飾されてもよく、化学的に修飾された抗体およびキメラ抗体を含んでもよい。このような抗体および抗体断片は上記の方法（上記）により得ることができる。

【0167】

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。

【0168】

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に対して、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチド、本ペプチドを発現する細胞、またはそれらの溶解産物などの抗原による免疫処置を行う。続いて、抗体産生細胞を動物から採取し、骨髓腫細胞と融合させてハイブリドーマを入手し、それ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）。

【0169】

あるいは、抗体を産生する免疫処置したリンパ球などの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。

【0170】

本発明は、過剰発現されるKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドに対する抗体を用いてNSCLCを治療または予防する方法を提供する。この方法によると、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドに対する、薬学的有効量の抗体を投与する。過剰発現されるKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドに対する抗体を、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1タンパク質の活性を減少させるのに十分な用量で投与する。あるいは、腫瘍細胞に特異的な細胞表面マーカーと結合する抗体を、薬物送達ツールとして用いることができる。したがって例えば、過剰発現されるKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドに対する抗体に細胞傷害性薬剤を結合させた抗体を、腫瘍細胞を損傷するのに十分な用量で投与することができる。

【0171】

さらに、本明細書に開示したタンパク質のドミナントネガティブ変異体をNSCLCの治療または予防のために用いることもできる。例えば、KIF11と特異的に結合するKOC1の断片を用いることができる。本明細書で用いる場合、「KOC1のドミナントネガティブ断片」とは、KIF11および輸送されるRNAのいずれかと複合体を形成し、それによって複合体のRNA輸送体活性を減じさせることができる変異型のKOC1のことである。このため、ドミナント

ネガティブ断片は、完全長KOC1ポリペプチドと機能的に等価ではないものである。好ましいドミナントネガティブ断片は、KOC1のRRMドメインを少なくとも1つ含むものである。または、もう1つの態様において、ドミナントネガティブ断片は2つのRRMドメイン、および0から3つまでのKHドメインを有する。例えば、KOC1DEL2 (2×RRM+2×KH) およびKOC1DEL3 (2×RRM、KHは有しない) は、ドミナントネガティブ効果のために好ましい断片である。KOC1DEL2およびKOC1DEL3のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 105のそれぞれ1~406位および1~197位からなる。断片は一般的には約300アミノ酸未満、一般的には約200アミノ酸未満である。

【0172】

本発明は、KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXO1遺伝子からなる群より選択される核酸にコードされたポリペプチド、もしくは同ポリペプチドの免疫学的に活性な断片、または同ポリペプチドもしくはその断片をコードするポリヌクレオチドを含むワクチンを対象に投与する段階を含む、対象のNSCLCを治療または予防する方法にも関する。このようなポリペプチドの投与は、抗腫瘍免疫を対象に誘導する。したがって、本発明は抗腫瘍免疫を誘導する方法をさらに提供する。このようなポリペプチド、またはその免疫学的に活性なこの断片は、NSCLCに対するワクチンとして有用である。場合によっては、タンパク質またはこの断片を、T細胞受容体 (TCR) に結合した状態で、またはマクロファージ、樹状細胞 (DC)、もしくはB細胞などの抗原提示細胞 (APC) 上に提示された状態で投与することができる。DCの抗原提示能力は強いため、APCの中でもDCの使用が最も好ましい。

【0173】

本発明では、「NSCLCに対するワクチン」という表現は、動物への接種時に、抗腫瘍免疫、またはNSCLCを抑制する免疫を誘導する機能をもつ物質を意味する。一般に抗腫瘍免疫は、以下のような免疫応答を含む：

- 腫瘍に対する細胞傷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。

【0174】

したがって、あるタンパク質が、動物への接種時に上記免疫応答の任意の1つを誘導する場合、そのタンパク質は抗腫瘍免疫誘導作用をもつと判断される。タンパク質による抗腫瘍免疫の誘導は、そのタンパク質に対する宿主における免疫系の応答を、インビボまたはインビトロで観察することで検出できる。

【0175】

例えば、細胞傷害性Tリンパ球の誘導を検出する方法は周知である。生体に侵入する外来物質は、抗原提示細胞 (APC) の作用によってT細胞およびB細胞に提示される。APCによって提示された抗原に抗原特異的に応答するT細胞は、抗原による刺激のために細胞傷害性T細胞 (または細胞傷害性Tリンパ球; CTL) に分化し、後に増殖する (これはT細胞の活性化と呼ばれる)。したがって、あるペプチドによるCTLの誘導は、ペプチドをAPCによってT細胞に提示させ、CTLの誘導を検出することで評価できる。またAPCは、CD4+ T細胞、CD8+ T細胞、マクロファージ、好酸球、およびNK細胞を活性化する効果をもつ。CD4+ T細胞は抗腫瘍免疫にも重要なので、ペプチドの抗腫瘍免疫誘導作用を、これらの細胞の活性化効果を指標として用いることで評価できる。

【0176】

樹状細胞 (DC) をAPCとして用いてCTLの誘導作用を評価する方法は当技術分野で周知である。DCは、APCの中で極めて強力なCTL誘導作用を有する代表的なAPCである。この方法では、最初に試験ポリペプチドをDCに接触させ、次にDCをT細胞に接触させる。DCとの接触後に対象細胞に対して細胞傷害作用を有するT細胞が検出されることは、試験ポリペプチドが、細胞傷害性T細胞を誘導する活性を有することを示す。腫瘍に対するCTLの活性は例えば、⁵¹Cr-標識腫瘍細胞の溶解を指標として用いて検出できる。あるいは³H-チミジンの取り込み活性、またはLDH (ラクトースデヒドロゲナーゼ) の放出を指標として用いることで、腫瘍細胞の損傷度を評価する方法も周知である。

【0177】

DCのほかに、末梢血単核球（PBMC）をAPCとして使用することもできる。CTLの誘導は、PBMCをGM-CSFおよびIL-4の存在下で培養することで増強され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で誘導されることが示される。

【0178】

これらの方法でCTL誘導活性をもつことが確認された試験ポリペプチドは、DC活性化効果と、これに続くCTL誘導活性を有するポリペプチドである。したがって、腫瘍細胞に対するCTLを誘導するポリペプチドは、NSCLCに対するワクチンとして有用である。さらに、ポリペプチドに接触させることによって、NSCLCに対するCTLを誘導する能力を獲得したAPCは、NSCLCに対するワクチンとして有用である。さらに、APCによるポリペプチド抗原の提示によって細胞傷害性を獲得したCTLを、NSCLCに対するワクチンとして使用することもできる。APCおよびCTLによる抗腫瘍免疫を利用する、NSCLCのこうした治療法は細胞免疫療法と呼ばれる。

【0179】

一般に、細胞免疫療法にポリペプチドを用いる場合、さまざまな構造をとる複数のポリペプチドを組み合わせ、これをDCに接触させることにより、CTL誘導の効率が高くなること知られている。したがって、DCをタンパク質断片で刺激する際は、複数の種類の断片の混合物を用いることが有利である。

【0180】

あるいは、ポリペプチドによる抗腫瘍免疫の誘導は、腫瘍に対する抗体産生の誘導を観察することで確認できる。例えば、ポリペプチドに対する抗体を、そのポリペプチドを接種した実験動物で誘導し、そして腫瘍細胞の成長、増殖、もしくは転移が、その抗体で抑制された場合、そのポリペプチドが抗腫瘍免疫を誘導する能力をもつと判断してよい。

【0181】

抗腫瘍免疫を本発明のワクチンを投与することで誘導すると、抗腫瘍免疫の誘導によってNSCLCの治療および予防が可能となる。NSCLCに対する治療または発症予防は、NSCLC細胞の成長阻害、NSCLC細胞の退縮、およびNSCLC細胞の出現抑制などの任意の段階を含む。NSCLCに罹患している個体の死亡率の減少、血中のマーカー遺伝子（KIF11、GHSR1b、および/またはNTSR1遺伝子に追加）の減少、NSCLCに伴う検出可能な症状の緩和なども、NSCLCの治療または予防に含まれる。このような治療および予防効果は、好ましくは統計的に有意である。例えば、NSCLCに対するワクチンの治療効果または予防効果を、ワクチンを投与していない対照と比較する観察において、5%以下は有意水準である。例えばスチューデントのt検定、Mann-WhitneyのU検定、またはANOVAを統計解析に用いることができる。

【0182】

免疫学的活性を有する上述のタンパク質、または同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組み合わせることができる。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（または連続的に）投与したときに、タンパク質に対する免疫応答を増強する化合物を意味する。アジュバントの例には、コレラ毒素、サルモネラ毒素、ミョウバンなどがあるが、これらに限定されない。また本発明のワクチンは、薬学的に許容される担体を適切に組み合わせることができる。このような担体の例には、滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液などがある。また、ワクチンは必要に応じて安定剤、懸濁剤、保存剤、界面活性剤などを含む場合がある。ワクチンは全身投与または局所投与する。ワクチンの投与は、1回の投与で実施してもよく、または複数回投与によって追加免疫してもよい。

【0183】

APCまたはCTLを本発明のワクチンとして使用すると、非小細胞肺癌を、例えばエキスピボの方法で治療または予防することができる。具体的には、治療または予防を受けた対象のPBMCを回収し、この細胞にポリペプチドをエキスピボで接触させ、APCもしくはCTLを誘導後に、細胞を対象に投与することができる。APCは、ポリペプチドをコードするベクタ

ーをPBMcにエキスピボで導入することで誘導することもできる。インビトロで誘導されたAPCまたはCTLをクローン化してから投与することができる。標的細胞を破壊する高い活性を有する細胞をクローン化して増やすことで、細胞免疫療法を、より効果的に実施することができる。また、このように単離されたAPCおよびCTLを、細胞が由来する個体に対してだけでなく、他の個体の類似のタイプの疾患に対する細胞免疫療法にも用いることができる。

【0184】

さらに、本発明は、対象におけるNSCLCの治療または予防のための方法であって、上記のスクリーニング方法の任意のものに従って得られた化合物を対象に投与する方法を提供する。本発明のスクリーニング方法のいずれかに従って得られる任意の化合物を、それが

10

【0185】

siRNAおよびそれらをコードするベクター

KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1に対するsiRNAを発現するベクターのトランスフェクションは、NSCLC細胞の増殖阻害を招く。したがって、センス鎖およびアンチセンス鎖を含む二本鎖分子であってKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1に対するsiRNAとして機能する分子、およびその二本鎖分子をコードするベクターを提供することは、本発明のもう1つの局面である。

【0186】

20

本発明の二本鎖分子はセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、この際、センス鎖はKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1標的配列に対応するリボヌクレオチド配列を含み、アンチセンス鎖は該センス鎖に対して相補的なリボヌクレオチド配列を含み、該センス鎖および該アンチセンス鎖は互いにハイブリダイズして該二本鎖分子を形成し、該二本鎖分子はKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子を発現する細胞に導入された場合に該遺伝子の発現を阻害する。

【0187】

本発明の二本鎖分子は、その本来の環境（すなわち、それが天然に存在する分子である場合には天然環境）に由来する、その天然の状態から物理的もしくは化学的に改変された、または化学合成されたポリヌクレオチドであってよい。本発明によれば、このような二本鎖分子には、DNA、RNA、およびそれらの誘導体から構成されるものが含まれる。DNAはA、T、C、およびGなどの塩基から構成されることが適切であり、RNAではTがUによって置き換えられている。

30

【0188】

上記のように、「相補的な」という用語は、ポリヌクレオチドのヌクレオチド単位間のワトソン-クリック型またはフーグスティーン型の塩基対合のことを指し、ヌクレオチド単位のハイブリダイゼーションまたは結合は、ミスマッチを少数しかまたは全く含まない安定な二重鎖（二本鎖構造）を形成する適切な条件下での、単位間の物理的または化学的な相互作用のことを示す。1つの好ましい態様において、このような二重鎖が10個塩基対毎に含むミスマッチは1個を上回ることはない。特に好ましい二重鎖は完全に相補的であり、ミスマッチを全く含まない。

40

【0189】

本発明の二本鎖分子は、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子のmRNA全体よりも短いKIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1標的配列に対応するリボヌクレオチド配列を含む。本明細書において、本明細書において、「KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子の標的配列」という語句は、NSCLC細胞株に導入された場合に、細胞の生存能力を抑制するのに有効な配列のことを指す。具体的には、標的配列は、SEQ ID NO: 1、3、5、および106の群より選択されるヌクレオチド配列からの、少なくとも10個、または適切には約19個から約25個までの連続したヌクレオチドを含む。すなわち、本二本鎖分子のセンス鎖は、少なくとも約10ヌクレオチドからなり、適切には19ヌクレオチドよりも長く、より好

50

ましくは21ヌクレオチドよりも長い。好ましい標的配列には、SEQ ID NO: 32、33、34、35、36、37、および108の配列が含まれる。センス鎖およびアンチセンス鎖を含む本二本鎖分子は、約100ヌクレオチド長よりも短い、好ましくは75ヌクレオチド長よりも短い、より好ましくは50ヌクレオチド長よりも短い、最も好ましくは25ヌクレオチド長よりも短いオリゴヌクレオチドである。本発明の適した二本鎖分子は、長さが約19～約25ヌクレオチドであるオリゴヌクレオチドである。さらに、siRNAの阻害活性を増強する目的で、ヌクレオチド「u」を、標的配列のアンチセンス鎖の3'末端に付加することができる。付加する「u」の数は少なくとも2個、一般的には2～10個、好ましくは2～5個である。付加された「u」は、siRNAのアンチセンス鎖の3'末端に一本鎖を形成する。これらの態様において、本発明のsiRNA分子は一般に、アンチセンス分子に関して上述したように修飾される。その他の修飾も可能であり、例えば、コレステロールと結合させたsiRNAは、改善された薬理学的特性を示すことが示されている (Songら、Nature Med. 9: 347-351(2003))。

10

【0190】

さらに、本発明の二本鎖分子は、一本鎖リボヌクレオチド配列を介して結びついているセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む単一のリボヌクレオチド転写物であってもよい。すなわち、本二本鎖分子は一般式：



を有してよく、式中、[A]は、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXO1の標的配列に対応するリボヌクレオチド配列であり；

[B]は、3～23ヌクレオチドからなるリボヌクレオチド配列（ループ配列）であり；かつ

20

[A']は、[A]に対して相補的なリボヌクレオチド配列である。相補的配列 [A'] および [A] は互いにハイブリダイズして二本鎖を形成し、一般式が5'-[A]-[B]-[A']-3'であるこのsiRNA分子全体がヘアピンループ構造を形成する。

【0191】

領域[A]は[A']とハイブリダイズし、すると領域[B]からなるループが形成される。ループ配列は、http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_506.htmlに記載されたもの、またはJacques, J.-M.ら、Nature 418: 435-438 (2002)に記載されたものから選択することができる。本二本鎖分子に含まれるループ配列のさらなる例には以下が含まれる：

CCC、CCACC、またはCCACACC：Jacques, J. M.ら、Nature, Vol. 418: 435-438 (2002)；

UUCG：Lee, N.S.ら、Nature Biotechnology 20: 500-505 (2002)；Fruscoloni, P.ら、

30

、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (4) : 1639-1644 (2003)；および

UUCAAGAGA：Dykxhoorn, D. M.ら、Nature Reviews Molecular Cell Biology 4: 457-467 (2002)。

【0192】

本発明のヘアピンループ構造を有する好ましいsiRNAを以下に示す。以下の構造において、ループ配列は以下のものからなる群より選択しうる：CCC、UUCG、CCACC、CCACACC、およびUUCAAGAGA。これらの配列のうち、最も好ましいループ配列はUUCAAGAGA (DNAにおいては「ttcaagaga」に対応する)：

guuaguguac gaacuggag-[B]-cuccaguuc guacacuaac (SEQ ID NO:32の標的配列用)；

gugucucugu uggaagacu-[B]-agaucucca acagagacac (SEQ ID NO:33の標的配列用)；

40

gaaggcaguu gaccaacac-[B]-guguugguc aacugccuuc (SEQ ID NO:34の標的配列用)；

ccucuaccug uccagcaug-[B]-caugcugga cagguagagg (SEQ ID NO:35の標的配列用)；

guucaucagc gccaucugg-[B]-ccagauggc gcugaugaac (SEQ ID NO:36の標的配列用)；

ggucgucaua caggucaac-[B]-guugaccug uaugacgacc (SEQ ID NO:37の標的配列用)；および

gcagcagaaa cgaccgaau-[B]-auucggucg uuucugcugc (SEQ ID NO:108の標的配列用)。

【0193】

本発明はさらに、本発明の二本鎖分子をコードするベクターを提供する。本ベクターは、二次構造を有しかつセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、適切には該センス鎖および該アンチセンス鎖を連結する一本鎖リボヌクレオチド配列も含む、転写物をコードする。本ベクターは、適切な細胞における分子の発現を導く調節配列を、本二本鎖分子をコード

50

する領域に隣接して含むことが好ましい。例えば、本発明の二本鎖分子は、それらのコード配列を、例えば核内低分子RNA (snRNA) U6またはヒトH1 RNAプロモーター由来のRNA pol III転写単位を含むベクター中にクローニングすることにより、細胞内で転写される。

【0194】

あるいは、本ベクターは例えば、標的配列を、目的の配列がその発現 (DNA分子の転写) が可能となる様式でベクターの調節配列と機能的に結合するように、発現ベクター中にクローニングすることによって作製される (Lee, N.S.ら、Nature Biotechnology 20: 500-505 (2002))。例えば、標的配列に対するアンチセンス配列を有するRNA分子の転写は、第1のプロモーター (例えば、クローニングされたDNAの3'末端に結合したプロモーター配列) によって行わせ、標的配列に対するセンス鎖を有するRNA分子の転写は第2のプロモーター (例えば、クローニングされたDNAの5'末端と結合したプロモーター配列) によって行わせる。発現されたセンス鎖およびアンチセンス鎖はインビボで互いにハイブリダイズして、標的配列を含む遺伝子のサイレンシングを行うsiRNA構築物を生じる。さらに、siRNA構築物のセンス鎖およびアンチセンス鎖をそれぞれ作製させるために、2つの構築物 (ベクター) を利用してもよい。

10

【0195】

ベクターを細胞に導入するために、トランスフェクション増強物質を用いることができる。FuGENE (Rochediagnostics)、Lipofectamin 2000 (Invitrogen)、Oligofectamin (Invitrogen)、およびNucleofector (Wako pure Chemical) は、トランスフェクション増強物質として有用である。

20

【0196】

NSCLCの治療または予防のための薬学的組成物

本発明は、NSCLC関連遺伝子の発現または活性を変化させる化合物に関する本スクリーニング方法によって選択された化合物を含む、NSCLCの治療または予防のための組成物を提供する。

【0197】

本発明のスクリーニング方法によって単離された化合物を、細胞増殖性疾患 (例えば、非小細胞肺癌) を治療するために、ヒトおよび他の哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、ヒヒ、チンパンジーに対して薬物として投与する場合には、単離された化合物を直接投与することもでき、または従来の薬剤調製法を用いて剤形として製剤化することもできる。本組成物のこのような医薬製剤には、経口的、直腸内、鼻内、局所外用 (口腔内および舌下を含む)、腔内もしくは非経口的 (筋肉内、皮下、および静脈内を含む) 投与のため、または吸入もしくは吹送による投与のために適した製剤が含まれる。製剤は任意で個別の投薬単位としてパッケージ化される。

30

【0198】

経口投与に適した薬学的製剤には、それぞれ所定量の活性成分を含むカプセル、カシェ剤、または錠剤などがある。製剤には、散剤、顆粒、溶液、懸濁液、または乳濁液も含まれる。活性成分は、任意でボーラス、舐剤、またはペーストとして投与される。経口投与用の錠剤およびカプセルは、結合剤、充填剤、潤滑剤、崩壊剤、または湿潤剤などの従来の賦形剤を含む場合がある。錠剤は、任意で1つもしくは複数の製剤成分を用いて、圧縮または成形により作製することができる。圧縮錠剤は、粉末または顆粒などの流動状の活性成分を、任意で結合剤、潤滑剤、不活性希釈剤、潤滑剤、表面活性剤、または分散剤と混合して適切な装置で圧縮することで調製することができる。成形錠剤 (compressed tablet) は、適切な装置内で、不活性希釈液で湿らせた粉末状化合物の混合物を成形することで作製できる。錠剤は、当技術分野で周知の方法にしたがって被覆することができる。経口流体調製物は例えば、水性もしくは油性懸濁液、溶液、乳濁液、シロップ、またはエリキシルの状態であってよく、または使用前に水もしくは他の適切な溶媒で再構成するための乾燥製品としてもよい。このような液体調製物は、懸濁剤、乳化剤、非水性溶媒 (食用油を含む場合がある)、または保存剤などの従来の添加剤を含む場合がある。錠剤は任

40

50

意選択で、インビボにおける活性成分の緩やかな放出、すなわち徐放性を提供するように製剤化することができる。錠剤の包装は、月に1回服用される1個の錠剤を含む場合がある。これらの調整物の薬剤の剤型または用量は、適切な用量を服用可能な指示された範囲内とする。

