

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-137151

(P2004-137151A)

(43) 公開日 平成16年5月13日(2004.5.13)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00 Z N A	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 4
A 6 1 P 35/00	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 5
審査請求 未請求 請求項の数 21 O L (全 17 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-300415 (P2002-300415)	(71) 出願人	899000079
(22) 出願日	平成14年10月15日 (2002.10.15)		学校法人慶應義塾
			東京都港区三田2丁目15番45号
		(74) 代理人	100107984
			弁理士 廣田 雅紀
		(74) 代理人	100102255
			弁理士 小澤 誠次
		(74) 代理人	100118957
			弁理士 岡 晴子
		(72) 発明者	戸田 正博
			東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大
			学医学部内
		(72) 発明者	河上 裕
			東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大
			学医学部内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脳腫瘍の治療・診断薬

(57) 【要約】

【課題】腫瘍、特に脳腫瘍の治療薬や診断薬、脳腫瘍の検出・診断用プローブ、脳腫瘍の診断キット、腫瘍、特に脳腫瘍の治療方法、抗脳腫瘍剤のスクリーニング方法を提供すること。

【解決手段】ヒト脳腫瘍患者の約11,000遺伝子の中から、ヒト脳腫瘍において非癌部脳組織と比較し顕著に発現が亢進している16個の遺伝子をGene Chip解析により選り出し、その中からESTデータベースを用いたESTスクリーニングにより絞り込み、RT-PCRやリアルタイム定量PCRを用いた解析により、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター受容体関連タンパク質(uPARAP)が腫瘍、特に脳腫瘍特異的に発現していることを見い出した。uPARAPの細胞外ドメインを特異的に認識する抗体等のuPARAPに特異的に結合するペプチド・タンパク質等の化合物を脳腫瘍の治療・診断薬とする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

u P A R A P に特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有効成分として含有することを特徴とする腫瘍の治療薬。

【請求項 2】

u P A R A P に特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物が、u P A R A P の細胞外ドメインを特異的に認識する抗体であることを特徴とする請求項 1 記載の腫瘍の治療薬。

【請求項 3】

u P A R 及び／又は P r o - u P A に特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有効成分として含有することを特徴とする腫瘍の治療薬。 10

【請求項 4】

u P A R A P 、u P A R 及び／又は P r o - u P A をコードする D N A 又は R N A のアンチセンス鎖の全部又は一部を有効成分として含有することを特徴とする腫瘍の治療薬。

【請求項 5】

腫瘍が脳腫瘍であることを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれか記載の腫瘍の治療薬。

【請求項 6】

u P A R A P に特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を腫瘍患者に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法。

【請求項 7】

u P A R A P に特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物が、u P A R A P の細胞外ドメインを特異的に認識する抗体であることを特徴とする請求項 6 記載の腫瘍の治療方法。 20

【請求項 8】

u P A R 及び／又は P r o - u P A に特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を腫瘍患者に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法。

【請求項 9】

u P A R A P 、u P A R 及び／又は P r o - u P A をコードする D N A 又は R N A のアンチセンス鎖の全部又は一部を腫瘍患者に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法。

【請求項 10】

腫瘍が脳腫瘍であることを特徴とする請求項 6 ～ 9 のいずれか記載の腫瘍の治療方法。 30

【請求項 11】

u P A R A P に特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有することを特徴とする腫瘍の診断薬。

【請求項 12】

u P A R A P に特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物が、u P A R A P の細胞外ドメインを特異的に認識する抗体であることを特徴とする請求項 11 記載の腫瘍の診断薬。

【請求項 13】

u P A R 及び／又は P r o - u P A に特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有することを特徴とする腫瘍の診断薬。 40

【請求項 14】

u P A R A P 、u P A R 及び／又は P r o - u P A をコードする D N A 又は R N A のアンチセンス鎖の全部又は一部を有することを特徴とする腫瘍の診断薬。