【0199】

非経口投与する製剤には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および製剤を対象レシピエントの血液と等張にする溶質を含みうる水性および非水性の無菌性注射溶液；ならびに懸濁剤および濃化剤を含みうる水性および非水性の滅菌済み懸濁液などがある。製剤は、単位用量または複数回投与用の容器中、例えば密封されたアンプルおよびバイアル中に入れることが可能であり、また使用直前に滅菌液体担体（例えば生理食塩水や注射用水）を添加するだけの凍結乾燥条件で貯蔵することができる。あるいは製剤を、持続注入用とすることができる。即時調合注射溶液および懸濁液は、既に説明した種類の滅菌粉末、顆粒、および錠剤から調製することができる。

10

【0200】

直腸投与用の製剤には、カカオバターやポリエチレングリコールなどの標準的な担体を含む坐剤などがある。口腔への局所投与、例えば頬または舌下に投与する製剤には、ショ糖およびアカシアなどの香味基剤またはトラガカントなどに活性成分を含むトローチ剤、ならびにゼラチン、グリセリン、ショ糖、またはアカシアなどの基剤中に活性成分を含む香錠が含まれる。活性成分を鼻内投与する場合、液体スプレー、または分散性粉末、または液滴状態を用いることができる。液滴は、1種類もしくは複数の分散剤、可溶化剤、または懸濁剤も含む、水性もしくは非水性の基剤で製剤化することができる。

20

【0201】

吸入投与では、組成物は、インサフレーター、ネブライザー、加圧容器、または他の便宜なエアロゾルスプレー送達手段から適宜投与される。加圧容器は、適切な噴霧剤（ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、炭酸ガス、または他の適切なガス）を含む場合がある。加圧エアロゾルの場合、投与単位は、一定量を送達するバルブを提供することで決定することができる。

【0202】

あるいは、吸入もしくは吹送による投与では、組成物は、乾燥粉末組成物、例えば活性成分と、乳糖やデンプンなどの適切な粉末基剤からなる粉末混合体の形状をとる場合がある。粉末組成物は、吸入器またはインサフレーターを利用して粉末を投与可能な、例えばカプセル、カートリッジ、ゼラチン、またはブリストア包装中の単位投与剤形とすることができる。

30

【0203】

他の製剤には、治療薬を放出する、移植可能な装置および粘着性パッチなどがある。

【0204】

望ましい場合、活性成分が徐放性となるように適合した上記の製剤を使用することができる。薬学的組成物は、抗菌剤、免疫抑制剤、または保存剤などの他の活性成分を含む場合もある。

【0205】

上記で特に言及した成分に加えて、本発明の製剤は、当該製剤の種類に関して当技術分野で周知の他の薬剤を含みうるということが理解されるべきであり、例えば経口投与に適した製剤は、香味剤を含みうる。

40

【0206】

好ましい単位投与剤型は、後述するような、活性成分の有効用量、またはこの適切な画分を含む剤型である。

【0207】

上述の各条件に関しては、組成物（例えばポリペプチドや有機化合物）を、約0.1～約250 mg/kg/日の用量で経口投与または注射する。成人の用量範囲は一般に、約5 mg～約17.5 g/日であり、好ましくは約5 mg～約10 g/日であり、最も好ましくは約100 mg～約3 g/

50

日である。個別の単位で提供される錠剤または他の単位投与剤型は、便宜上、同一単位量を複数回投与した量で有効性を示すような単位量、例えば約5 mg～約500 mg、通常は約100 mg～約500 mgを含む量を含む。

【0208】

使用される用量は、対象の年齢および性別、治療する正確な疾患、およびその重症度を含む、いくつかの因子に依存する。投与経路も、条件および重症度によって変動する場合がある。

【0209】

本発明はさらに、KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXO1遺伝子の群より選択される任意の1つの遺伝子の発現を阻害する活性成分を含む、NSCLCを治療または予防するための組成物を提供する。このような活性成分は、対象遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、もしくはリボザイム、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、もしくはリボザイムの発現ベクターなどの誘導体の場合がある。活性成分は、誘導体に対して不活性な適切な基剤と混合することにより、塗布剤またはパップ剤などの外用剤に使用することができる。

10

【0210】

また、必要に応じて、このような活性成分を、賦形剤、等張剤、可溶化剤、保存剤、鎮痛剤などを添加することにより、錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル剤、注射剤、溶液、点鼻薬、および凍結乾燥剤に製剤化することができる。これらは、医薬を含む核酸を調製する従来の方法で調製することができる。

20

【0211】

好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体、siRNA誘導体、またはリボザイム誘導体を、患部に直接塗布することで、または患部に到達するように血管内に注入することで患者に投与する。封入剤を組成物中に使用することで、持続性および膜透過性を高めることもできる。封入剤の例には、リポソーム、ポリ-L-リシン、脂質、コレステロール、リポフェクチン、およびこれらの誘導体などがある。

【0212】

このような組成物の用量は、患者の条件にあわせて適切に調整し、かつ所望の量を用いることができる。例えば0.1～100 mg/kg、好ましくは0.1～50 mg/kgの用量範囲で投与することができる。

30

【0213】

本発明の別の態様は、KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXO1遺伝子の群より選択される遺伝子の任意の1つにコードされたポリペプチドに対する抗体、または同ポリペプチドに結合する抗体の断片を含む、NSCLCを治療または予防するための組成物である。

【0214】

症状によってある程度の差があるものの、NSCLCを治療または予防するための抗体またはこの断片の用量は、正常な成人（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、より好ましくは約1.0 mg～約20 mg/日である。

【0215】

注射液の状態で正常な成人（体重60 kg）に非経口的に投与する場合は、患者の状態、疾患の症状、および投与方法によってある程度の差はあるものの、約0.01 mg～約30 mg/日、好ましくは約0.1～約20 mg/日、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都合である。また他の動物の例でも、体重60 kgに換算した量を投与することが可能である。

40

【0216】

以下の実施例は、本発明を説明し、当業者が本発明を作製および使用することを支援するために提示する。これらの例は、本発明の範囲を制限することを決して意図しない。

【0217】

特に明記しない限り、本明細書で用いられるすべての科学技術用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般に理解される用語と同じ意味をもつ。本発明を実施または検

50

討するにあたって、本明細書に記載されたものと類似または等価の方法および材料が使用される場合があるが、適切な方法および材料を以下に説明する。本明細書で引用された任意の特許、特許出願、および刊行物は、参照として本明細書に組み入れられる。

【0218】

発明を実施するための最良の形態

材料および方法

(1) 患者および組織試料

原発性NSCLC試料（このうち22例は腺癌（ADC）、14例は扁平上皮癌（SCC）、1件は腺扁平上皮癌に分類された）は、患者37例から、インフォームドコンセントを得た上で以前に入手した（Kikuchi, T.ら、Oncogene 22, 2192-2205（2003））。さらに15例の原発性NSCLC（7例のADCおよび8例のSCCを含む）を、本発明者らの施設で手術を受ける患者から、隣接する正常肺組織試料とともに入手した。

10

【0219】

(2) 細胞株

この検討に用いた30例のヒトNSCLC細胞株および4例のSCLC細胞株は以下の通りである：腺癌（ADC）A427、A549、NCI-H23、NCI-H522、LC174、LC176、LC319、PC3、PC9、PC14、PC14-PE6、NCI-H1373、NCI-H1435、NCI-H1793、SK-LU-1、NCI-H358、NCI-H1650、およびSW1573；腺扁平上皮癌（ASC）NCI-H226、NCI-H596、およびNCI-H647；扁平上皮癌（SCC）REF-LC-AI、SW-900、SK-MES-1、EBC-1、LU61、NCI-H520、NCI-H1703、およびNCI-H2170；大細胞癌（LCC）に関してはLX1；ならびにSCLCに関してはDMS114、DMS273、SBC-3、およびSBC-5。ヒト末梢気道上皮細胞SAECは、Cambrex Bio Science Inc.から購入した最適培地（SAGM）中で増殖させた。ヒト気管支上皮細胞株であるBEAS2B細胞も利用した。

20

【0220】

34例のヒトNSCLCまたはSCLC癌細胞株および2例の正常気管支上皮細胞株を、5または10%ウシ胎仔血清を加えた適切な培地中にて単層で増殖させた（表1参照）。

【0221】

（表1）

細胞株の名称	培地	供給元		
腺癌 (ADC)				
A427	EMEM(10%FBS)	ATCC(HTB-53)	10	
A549	RPMI-1640(10%FBS)	ATCC(CCL-185)		
NCI-H23	RPMI-1640(10%FBS)	ATCC(CRL-5800)		
NCI-H522	RPMI-1640(10%FBS)	ATCC(CRL-5810)		
LC174	RPMI-1640(10%FBS)	愛知県がんセンター		
LC176	RPMI-1640(10%FBS)	愛知県がんセンター		
LC319	RPMI-1640(10%FBS)	愛知県がんセンター		
PC-3	DMEM(10%FBS)	徳島大学		
PC-9	DMEM(10%FBS)	徳島大学		
PC14	RPMI-1640(10%FBS)	徳島大学		
PC14-PE6	RPMI-1640(10%FBS)	徳島大学	20	
NCI-H1373	RPMI-1640(10%FBS)	ATCC(CRL-5866)		
NCI-H1435	F12+DMEM(5%FBS)+EGF(+)	SNU バンク		
NCI-H1793	F12+DMEM(5%FBS)+Glu	SNU バンク		
SK-LU-1	DMEM(10%FBS)	SNU バンク		
BAC NCI-H358	RPMI-1640(10%FBS)	SNU バンク		
BAC NCI-H1650	RPMI-1640(10%FBS)	ATCC(CRL-5883)		
BAC SW1573	Leibovitz's L-15(10%FBS)	ATCC(CRL-2170)		
腺扁平上皮癌 (ASC)				
NCI-H226	RPMI-1640(10%FBS)	ATCC(CRL-5826)		20
NCI-H647	RPMI-1640(10%FBS)	ATCC(CRL-5834)		
NCI-H596	RPMI-1640(10%FBS)	SNU バンク		
扁平上皮癌 (SCC)				
RERF-LC-AI	DMEM(10%FBS)	徳島大学	30	
SW-900	Leibovitz's L-15(10%FBS)	SNU バンク		
SK-MES-1	DMEM(10%FBS)	SNU バンク		
EBC-1	DMEM(10%FBS)	徳島大学		
LU61	DMEM(10%FBS)	実験動物中央研究所		
NCI-H520	RPMI-1640(10%FBS)	ATCC(HTB-182)		
NCI-H1703	RPMI-1640(10%FBS)	ATCC(CRL-5889)		
NCI-H2170	RPMI-1640(10%FBS)	ATCC(CRL-5928)		
大細胞癌 (LCC)				
LX1	DMEM(10%FBS)	実験動物中央研究所		40
小細胞肺癌 (SCLCs)				
DMS114	RPMI-1640(10%FBS)	ATCC(CRL-2066)		
DMS273	RPMI-1640(10%FBS)	癌研究会		
SBC-3	RPMI-1640(10%FBS)	徳島大学		
SBC-5	EMEM(10%FBS)	徳島大学		
末梢気道上皮細胞				
SAEC	SAGM	Cambrex Bio Science Inc.		
ヒト気管支細胞株				
BEAS2B	RPMI-1640(10%FBS)	ATCC(CRL-9609)		

【 0 2 2 2 】

(3) 半定量的RT-PCR解析

培養細胞および臨床組織から、Trizol試薬 (Life Technologies, Inc.) を製造元のプロトコールに従って使用して全RNAを抽出した。抽出したRNAおよび正常ヒト組織のポリ (A) RNAをDNアーゼI (Nippon Gene) で処理した上で、オリゴ (dT) プライマーおよびSupe

rScript II逆転写酵素 (Invitrogen) を用いて逆転写させた。半定量的RT-PCR実験は、以下の合成した遺伝子特異的プライマー、または内部対照としての β -アクチン (ACTB) 特異的プライマーを用いて行った：

KOC1,	5' -TAAATGGCTTCAGGAGACTTCAG-3' (SEQ ID NO:7)および	
	5' -GGTTTTAAATGCAGCTCCTATGTG-3' (SEQ ID NO:8);	
KIF11,	5' -CTGAACAGTGGGTATCTTCCTTA-3' (SEQ ID NO:9)および	
	5' -GATGGCTCTTGAAGTAGAGGTTTC-3' (SEQ ID NO:10);	
NMU,	5' -TGAAGAGATTTCAGAGTGGACGA-3' (SEQ ID NO:11)および	
	5' -ACTGAGAACATTGACAACACAGG-3' (SEQ ID NO:12);	
NMU1R,	5' -AAGAGGGACAGGGACAAGTAGT-3' (SEQ ID NO:13)および	10
	5' -ATGCCACTGTTACTGCTTCAG-3' (SEQ ID NO:14);	
NMU2R,	5' -GGCTCTTACAACCTCATGTACCCA-3' (SEQ ID NO:15)および	
	5' -TGATACAGAGACATGAAGTGAGCA-3' (SEQ ID NO:16);	
GHSR1a,	5' -TGGTGTTCCTTCATCCT-3' (SEQ ID NO:17)および	
	5' -GAATCCCAGAAGTCTGAACA-3' (SEQ ID NO:18);	
GHSR1b,	5' -ACGGTCTCTACAGTCTCA-3' (SEQ ID NO:19)および	
	5' -CACAGGGAGAGGATAGGA-3' (SEQ ID NO:20);	
NTSR1,	5' -AGTGGGCTCAGAGTCTAGCAAAT-3' (SEQ ID NO:21)および	
	5' -TATTGAGAGATACACGGGGTTTG-3' (SEQ ID NO:22);	
GHRL,	5' -TGAGCCCTGAACACCAGAGAG-3' (SEQ ID NO:23)および	20
	5' -AAAGCCAGATGAGCGCTTCTA-3' (SEQ ID NO:24);	
NTS,	5' -TCTTCAGCATGATGTGTTGTGT-3' (SEQ ID NO:25)および	
	5' -TGAGAGATTCATGAGGAAGTCTTG-3' (SEQ ID NO:26);	
ACTB,	5' -GAGGTGATAGCATTGCTTTTCG-3' (SEQ ID NO:27)および	
	5' -CAAGTCAGTGTACAGGTAAGC-3' (SEQ ID NO:28)。	

PCR反応は、産物量が増幅の対数期の範囲内に確実に収まるようにサイクル数を最適化した。

【0223】

定量的リアルタイムRT-PCR (QRT-PCR) 解析およびノーザンブロット解析

KOC1遺伝子およびKIF11遺伝子の発現レベルを、ABI Prism 7700配列検出システム (Applied Biosystems) を用いるQRT-PCRによって測定した。培養細胞および臨床組織から、Trizol試薬 (Life Technologies, Inc.) を製造元のプロトコルに従って使用して全RNAを抽出した。抽出したRNAおよび正常ヒト組織のポリ (A) RNAをDNアーゼI (Nippon Gene) で処理した上で、オリゴ (dT) プライマーおよびSuperScript II逆転写酵素 (Invitrogen) を用いて逆転写させた。定量用対照としてのACTB遺伝子に関してはTaqMan Pre-Developed Assay Human ACTB (Applied Biosystems; #4333762F) を用いた。各遺伝子に対するプライマー対およびTaqManプローブは、Primer Expressソフトウェアを用いて以下のように設計した：

KOC1,	5' -ACGAATCATTTGCTCACTCCTT-3' (センス) (SEQ ID NO:98)、	
	5' -ACCCACACCCAACACAATTGT-3' (アンチセンス) (SEQ ID NO:99)、	40
	5' -ACAGCAAAGCCC-3' (TaqMan-MGBプローブ) (SEQ ID NO:100);	
KIF11,	5' -TTCACCCTGACAGAGTTCACAAA-3' (センス) (SEQ ID NO:101)	
	5' -GGGTGGTCTCCATAATAGCAA-3' (アンチセンス) (SEQ ID NO:102)、	
	5' -AGCCCACTTTAGAGTATAC-3' (TaqMan-MGBプローブ) (SEQ ID NO:103)。	

【0224】

各遺伝子およびACTB遺伝子に対するPCRは単一のチューブ内で2回ずつ行った。結果はこれらの2回の独立した試験の平均として表した。

【0225】

(4) ノーザン-ブロット解析

ヒト多組織ブロット (BD Biosciences Clontech) を、KOC1、KIF11、およびGHSR1の³²P 50

標識PCR産物とハイブリダイズさせた。KOC1、KIF11、およびGHSR1のcDNAプローブは、上記のものと同様のプライマーを用いるRT-PCRによって調製した。プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、および洗浄は供給元の推奨に従って行った。プロットのオートラジオグラフィーは増感BASスクリーン（BIO-RAD）を用いて室温（RT）で30～168時間行った。

【0226】

抗KOC1抗体および抗KIF11抗体の作製

それぞれN末端にHisタグ付加エピトープを含むKOC1（完全長）およびKIF11（コドン361～1056に対応する部分的アミノ酸配列）を発現するプラスミドを、pET28ベクター（Novagen）を用いて調製した。組換えタンパク質を大腸菌BL21コドン+株（Stratagene）で発現させ、TALON樹脂（BD Biosciences Clontech）を供給元のプロトコールに従い使用して精製した上で、ウサギに接種した。免疫血清を標準的な方法に従ってアフィニティーカラムで精製した。アフィニティー精製した抗KOC1抗体および抗KIF11抗体をウエスタンブロット解析、免疫沈降、および免疫染色のために用いた。本発明者らは、内因性IMP-1、IMP-2、およびIMP-3をいずれも発現しないが、HAタグ付加IMP-1、IMP-2、およびIMP-3発現ベクターがトランスフェクトされたNCI-H520細胞の溶解物を用いて、ウエスタンブロット解析により、抗KOC1抗体がKOC1に対して特異的であり、他の相同タンパク質であるIMP-1およびIMP-2とは交差反応しないことを確認した。

【0227】

KOC1欠失変異体の構築、および、KOC1-KIF11結合領域の同定のための免疫沈降アッセイ

KOC1およびそのドメインのいくつか（図3a）を、N末端にFLAGタグを付加しC末端にHAタグを付加したpCAGGSベクターの適切な部位にクローニングした。KOC1欠失変異体のみがトランスフェクトされたCOS-7細胞を、抗HAアガロース（SIGMA）により免疫沈降させた。ウエスタンブロット法により、内因性KIF11のバンドがアフィニティー精製した抗KIF11抗体を用いて検出された。

【0228】

（表3）RT-PCRによる欠失変異体の構築のためのプライマー配列

	F	SEQ ID NO.	R	SEQ ID NO.
完全長	5'-ATGAACAACTGTATATCGG-3'	69	5'-CTTCCGTCTTGACTGAGG-3'	70
KOC1 DEL1	5'-ATGAACAACTGTATATCGG-3'	71	5'-ATGAGCTTCAAGTTTCACC-3'	72
KOC1 DEL2	5'-ATGAACAACTGTATATCGG-3'	73	5'-CTCCGTTTCTGATTGCTC-3'	74
KOC1 DEL3	5'-ATGAACAACTGTATATCGG-3'	75	5'-AGGCAAATCACATGGTTTCTG-3'	76
KOC1 DEL4	5'-TTGCCTCTGCGCCTGCTG-3'	77	5'-CTTCCGTCTTGACTGAGG-3'	78
KOC1 DEL5	5'-TTGCCTCTGCGCCTGCTG-3'	79	5'-CTCCGTTTCTGATTGCTC-3'	80

【0229】

KOC1結合mRNAの同定のためのRNA免疫沈降およびcDNAマイクロアレイ・スクリーニング

本発明者らは、インビボでKOC1が関与するRNA-タンパク質相互作用を解析するために、NiranjanakumariらのRNA免疫沈降プロトコール（Niranjanakumari, S.ら、Methods 26, 182-190（2002））を採用した。免疫沈降させたRNAを、5例の肺癌細胞株（A549、LC319、PC14、RERF-LC-AI、およびSK-MES-1）から単離した。32,256種の遺伝子を提示するcDNAマイクロアレイに対するハイブリダイゼーション（IP-マイクロアレイ解析）を目的として、免疫沈降した各RNA（IP-RNA）および全RNA（対照）からT7を用いて増幅したRNA（aRNA）の2.5μgアリコート、以前の記載の通りにそれぞれCy5-dCTPおよびCy3-dCTPの存在下で逆転写させた（Kikuchi, T.ら、Oncogene 22, 2192-2205（2003））。IP-マイクロアレイ解析によって同定されたmRNAのKOC1に対する結合を確認するために、本発明者らは、遺伝子特異的プライマー、および抗KOC1抗体とともに免疫沈降したNSCLC細胞抽出物由来のRNA

を用いるRT-PCR実験を行った（IP-RT-PCR）。KOC1結合mRNAに対する結合のために必要なKOC1の領域を確かめるために、本発明者らは以下のようなノースウエスタンブロット解析、および、種々のKOC1欠失変異体がトランスフェクトされたこれらの免疫沈降抽出物からのKOC1結合mRNAのIP-RT-PCRも行った。

【0230】

（表4）IP-RT-PCRのためのプライマー配列

	F	SEQ ID NO.	R	SEQ ID NO.
CCT2	5'-TTATCCTGAACAGCTCT TTGGTG-3'	81	5'-AAGCGAAGGTCAGCTAAATA TCC-3'	82
SBP2	5'-CTTTCTGAGCACACTAC GGATCT-3'	83	5'-AAGCCCTCTTACTTACAGGG AAA-3'	84
SLC25A3	5'-GGTTCCCCTGGATTTAG TGAA-3'	85	5'-CAACAGTAAATCTGAAACTC TTGCC-3'	86
RAB35	5'-GACAAAGGTAGCAAGA GGATTC-3'	87	5'-CTGGTGTTAAACTCGGTTCT TC-3'	88
PSMB7	5'-CTAGTGAGTGAGGCTAT TGCAGC-3'	89	5'-GTCTCTTCTAGCACCTCAAT CTCC-3'	90
GL	5'-ATCTGACTTTCTGTCCA CTGCAT-3'	91	5'-TAATTCAGCATAAGCCAAAG CC-3'	92
PKP4	5'-ACACAGTATGGACTGAA ATCGAC-3'	93	5'-CACCTCAATCTGAACAAGGT TAG-3'	94
WINS1	5'-GGCCTCTCAAAGTCTGG TAGATT-3'	95	5'-ATATTCCCACTTCAGAGACG ACA-3'	96

【0231】

ノースウエスタンブロット解析

KOC1欠失変異体がトランスフェクトされた細胞からの免疫沈降抽出物（ μ M）を2×SDSサンプルバッファー中で煮沸し、10～20%勾配のポリアクリルアミドゲル（BIO-RAD）による電気泳動を行って、ポリニフッ化ビニリデン膜（Hybond-P）に移行させた。続いてこの膜を、ブロッキングバッファー（10mM Tris-HCl（pH 7.8）、150mM NaCl、1mg/ml酵母tRNA）中にて室温で1時間にわたりブロッキングし、50mlの10mM Tris-HCl（pH 7.8）による5分間の洗浄を2回行った上で、5mlのNWBバッファー（10mM Tris-HCl（pH 7.8）、1mM EDTA、50mM NaCl、0.02%Ficoll、0.02%ポリビニルピロリドン、0.02%BSA）中でDIG標識RNAプローブとともに室温で2時間インキュベートした。この膜をNWBバッファーで4回洗浄した後に、タンパク質と結合したRNAプローブを、DIG核酸検出キット（Roche）を供給元のプロトコールに従って用いて検出した。

【0232】

KOC1タンパク質およびKIF11タンパク質ならびにKOC1 会合性RAB35 mRNAの生細胞イメージング

ECFPと融合したKOC1（ECFP-KOC1）タンパク質を発現するプラスミドを、pECFP-N1ベクター（BD Biosciences Clontech）を用いて調製した。EYFPと融合したKIF11（EYFP-KIF11）タンパク質を発現するプラスミドも、pEYFP-N1ベクター（BD Biosciences Clontech）を用いて調製した。ECFP-KOC1またはEYFP-KIF11タンパク質を発現するプラスミドがトランスフェクトされたCOS-7細胞のタイムラプス画像を、Live Cell Imaging System（Power IX81, OLYMPUS）および共焦点顕微鏡（TCS SP2-A0BS, Leica Microsystems；FV1000 FLUOVIEW, OLYMPUS）により、5～15時間にわたって取り込んだ。

【0233】

KOC1関連遺伝子RAB35の完全長cDNA配列を有する線状化プラスミドのインビトロ転写を、DAVIS Labのプロトコール（<http://www.ed.ac.uk/~ilan>）を用いて行った。KOC1とのインビボ共局在に関する蛍光リポプローブを作製するために、mCAP RNAキャッピングキット

(Stratagene) をAlexa Fluor 546標識UTP (Molecular Probes) の存在下で用いてプラスミドを転写させた。本発明者らは、EGFPと融合したKOC1 (EGFP-KOC1) タンパク質を発現するプラスミドを、pEGFP-N1ベクター (BD Biosciences Clontech) を用いて調製した。共局在性のEGFP-KOC1およびAlexa Fluor 546標識RAB35 mRNAの生細胞イメージングのためには、pEGFP-KOC1を前もってトランスフェクトしたCOS-7細胞に対して、さらに36時間後にAlexa Fluor 546標識RAB35 mRNA (3.5cm培養皿当たり3 μ g) をRNアーゼ阻害剤 (TAKARA) の存在下でトランスフェクトした。プラスミド-DNAおよびRNAの試料は、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を製造元のプロトコールに従い使用してトランスフェクトした。細胞をPBSで2回洗浄し、トランスフェクションから90分後に新たな培地を標識mRNAとともに加えた。細胞をインキュベーター (37°C、5%CO₂) 内で30分間回復させ、その後に共焦点顕微鏡 (FV1000 FLUOVIEW, OLYMPUS) を用いて生細胞イメージングを3~6時間行った。KOC1-RNP複合体による1つの細胞から別の細胞へのmRNAの特異的輸送について調べるために、本発明者らは2種類の異なったCOS-7由来細胞を調製した；一方はpEGFP-KOC1およびAlexa Fluor 546標識RAB35 mRNAをトランスフェクトしたCOS-7細胞、もう一方はCellTracker (Molecular Probes) を供給元のプロトコールに従って用いて単標識した親COS-7細胞である。これらの2つの細胞集団を混合し、12時間共培養した後に、共焦点顕微鏡を用いて生細胞イメージングを6時間行った。

【0234】

レシピエント細胞における、KOC1-RNP複合体によって輸送されたmRNAの翻訳について調べるため、本発明者らは2種類のCOS-7由来細胞を調製した；一方の種類はpCAGGS-FLAGタグ付加-KOC1および-KIF11を同時トランスフェクトしたCOS-7細胞である。24時間の培養後に、EGFPと融合させたRAB35完全長mRNAを含むプラスミドをこれらの細胞に再びトランスフェクトした。もう一方の種類は、CellTracker (青色) による単標識を行ったCOS-7細胞である。これらの2種類の細胞を混合し、24時間共培養した後に、ビデオ顕微鏡を用いて12時間にわたり生細胞イメージングを行った。2つの細胞間での、CellTrackerで染色したレシピエント細胞 (青色) における、ならびに超微細構造上での、EGFP標識RAB35 mRNAおよび対応するタンパク質の合成を、インサイチューハイブリダイゼーションおよびタイムラプスビデオ顕微鏡検査により試験した。

【0235】

蛍光インサイチューハイブリダイゼーション

本発明者らは、RAB35またはEGFPのmRNAに対して相補的なDIG標識プローブを用いたインサイチューハイブリダイゼーションを60°Cで16時間行った。DIG標識は、アルカリホスファターゼ呈色基質であるNBT-BCIPを用いて検出した。細胞を洗浄してマウントし、光学顕微鏡上で可視化した。固定した細胞を、RAB35 mRNAに対して相補的なDIG標識物の混合物と、50%ホルムアミド/2×SSC中、42°Cで16時間ハイブリダイズさせた。細胞を洗浄してマウントし、共焦点顕微鏡上で可視化した。

【0236】

(5) RNA干渉アッセイ

低分子干渉RNA (siRNA) を発現するプラスミドベクターを調製するために、本発明者らは、それ自身のプロモーター領域を含むH1RNA遺伝子のゲノム断片を、プライマーのセット、5'-TGGTAGCCAAGTGCAGGTTATA-3' (SEQ ID No: 44) および5'-CCAAAGGGTTTCTGCAGTTTCA-3' (SEQ ID No: 45) ならびにテンプレートとしてヒト胎盤DNAを用いるPCRによって増幅した。その産物を精製し、TAクローニングキットを供給元のプロトコール (Invitrogen) に従い使用してpCR2.0プラスミドベクター中にクローニングした。H1RNAを含むBamHIおよびXhoI断片をpcDNA3.1(+)のヌクレオチド1257位と56位との間に挿入し、この断片を、

5'-TGCGGATCCAGAGCAGATTGTACTGAGAGT-3' (SEQ ID No: 46) および

5'-CTCTATCTCGAGTGAGGCGAAAGAACCA-3' (SEQ ID No: 47)

を用いるPCRによって増幅した。連結されたDNAは、プライマー、

5'-TTTAAGCTTGAAGACATTTTTGGAACCAACCA-3' (SEQ ID No: 48) および

5'-TTTAAGCTTGAAGACATGGGAAAGAGTGGTCTCA-3' (SEQ ID No: 49)

を用いるPCR増幅のためのテンプレートとなった。

【0237】

その産物をHindIIIで消化した後に、自己連結させて、SEQ ID NO：50に示されたヌクレオチド配列を有するpsiH1BX3.0ベクタープラスミドを作製した。

【0238】

siRNAをコードするDNA断片を、GAP中のヌクレオチド489位～492位に、以下のプラスミド配列（SEQ ID NO：50）に（-）として示されているように挿入した。

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGGATCCA
CTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTGGTAGCCAAGTGCAGGTTATAGGGAGCT
GAAGGGAAGGGGGTCACAGTAGGTGGCATCGTTTCCTTTCTGACTGCCCGCCCCCGCATGCC
GTCCCGCGATATTGAGCTCCGAACCTCTCGCCCTGCCGCCGCGGTGCTCCGTGCGCCGCGCG
CCGCCATGGAATTCGAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCCAGTGTC
ACTAGGCGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGG
GAGTGGCGCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAAT
GTCTTTGGATTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTCTTTCCC---TTTTTGGGAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAACGAAACCGGGCGGGCGCGGTGGTTACGCCTATAATCCCAGC
ACTTTGGGAGGCCGAGGCGGGCGGATCACAAGGTCAGGAGGTGAGACCATCCAGGCTAAC
ACGGTGAACCCCCCCCCCATCTCTACTAAAAAAAAAAAAATACAAAAAATTAGCCATTAGCCG
GGCGTGGTGGCGGGCGCCTATAATCCCAGCTACTTGGGAGGCTGAAGCAGAATGGCGTGAAC
CCGGGAGGCGGACGTTGACGTGAGCCGAGATCGCGCCGACTGCATTCCAGCCTGGGCGACA
GAGCGAGTCTCAAAAAAAAAACCGAGTGGAATGTGAAAAGCTCCGTGAAACTGCAGAAACC
CAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGTGAGGCGGAAAGAACCA
GCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTG
GTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTC
TTCCCTTCCTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTT
TAGGGTTCGATTAGTGTCTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTT
CAGGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCT
TTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGCTATCTTTTGA
TTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTT
AACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAG
CAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCA
GGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCG
CCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCT
GACTAATTTTTTTTATTTATGTCAGAGGCCGAGGCCGCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTA
GTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGTCCCGGGAGCTTGTATATCCAT
TTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCA
CGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAA
TCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTGTCA
AGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTG
GCCACGACGGGCGTTCTTTCGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTG
GCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCACTCACCTTGCTCCTGCCGAGAA
AGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTC
GACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTA CTGGATGGAAGCCGGTCTTGTGCA
TCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACFGTTCGCCAGGCTCA
AGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATA
TCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACC
GCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTG
ACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCT
TCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAA
CCTGCCATCACGAGATTTTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGT
TTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCA
CCCCAACTTGTTTATTGTCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACA
AATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCA
TGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTG
TGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCC
TGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAG
TCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTT
GCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCG
GCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGC
AGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTT
GCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCA

10

20

30

40

GAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCG
 TCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAG
 CGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAG
 CTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGT
 CTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGAT
 TAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCT
 AACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAAAGA
 GTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAG
 CAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGAC
 GCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTAAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTC
 ACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTG
 CTGTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTCA
 TCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCC
 CCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACC
 AGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCT
 ATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTT
 GCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTT
 CCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCG
 GTCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCAC
 TGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAAC
 CAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGA
 TAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTGGAACGTTCTTCGGGGCG
 AAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAA
 CTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAA
 TGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCA
 ATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAA
 AAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC

10

20

【0239】

30 μlのLipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて、10 μgのsiRNA発現ベクターを、
 いずれも内因的にKOC1、KIF11、NMU、GHSR1b、NTSR1、RAB35、およびFOXM1を過剰発現す
 るNSCLC細胞株A549およびLC319にトランスフェクトした。90%を上回るトランスフェクト
 細胞のが合成siRNAを発現し、これらの細胞における標的遺伝子（KIF11、GHSR1b、NTSR1
 、RAB35、またはFOXM1）の内因性発現は効果的に抑制された。トランスフェクト細胞を適
 切な濃度のジェネティシン（G418）の存在下で5日間培養し、その後に細胞の数および生
 存度をギムザ染色および3連のMTTアッセイによって測定した。RNAiのための合成オリゴヌ
 クレオチドの標的配列は以下の通りとした：対照1（EGFP：発光オワンクラゲ（*Aequorea*
victoria）EGFPの変異体である強化緑色蛍光タンパク質（EGFP）遺伝子）、5'-GAAGCAGCA
 CGACTTCTTC-3'（SEQ ID NO：29）；対照2（ルシフェラーゼ：フォチナス-ピラリス（*Phot*
inus pyralis）のルシフェラーゼ遺伝子）、5'-CGTACGCGGAATACTTCGA-3'（SEQ ID NO：30
 ）；対照3（スクランブル：5Sおよび16S rRNAをコードする葉緑体ミドリムシ（*Euglena g*
racilis）遺伝子）、5'-GCGCGCTTTGTAGGATTCG-3'（SEQ ID NO：31）；
 siRNA-KIF11-1（#1）、5'-GTTAGTGTACGAAGTGGAG-3'（SEQ ID NO：32）；
 siRNA-KIF11-2（#2）、5'-GTGTCTCTGTTGGAGATCT-3'（SEQ ID NO：33）；
 siRNA-KIF11-3（#3）、5'-GAAGGCAGTTGACCAACAC-3'（SEQ ID NO：34）；
 siRNA-GHSR-1（si-GHSR-1）、5'-CCTCTACCTGTCCAGCATG-3'（SEQ ID NO：35）；
 siRNA-NTSR1-1（si-NTSR1-1）、5'-GTTTCATCAGCGCCATCTGG-3'（SEQ ID NO：36）；
 siRNA-NTSR1-2（si-NTSR1-2）、5'-GGTCGTCATACAGGTCAAC-3'（SEQ ID NO：37）、
 siRNA-RAB35（si-RAB35）、5'-GAGATGTTCAACTGCATCA -3'（SEQ ID NO：114）、
 siRNA-FOXMI（si-FOXMI）、5'-GCAGCAGAAACGACCGAAT-3'（SEQ ID NO：108）。

30

40

【0240】

これらのsiRNAに用いたオリゴヌクレオチドは以下に示されている。各々の構築物は、
 以下の二本鎖オリゴヌクレオチドをpsiH1BX3.0ベクターのBbsI部位にクローニングするこ
 とによって調製した。SEQ ID NO：1、3、5、112、および106のKIF11、GHSR1b、NTSR1、RA
 B35、およびFOXMI核酸配列に対する、対応するヌクレオチド位置を、各オリゴヌクレオチ

50

ド配列に関して列記している。各オリゴヌクレオチドは、KIF11、GHSR1b、NTSR1、RAB35、およびFOXMIの標的配列のセンスヌクレオチド配列とアンチセンスヌクレオチド配列との組み合わせである。各siRNAのヘアピンループ構造のヌクレオチド配列も以下に示されている（エンドヌクレアーゼ認識部位は、各ヘアピンループ構造配列から除外されている）。

KIF11 si1 288-306 (gttagtgtac gaactggag/ SEQ ID NO:32の標的配列用)

(インサートF) Tccc gttagtgtacgaactggag ttcaagaga ctccagttcgtacactaac/SEQ ID NO:51

(インサートR) Aaaa gttagtgtacgaactggag tctcttgaa ctccagttcgtacactaac/SEQ ID NO:52 10

(ヘアピン) gttagtgtacgaactggag ttcaagaga ctccagttcgtacactaac/SEQ ID NO:53

KIF11 si2 612-630 (gtgtctctgt tggagatct/ SEQ ID NO:33の標的配列用)

(インサートF) Tccc gtgtctctgt tggagatct ttcaagaga agatctccaacagagacac/SEQ ID NO:54

(インサートR) Aaaa gtgtctctgt tggagatct tctcttgaa agatctccaacagagacac/SEQ ID NO:55

(ヘアピン) gtgtctctgt tggagatct ttcaagaga agatctccaacagagacac/SEQ ID NO:56

20

KIF11 si3 1700-1718 (gaaggcagtt gaccaacac/ SEQ ID NO:34の標的配列用)

(インサートF) Tccc gaaggcagtt gaccaacac ttcaagaga gtgttggtcaactgccttc/SEQ ID NO:57

(インサートR) Aaaa gaaggcagtt gaccaacac tctcttgaa gtgttggtcaactgccttc/SEQ ID NO:58

(ヘアピン) gaaggcagtt gaccaacac ttcaagaga gtgttggtcaactgccttc/SEQ ID NO:59

GHSR1b si1 237-255 (cctctacctg tccagcatg/ SEQ ID NO:35の標的配列用)

(インサートF) Tccc cctctacctg tccagcatg ttcaagaga catgctggacaggtagagg/SEQ ID NO:60 30

(インサートR) Aaaa cctctacctg tccagcatg tctcttgaa catgctggacaggtagagg/SEQ ID NO:61

(ヘアピン) cctctacctg tccagcatg ttcaagaga catgctggacaggtagagg/SEQ ID NO:62

NTSR1 si1 933-951 (gttcatcagc gccatctgg/ SEQ ID NO:36の標的配列用)

(インサートF) Tccc gttcatcagc gccatctgg ttcaagaga ccagatggcgctgatgaac/SEQ ID NO:63

(インサートR) Aaaa gttcatcagc gccatctgg tctcttgaa ccagatggcgctgatgaac/SEQ ID NO:64

(ヘアピン) gttcatcagc gccatctgg ttcaagaga ccagatggcgctgatgaac/SEQ ID NO:65

40

NTSR1 si2 1074-1092 (ggtcgtcata caggtcaac/ SEQ ID NO:37の標的配列用)

(インサートF) Tccc ggtcgtcata caggtcaac ttcaagaga gttgacctgtatgacgacc/SEQ ID NO:66

(インサートR) Aaaa ggtcgtcata caggtcaac tctcttgaa gttgacctgtatgacgacc/SEQ ID NO:67

(ヘアピン) ggtcgtcata caggtcaac ttcaagaga gttgacctgtatgacgacc/SEQ ID NO:68

RAB35 si 620-638 (gagatgttca actgcatca/ SEQ ID NO:114の標的配列用)

(インサートF) Tccc gagatgttca actgcatca ttcaagaga tgatgcagt tgaacatctc/SEQ ID

50

NO:115

(インサートR) Aaaa gagatgttca actgcatca tctcttgaa tgatgcagt tgaacatctc /SEQ ID

NO:116

(ヘアピン) gagatgttca actgcatca ttcaagaga tgatgcagt tgaacatctc /SEQ ID NO:117

FOXMI si 1240-1258 (gcagcagaaacgaccgaat/ SEQ ID NO:108の標的配列用)

(インサートF) Tccc gcagcagaaa cgaccgaat ttcaagaga attcggtcg tttctgctgc /SEQ ID NO:109

(インサートR) Aaaa gcagcagaaa cgaccgaat tctcttgaa attcggtcg tttctgctgc /SEQ ID NO:110

(ヘアピン) gcagcagaaa cgaccgaat ttcaagaga attcggtcg tttctgctgc /SEQ ID NO:111

。

【0241】

本発明のRNAi系を検証するために、個々の対照siRNA (EGFP、ルシフェラーゼおよびスクランブル) が、COS-7細胞に一過性にトランスフェクトされた対応する標的遺伝子の発現を低下させることを、半定量的RT-PCRを用いて最初に確認した。KIF11、GHSR1b、NTSR1、RAB35、およびFOXMIの発現が、各々のsiRNA (si-KIF11-1、si-KIF11-2、si-KIF11-3、si-GHSR-1、si-NTSR1-1、si-NTSR1-2、si-RAB35、およびsi-FOXMI) によっては下方制御されるが、対照によっては下方制御されないことが、このアッセイ法のために用いた細胞株での半定量的RT-PCRによって確かめられた。

【0242】

ドミナントネガティブアッセイ

本発明者らは、肺癌細胞の増殖または生存におけるKOC1-KIF11複合体の機能的役割を調べるために、KOC1欠失変異体を用いてドミナントネガティブアッセイを行った。KOC1DEL3およびKOC1DEL2構築物 (図3a; 10 μ g)、モックプラスミド (10 μ g)、または最終用量が10 μ g DNAとなる両方の構築物のプラスミド混合物 (KOC1DEL3またはKOC1DEL2:モック (μ g) がそれぞれ7.5:2.5、5:5、または2.5:7.5) をLC319細胞にトランスフェクトした。トランスフェクト細胞をG418の存在下で7日間培養し、それらの生存率を3連のMTTアッセイによって測定した。