【請求項 15】

腫瘍が脳腫瘍であることを特徴とする請求項 11 ～ 14 のいずれか記載の腫瘍の診断薬。

【請求項 16】

R N A 抽出液、c D N A 及び c R N A 合成酵素、D N A チップ若しくはオリゴヌクレオチドチップ又はタンパク質チップ、プローブ及び u P A R A P 増幅用プライマー、抗 u P A R A P 抗体を備えたことを特徴とする脳腫瘍の診断キット。 50

【請求項 17】

腫瘍が脳腫瘍であることを特徴とする請求項 16 記載の腫瘍の診断キット。

【請求項 18】

u P A R A P 遺伝子を含む発現ベクターを導入した細胞を被検物質の存在下で培養し、u P A R A P の発現及び／又は機能低下の程度を測定評価することを特徴とする抗腫瘍剤のスクリーニング方法。

【請求項 19】

u P A R A P と u P A R を膜表面に共発現した細胞に、被検物質の存在下、P r o - u P A を接触せしめ、P r o - u P A と u P A R の結合の程度を測定評価することを特徴とする抗腫瘍剤のスクリーニング方法。

10

【請求項 20】

u P A R A P 又はその一部分を被検物質と接触させ、被検物質の u P A R A P に対する結合の強さの程度を測定評価することを特徴とする抗腫瘍剤のスクリーニング方法。

【請求項 21】

抗腫瘍剤が抗脳腫瘍剤であることを特徴とする請求項 18 ～ 20 のいずれか記載の抗腫瘍剤のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ウロキナーゼ型プラスミノージェンアクチベーター受容体関連タンパク質 (u P A R A P) の細胞外ドメインを認識する抗体等の u P A R A P に特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有効成分として含有する脳腫瘍の診断・治療薬や u P A R A P をコードする D N A 又は R N A のアンチセンス鎖を有効成分として含有する脳腫瘍の診断・治療薬、それらを用いた脳腫瘍の治療方法等に関する。

20

【0002】

【従来の技術】

近年マイクロアレイの技術が発達し、一度に多くの遺伝子及びタンパク質の発現を解析することを可能にした。特に D N A マイクロアレイによる癌組織における遺伝子発現の解析によって癌の進行や薬剤の感受性の面で新たな知見が得られている。最近、遺伝子発見モニタリング、シーケンス解析及びジェノタイピングなどの広範な核酸解析に利用可能な

30

【0003】

他方、ウロキナーゼ型プラスミノージェンアクチベーター受容体関連タンパク質 (u P A R A P) は、K I A A 0 7 0 9 あるいは E n d o 1 8 0 としても報告され、また、u P A R A P を特異的に認識する抗体も知られている。K I A A 0 7 0 9 は、5 0 k D a 以上の分子量を持つタンパク質をコードするヒト脳から得られた 1 0 0 個の新規な c D N A クローン (K I A A 0 6 1 1 ～ K I A A 0 7 1 0 遺伝子と名付けられた) のうちの K I A A 0 7 0 9 遺伝子 (アクセッションナンバー A B 0 1 4 6 0 9) がコードするタンパク質として報告されている (非特許文献 1)。また、抗 E n d o 1 8 0 モノクローナル抗体とポリク

40

【0004】

また、ウロキナーゼ型プラスミノージェンアクチベーター (u P A) 及び u P A 受容体 (u P A R) は、プラスミノージェン活性化システムにおいて重要な要素であり、組織の再構築

50

及び癌浸潤を促進する働きをし、かかるuPARとuPARAとの複合体のクリアランスに關与する内在性受容体としてのuPARAPや、uPARAPを特異的に認識する抗uPARAPポリクロナール抗体についての報告もなされている（非特許文献4）。この報告によると、良性胸部障害及び悪性胸部障害においてuPARAPの発現を調べたところ、健全な胸部組織では陰性であったものの、すべての良性障害及び非浸潤乳管癌では障害に關連する纖維芽様細胞及び筋上皮細胞中で免疫反応性を示し、浸潤癌では、uPARAPの免疫反応性は腫瘍に關連する間葉系細胞に限定され、uPARAPが筋線維芽細胞及びマクロファージ中に局在化しているとされている。