【0243】

(6) 免疫共沈降およびMALDI-TOF質量分析法

ヒト肺癌細胞株LC319細胞に対して、両側にタグを付加したpCAGGS-n3FH (NH₂末端FLAG、COOH末端HA) -KOC1発現ベクターまたは空ベクター (モックトランスフェクション) をトランスフェクトした。細胞の抽出をIP-バッファー (0.5%NP-40、50mM Tris-HCl、150mM NaCl、およびプロテアーゼ阻害剤) 中にて氷上で30分間行った。抽出物を14,000rpmで15分間遠心し、その上清を、抗FlagM2アガロース (Sigma-Aldrich) および抗HAビーズ (Sigma-Aldrich) を用いる免疫沈降に1~2時間供した。ビーズをIPバッファーで6回洗浄し、最終洗浄画分を除去した後にLaemmliサンプルバッファー中でビーズを煮沸することによってタンパク質を溶出させた。溶出したタンパク質をSDS-PAGEによって分離し、銀染色によって染色した。125kDaのバンドがゲル抽出によって抽出され、これをMALDI-TOF質量分析法を用いる質量分析シーケンシングのために用いた。この分析により、KIF11は125kDa産物として同定された。

【0244】

KOC1とKIF11との相互作用を確認するために、A549細胞に対してFlagタグ付加KIF11およびmycタグ付加KOC1を一過性に同時トランスフェクトし、抗Flag M2アガロースによって細胞を免疫沈降させた。その後、抗myc抗体 (9E10; Santa Cruz) を用いて細胞のイムノブロット法を行った。次に、ベクターと細胞の同一の組み合わせを用いて、細胞を抗mycアガロース (SIGMA) で免疫沈降させ、抗Flag M2抗体 (Sigma-Aldrich) によるイムノブロット法を行った。

【0245】

この相互作用をさらに確かめるために、A549細胞に対してFlagタグ付加KIF11およびmycタグ付加KOC1を一過性に同時トランスフェクトしたところ、以下に述べるように、FITC標識抗FLAG抗体およびローダミン標識抗myc抗体を用いた免疫細胞化学染色により、FITC標識KIF11およびローダミン標識KOC1の共局在が主として細胞質中に検出された。

【0246】

(7) 免疫細胞化学

カバーガラス上で増殖させたA549細胞を継代後に24時間培養し、これにFlagタグ付加KIF11およびmycタグ付加KOC1を同時トランスフェクトした。24時間のインキュベーション後に、細胞を氷上でアセトン/メタノール(1:1)により5分間固定し、CAS BLOCK (ZYMED) 中で室温で7分間ブロッキングした後に、ウサギ抗Flagポリクローナル抗体 (SIGMA) とともに室温で1時間インキュベートした。固定した細胞をPBSで3回洗浄し、抗ウサギ IgG-FITCと室温で1時間反応させた。続いて細胞を再びブロッキングし、抗myc抗体 (9E10; Santa Cruz) とともに室温で1時間インキュベートした。最後に細胞に対して抗マウスIgG-ローダミンを室温で1時間適用した。細胞をLeica TCS SP2-AOBS共焦点顕微鏡で観察した。

10

【0247】

免疫組織化学および組織マイクロアレイ解析

ホルマリン固定したNSCLCを用いた腫瘍組織マイクロアレイを、別稿に発表されている通りに構築した (Kononen, J.ら、Nat. Med. 4, 844-847 (1998); Sauter, G.ら、Nat. Rev. Drug Discov. 2, 962-972 (2003))。KOC1およびKIF11は、臨床的な経過観察データを事前に知らされていない3人の調査者によって、染色強度に基づき半定量的に有無が評価された。

20

【0248】

(8) リガンド-受容体結合アッセイ

NMU-25とその候補受容体であるGHSR1a、GHSR1b、およびNTSR1との直接的な結合を同定するために、以下の実験を行った。各々の受容体遺伝子の全コード領域を、プライマー、GHSR1a (5'-GGAATTCCATGTGGAACGCGACGCCAGCGAA-3' (SEQ ID NO:38)および5'-CGCGGATCCGCGTGTATTAATACTAGATTCTGTCCAGGCC-3' (SEQ ID NO:39))、GHSR1b (5'-GGAATTCCATGTGGAACGCGACGCCAGCGAA-3' (SEQ ID NO:40)および5'-CGCGGATCCGCGGAGAGAAGGGAGAAGGCACAGGGA-3' (SEQ ID NO:41))、ならびにNTSR1 (5'-GGAATTCCATGCGCCTCAACAGCTCCGCGCCGGGAA-3' (SEQ ID NO:42)および5'-CGCGGATCCGCGGTACAGCGTCTCGCGGGTGGCATTGCT-3' (SEQ ID NO:43))を用いるRT-PCRによって増幅した。その産物をEcoRIおよびBamHIで消化し、p3XFLAG-CMV10ベクター (Sigma-Aldrich Co.) の適切な部位にクローニングした。COS-7細胞に対して、上記のように、FuGENE6を用いて、GHSR1bまたはNTSR1発現プラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクトされたCOS-7細胞を、0.5 μ Mローダミン標識NMU-25ペプチド (NMU-25-ローダミン: Phoenix Pharmaceuticals, Inc.) とともに12時間培養し、PBS (-) 中で5回洗浄して、4%パラホルムアルデヒド溶液中で室温で60分間固定した。続いて細胞を、Flagタグを付加したGHSR1a、GHSR1bまたはNTSR1タンパク質に対する抗体 (Sigma-Aldrich Co.) とともにインキュベートし、FITCを結合させたヤギ抗マウス二次抗体 (Cappel) で染色した上で、レーザー共焦点顕微鏡検査 (TCS SP2 AOBS: Leica Microsystems) により観察した。さらに、3つの異なる陰性対照をこのアッセイ法のために調製した: 1) NMU-25-ローダミンを添加していない非トランスフェクトCOS-7細胞; 2) NMU-25-ローダミンで処理した非トランスフェクトCOS-7細胞; および3) GHSR1a、GHSR1b、またはNTSR1がトランスフェクトされ、NMU-25-ローダミンで処理していないCOS-7細胞。既知のNMU受容体 (NMU1R) をトランスフェクトしたCOS-7細胞を本アッセイ法の陽性対照として用いた。

30

40

【0249】

NMU-25と候補受容体との結合を確かめるために、同一の一連のCOS-7細胞を用いてフローサイトメトリー分析を行った。具体的には、COS-7細胞を 1×10^5 個/100mm培養皿の密度でプレーティングし、これにGHSR1b、NTSR1、またはNMU1R発現ベクターをトランスフェ

50

クトし；トランスフェクションから24時間後に、細胞を0.5 μ M NMU-25-ローダミンとともに12時間インキュベートし、洗浄して、トリプシン処理し、PBS中に集めた上で、PBS中でさらにもう1回洗浄した。ローダミン標識NMU-25と結合する細胞の集団をフローサイトメトリーによって測定した。

【0250】

NMU-25とNSCLC細胞上の内因性候補受容体との結合をさらに確かめるために、本発明者らはLC319細胞およびPC-14細胞を用いて受容体-リガンド結合アッセイを行った。手短に述べると、トリプシン処理したこれらの細胞を、アッセイ法の24時間前に、壁が黒く底が透明な96ウェルのマイクロタイタープレートに播いた。培地を除去し、細胞を、Cy5-NMU-25と、10倍過剰量の非標識性競合物質とともにインキュベートした。プレートを暗所にて37℃で24時間インキュベートして、8200 Cellular Detectionシステム (Applied Biosystems) で走査した。8200解析ソフトウェアは、デジタル化されたグレースケール画像を作成して、各細胞の表面に結合した蛍光の量を定量化し、蛍光細胞を計数する。

【0251】

cAMPレベルの測定

トリプシン処理したLC319細胞を96ウェルマイクロタイタープレートに播き（細胞 5.0×10^4 個）、10%FCS(+)RPMI-1640培地中で24時間培養した後、アッセイ法の20分前に培地を無血清RPMI-1640培地/1mM IBMX（イソブチルメチルキサンチン）に交換した。細胞をNMU-25ペプチドとともに20分間インキュベートした後に、cAMP EIA System (Amersham Biosystems) を用いてcAMPレベルを測定した。

【0252】

細胞内Ca²⁺動員アッセイ

トリプシン処理したLC319細胞を、ポリ-D-リジンをコーティングした壁が黒く底が透明な384ウェルのマイクロタイタープレート（ 1.0×10^4 個/ml）に、アッセイ法の24時間前に播いた。細胞に1mM Fluo-4-AM蛍光指示色素をアッセイバッファー（ハンス平衡塩類溶液、20mM HEPES、2.5mMプロベネシド）中で1時間負荷し、アッセイバッファーで3回洗浄し、インキュベーターに戻してから10分間後に蛍光定量画像プレートリーダー（FLIPR, Molecular Devices）でアッセイした。ベースラインに対する蛍光の最大の変化を用いて、NMU-25ペプチド刺激に対する細胞の応答を測定した。

【0253】

cDNAマイクロアレイによるNMUの下流遺伝子の同定

LC319細胞に対して、NMUに対するsiRNA（si-NMU）またはルシフェラーゼに対するsiRNA（対照siRNA）のいずれかをトランスフェクトした。トランスフェクションから12、24、および36時間後にmRNAを抽出し、Cy5またはCy3色素で標識した上で、以前に記載されたように32,256種の遺伝子を含むcDNAマイクロアレイスライドに対する同時ハイブリダイゼーションに供した（Kakiuchi, S.ら、(2004). Hum. Mol. Genet. 13, 3029-3043., Ochi, K.ら、(2004). Int. J. Oncol. 24, 647-655.）。データの標準化の後に、シグナルがカットオフ値を上回った遺伝子をさらに解析した。NMU発現の時間依存的な低下に伴って強度が有意に低下した遺伝子を、SOMクラスター分析を用いてまず選択した。NMUの下流遺伝子候補の検証は、以下に列記した遺伝子特異的プライマーを用いる、マイクロアレイハイブリダイゼーションに用いたLC319細胞由来の同じmRNAの半定量的RT-PCR実験を用いて行った。

FLJ42024 (5' -AAAAAGGGGATGCCTAGAACTC-3' (SEQ ID NO:118)および

5' -CTTTCAGCACGTCAAGGACAT-3' (SEQ ID NO:119))、

GCDH (5' -ACACCTACGAAGGTACACATGAC-3' (SEQ ID NO:120)および

(5' -GCTATTTTCAGGGTAAATGGAGTC-3' (SEQ ID NO:121))、

CDK5RAP1 (5' -CAGAGATGGAGGATGTCAATAAC-3' (SEQ ID NO:122)および

(5' -CATAGCAGCTTTAAAGAGACACG-3' (SEQ ID NO:123))、

LOC134145 (5' -CCACCATAACAGTGGAGTGGG-3' (SEQ ID NO:124)

(5' -CAGTTACAGGTGTATGACTGGGAG-3' (SEQ ID NO:125))、

10

20

30

40

50

NUP188 (5' -CTGAATACAACCTTCCTGTTTGCC-3' (SEQ ID NO: 126)および
(5' -GACCACAGAATTACCAAACTGC-3' (SEQ ID NO: 127))

【0254】

候補遺伝子の発現は、さらに、0および48時間の時点で1 μ M NMU-25またはBSAにより処理したLC319細胞から72および96時間の時点で単離したmRNAを用いた半定量的RT-PCRによっても検出した。

【0255】

結果

(1) KOC1と相互作用するタンパク質としてのKIF11の同定

pCAGGS-n3FH-KOC1ベクターをトランスフェクトしたLC319細胞を抽出し、抗Flag M2モノクローナル抗体で免疫沈降させた後に、抗HAモノクローナル抗体で免疫沈降させた。KOC1を含むタンパク質複合体をSDS-PAGEゲル上での銀染色によって染色した。モックトランスフェクションでは存在しなかった125kDaバンドを抽出し、これがKIF11 (NM_004523; SEQ ID NO: 1)であることを質量分析シーケンシングによって明らかにした。

【0256】

(2) KOC1とKIF11との相互作用の確認

Flagタグ付加KIF11およびmycタグ付加KOC1を同時トランスフェクトしたA549細胞、KIF11またはKOC1のいずれかをトランスフェクトした細胞、ならびに非トランスフェクト細胞を、抗Flag M2アガロースにより免疫沈降させ、その後に抗myc抗体によるイムノブロット法を行った。これに対して、同じ一連のA549細胞を抗mycアガロースにより免疫沈降させ、抗Flag M2抗体によるイムノブロット法も行った。両方の構築物を同時トランスフェクトした場合にのみ単一のバンドが見いだされた(図1a)。免疫細胞化学検査では、Flagタグ付加FITC標識KIF11がA549の細胞質中でmycタグ付加ローダミン標識KOC1と共局在することが示された(図1b)。

【0257】

次に本発明者らは、ウェスタンブロット解析により、抗KOC1抗体がKOC1に対して特異的であって他の相同タンパク質であるIMP-1およびIMP-2とは交差反応しないことを、内因性IMP-1、IMP-2、およびIMP-3 (KOC1) を発現しないことが確認されているがHAタグ付加IMP-1、IMP-2、およびIMP-3 (KOC1) 発現ベクターがトランスフェクトされたH520細胞の溶解物を用いて確かめた。pCAGGS-FLAGタグ付加KOC1ベクターまたはモックベクター(対照)をトランスフェクトしたLC319細胞の溶解物を抽出して、抗FLAG M2モノクローナル抗体により免疫沈降させた。KOC1を含むタンパク質複合体を、SDS-PAGEゲル上でSilverQuest (Invitrogen) により染色した。125kDaのバンドは、KOC1を発現するプラスミドをトランスフェクトした細胞の溶解物からの免疫沈降物中には特異的に検出されたが、対照溶解物(モックプラスミド)からは検出されなかった。引き続いてのMALDI-TOF質量分析により、この125kDaタンパク質はキネシンファミリーのメンバーであるKIF11であることが同定された。本発明者らは、内因性KOC1とKIF11との直接的な相互作用を、アフィニティー精製した抗KOC1および抗KIF11ポリクローナル抗体を用いる、A549およびLC319からの抽出物を用いた免疫沈降実験によって確かめた(図1c)。

【0258】

(3) NSCLCにおけるKIF11発現

原発性NSCLC(臨床試料)および肺癌細胞株におけるKIF11発現の検証を行った。KIF11発現の増加が16例のNSCLC症例中12例(ADC 8例のうち5例、およびSCC 8例のうち7例)で確かめられた。さらに、KIF11の上方制御は15例のNSCLC細胞株のうち14例でも観察された。

【0259】

本発明者らは次に、原発性NSCLC組織および肺癌細胞株を再度試験し、定量的RT-PCRによって試験した18例のNSCLC臨床試料および20例全てのNSCLCまたはSCLC細胞株においてもKIF11発現の増加を見いだした(図2a,b)。ACTB遺伝子に対する相対的なKOC1遺伝子およびKIF11遺伝子のmRNAレベルは、有意に関連していた($r=0.702$, $P=0.0029$ 、スピアマン

10

20

30

40

50

の順位相関による)。これらの2つの遺伝子はほとんどの肺癌細胞株とともに活性化されていた($r=0.458$, $P=0.0359$ 、スピアマン順位相関による)。

【0260】

(4) 正常ヒト組織におけるKIF11発現

KIF11 cDNAをプローブとして用いるノーザンブロット法により、4.5kbおよび5.5kbの転写物が極めて弱いバンドとして同定され、これは試験した23例の正常ヒト組織のうち胎盤、精巣、および骨髄のみに認められた。KIF11の報告されているcDNA配列はより大きい方の転写物に対応すると考えられた。小さい方のバンドに対応する転写物について調べるために、本発明者らは精巣組織およびNSCLC細胞株から単離したmRNAを逆転写させた。本発明者らは、4種のプライマーセットを用いるPCRによってKIF11 cDNAの全配列を増幅したが、これらの試料中には選択的スプライシングを受ける転写物は見いだされなかった。したがって、小さい方のバンドはいくつかの関連遺伝子の転写物のクロスハイブリダイゼーションを反映している可能性がある。正常ヒト組織におけるKIF11の発現パターンはKOC1の発現パターンと有意に相関した(図2c)。

【0261】

KOC1内のKIF11結合領域の同定

KIF11との相互作用のために必要なKOC1の特定ドメインを明らかにするために、本発明者らは、COS-7細胞に対して、NH₂ (N) 末端FLAGタグまたはCOOH (C) 末端HAタグを付加した配列を有するKOC1の5つの欠失構築物(KOC1DEL1~5; 図3a)の1つをトランスフェクトした。モノクローナル抗HAによる免疫沈降法により、KOC1DEL4およびKOC1DEL5構築物(どちらも2つのRNA認識モチーフ(RRM)を欠いている)は内因性KIF11と相互作用を行えないが、一方2つのRRMを有するKOC1構築物は全て、KIF11に対する結合親和性を保っていることが示された(図3b)。

【0262】

RNA-免疫沈降法およびcDNAマイクロアレイを用いた、KOC1-KIF11複合体と結合するmRNAの単離

KOC1タンパク質は、IGF2のリーダー3 mRNAと複数の付着を示すことが公知であり、これはおそらくその2つの機能性RRMおよび4つのK相同(KH)ドメインを介すると考えられる(Nielsen, J.ら、Mol. Cell Biol. 19, 1262-1270 (1999))。しかしながら、本発明者らが試験した肺癌細胞株またはNSCLC臨床組織試料のいずれにおいてもIGF2 mRNAの発現は検出されなかった。このため、肺癌発生におけるKOC1の機能を解明するために、本発明者らは、KOC1と相互作用すると考えられ、そのため肺癌の増殖および/または進行に重要な役割を果たす可能性のあるmRNAを検索した。本発明者らはまず、抗KOC1抗体および5つのNSCLC細胞株(A549、LC319、PC14、RERF-LC-AI、およびSK-MES-1)を用いてmRNAを免疫沈降させた。続いて、Cy-5標識した免疫沈降RNA(IP-mRNA)およびそれぞれに合致する細胞株から単離してCy-3標識した全RNAを、ヒトcDNAマイクロアレイ上で同時にハイブリダイズさせた(IP-マイクロアレイ)。スクリーニングした32,256個の遺伝子のうち、本発明者らは、5つの試験NSCLC細胞株のうち少なくとも4種でIP-mRNAにおける方が全RNAよりも豊富であったものを合計55個同定し(表2参照)、IP-mRNAをテンプレートとして用いるRT-PCR(IP-RT-PCR)によって、これらの候補が全て豊富に存在することを確認した。RNA-免疫沈降の特異性について試験するために、本発明者らは、 β -アクチン(ACTB) mRNAを用い、IP-mRNAをテンプレートとして使用するRT-PCR実験を行った。ACTBは抗KOC1抗体によっては全く沈降しなかった。RNA-免疫沈降のバックグラウンド対照として、本発明者らは正常ウサギIgGおよび5つのNSCLC細胞株を用いてmRNAを沈降させ、試験した8つのKOC1結合mRNA(CCT2、SBP2、SLC25A3、RAB35、PSMB7、GLI、PKP4およびWINS1)がいずれも正常ウサギIgGによっては沈降しないことを確認した。本発明者らはまた、RT-PCRにより、NSCLC試料における候補遺伝子の多くの発現が増加していることも確認した(データ非提示)。これらのKOC1結合mRNAが同時に存在することがKOC1-KIF11複合体形成のために必要か否かを試験するために、本発明者らは、30単位のRNアーゼT1(SIGMA)によりインビトロで処理するかまたは処理しないままの細胞溶解物を用いて免疫沈降実験を行ったところ、mRNAの

存在下または非存在下での2つのタンパク質間の相互作用には差が認められず、このことからKOC1-KIF11複合体形成にこれらの特定のmRNAが必要であることの可能性は低いことが示唆された。

【0263】

その戦略を追求することにより、本発明者らは、KOC1およびKIF11がNSCLC臨床試料および細胞株の大部分において過剰発現されることだけでなく、これらの遺伝子の産物によって形成される複合体が細胞内および細胞間のmRNA輸送システムに寄与することによってNSCLC細胞の増殖および発達のために不可欠であることも示すことができた。RNA結合タンパク質による細胞内mRNA輸送はショウジョウバエおよびアフリカツメガエルの卵母細胞および発生中の胚、ならびに線維芽細胞およびニューロンなどの体細胞で報告されている (King, M.L.ら、Bioessays 21, 546-557 (1999); Mowry, K.L. & Cote, C.A. Faseb. J. 13, 435-445 (1999); Lasko, P., J. Cell Biol. 150, F51-56 (2000); Steward, O. Neuron 18, 9-12 (1997)) beta-actin mRNA is transported to the leading lamellae of chicken-embryo fibroblasts (CEFs) and to the growth cones of developing neurons (Lawrence, J.B. & Singer, R.H. Cell 45, 407-415 (1986); Bassell, G.J.ら、J. Neurosci. 18, 251-265 (1998)). The localization of ACTB mRNA depends on the “zipcode”, a cis-acting element in the 3' UTR of the mRNA (Kislauskis, E.H.ら、J. Cell Biol. 123, 165-172 (1993)). The respective trans-acting factor, zipcode-binding protein 1 (ZBP1), was identified by affinity purification with the zipcode of ACTB mRNA; (Ross, A.F.ら、Mol. Cell Biol. 17, 2158-2165 (1997)) homologues of ZBP1 have since been identified in a wide range of organisms including Xenopus, Drosophila, mouse, and human (Mueller-Pillasch, F.ら、Oncogene 14, 2729-2733 (1997); Deshler, J.O.ら、Science 276, 1128-1131 (1997); Doyle, G.A.ら、Nucleic Acids Res. 26, 5036-5044 (1998)). ZBP1様タンパク質は2つのRRMをN末端領域に含み、4つのhnRNP KH (リボ核タンパク質K相同) ドメインをC末端に含む。KOC1はIGF2 mRNA結合タンパク質の1つであり、ZBP1ファミリーのメンバーであると考えられている; これはIGF2のリーダー-3 mRNAに対して多数の付着を示し (Nielsen, J.ら、Mol. Cell Biol. 19, 1262-1270 (1999))、いくつかの種類の癌で過剰発現される (Mueller-Pillasch, F.ら、Oncogene 14, 2729-2733 (1997); Zhang, J.Y.ら、Clin. Immunol. 100, 149-156 (2001); Mueller, F.ら、Br. J. Cancer 88, 699-701 (2003); Wang, T.ら、Br. J. Cancer 88, 887-894 (2003))。しかしながら、本発明者らが試験したNSCLC細胞株および臨床試料のほとんどにおいてIGF2リーダー-3 mRNAの発現を検出することができなかったため、本発明者らは、KOC1は他のmRNAとの相互作用およびその輸送を介して肺癌細胞の増殖を媒介しようと考えた。本発明者らがcDNAマイクロアレイと組み合わせたRNA-免疫沈降実験 (IP-マイクロアレイ)を試みたところ、NSCLC細胞においてKOC1と結合する可能性の高い数十種類の候補mRNAが同定された (表2参照)。このリストには、細胞接着 (PKP4, L1CAM1)、癌細胞の発達および浸潤 (IGFBP2)、ならびに低分子GTPの結合 (RAB35) という機能を有するタンパク質をコードする遺伝子が含まれ (Papagerakis, S.ら、Hum. Pathol. 34, 565-572 (2003); Fogel, M.ら、Cancer Lett. 189, 237-247 (2003); Wang, H.ら、Cancer Res. 63, 4315-4321 (2003); Zhao, H.ら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 293, 1060-1065 (2002))、それらの多くはNSCLC臨床試料において高レベルで発現された (データ非提示)。その産物が細胞の増殖または移動と関連しているmRNAを輸送するシステムの活性化は極めて興味深く、この線に沿ったさらなる調査は肺癌発生に関する理解を深めることにつながると考えられる。

【0264】

(表2)

順位 ⁽¹⁾	遺伝子	アクセッション	A549	LC319	PC14	RERF	SKMES1	合計*
1	LOC283050	AA843724	6.0	7.7	5.4	6.4	9.2	34.7
2	KIAA0169	R49113	6.2	8.9	4.9	5.7	6.8	32.5
3	CCT2	AF026166	4.1	8.0	5.4	5.7	9.1	32.3
4	LOH11CR2A	NM_014622	9.1	5.6	5.8	3.9	4.5	28.8
5	SNTB2	AA625860	6.0	5.0	6.8	4.0	5.0	26.9
6	CFLAR	U97074	5.3	5.7	3.8	4.3	5.9	25.0
7	SBP2	AF380995	5.0	6.1	3.9	2.9	6.1	24.0
8	LOC56267	AA420728	4.8	5.4	5.4	2.5	5.0	23.1
9	SLC25A3	NM_002635	3.5	5.8	2.9	4.1	5.3	21.7
10	IFIT1	M24594	4.4	4.2	3.8	3.6	5.2	21.2
11	OSTalpha	H79642	2.3	5.9	5.6	3.8	2.8	20.4
12	FILIP1	XM_029179	10.3	2.3	2.1	2.7	2.5	19.9
13	ZNF415	AY283600	3.5	5.2	3.3	4.0	3.8	19.8
14	RAB35	BX344673; NM_006861	3.0	4.1	4.2	4.0	4.6	19.8
15	APG-1	AW966019	0.0	6.2	6.2	2.5	4.4	19.4
16	INPP4B	AA759168	3.4	3.2	4.4	3.6	4.5	19.1
17	na	AI160370	3.6	4.1	2.9	4.6	3.1	18.3
18	N33	NM_006765	4.5	0.0	4.0	4.7	5.0	18.1
19	RPS3A	BX343424	1.6	4.5	3.2	3.1	4.3	16.8
20	PSMB7	BM837906	4.0	4.2	2.2	3.1	2.9	16.5
21	GIT2	NM_057169	3.4	4.2	2.3	2.9	3.4	16.1
22	GL	AJ420489	4.4	3.2	3.2	2.3	2.9	16.0
23	SOS2	XM_043720	2.1	3.5	2.5	2.3	4.7	15.1
24	L1CAM	M77640	3.4	2.9	2.5	2.6	3.6	14.9
25	BRUNOL4	BM671360	2.8	3.8	1.7	2.5	4.1	14.9
26	RRAGA	U41654	2.9	4.3	2.4	2.4	2.8	14.8
27	IGFBP2	BC004312	3.9	3.7	2.0	2.5	2.6	14.8
28	SRPK1	BC038292	3.3	2.5	2.8	2.8	3.4	14.8
29	FLJ12649	R41135	1.2	2.8	2.6	3.4	4.5	14.4
30	AGL	NM_000028	4.0	2.8	2.6	2.5	2.4	14.3
31	FLJ23468	BX355581	3.0	3.4	3.0	2.1	2.4	13.9
32	MGC4730	BM665147	2.6	2.8	2.6	2.3	3.1	13.4
33	GAB2	NM_012296	3.7	3.4	1.3	2.8	2.2	13.4
34	USP15	AF106069	2.0	3.0	2.4	2.6	3.2	13.1
35	KIAA0657	AB014557	0.0	4.7	2.2	3.0	3.1	13.1

10

20

30

40

36	C6orf134	AI146643	3.2	0.0	2.5	2.7	4.5	12.8
37	MSCP	AK093931	2.5	3.0	4.2	3.0	0.0	12.7
38	ACAA2	D16294	2.1	2.0	3.0	2.6	3.1	12.7
39	PKP4	AI681111	3.2	2.5	2.9	1.7	2.3	12.6
40	RGS5	BX537427	2.0	3.0	1.3	3.4	2.8	12.5
41	CYFIP1	BC005097	2.2	2.1	2.6	1.3	4.0	12.2
42	PLAGL2	AK026951	1.2	2.7	2.3	2.4	3.3	11.9
43	EHD4	AW779971	2.7	2.3	2.3	1.9	2.6	11.9
44	KIAA1666	XM_300791	2.1	2.9	2.4	2.3	2.2	11.9
45	RAP80	BX537376	2.4	2.1	3.0	1.8	2.5	11.7
46	LOC118812	BG537484	0.0	2.3	2.3	3.2	3.7	11.5
47	UTX	AF000993	1.0	2.2	2.8	3.2	2.2	11.4
48	PCBP3	AK094301	2.4	2.9	1.3	2.3	2.5	11.4
49	AP3S2	BC002785	2.4	2.3	1.2	2.8	2.3	11.0
50	WINS1	AA741459	1.4	3.0	2.2	2.1	2.2	10.9
51	na ⁽²⁾	AF504647	0.8	2.0	2.1	2.1	3.6	10.7
52	LOC203859	AL832374	2.0	2.6	2.5	3.4	0.0	10.5
53	HNMT	NM_006895	2.3	2.0	1.9	2.1	2.2	10.5
54	LOC282965	XM_210833	1.1	2.8	2.0	2.2	2.0	10.1
55	PDK2	AK055119	1.0	2.4	2.2	2.4	2.0	10.0
N/C ⁽³⁾	ACTB	BC053988	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

(1) 5つの細胞株全ての変化の倍数值 (IP-mRNA／投入RNA) の合計 (*) に従って、プロ
ーブセットに順位を付けた。

(2) na：注釈なし

(3) N／C：陰性対照

【0265】

KOC1内のmRNA結合領域の同定

KOC1結合mRNAに対する結合のために必要なKOC1の領域を明らかにするために、本発明者
らは、A549細胞において発現させたKOC1欠失変異体の免疫沈降組換えタンパク質 (図4a)
およびKOC1結合mRNAの1つであるDIG標識RAB35 mRNAを用いたノースウエスタンブロット解
析を行った。4つのKHドメインを欠くKOC1DEL3、ならびにN末端の2つのRRMおよびC末端の2
つのKHドメインを欠くKOC1DEL5は、RAB35 mRNAと結合しなかった。一方、4つのKHドメイ
ンのみを有する構築物であるKOC1DEL4、およびC末端の2つのKHドメインを有さない構築物
であるKOC1DEL2は、mRNAに対して、完全長KOC1構築物と比較して極めて弱い結合親和性を
示し (図4b)、このことから2つのRRM およびC末端の2つのKHドメインがKOC1結合mRNAに
対する結合のために重要であることが示唆された。

【0266】

本発明者らはさらに、KOC1欠失変異体のうち5つをA549細胞で発現させ、細胞溶解物を
用いる免疫沈降実験を2回、最初はモノクローナル抗HA抗体を用い、続いてモノクローナ
ル抗FLAG M2抗体を用いて行った。IP-mRNAを用いて、本発明者らは、それぞれの欠失タン
パク質が、以上のリスト (表2参照) から選択した8つの内因性mRNA (CCT2、SBP2、SLC25A
3、RAB35、PSMB7、GL、PKP4、およびWINS1) と結合する能力を試験した。その結果はノー
スウエスタンブロット解析と完全に一致し、これにより、C末端の2つのKHドメインおよび
N末端における2つのRRMの両方がKOC1のmRNAとの有効な結合のためには不可欠であること
が独立に確かめられた (図4c)。

【0267】

KOC1-KIF11リボ核タンパク質複合体およびKOC1結合mRNAの微小管依存的な細胞内輸送および細胞間輸送

KOC1およびKIF11の機能的役割についてさらに調べるために、本発明者らは、EGFP-KOC1（シアン）およびEYFP-KIF11（黄色）を発現するように設計されたプラスミドを調製した。本発明者らは続いて、2つのプラスミドをとともにCOS-7細胞にトランスフェクトし、それらの局在について免疫蛍光ビデオ顕微鏡検査およびリアルタイム共焦点顕微鏡検査を用いて試験した。KOC1およびKIF11の両方を発現する細胞は突起を出し、続いて隣接細胞と結合した（データ非提示）。生細胞のより詳細な観察により、KOC1がKIF11と複合体を形成し（KOC1-KIF11 RNP複合体；緑色粒子）、それが2つの細胞を連結する超微細構造を通じて一方の細胞から別の細胞に輸送されることが判明した（図5a）。KOC1-KIF11複合体の移動は一方の細胞からもう一方の細胞に一方方向性であるように思われた。

10

【0268】

さらに、KOC1-KIF11複合体が高レベルのKOC1-RNP複合体を有する1つの細胞から複合体のレベルがより低いもう1つの細胞へとKOC1結合mRNAを特異的に輸送しうるか否かを試験するために、本発明者らは、2つの異なる細胞集団を混合して共培養した。一方はpEGFP-KOC1（緑色）およびAlexa Fluor 546標識完全長RAB35 mRNA（赤色）をとともにトランスフェクトしたCOS-7細胞であり、もう一方はCellTracker（青色）で単標識した親COS-7細胞である。本発明者らは、KOC1粒子（緑色）だけでなくKOC1-RAB35 mRNAのRNP粒子（黄色）も、前者の細胞から後者の細胞へと超微細構造を通して移行することを観察した（図5b）。KOC1およびKIF11の両方が過剰発現されるA549細胞におけるインサイチュアハイブリダイゼーションを用いて、本発明者らはさらに、内因性RAB35 mRNA（緑色）が細胞質中のほかに超微細な細胞間構造内にも局在することを確認した（データ非提示）。

20

【0269】

本発明者らはまた、個々のA549細胞を橋渡しする微小管の超微細構造上のKOC1およびKIF11粒子の内因性局在についても、一次抗体用にアフィニティー精製した抗KOC1抗体または抗KIF11抗体、二次抗体用にAlexa594標識抗ウサギIgG（Molecular Probes）を用い、さらに抗 α -チューブリン-FITCモノクローナル抗体を用いる免疫細胞化学検査によって調べた。10 μ Mの微小管攪乱物質であるノコダゾール（SIGMA）で4時間処理したA549細胞は、内因性KOC1およびKIF11の崩壊および凝集を、細胞質中の微小管の脱重合とともに示した。さらに、細胞間の残留構造上には粒子は全く認められなかった。この結果から、KOC1-KIF11複合体がかかわる微小管依存的な輸送機序の可能性が示唆された。NSCLC細胞においてKOC1-KIF11複合体がmRNAを輸送する詳細な機序をさらに明らかにするために、本発明者らは、KIF11と相互作用する可能性のある他の成分について検索した。LC319細胞の溶解物を用いた抗KIF11ポリクローナル抗体による免疫沈降によって150kDaタンパク質が同定され、これはダイナクチン1（DCTN1；p150、接着型（glued）ホモログ、ショウジョウバエ）であることが後にMALDI-TOF質量分析によって明らかになった。DCTN1はDCTNの最大のサブユニットであり、細胞質モータータンパク質ダイニンと結合して微小管に沿った小胞輸送を活性化するか（Holzbaur, E.L. & Tokito, M.K. Genomics 31, 398-399 (1996)；Tokito, M.K.ら、Mol. Biol. Cell 7, 1167-1180 (1996))、またはKIF11と結合しておそらくは中心体の分離に関与すると考えられている（Blangy, A.ら、J. Biol. Chem. 272, 19418-19424 (1997)）。本発明者らは、一次抗体用のアフィニティー精製した抗KOC1ポリクローナル抗体または抗KIF11ポリクローナル抗体と二次抗体用のAlexa488標識抗ウサギIgGとの組み合わせ、および一次抗体用の抗DCTN1モノクローナル抗体（BD transduction Laboratories、#610473）と二次抗体用の抗Alexa594標識抗ウサギIgGとの組み合わせを用いる免疫細胞化学法により、個々のA549細胞間の超微細構造上でのKOC1/KIF11、およびDCTN1の内因性共局在を観察した。また、本発明者らは、A549細胞およびLC319細胞からの抽出物を使用して、抗KIF11ポリクローナル抗体および抗DCTN1モノクローナル抗体（BD transduction Laboratories、#610473）を用いる免疫沈降実験により、内因性のKIF11とDCTN1との直接的な相互作用を確認した（図6a）。

30

40

50

【0270】

mRNAのKIF11依存的な細胞間輸送をさらに示すために、本発明者らは、KIF11を特異的に阻害する細胞浸透性阻害剤モナストロール (monastrol) の影響を試験した。以前の報告により、モナストロールはKIF11のATPアーゼ活性を、そのモータードメインに直接結合することによって部分的に阻害することが示されている (DeBonis, S.ら、Biochemistry 42, 338-349 (2003); Kononen, J.ら、Nat. Med. 4, 844-847 (1998))。A549細胞を150 μ M モナストロール (SIGMA) で24時間処理したところ、微小管に沿って単星 (monoaster) の中心部での内因性KIF11および外因性EYFP-KIF11の蓄積、ならびに「単星性紡錘体 (monastral spindle)」と呼ばれる単極紡錘体を伴う有糸分裂中の細胞周期の停止が誘導された。A549細胞を150 μ Mのモナストロールで24時間処理したところ、有糸分裂中の細胞に対して「単星性紡錘体」と呼ばれる単極紡錘体を伴う細胞周期の停止が誘導され、微小管に沿った単星の中心部での内因性KIF11の蓄積ももたらされた。一方、ほとんどの非有糸分裂細胞は突起を出さなくなり、続いてモナストロール処理から2時間以内に隣接細胞との連絡が失われた。タイムラプスビデオ顕微鏡検査を用いて細胞間超微細構造の数 ($n=252$ 個の構造) を計数することによるさらなる定量分析により、試験した非有糸分裂細胞における細胞間連絡の半数以上がモナストロール処理から1時間後までに消失したことが示された。しかしながら、モナストロール曝露から細胞を解放してから6時間後には、細胞間架橋形成が再構成されるとともに正常な有糸分裂過程にある細胞が観察され、このことからKIF11が超微細な細胞間構造の形成のために不可欠であることが示された (データ非提示)。

10

20

【0271】

一部の細胞は突起を失い、その後に隣接細胞と連絡しなくなった。生細胞のより詳細な観察により、KOC1-KIF11 RNP複合体 (緑色粒子) は、その後に観察中に消失した2つの細胞を連絡する超微細構造を通して一方の細胞から別の細胞へと全く輸送されないことが見いだされた。

【0272】

本研究において、本発明者らは、ヒト肺癌におけるKOC1、KIF11、およびDCTN1の内因性相互作用を示すとともに、これらの複合体の、1つの細胞から別の細胞へのmRNAの輸送における可能性のある役割を明らかにした。DCTN1はDCTNの最大のサブユニットであり、細胞質モータータンパク質であるダイニンと結合して微小管に沿った小胞輸送を活性化 (Holzbaur, E.L. & Tokito, M.K. Genomics 31, 398-399 (1996))。ダイニン-DCTN相互作用はおそらく、小胞およびオルガネラの軸索輸送機序の重要な成分であると考えられる (Holzbaur, E.L. & Tokito, M.K. Genomics 31, 398-399 (1996); Tokito, M.K.ら、Mol. Biol. Cell 7, 1167-1180 (1996))。ダイニンに対するDCTNの結合は、この結合を特異的に妨害する抗体が微小管に沿った小胞移動をブロックすることから、ニューロンの機能に重要であることが報告されている。DCTN1およびKIF11とのインビトロ相互作用ならびに有糸分裂中のそれらの共局在が観察されているが (Blangy, A.ら、J. Biol. Chem. 272, 19418-19424 (1997))、この複合体がかかわる細胞間輸送システムを示した報告はなかった。本発明者らの実験では、キネシンファミリーのメンバーであるKIF11が、NSCLCにおいてKOC1とともに過剰発現されたことから、本発明者らは、KOC1、KIF11、およびDCTN1の直接的な相互作用が、肺癌細胞間の微小管の特異なアラインメントの成立に重大な役割を果たしうると提唱している。

30

40

【0273】

受容細胞における輸送されたKOC1結合mRNAによるタンパク質合成

KOC1-KIF11 RNP複合体によるmRNA輸送に生理的な関連があるか否かを解明するために (レシピエント細胞は輸送されたmRNAを翻訳することによってタンパク質を合成しう)、本発明者らは、mycタグ付加配列およびEGFPタンパク質配列とインフレームで融合させた、KOC1/KIF11複合体の結合標的の1つである完全長RAB35 mRNAの発現ベクターを構築した。本発明者らは続いて、このキメラmRNAが1つの細胞から別の細胞へと輸送され、その後にレシピエント細胞で翻訳されてタンパク質産生が起こるか否かを調べた。Flagタグを付

50

加したKOC1およびKIF11を発現するCOS7細胞に対して、これらのRAB35 mRNA発現構築物を有する構築物をトランスフェクトした（細胞A）。親mRNA-レシピエントCOS-7細胞はCellTrackerにより単染色した（青色；細胞B）。これらの2つの細胞集団を合わせて混合し、24時間共培養した。本発明者らはまず、細胞Aと細胞Bとの間でのRAB35-EGFP mRNAの細胞間輸送を、アンチセンスEGFPをプローブとして用いるインサイチュハイブリダイゼーションによって確かめた；細胞を24時間共培養した後に、CellTracker染色した細胞Bにおいて、および2つの細胞種の間での超微細構造上でも、RAB35-EGFP mRNAの弱い染色が検出された（図7a）。本発明者らは続いて、CellTracker染色したB型細胞におけるEGFPと融合させたRAB35タンパク質の存在を試験し、それぞれ免疫細胞化学およびタイムラプスビデオ顕微鏡検査を用いてそれらを見いだした（図7bおよび7c）。タイムラプスビデオ顕微鏡検査を用いたこれらの観察中に、A型細胞からB型細胞への視認しうるEGFPタンパク質粒子の輸送はみられなかったが、EGFPタンパク質は細胞質の器官内に徐々に出現し、これはB型細胞の小胞体（ER）であるように思われた（図7d）。これらの結果から、KOC1およびKIF11が、細胞増殖および／または接着を誘導すると考えられるタンパク質をコードするmRNAのサブセットと機能的に結合すること、ならびにKOC1およびKIF11の存在が細胞間輸送のために不可欠であることが示された。以前の報告は、高いKOC1レベルがIGF2リーダー-3などの結合性mRNAの翻訳の妨げとなる可能性を示唆していたが、KOC1構築物および完全長RAB35-EGFP mRNA構築物を共にCOS-7細胞に同時トランスフェクトした本発明者らの実験では、RAB35-EGFP融合タンパク質レベルの低下は検出されなかった（図7e）。