【0005】

【非特許文献1】

DNA Res. , 5 (3) , 169-176 , 1998

【非特許文献2】

J. Cell Sci. , 113 , 6 , 1021-1032 , 2000

【非特許文献3】

J. Biol. Chem. , 275 (3) , 1993-2002 , 2000
Jan 21

【非特許文献4】

Int. J. Cancer , 1 , 98 , 656-64 , 2002

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、腫瘍、特に脳腫瘍の治療薬や診断薬、脳腫瘍の検出・診断用プローブ、脳腫瘍の診断キット、腫瘍、特に脳腫瘍の治療方法、抗脳腫瘍剤のスクリーニング方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、ヒト脳腫瘍患者の約11,000遺伝子の中から、ヒト脳腫瘍において非癌部脳組織と比較し顕著に発現が亢進している16個の遺伝子をGeneChip解析により選り出し、その中からESTデータベースを用いたスクリーニングにより絞り込み、RT-PCRやリアルタイム定量PCRを用いた解析により、uPARAPが腫瘍、特に脳腫瘍で高発現していることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち本発明は、uPARAPに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有効成分として含有することを特徴とする腫瘍の治療薬（請求項1）や、uPARAPに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物が、uPARAPの細胞外ドメインを特異的に認識する抗体であることを特徴とする請求項1記載の腫瘍の治療薬（請求項2）や、uPAR及び／又はPro-uPAに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有効成分として含有することを特徴とする腫瘍の治療薬（請求項3）や、uPARAP、uPAR及び／又はPro-uPAをコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部を有効成分として含有することを特徴とする腫瘍の治療薬（請求項4）や、腫瘍が脳腫瘍であることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の腫瘍の治療薬（請求項5）に関する。

【0009】

また本発明は、uPARAPに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を腫瘍患者に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法（請求項6）や、uPARAPに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物が、uPARAPの細胞外ドメインを特異的に認識する抗体であることを特徴とする請求項6記載の腫瘍の治療方法（請求項7）や、uPAR及び／又はPro-uPAに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を腫瘍患者に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法（請求項8）や、uPARAP、uPAR及び／又はPro-uPAをコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部を腫瘍患者に投与することを特

10

20

30

40

50

徴とする腫瘍の治療方法（請求項 9）や、腫瘍が脳腫瘍であることを特徴とする請求項 6～9 のいずれか記載の腫瘍の治療方法（請求項 10）に関する。

【0010】

さらに本発明は、uPARAP に特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有することを特徴とする腫瘍の診断薬（請求項 11）や、uPARAP に特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物が、uPARAP の細胞外ドメインを特異的に認識する抗体であることを特徴とする請求項 11 記載の腫瘍の診断薬（請求項 12）や、uPAR 及び／又は Pro-uPA に特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有することを特徴とする腫瘍の診断薬（請求項 13）や、uPARAP、uPAR 及び／又は Pro-uPA をコードする DNA 又は RNA のアンチセンス鎖の全部又は一部を有することを特徴とする腫瘍の診断薬（請求項 14）や、腫瘍が脳腫瘍であることを特徴とする請求項 11～14 のいずれか記載の腫瘍の診断薬（請求項 15）や、RNA 抽出液、cDNA 及び cRNA 合成酵素、DNA チップ若しくはオリゴヌクレオチドチップ又はタンパク質チップ、プローブ及び uPARAP 増幅用プライマー、抗 uPARAP 抗体を備えたことを特徴とする脳腫瘍の診断キット（請求項 16）や、腫瘍が脳腫瘍であることを特徴とする請求項 16 記載の腫瘍の診断キット（請求項 17）や、uPARAP 遺伝子を含む発現ベクターを導入した細胞を被検物質の存在下で培養し、uPARAP の発現及び／又は機能低下の程度を測定評価することを特徴とする抗腫瘍剤のスクリーニング方法（請求項 18）や、uPARAP と uPAR を膜表面に共発現した細胞に、被検物質の存在下、Pro-uPA を接触せしめ、Pro-uPA と uPAR の結合の程度を測定評価することを特徴とする抗腫瘍剤のスクリーニング方法（請求項 19）や、uPARAP 又はその一部分を被検物質と接触させ、被検物質の uPARAP に対する結合の強さの程度を測定評価することを特徴とする抗腫瘍剤のスクリーニング方法（請求項 20）や、抗腫瘍剤が抗脳腫瘍剤であることを特徴とする請求項 18～20 のいずれか記載の抗腫瘍剤のスクリーニング方法（請求項 21）に関する。