【0274】

また、本発明者らの実験は、隣接細胞と連絡する突き出した突起の形成を明らかにするとともに、高レベルの内因性KOC1およびKIF11を発現する2つの肺癌細胞株（A549およびLC319）において、トランスフェクトされたRAB35 mRNAおよびKOC1タンパク質が超微細な細胞間構造上に主として同時に分布することも示した。一方、本発明者らは、KIF11は発現するがKOC1は発現しないNCI-H520細胞では、トランスフェクトされたRAB35 mRNAの特異的な局在を見いだせなかった。この観察により、KOC1およびKIF11の同時活性化が癌細胞間の連絡に重要であることが裏づけられた。ヒト癌における既知の細胞間コミュニケーションシステムのうち、悪性神経膠腫細胞と血管内皮細胞との間の機能的ギャップ結合の形成は腫瘍における血管新生に影響を及ぼすようである（Zhang, W.ら、Cancer Res. 59, 1994-2003 (1999)；Zhang, W.ら、J. Neurosurg. 98, 846-853 (2003)）。しかしながら、本発明者らの知る限りでは、本発明者らの報告は、哺乳動物体細胞におけるリボ核タンパク質粒子とモータータンパク質との組み合わせによるmRNAの細胞間輸送を記載し、かつ癌細胞の増殖および生存のために決定的に重要な細胞間ネットワークの形成におけるその生物学的意義を評価した、初めての報告である。

【0275】

(5) KIF11に対するsiRNAによるNSCLC細胞の増殖の阻害

KIF11に対するsiRNAプラスミドの、A549細胞（図8a）またはLC319細胞（データ非提示）へのトランスフェクションにより、3つの対照siRNAのいずれかを含む細胞およびモックトランスフェクション細胞と比較してKIF11のmRNA発現は抑制された。mRNA発現の低下に応じて、A549細胞およびLC319細胞は、MTTアッセイ（図8b）およびコロニー形成アッセイ（データ非提示）によって測定した細胞生存度およびコロニー数の有意な低下を示した。本発明者らはまた、KIF11に対するsiRNAの細胞間輸送における影響についてもタイムラプスビデオ検査を用いて調べた。モナストロール処理と類似の現象が観察された；一部の細胞では突起への突出が減少し、2つの細胞を連結する超微細構造が消失した。

【0276】

肺癌細胞の増殖または生存に対するKOC1-KIF11相互作用の機能的意義を調べるために、KIF11との相互作用が可能な2つのRRMを含むKOC1の欠失性断片（KOC1DEL3；図3a、b）を、内因性のKOC1とKIF11との直接的な相互作用を抑制するドミナントネガティブ機能に関して試験した。本発明者らは、KOC1DEL3およびモックプラスミド（対照）をLC319細胞にトランスフェクトし、KOC1DEL3と内因性KIF11との相互作用を検出した。本発明者らはさら

に、RRMドメインの過剰発現がKOC1とKIF11との複合体形成を減少させることを免疫沈降によって実証した（図9a、b）。予想された通り、その断片のトランスフェクションは、MTTアッセイによる測定の際に細胞生存度における有意な用量依存的低下をもたらした（ $P < 0.001$ 、KOC1DEL3 対 モック；図9c）。本発明者らはまた、KHドメイン対照のみを含む構築物のトランスフェクションは増殖に対して影響を及ぼさないことも確認した。

【0277】

さらに、肺癌細胞の増殖または生存に対するKOC1-KIF11相互作用の機能的意義を調べるために、mRNA結合のために不可欠なC末端の2つのKHドメインを欠いているが、KIF11との相互作用は可能であるKOC1の欠失性断片（KOC1DEL2；図3a、b）を、内因性のKOC1とKIF11との直接的な相互作用を抑制するドミナントネガティブ機能に関して試験した。本発明者らは、KOC1DEL2およびモックプラスミド（対照）をA549細胞にトランスフェクトし、KOC1DEL2の内因性KIF11との相互作用を検出した（図9d）。本発明者らはさらに免疫沈降により、KOC1DEL2の過剰発現が内因性KOC1とKIF11との複合体形成を減少させることを実証した（図9e）。予想された通り、ドミナントネガティブ断片のトランスフェクションは、MTTアッセイによる測定の際に、細胞生存度における有意な用量依存的低下をもたらした（ $P = 0.0006$ 、KOC1DEL2 対 モック；図9f）。

【0278】

本発明者らはまた、肺癌細胞の細胞増殖または生存の制御におけるこれらのKIF11輸送性mRNAのいくつかの生物学的役割についても試験し、KOC1-RNP複合体結合mRNAとして同定されたRAB35に対するsiRNA（si-RAB35）を発現するプラスミドを構築した。プラスミド（si-RAB35）のA549細胞へのトランスフェクションは、対照と比較して内因性RAB35の発現を有意に抑制し、MTTアッセイおよびコロニー形成アッセイによって測定した細胞生存度およびコロニー数の有意な低下をもたらした（図10a、b）。

【0279】

KOC1およびKIF11の過剰発現とNSCLC患者の不良予後との関連性

本発明者らは、265例のNSCLC組織からなる組織マイクロアレイを用いる、抗KOC1ポリクローナル抗体および抗KIF11ポリクローナル抗体による免疫組織化学分析を行った（図11a）。265例のうち、KOC1染色は172例（64.9%）で陽性であり；129例はKIF11に関して陽性であった（48.7%）。これらの腫瘍においてKOC1の発現パターンはKIF11の発現と有意に一致した（ $X^2 = 60.8$ 、 $P < 0.0001$ ）。本発明者らは続いて、KOC1および／またはKIF11の過剰発現が臨床的転帰と関連性があるか否かを調べた。本発明者らは、NSCLCにおけるKOC1の発現がpT因子の状態（ $X^2 = 23.1$ 、 $P < 0.0001$ ）および腫瘍特異的5年生存率（ $P = 0.0115$ 、Log-rank検定による）と有意な関連性があることを見いだした（図11b、上図）。NSCLCにおけるKIF11の発現は、pT因子（ $X^2 = 15.0$ 、 $P < 0.0001$ ）、pN因子（ $X^2 = 4.4$ 、 $P = 0.0356$ ）および5年生存率（ $P = 0.0008$ 、Log-rank検定による）と有意な関連性があった（図11b、下図）。単変量解析によれば、pT、pN、性別、およびKOC1／KIF11発現はそれぞれ、NSCLC患者における腫瘍特異的生存度の低さと有意な関連性があった。さらに、KOC1およびKIF11は独立した予後因子であることが、Cox比例ハザードモデルを用いた多変量解析によって明らかになった（それぞれ $P = 0.0499$ および $P = 0.0259$ ）。

【0280】

(6) NSCLCにおけるNMUに対する候補受容体のスクリーニング

2つの既知のNMU受容体であるNMU1R（FM3／GPR66）およびNMU2R（FM4）は、エネルギーホメオスタシスにおいて重要な役割を果たしている（Fujii, R.ら、J. Biol. Chem. 275: 21068-21074 (2000)；Howard, A.D.ら、Nature 406: 70-74 (2000)；Funes, S.ら、Peptides 23: 1607-1615 (2002)）。NMU1Rは多くのヒト末梢組織に存在するが（Fujii, R.ら、J. Biol. Chem. 275: 21068-21074 (2000)；Howard, A.D.ら、Nature 406: 70-74 (2000)；Funes, S.ら、Peptides 23: 1607-1615 (2002)）、NMU2Rは脳にしか局在しない。NMU1R遺伝子およびNMU2R遺伝子がNSCLCにおいて発現されるか否かを調べるために、正常なヒト脳および肺、NSCLC細胞株、ならびに臨床組織におけるこれらのNMU受容体の発現を、半定量的RT-PCR実験によって分析した。試験した細胞株および臨床試料のいずれにおいても

、NMU1Rの発現もNMU2Rの発現も検出されなかったが、NMU1Rは肺で、NMU2Rは脳で発現され（データ非提示）、このことからNMUが他の受容体との相互作用を介して肺癌細胞の増殖を媒介しうることが示唆された。

【0281】

NMU2RおよびNMU1Rは当初、既知の神経ペプチドであるGPCRの相同体として単離されたため、未同定のNMU受容体は、NMU1R／NMU2Rとある程度の相同性を示す同じファミリーのメンバーであると推測された。このため、NMU受容体の候補をBLASTプログラムを用いて検索した。その結果および本発明者らの発現プロファイルデータでのNSCLCにおけるその高い発現レベルから、GHSR1b（NM_004122；SEQ ID NO：3および4）およびNTSR1（NM_002531；SEQ ID NO：5および6）が好適な候補であることが示された。GHSRは1a型および1b型という2つの転写物を有する。完全長ヒト1a型 cDNAは、Gタンパク質共役型受容体の典型的な特徴である7回膜貫通ドメインを有すると推定される366アミノ酸のポリペプチドをコードする。単一のイントロンがそのオープンリーディングフレームを膜貫通ドメイン1～5および6～7をコードする2つのエクソンに分割しており、このためGHSR1aはイントロン含有型のGPCRに分類される。1b型は、5回膜貫通ドメインを有する289アミノ酸のポリペプチドをコードする単一のエクソンから転写される非スプライシングmRNAバリエーションである。それぞれのバリエーションに対する特異的プライマーを用いた半定量的RT-PCR分析により、GHSR1aはNSCLCでは発現されないことが示された。一方、GHSR1bおよびNTSR1はいくつかのNSCLC細胞株では比較的高レベルで発現されたが、正常肺では全く発現されなかった（図13a）。GHSR1b産物はNMU1Rに対して46%の相同性を有し、NTSR1はNMU1Rに対して47%の相同性を有する418アミノ酸をコードする。

【0282】

(7) NSCLCにおけるNMUに対する候補受容体の同定

NMUとGHSR1b／NTSR1との直接的な相互作用について確かめるために、COS-7細胞に対して、Flagタグを付加したGHSR1bまたはNTSR1を発現するように設計されたプラスミドを一過性にトランスフェクトし、ローダミン標識NMU-25の存在下で培養した。続いて、細胞におけるFlagタグ付加GHSR1b／NTSR1およびNMU-25-ローダミンの局在について、FITCを結合させた抗FLAG抗体を用いて調べたところ、NMU-25および両方の受容体のいずれもがともに細胞膜に位置することが見いだされた（図13c）。NMU-25とこれらの受容体の共局在は、以下のリガンド／細胞の組み合わせのいずれかを用いた対照アッセイでは観察されなかった：1) NMU-25-ローダミンと、受容体プラスミドのいずれかをトランスフェクトしていないCOS-7細胞とのインキュベーション；2) NMU-25-ローダミンを伴わずにインキュベートした非トランスフェクトCOS-7細胞；および3) 受容体プラスミドのいずれかをトランスフェクトしたが、NMU-25-ローダミンは伴わずにインキュベートしたCOS-7細胞。この結果は、ローダミン標識NMU-25の、2つの受容体のいずれかを発現するCOS-7細胞の表面への結合（図13d）、およびローダミン標識NMU-25のCOS-7細胞の表面への用量依存的な様式での結合を示したフローサイトメトリーによって確かめられた。

【0283】

(8) 正常ヒト組織におけるGHSR1b発現

正常ヒト組織におけるGHSR1bの発現はその時点で明確には報告されていなかったため、GHSR1bの分布をヒト多組織ノーザンブロットを用いて明らかにした。プローブとしてGHSR1b cDNAを用いるノーザンブロット法により、試験した23種の正常ヒト組織のうち心臓、肝臓、骨格筋、脾臓、および胃において、0.9kbの転写物が、1.1kbの転写物であるGHSR1aと比較してシグナルの極めて弱いバンドとして同定された（図13b）。

【0284】

NMU-25とNSCLC細胞表面の内因性GHSR1bおよびNTSR1との結合をさらに確かめるために、本発明者らはNMU-25で処理したLC319細胞およびPC-14細胞を用いる受容体-リガンド結合アッセイを行った。本発明者らは、Cy5標識NMU-25の、2つの受容体の両方を発現するがNMU1R／NMU2Rはほとんど発現しない、これらの2種類の細胞株の表面に対する結合を検出した（図13e）。

【0285】

GPCRに対する生物活性リガンドはそれらのコグネート受容体と特異的に結合して、細胞内 Ca^{2+} およびcAMPレベルといった二次メッセンジャーの増加を引き起こすことが報告されている。本発明者らはこのため、NMUがLC319細胞において、そのGHSR1b/NTSR1との相互作用によってこれらの二次メッセンジャーを誘導する能力を明らかにした。細胞を培地中において最終濃度3~100 μM のNMU-25の存在下で培養したところ、GHSR1bおよびNTSR1の両方を発現するLC319細胞におけるcAMP産生は、NMU-25の用量依存的な様式で観察されたが、 Ca^{2+} 流動についてはこれは観察されなかった。これらの結果は、NSCLC細胞が機能的なGHSR1b/NTSR1を発現することを示している（図13f左図）。GHSR1b/NTSR1、GHRL、またはNTSに関して報告されている他のリガンドを添加することにより、この影響はNMU-25特異的であることが確かめられた（図13f右図）。さらに、GHRLおよびNTSはLC319細胞における細胞内カルシウムの動員応答を引き起こし（データ非提示）、このことからGHSR1bおよび/またはNTSR1に関して十分に解明されていない種々の機能が示唆された。

【0286】

(9) GHSR/NTSR1に対するsiRNAによるNSCLC細胞の増殖の阻害

さらに、GHSRまたはNTSR1に対するsiRNAを発現するように設計されたプラスミド（si-GHSR-1、si-NTSR1-1、およびsi-NTSR1-2）を用いて、肺癌発生におけるNMU-受容体相互作用の生物学的意義について試験した。これらのプラスミドのいずれかをA549細胞またはLC319細胞にトランスフェクトしたところ、3種類の対照siRNAのいずれかを含有細胞と比較して内因性受容体の発現が抑制された（図14a）。受容体の発現の低下に応じて、A549細胞およびLC319細胞は細胞生存度（図14b）およびコロニー数（データ非提示）の有意な低下を示した。これらの結果から、NMUはGHSR1bおよびNTSR1との相互作用によってNSCLCの発生/進行に重大な役割を果たしている可能性が強く裏づけられた。

【0287】

NMUの下流遺伝子の同定

NMUシグナル伝達経路をさらに解明するため、およびNMUによって調節される下流遺伝子を同定するために、NMUに対するsiRNA（si-NMU）またはLUCに対するsiRNA（対照siRNA）を、NMUを過剰発現するLC319細胞に対してトランスフェクトし、遺伝子発現の下方制御を、32,256個の遺伝子を含むcDNAマイクロアレイを用いてモニターした。この方法によって検出された数百もの遺伝子に対して、本発明者らは候補遺伝子をさらに選択するために自己組織化マップ（SOM）クラスタリング分析を行った。SOMクラスタリングは、Kohonen（Kohonen, T. (1990). The self-organizing map. IEEE 78, 1464-1480）によって最初に開発され、マイクロアレイからの遺伝子発現データの解析へと応用された、データのマイニングおよび可視化の方法である。このクラスタリング法はk-meansクラスタリング（Kaeck, S. M.ら、(2002). Cell 111, 837-851.）と類似しているが、遺伝子発現パターンに基づいて群に分類し、群間の関係を二次元マップによって示す点で異なっている。本発明者らのバリエーションフィルターを通過させる遺伝子は5×4のSOMによって群別化した。

【0288】

本発明者らはまず、SOMクラスター分析を用いて、その強度がNMU発現の低下に従って有意に減少した70種の遺伝子を選択した（図15a）。半定量的RT-PCR分析により、si-NMUをトランスフェクトしたLC319細胞では候補転写物の時間依存的な様式の低下が確認されたが、LUCに対する対照siRNAではこれがみられないことを確かめた（図15b）。また、これらの転写物は、外因性NMUを発現するLC319細胞では正常肺組織の転写物と比較して2倍を上回って上方制御されていることが確認された。NMU発現に応じたこれらの遺伝子の過剰発現を肺癌組織および細胞株においても評価し（データ非提示）。本発明者らは最終的に、以上の選択基準を満たす6種のNMU標的遺伝子候補；FOXO1、FLJ42024、GCDH、CDK5RAP1、LOC134145、およびNUP188を同定した（図15b）。

【0289】

FOXO1 mRNAレベルは正常肺組織と比較して肺癌で有意に上昇しており、その発現はNMUならびにNMUの2つの受容体GHSR1bおよびNTSR1と良好な一致を示したものの、肺癌発生に

におけるFOXM1の働きは未だに不明である。このため、本発明者らはさらなる分析のためにFOXM1を選択した。NMUリガンド-受容体シグナル伝達によるFOXM1の特異的な誘導について明らかにするために、GHSR1bおよびNTSR1を発現するLC319細胞を、培地中の最終濃度100 μ MのNMU-25またはBSA（対照）の存在下で培養した。NMU-25で処理した細胞は対照細胞と比較してより高いFOXM1の発現を示した（図15c）。さらに、外因性NMUを発現するLC319細胞においても、モックベクターをトランスフェクトした対照細胞と比較してFOXM1が上方制御されていることが確かめられた（データ非提示）。

【0290】

本発明者らは続いて、FOXM1に対するsiRNAを発現するように設計されたプラスミド（si-FOXM1）を用いて、NMUシグナル伝達によるFOXM1活性化の、肺癌細胞の増殖または生存に対する生物学的意義について試験した。A549細胞またはLC319細胞にsi-FOXM1をトランスフェクトしたところ、内因性FOXM1の発現は、3つの対照siRNAのいずれかを含む細胞と比較して抑制された（図16aおよび16b）。FOXM1の発現低下に応じて、A549細胞およびLC319細胞は細胞生存度およびコロニー数の有意な低下を示した（図16aおよびb）。これらの結果により、NMUがGHSR1b/NTSR1との相互作用およびそれに引き続くFOXM1などのその下流標的の活性化により、肺癌細胞の増殖に大きな影響を及ぼしうることが強く示された。

【0291】

本明細書に提示したNMUに対するsiRNAで処理したLC319細胞のマイクロアレイデータにより、NMUシグナル伝達経路が、そのタンパク質産物が転写因子として機能可能であって細胞増殖の制御またはシグナル伝達への関与が可能な転写物を含む下流遺伝子のセットをトランス活性化することにより、肺癌細胞の増殖促進に影響を及ぼしうることが実証された。本発明者らは、さらなる生物学的アッセイにより、FOXM1転写因子がNMUシグナル伝達の下流標的であるという証拠を提供した。FOXM1はいくつかの種類のヒト癌において過剰発現されることが知られている（Teh, M.T.ら、Cancer Res. 62, 4773-4780.; van den Boom, J.ら、(2003). Am. J. Pathol. 163, 1033-1043.; Kalinichenko, V.V.ら、(2004). Genes. Dev. 18, 830-850）。「フォークヘッド」遺伝子ファミリーは、ショウジョウバエにおいて最初に同定された、保存的な100アミノ酸のDNA結合モチーフを有する転写因子を含み、細胞増殖、増殖、分化、寿命、および形質転換に関与する遺伝子の発現の調節において重要な役割を果たすことが示されている。ヒト肝癌HepG2細胞株における同時トランスフェクションアッセイにより、FOXM1タンパク質はサイクリンB1（CCNB1）およびサイクリンD1（CCND1）の両方の発現を刺激することが示されており（Wang, X.ら、(2002). Proc. Nat. Acad. Sci. 99, 16881-16886.）、このことはこれらのサイクリン遺伝子が直接的なFOXM1転写標的であること、ならびにFOXM1が細胞分裂のため、および有糸分裂からの脱出のために必須である遺伝子の転写ネットワークを制御することを示唆している。本発明者らが、本発明者らが試験した一連のNSCLCの大多数におけるCCNB1の活性化、およびFOXM1に対するその発現の良好な一致を観察したことに注意すべきである（データ非提示）。一方、p27（Kip1）およびp19（Arf）（CDKN2A）がFOXM1と相互作用し、FOXM1の転写活性を阻害することも実証された（Kalinichenko, V.V.ら、(2004). Genes. Dev. 18, 830-850）。NSCLC細胞におけるNMUによる細胞増殖の促進はFOXM1のトランス活性化を反映している可能性があり、これは結果的にそれらの分子経路の機能に影響を及ぼすと考えられる。

【0292】

組織マイクロアレイに対する免疫組織化学分析により、本発明者らは、NSCLC試料（SCC、ADC、LCC、およびBAC）およびSCLC試料の大半でNMUタンパク質の発現増加を検出したが、正常肺組織では検出されなかった。NMUは分泌タンパク質であり、本発明者らの分析に用いたNSCLC臨床試料の大部分は早期の手術可能な段階にあったため、NMUはファイバースコープ経気管支生検（TBB）または血液検査との併用により、早期肺癌の診断のためのバイオマーカーとして役立つ可能性がある。

【0293】

以上をまとめると、本発明者らは、NMUならびにこの分子に対する2つの新たに判明し

10

20

30

40

50

た受容体GHSR1bおよびNTSR1が、下流標的遺伝子の転写を調節することにより、NSCLCにおけるオートクリン増殖促進経路に対して必須の役割を果たしていることを示した。本明細書で報告したデータは、NMU-GHSR1b/NTSR1経路を標的とする、肺癌に対して特異的な新規の抗癌薬を設計しうる可能性を強く意味している。これらはまた、siRNA自体に、化学療法抵抗性の進行肺癌の治療のための新規アプローチとして、この経路を妨げる可能性があることも示唆している。