【0011】

【発明の実施の形態】

脳腫瘍患者から摘出した脳腫瘍組織において非癌部と発現レベルが異なる遺伝子やタンパク質は、脳腫瘍組織と脳非癌部組織との比較から得ることができる。まず複数の患者より提供された脳非癌部組織における各遺伝子やタンパク質発現レベルの平均を得る。次に、各遺伝子やタンパク質発現レベルの平均をそれぞれの患者の脳腫瘍組織中の各遺伝子又はタンパク質の発現レベルと比較し、多くの患者で非癌部の平均よりも発現が亢進している遺伝子又はタンパク質を選択する。また、正常組織との発現の違いの程度によって、脳腫瘍組織において発現が亢進している遺伝子をランク付けすることもできる。脳腫瘍組織及び非癌部組織における遺伝子の発現は、RNA の発現レベル又はタンパク質の発現レベルで解析することができ、多くの場合、RNA やタンパク質の発現レベルは、DNA マイクロアレイ、RT-PCR、ノーザンブロッティング、RNase プロテクションアッセイ、ウエスタンブロッティング、ELISA 法、タンパク質アレイといった一般によく知られた方法で測定することができ、フルオロセインやロダミン、ルミノールによる化学蛍光又は ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{33}P 、 ^{32}P 、 ^{125}I といった放射性同位体による放射線、光学的密度を測定することにより行われる。かかる方法により得られた脳腫瘍組織で特に発現が亢進した遺伝子やタンパク質に関する知見から、本発明の脳腫瘍等の腫瘍の治療・診断薬は導かれる。

【0012】

本発明の脳腫瘍等の腫瘍の治療薬としては、uPARAP に特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有効成分として含有するものであれば特に制限されるものではなく、uPARAP に特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物としては、uPARAP の細胞外ドメインを特異的に認識する抗体の他、コラーゲン V、レクチン、N-アセチルグルコサミン、グリコプロテイン、マトリックスメタロプロテアーゼ、放線菌やカビの生産する天然物化合物、合成化合物、及びこれらの誘

導体等を挙げることができる。また、本発明の脳腫瘍等の腫瘍の治療薬としては、u P A R 及び／又は P r o - u P A に特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有効成分として含有するものであれば特に制限されるものではなく、u P A R 及び／又は P r o - u P A に特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物としては、u P A R や P r o - u P A を特異的に認識する抗体を挙げることができる。さらに、本発明の脳腫瘍等の腫瘍の治療薬としては、u P A R A P、u P A R 及び／又は P r o - u P A をコードする D N A 又は R N A のアンチセンス鎖の全部又は一部を有効成分として含有するものであれば特に制限されるものではなく、これらアンチセンス鎖の全部又は一部はベクター等に組み込んだ形態で用いることもできる。

【0013】

10

上記 u P A R A P の細胞外ドメインを特異的に認識する抗体や、u P A R や P r o - u P A を特異的に認識する抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、2つのエピトープを同時に認識することができる二機能性抗体等を例示することができる。これら抗体は、慣用のプロトコルを用いて、動物（好ましくはヒト以外）に u P A R A P 等のタンパク質又はエピトープを含む断片、類似体若しくは u P A R A P 等を膜表面に発現している細胞を投与することにより産生され、例えばモノクローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたらず、ハイブリドーマ法（Nature 256, 495-497, 1975）、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法（Immunology Today, 4, 72, 1983）及びEBV-ハイブリドーマ法（MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985）など任意の方法を用いることができる。

20

【0014】

また、一本鎖抗体をつくるために、一本鎖抗体の調製法（米国特許第4, 946, 778号、米国特許第5, 260, 203号、米国特許第5, 091, 513号、米国特許第5, 455, 030号）を用いることができ、ヒト化抗体をつくるために、ヒト化抗体の調製法（米国特許第5, 585, 089号、Nature, 321, 522-525, 1986、Protein Engineering, 4, 773-783, 1991）を用いることができ、キメラ抗体をつくるために、キメラ抗体の調製法（米国特許第4, 816, 567号、Science, 229, 1202-1207, 1985、BioTechniques, 4, 214, 1986、Nature, 312, 643-646, 1984、Nature, 314, 268, 270, 1985）を用いることができる。二機能性抗体は、2つの関連した抗体を産生する2つのモノクローナル細胞系同士のハイブリッド、又は2つの抗体の断片の化学結合によって産生することができ、例えば、u P A R A P と u P A R とに同時に結合しうる二機能性抗体を挙げることができる。

30

【0015】

また、上記抗体の F a b 断片や F (a b ')₂ 断片等も、上記抗体と同様に、u P A R A P 等に特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物として例示することができる。例えば、F a b 断片は抗体をパパイン等で処理することにより、また F (a b ')₂ 断片はペプシン等で処理することにより調製することができる。

40

【0016】

本発明の脳腫瘍等の腫瘍の治療方法としては、上述の u P A R A P に特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を脳腫瘍患者に投与する方法であれば特に制限されるものではなく、u P A R A P に特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物としては、上述の u P A R A P の細胞外ドメインを特異的に認識する抗体を好適に例示することができる。また、本発明の脳腫瘍等の腫瘍の治療方法としては、上述の u P A R 及び／又は P r o - u P A に特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を脳腫瘍患者に投与する方法であれば特に制限されない。さらに、本発明の脳腫瘍等の腫瘍の治療薬としては、u P A R A P、u P A R 及び／又は P r o

50

－u P AをコードするD N A又はR N Aのアンチセンス鎖の全部又は一部を有効成分として含有するものであれば特に制限されるものではなく、これらアンチセンス鎖の全部又は一部はそのまま投与してもよいが、ベクター等に組み込んだ形態で投与することもできる。

【0017】

上記本発明の脳腫瘍等の腫瘍の治療薬や、後述する本発明のスクリーニング方法により得られる抗脳腫瘍剤等の抗腫瘍剤を医薬品として用いる場合は、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、p H緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を添加することができる。またこれら治療薬や抗脳腫瘍剤は、経口的又は非経口的に投与することができる。すなわち通常用いられる投与形態、例えば粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口投与することができる他、スプレー剤の型で鼻孔内投与することもできる。

【0018】

本発明の脳腫瘍等の腫瘍の診断薬としては、上述のu P A R A Pの細胞外ドメインを特異的に認識する抗体などのu P A R A Pに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有するものを挙げることができ、また、本発明の脳腫瘍等の腫瘍の診断薬としては、上述のu P A R及び／又はP r o－u P Aに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有するものや、上述のu P A R A P、u P A R及び／又はP r o－u P AをコードするD N A又はR N Aのアンチセンス鎖の全部又は一部を有するものであれば特に制限されるものではなく、かかるアンチセンス鎖は脳腫瘍等の腫瘍の検出・診断用プローブとして有利に用いることができる。上記抗体などの化合物やアンチセンス鎖は、通常標識されているものを用いることが好ましい。標識物質としては、単独で又は他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらしことができる物質、例えば、酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジンあるいは放射性同位体等を挙げることができる。具体的には、ペルオキシダーゼ（例えば、h o r s e r a d i s h p e r o x i d a s e）、アルカリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、ペニシリナーゼ、カタラーゼ、アポグルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ルシフェラーゼ若しくはアセチルコリンエステラーゼ等の酵素、フルオレスセインイソチオシアネート、フィコビリタンパク、希土類金属キレート、ダンシルクロライド若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート等の蛍光物質、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 若しくは ^{131}I 等の放射性同位体、ビオチン、アビジン、又は化学発光物質を挙げることができる。上記の放射性同位体及び蛍光物質は、単独で検出可能なシグナルをもたらしことができる。一方、酵素、化学発光物質、ビオチン及びアビジンは、単独では検出可能なシグナルをもたらしできないため、さらに1種以上の他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらしことができる。例えば、酵素の場合には少なくとも基質が必要であり、酵素活性を測定する方法（比色法、蛍光法、生物発光法あるいは化学発光法等）に依存して種々の基質が用いられる。また、ビオチンの場合には少なくともアビジンあるいは酵素修飾アビジン（例えば、ストレプトアビジン- β -ガラクトシダーゼ（S t r e p t o a v i d i n - β - g a l a c t o s i d a s e））を基質として反応させるのが一般的である。