【0294】

産業上の利用可能性

ヒト遺伝子KIF11、GHSR1b、NTSR1、およびFOXM1の発現は、正常肺組織と比較して、非小細胞肺癌（NSCLC）において顕著に増加している。したがって、これらの遺伝子はNSCLCの診断マーカーとして都合良く用いることができ、それらによってコードされるタンパク質をNSCLCの診断アッセイに用いることもできる。

【0295】

本発明者らはまた、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1の発現が細胞増殖を促進し、一方、KIF11、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子に対応する低分子干渉性RNAによって細胞増殖が抑制されることも示した。これらの知見は、KIF11、KOC1、GHSR1b、NTSR1、およびFOXM1タンパク質それぞれが発癌活性を刺激することを示している。したがって、これらの腫瘍性タンパク質のそれぞれは抗癌薬の開発のための有用な標的である。例えば、KIF11、KOC1、GHSR1b、NTSR1、もしくはFOXM1の発現を阻止する作用因子、またはその活性を妨げる作用因子には、抗癌薬、特にNSCLCの治療のための抗癌薬としての治療的有用性がある可能性がある。このような作用因子の例には、KIF11、KOC1、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、低分子干渉性RNAおよびリボザイム、ならびにKIF11、KOC1、GHSR1b、NTSR1、またはFOXM1ポリペプチドを認識する抗体が含まれる。

【0296】

本発明をその具体的な態様に言及しながら詳細に説明してきたが、発明の精神および範囲から逸脱することなく、さまざまな変更および修正が成されうることが当業者には明らかであると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0297】

【図1】KOC1とKIF11との関係を裏付ける写真を示している。(a)は、KOC1とKIF11との相互作用を裏付けるKOC1およびKIF11の免疫共沈の結果を示している。A549細胞に対して、Flagタグを付加したKIF11およびmycタグを付加したKOC1を一過性に同時トランスフェクトし、抗Flag M2アガロースにより免疫沈降させ、その後抗myc抗体によるイムノブロットを行った。一方、ベクターおよび細胞の同じ組み合わせを用いて、細胞を抗mycアガロースにより免疫沈降させた上で、抗Flag M2抗体によるイムノブロットも行った。イムノブロットされたタンパク質に対応するバンドは、両方の構築物を同時トランスフェクトした場合にのみ認められた。(b)は、KOC1とKIF11との共局在を示す免疫細胞化学染色の結果を示している。COS-7細胞に対して、Flagタグ付加KIF11およびmycタグ付加KOC1を一過性にトランスフェクトし、FITC標識抗FLAG抗体およびローダミン標識抗myc抗体を用いて、それらの共局在を主として細胞質中に検出した。(c)は、肺癌細胞株A549およびLC319の抽出物からの内因性のKOC1およびKIF11の相互免疫共沈降の結果を示している。(上図)抗KOC1抗体により免疫沈降させた両方の細胞抽出物のウェスタンブロット分析であり、KIF11タンパク質が免疫沈降中に検出された。(下図)抗KIF11抗体により免疫沈降させた抽出物のウェスタンブロットであり、KOC1タンパク質が免疫沈降中に検出された。

【図2】肺腫瘍および正常組織におけるKOC1およびKIF11の同時活性化を裏付ける写真を示している。(a)は、NSCLCおよび対応する正常肺組織の臨床試料におけるKOC1およびKIF11の発現を試験したQRT-PCRの結果を示している。Y軸は、2つの遺伝子（KOC1またはKIF11/ACTB）の相対的発現率を示している。(b)は、20個の肺癌細胞株におけるKOC1およびKIF11の発現を試験したQRT-PCRの結果を示している。(c)は、正常ヒト組織におけるKOC

1およびKIF11の発現を検出したノーザン-ブロット分析の結果を示している。

【図3】KOC1とKIF11との関係を裏付ける写真を示している。(a)は、末端領域の一方または両方を欠失し、N末端およびC末端にそれぞれFLAGおよびHAタグが付加された5つのKOC1欠失変異体の概略図を示している。KH、リボ核タンパク質K相同ドメインを示している。

(b)は、KIF11と結合するKOC1の領域の同定のための免疫沈降実験の結果を示している。2つのRNA認識モチーフ(RRM)を欠くKOC1DEL4構築物およびKOC1DEL5構築物は、内因性KIF11と相互作用する任意の測定可能な能力を保持していなかった。

【図4】KOC1とKOC1結合mRNAとの関係を裏付ける写真である。(a)は、KOC1におけるmRNA結合領域の同定のための、免疫沈降させたKOC1欠失変異体およびDIG標識RAB35完全長mRNAを用いたウエスタンブロット法の結果を示している。(b)は、KOC1におけるmRNA結合領域の同定のための、免疫沈降させたKOC1欠失変異体およびDIG標識RAB35完全長mRNAを用いたノースウエスタン法の結果を示している。KOC1DEL3およびKOC1DEL5はこれらのmRNAのいずれとも結合せず、4つのKHドメインのみを有する構築物であるKOC1DEL4は、C末端の2つのKHドメインを有しない構築物であるKOC1DEL2と、mRNAに対して同様の結合親和性を示した。(c)は、IP-マイクロアレイの確認のためのIP-RT-PCRの結果、およびA549細胞にトランスフェクトされた種々のKOC1欠失変異体の、55個の候補遺伝子(表2参照)のうち代表的な8つの内因性mRNA(CCT2、SBP2、SLC25A3、RAB35、PSMB7、GL、PKP4およびWINS1)と直接結合する能力を示している。

【図5】培養哺乳動物生細胞におけるKOC1-KIF11-mRNAリボ核タンパク質複合体の移動を示した写真を示している。(a)は、KOC1-KIF11タンパク質複合体の輸送を示している写真である。蛍光シアン性(ECFP)KOC1タンパク質および黄色(EYFP)KIF11タンパク質を発現する小さな粒子が共局在しており、連結されたCOS-7細胞間を超微細な細胞間構造(矢印)を通して一緒に移行した。(b)は、高レベルのKOC1-RNP複合体(細胞A)を含む1つのCOS-7細胞から、複合体のレベルがより低いもう1つの細胞(CellTracker(青色)による単染色;細胞B)へのKOC1-RAB35 mRNA RNP複合体の輸送を示している写真である。KOC1(緑色)-RAB35 mRNA(赤色)複合体の小さな粒子、およびKOC1粒子(緑色)が、超微細な細胞間構造(矢印)を通して細胞Aから細胞Bへと移行した。

【図6】KOC1-KIF11-mRNAリボ核タンパク質複合体の局在を示した写真を示している。(a)は、内因性KIF11とDCTN1との間の直接的な相互作用を裏付ける、A549およびLC319からの細胞抽出物の免疫沈降の結果を示している(上図および下図)。

【図7】レシピエント細胞内に輸送されたKOC1結合mRNAの翻訳を示した写真を示している。(a)は、インサイチューハイブリダイゼーションによりモニターした、レシピエント細胞内に輸送されたmRNAの翻訳を示している写真である。(b)は、受容細胞における輸送されたmRNAに基づくタンパク質合成を示している写真である。mycタグ配列とインフレームに融合させた完全長RAB35 mRNAを有する構築物を示している(上図)。免疫細胞化学を用いた、CellTrackerで染色した受容細胞(青色)の細胞質におけるmycタグ付加RAB35タンパク質の共局在を示している(下方の図)。(c)は、受容細胞における輸送されたmRNAに基づくタンパク質合成を示している写真である。EGFPタンパク質配列とインフレームに融合させた完全長RAB35 mRNAを有する構築物を示している。(d)は、受容細胞における輸送されたmRNAに基づくタンパク質合成を示している写真である。タイムラプスビデオ顕微鏡検査を用いた、CellTracker陽性受容細胞(青色)におけるEGFP融合RAB35タンパク質の発現が示されている。EGFPおよび関連するDICの像を示した。(e)は、RAB35-EGFPベクターおよびHAタグ付加KOC1ベクターを同時トランスフェクトしたCOS-7細胞と、RAB35-EGFPベクターおよびモックプラスミドベクターを同時トランスフェクトしたCOS-7細胞との間で、RAB35-EGFP融合タンパク質のタンパク質レベルに有意差が認められなかったことを示している写真である。このことは、KOC1がRAB35-EGFP mRNAの翻訳を妨害しないと考えられることを示している。

【図8】細胞に対するKIF11 siRNAの影響を示している。(a)は、KIF11に対するsiRNAによる、NSCLC細胞の増殖に対する阻害を示している。A549細胞における特異的siRNA(si-KIF#1、#2、および#3)または対照siRNA(EGFP、LUC、SC)に応じたKIF11の発現を半定量

10

20

30

40

50

的RT-PCRにより分析した。(b)は、3連のMTTアッセイによって評価した、si-KIF#1、#2、#3、EGFP、LUC、またはSCに応じたA549細胞の生存度を示している。

【図9】細胞に対するKOC1ドミナントネガティブ体の影響を示している。(a)は、LC319細胞におけるKOC1欠失変異体KOC1DEL3と内因性KIF11との相互作用を裏付ける免疫沈降の結果を示している。(b)は、RRMドメインを過剰発現するLC319細胞における内因性KOC1とKIF11との複合体形成の減少を裏付ける免疫沈降の結果を示している。(c)は、3連のMTTアッセイによって評価した、KOC1DEL3の用量依存的ドミナントネガティブ作用応答したLC319細胞の生存度を示している。X軸は、個々のアッセイ法においてLC319細胞にトランスフェクトしたKOC1DEL3プラスミド-DNAの用量(μg)を示している。(d)は、KOC1DEL2構築物がトランスフェクトされたA549細胞における内因性KOC1とKIF11との複合体形成の減少を検出する免疫沈降の結果を示している。(e)は、A549細胞におけるKOC1DEL2と内因性KIF11との相互作用を検出する免疫沈降の結果を示している。(f)は、3連のMTTアッセイによって評価した、KOC1DEL2の用量依存的ドミナントネガティブ作用に対するA549細胞の生存度を示している。X軸は、個々のアッセイ法においてA549細胞にトランスフェクトしたKOC1DEL2プラスミド-DNAの用量(μg)を示している。

10

【図10】細胞に対するRAB35 siRNAの影響を示している。(a)は、A549細胞におけるsi-RAB35または対照siRNAに対するmRNAノックダウン効果を分析する半定量的RT-PCRの結果を示している。(b)は、特異的siRNAまたは対照プラスミド(EGFP、スクランブル(Scramble)、またはルシフェラーゼ)がトランスフェクトされたA549細胞のMTTアッセイの結果を示している。エラーバーは3連のアッセイ法の標準偏差を表している。

20

【図11】KOC1およびKIF11の過剰発現とNSCLCの転帰不良との関連性を示している。(a)は、組織マイクロアレイに対して抗KOC1ポリクローナル抗体(左)および抗KIF11ポリクローナル抗体(右)を用いた、外科切除されたSCC組織由来の代表的試料に関する免疫組織化学的評価の結果を示している(200倍)。(b)は、組織マイクロアレイ上でのKOC1発現(左図)およびKIF11発現(右図)による、腫瘍特異的生存期間に関する Kaplan-Meier 分析の結果を示している。

【図12】微小管上のKOC1-KIF11-DCTN1複合体による細胞内および細胞間mRNA輸送の機序に関する模式的モデルを示している。KIF11モータータンパク質およびDCTN1を含むKOC1リボ核タンパク質複合体は、KOC1結合mRNAを、微小管構造を通じて哺乳動物体細胞の内部または細胞間で輸送する。このモデルは、増殖中の癌細胞同士が、癌の増殖または進行に重要であるmRNAを1つの細胞から別の細胞へと輸送するシステムにこの分子複合体を関与させることにより能動的連絡しうることを意味する。図8はNMUとGHSR1b/NTSR1との関係を示している。

30

【図13】(a)は、NSCLC細胞株において検出されたNMU、候補受容体、およびそれらの既知のリガンドの発現を示した半定量的RT-PCR分析の結果を示している。(b)は、正常ヒト組織におけるGHSR1bの発現を示している。(c)は、FLAGタグを付加したGHSR1bまたはNTSR1が一過性にトランスフェクトされたCOS-7細胞の細胞表面にNMUおよびGHSR1b/NTSR1が共局在することを示した、FITC標識抗FLAG抗体を用いた免疫細胞化学染色の結果を示している。(d)は、NMUとGHSR1b/NTSR1との相互作用を示している。COS-7細胞に対して同一のベクターを一過性にトランスフェクトし、ローダミンで標識したNMU-25の細胞表面との結合をフローサイトメトリーによって検出した。これらのアッセイ法に関する陰性対照として、3つのリガンド/細胞の組み合わせを調製した：1) 非トランスフェクトCOS-7細胞；2) NMU-25-ローダミン 対 非トランスフェクトCOS-7細胞の組み合わせ；および3) GHSR1bまたはNTSR1のみをトランスフェクトしたCOS-7細胞。(e)は、NMU-25で処理したLC319細胞およびPC-14細胞を用いた受容体-リガンド結合アッセイの結果を示している。(f)は、NMUで処理したNSCLC細胞によるcAMP産生を示している。

40

【図14】細胞に対するsiRNAの影響を示している。(a)は、GHSR1bおよびNTSR1に対するsiRNAによる、NSCLC細胞の増殖に対する阻害を示している。A549細胞およびLC319細胞における特異的siRNA(si-GHSRまたはsi-NTSR1)または対照siRNA(EGFP、LUC、SCR)に応じたGHSRまたはNTSR1の発現を半定量的RT-PCRによって分析した。(b)は、si-GHSR、N

50

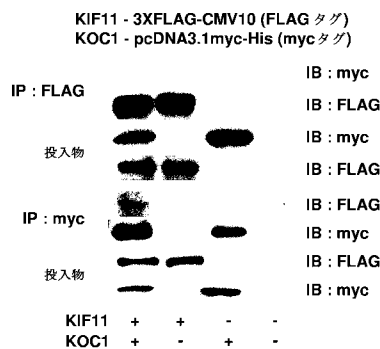
TSR1、EGFP、LUC、またはSCRに応じたA549細胞またはLC319細胞の生存度を評価する3連のMTTアッセイの結果を示している。

【図15】NMUの下流遺伝子候補の検証を示している。(a)は、si-NMUによるNMU転写物の時間依存的な減少を示している。(b)は、si-NMUで処理したLC319細胞からのmRNAに関する、遺伝子特異的プライマーを用いた半定量的RT-PCR実験の結果を示し、これにより下流標的遺伝子候補の発現の時間依存的な減少が裏付けられている。(c)は、NMU-25またはBSA(対照)(100 μ M)とともにインキュベートしたLC319細胞からのmRNAを用いた半定量的RT-PCRの結果を示し、NMUの下流標的遺伝子候補としてのFOXO1の誘導が検出されている。

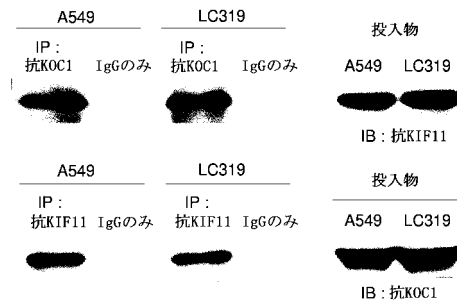
【図16】細胞に対するFOXO1 siRNAの影響を示している。(a)は、FOXO1に対するsiRNAによるNSCLC細胞の増殖の阻害を示している。半定量的RT-PCRによって分析した、A549細胞における特異的siRNA (si-FOXO1) または対照siRNA (EGFP、LUC、SCR) に応じたFOXO1の発現を示している(上図)。3連のMTTアッセイにより評価した、si-FOXO1、EGFP、LUC、またはSCRに応じたA549細胞の生存度を示している(下図)。(b)は、FOXO1に対するsiRNAによるNSCLC細胞の増殖の阻害を示している。半定量的RT-PCRによって分析した、LC319細胞における特異的siRNA (si-FOXO1) または対照siRNA (EGFP、LUC、SCR) に応じたFOXO1の発現を示している(上図)。3連のMTTアッセイにより評価した、si-FOXO1、EGFP、LUC、またはSCRに応じたA549細胞の生存度を示している(下図)。

【図17】オートクリン性NMU-GHSR1b発癌シグナル伝達経路におけるNMU-受容体相互作用を介した癌細胞の増殖および浸潤の促進に関する模式的モデルである。NMUのGHSR1bおよび/またはNTSR1との結合は、アデニル酸シクラーゼの活性化、細胞内cAMPの蓄積、およびそれに続くcAMP依存性プロテインキナーゼ(PKA)の活性化をもたらす。調節サブユニット(R)からのPKA(C)の触媒サブユニットの放出は、下流FOXO1遺伝子および/または関連する標的遺伝子の活性化を引き起こす。

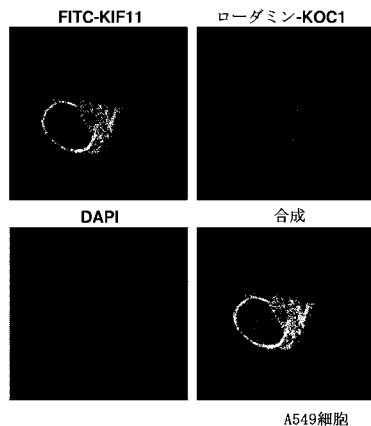
【図1a】



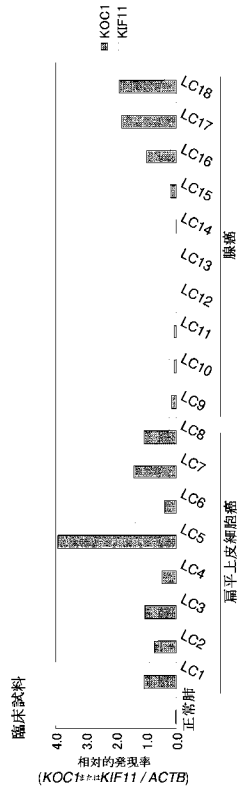
【図1c】



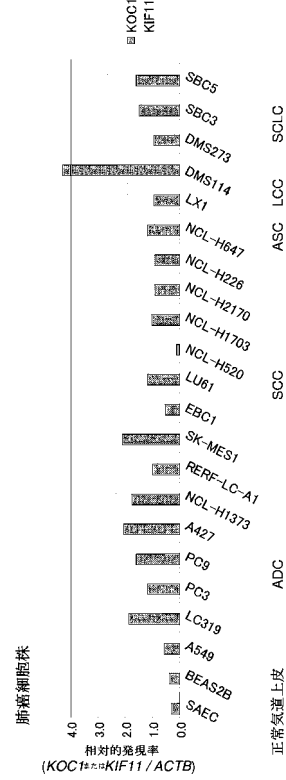
【図1b】



【図 2 a】



【図 2 b】

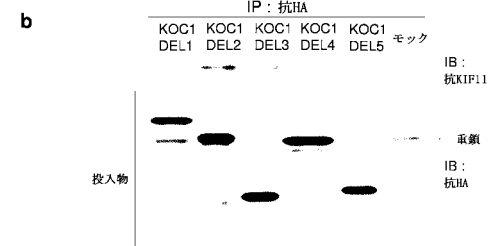


【図 2 c】

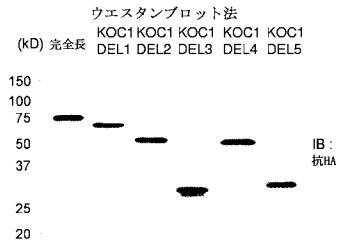


【図 3】

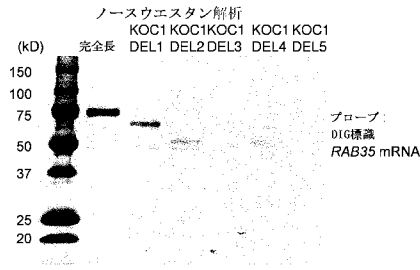
- a
- KOC1 完全長 1 579
FLAG — RRM — RRM — KH — KH — KH — KH — HA
- ① KOC1DEL1 FLAG — RRM — RRM — KH — KH — KH — HA
- ② KOC1DEL2 FLAG — RRM — RRM — KH — KH — HA
- ③ KOC1DEL3 FLAG — RRM — RRM — HA
- ④ KOC1DEL4 FLAG — KH — KH — KH — KH — HA
- ⑤ KOC1DEL5 FLAG — KH — KH — HA