【0019】

本発明の脳腫瘍等の腫瘍の診断キットとしては、ノーザン・ブロット、i n s i t u ハイブリダイゼーション、R N a s eプロテクションアッセイ、ウエスタンブロッティング、E L I S A法、R T－P C Rといった選択した遺伝子やタンパク質の発現を評価するのに必要な、R N A抽出液、c D N A及びc R N A合成酵素、D N Aチップ若しくはオリゴヌクレオチドチップ又はタンパク質チップ、プローブ及びu P A R A P増幅用プライマー、抗u P A R A P抗体を備えたものであれば特に制限されないが、G A P D H（グリセルアルデヒド-3-フォスフェートデヒドロゲナーゼ）遺伝子等のコントロール遺伝子増

幅用プライマー、GAPDH等に対する抗体などをも有するものが好ましい。かかる本発明の脳腫瘍の診断キットを用いて、脳組織、血液あるいは他の組織においてuPARAP遺伝子やuPARAPの発現レベルを調べることによって脳腫瘍の診断を行うことが可能となる。

【0020】

本発明の抗脳腫瘍剤のスクリーニング方法としては、uPARAP遺伝子を含む発現ベクターを導入した細胞を被検物質の存在下で培養し、uPARAPの発現及び／又は機能低下の程度、例えば、プラスミノーゲンアクチベーター等のuPARAP活性化シグナルにより増幅される遺伝子を測定評価する方法や、uPARAPとuPARを膜表面に共発現した細胞に、被検物質の存在下、Pro-uPAを接触せしめ、Pro-uPAとuPARの結合の程度、例えば、プラスミノーゲンアクチベーター等のuPARAP活性化シグナルにより増幅される遺伝子を測定評価する方法や、uPARAP又はuPARAPの細胞外ドメイン等その一部分を被検物質と接触させ、被検物質のuPARAPに対する結合の強さの程度、例えば、被検物質のuPARAPに対する結合の強さを測定評価するであれば特に制限されるものではなく、上記細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等の細菌原核細胞や、酵母、アスペルギルス等の真核細胞や、ドロソフィラS2、スポドプテラSf9等の昆虫細胞や、L細胞、CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、C127細胞、BALB/c3T3細胞（ジヒドロ葉酸レダクターゼやチミジンキナーゼなどを欠損した変異株を含む）、BHK21細胞、HEK293細胞、Bowesメラノーマ細胞、卵母細胞等の動植物細胞などを挙げる10
ことができ、上記uPARAP等を発現することができる発現ベクターの細胞への導入は、Davisら（BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986）及びSambrookら（MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989）などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション（transfection）、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレップローディング（scrape loading）、弾丸導入（ballistic introduction）、感染等を例示することができる。20
30