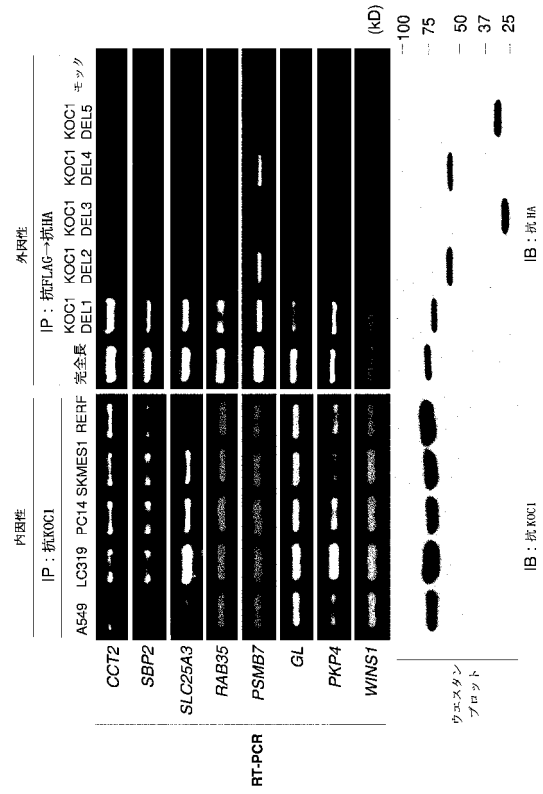
【図 4 a】



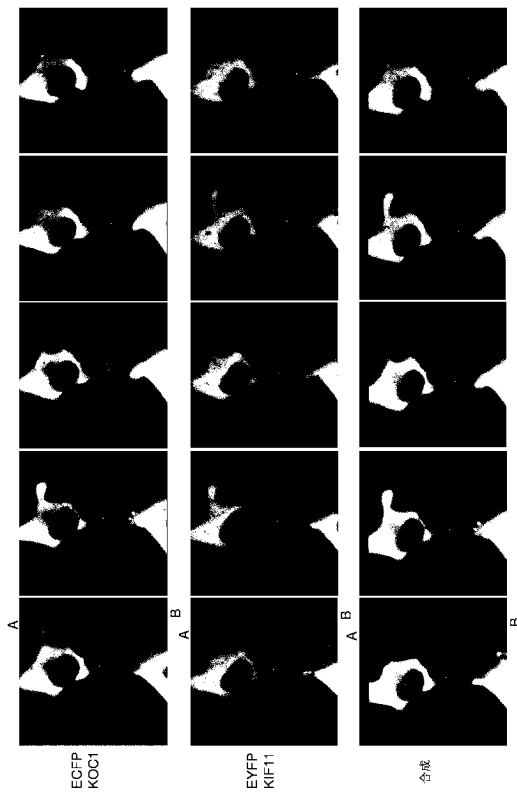
【図 4 b】



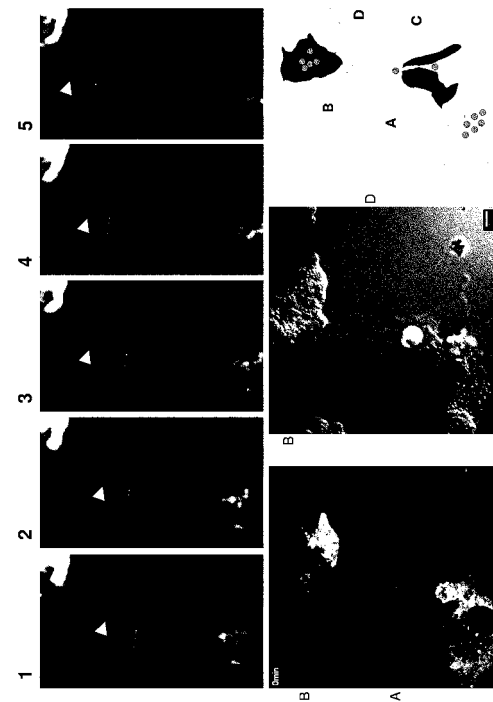
【図 4 c】



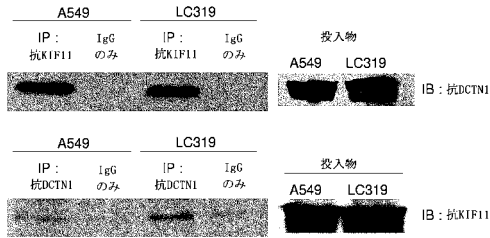
【図 5 a】



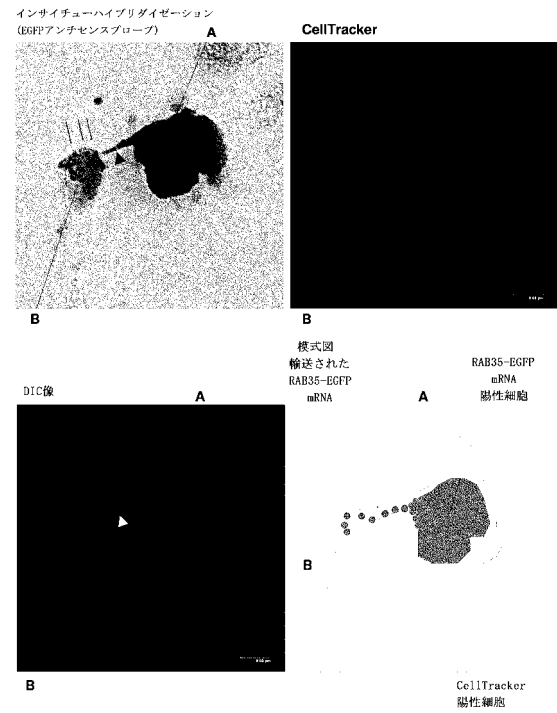
【図 5 b】



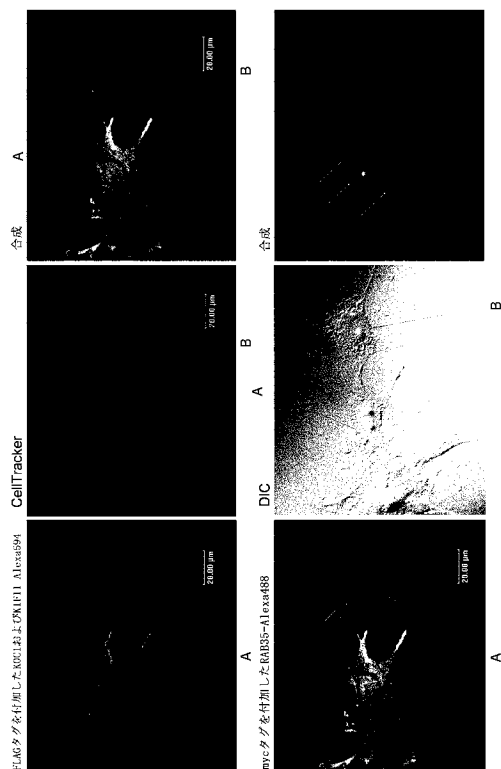
【図 6】



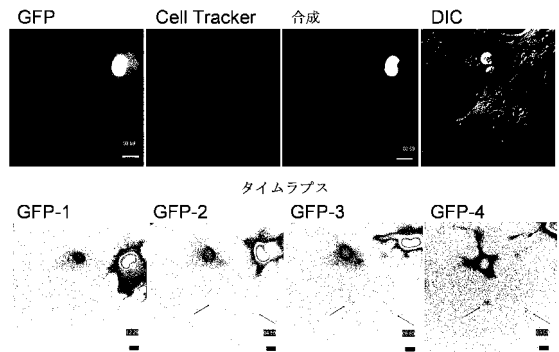
【図 7 a】



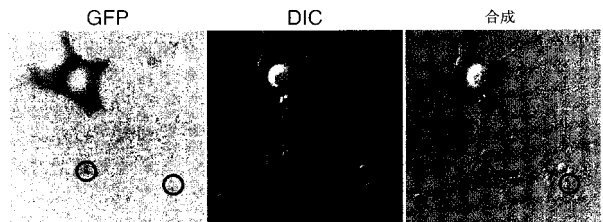
【図 7 b】



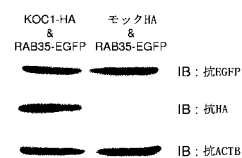
【図 7 c】



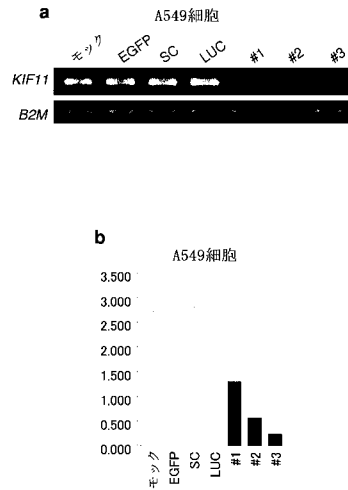
【図 7 d】



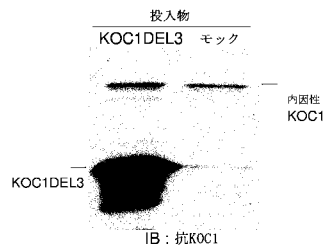
【図 7 e】



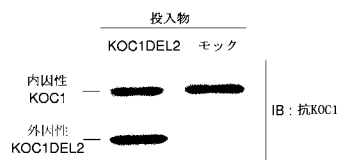
【図 8】



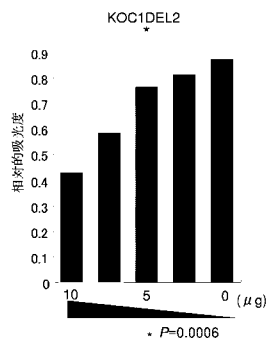
【図 9 a】



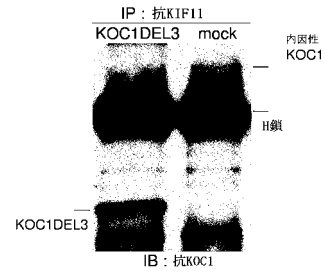
【図 9 e】



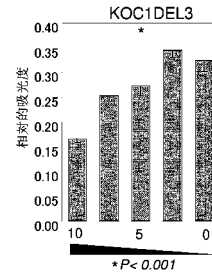
【図 9 f】



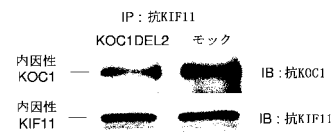
【図 9 b】



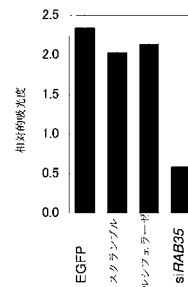
【図 9 c】



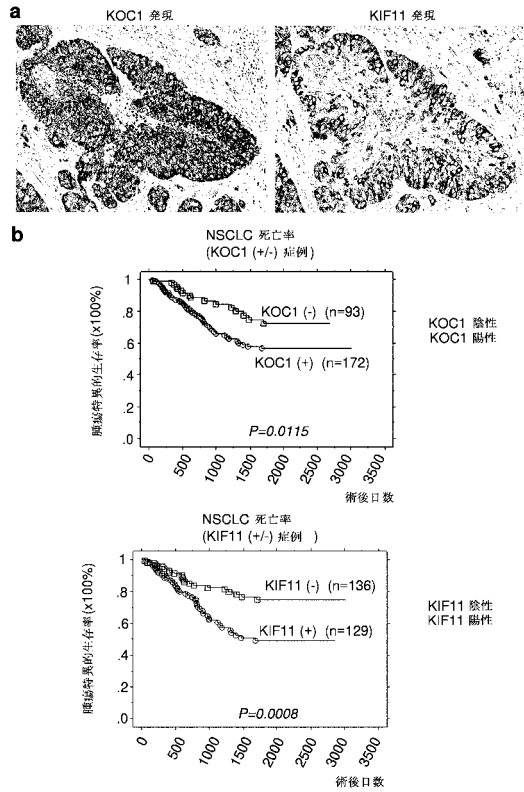
【図 9 d】



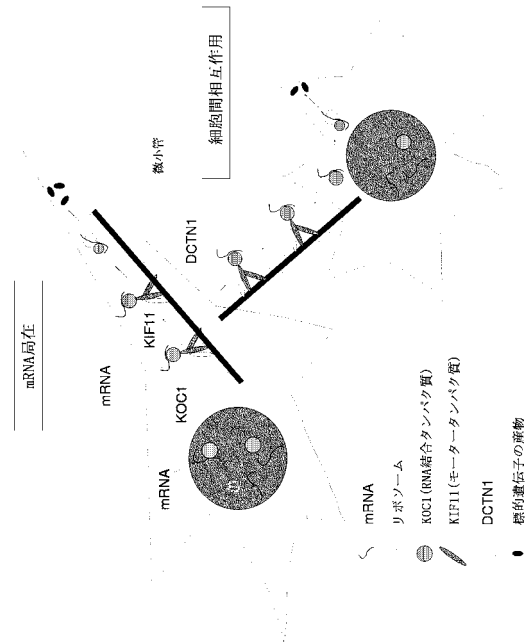
【図 10】

**b**

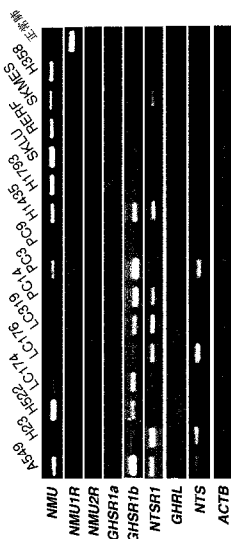
【図 1 1】



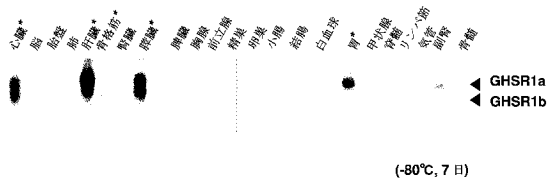
【図 1 2】



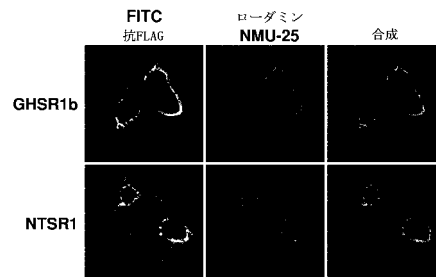
【図 1 3 a】



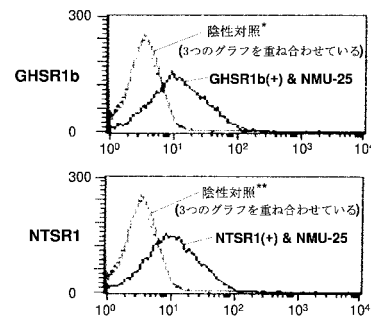
【図 1 3 b】



【図 1 3 c】



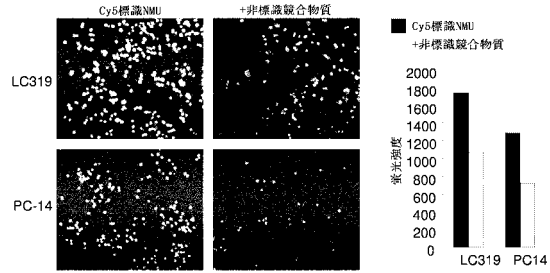
【図 1 3 d】



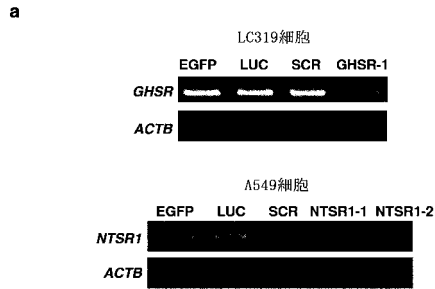
* 本試験に用いた3つの対照アッセイ:
1. COS-7細胞(レポーターなし)のみ
2. 受容体およびNMU-25なし
3. GHSR1b(+)-COS-7細胞のみ

** 本試験に用いた3つの対照アッセイ:
1. COS-7細胞(レポーターなし)のみ
2. 受容体およびNMU-25なし
3. NTSR1(+)-COS-7細胞のみ

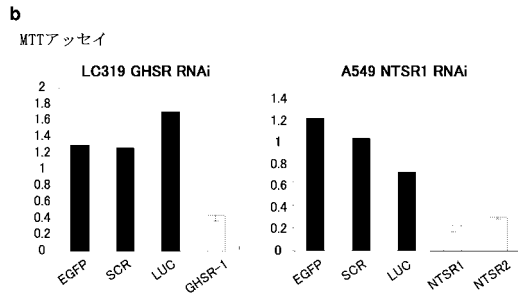
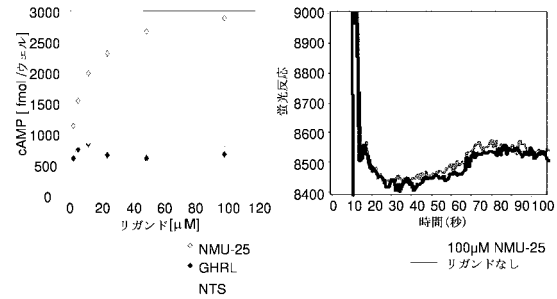
【図 13 e】



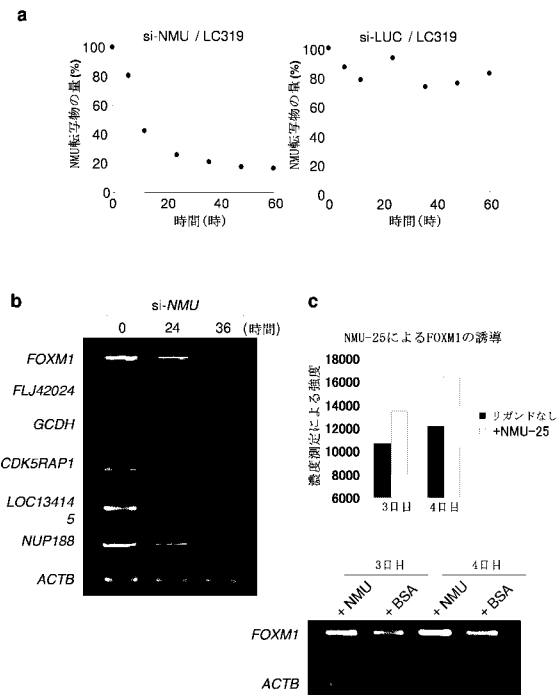
【図 14】



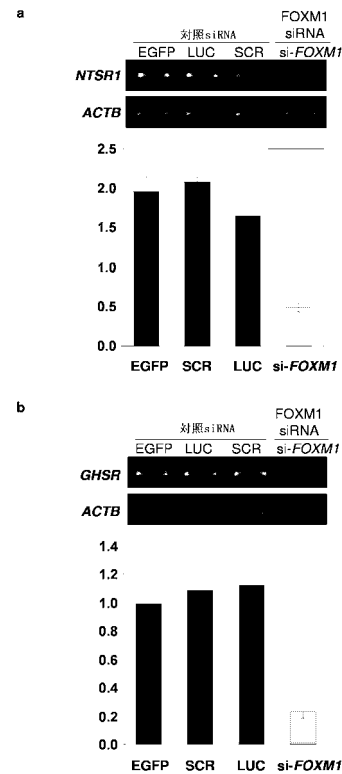
【図 13 f】



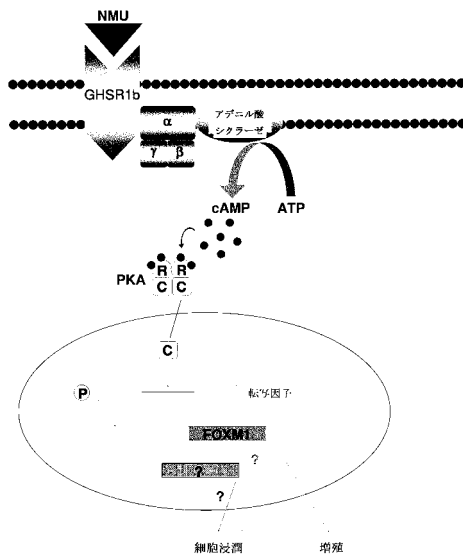
【図 15】



【図 16】



【図 17】



【配列表】

0004938451000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<i>C 0 7 K 14/82 (2006.01)</i>		C 1 2 M 1/00	A
<i>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</i>		C 0 7 K 14/82	
<i>A 6 1 K 31/713 (2006.01)</i>		A 6 1 K 48/00	
<i>A 6 1 K 31/711 (2006.01)</i>		A 6 1 K 31/713	
<i>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</i>		A 6 1 K 31/711	
<i>A 6 1 K 39/00 (2006.01)</i>		A 6 1 P 35/00	
<i>G 0 1 N 33/15 (2006.01)</i>		A 6 1 K 39/00	H
<i>G 0 1 N 33/50 (2006.01)</i>		G 0 1 N 33/15	Z
		G 0 1 N 33/50	Z

- (56)参考文献 米国特許第0 6 5 4 4 7 6 6 (US, B1)
 国際公開第0 1 / 0 3 1 3 3 5 (WO, A1)
 特表2 0 0 3 - 5 0 5 0 8 0 (JP, A)
 米国特許第0 6 7 0 6 8 6 7 (US, B1)
 国際公開第0 1 / 0 9 4 6 2 9 (WO, A1)
 WEIL, BIOTECHNIQUES, 2002 V33 N6, P.1244-1248
 Oncogene, (2003), vol.22, p.2192-2205
 第62回日本癌学会総会, 2003, p.247
 Cancer Res, (2003), vol.63, p.7038-7041

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C12N 15/00-90
 CA/REGISTRY/BIOSIS/WPIDS(STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)