【0021】

上記uPARAP活性化シグナルにより増幅される遺伝子は、定量的PCRにより測定することができる。定量的PCRは、標的遺伝子及びコントロール遺伝子の増幅産物の量に基づいて、生物集団中の異種個体の存在割合を定量的に測定することを可能にするPCRである。例えば、定量的な測定を可能にするような反応条件下でPCRを行い、増幅産物を電気泳動にかけ、増幅産物に対応するバンドの強度に基づいて定量的測定を達成することができる。より簡便かつ正確に定量的測定を実施するためには、増幅産物の経時的定量的な測定を可能にするPCR用装置（リアルタイム（Real Time）PCR装置）を使用することが好ましい。このようなPCR装置として、LightCycler（ロシュ社製）、ABI Sequence Detector PRISM 7700（パーキンエルマーバイオシステムズ社製）などが市販されている。リアルタイムPCRを行う方法としては、TaqMan法（特許第2825976号）、ハイブリダイゼーション法あるいはサイバークリーンIなどのインターカレーターを用いる方法等を挙げる30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660
670
680
690
700
710
720
730
740
750
760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870
880
890
900
910
920
930
940
950
960
970
980
990
1000
1010
1020
1030
1040
1050
1060
1070
1080
1090
1100
1110
1120
1130
1140
1150
1160
1170
1180
1190
1200
1210
1220
1230
1240
1250
1260
1270
1280
1290
1300
1310
1320
1330
1340
1350
1360
1370
1380
1390
1400
1410
1420
1430
1440
1450
1460
1470
1480
1490
1500
1510
1520
1530
1540
1550
1560
1570
1580
1590
1600
1610
1620
1630
1640
1650
1660
1670
1680
1690
1700
1710
1720
1730
1740
1750
1760
1770
1780
1790
1800
1810
1820
1830
1840
1850
1860
1870
1880
1890
1900
1910
1920
1930
1940
1950
1960
1970
1980
1990
2000
2010
2020
2030
2040
2050
2060
2070
2080
2090
2100
2110
2120
2130
2140
2150
2160
2170
2180
2190
2200
2210
2220
2230
2240
2250
2260
2270
2280
2290
2300
2310
2320
2330
2340
2350
2360
2370
2380
2390
2400
2410
2420
2430
2440
2450
2460
2470
2480
2490
2500
2510
2520
2530
2540
2550
2560
2570
2580
2590
2600
2610
2620
2630
2640
2650
2660
2670
2680
2690
2700
2710
2720
2730
2740
2750
2760
2770
2780
2790
2800
2810
2820
2830
2840
2850
2860
2870
2880
2890
2900
2910
2920
2930
2940
2950
2960
2970
2980
2990
3000
3010
3020
3030
3040
3050
3060
3070
3080
3090
3100
3110
3120
3130
3140
3150
3160
3170
3180
3190
3200
3210
3220
3230
3240
3250
3260
3270
3280
3290
3300
3310
3320
3330
3340
3350
3360
3370
3380
3390
3400
3410
3420
3430
3440
3450
3460
3470
3480
3490
3500
3510
3520
3530
3540
3550
3560
3570
3580
3590
3600
3610
3620
3630
3640
3650
3660
3670
3680
3690
3700
3710
3720
3730
3740
3750
3760
3770
3780
3790
3800
3810
3820
3830
3840
3850
3860
3870
3880
3890
3900
3910
3920
3930
3940
3950
3960
3970
3980
3990
4000
4010
4020
4030
4040
4050
4060
4070
4080
4090
4100
4110
4120
4130
4140
4150
4160
4170
4180
4190
4200
4210
4220
4230
4240
4250
4260
4270
4280
4290
4300
4310
4320
4330
4340
4350
4360
4370
4380
4390
4400
4410
4420
4430
4440
4450
4460
4470
4480
4490
4500
4510
4520
4530
4540
4550
4560
4570
4580
4590
4600
4610
4620
4630
4640
4650
4660
4670
4680
4690
4700
4710
4720
4730
4740
4750
4760
4770
4780
4790
4800
4810
4820
4830
4840
4850
4860
4870
4880
4890
4900
4910
4920
4930
4940
4950
4960
4970
4980
4990
5000
5010
5020
5030
5040
5050
5060
5070
5080
5090
5100
5110
5120
5130
5140
5150
5160
5170
5180
5190
5200
5210
5220
5230
5240
5250
5260
5270
5280
5290
5300
5310
5320
5330
5340
5350
5360
5370
5380
5390
5400
5410
5420
5430
5440
5450
5460
5470
5480
5490
5500
5510
5520
5530
5540
5550
5560
5570
5580
5590
5600
5610
5620
5630
5640
5650
5660
5670
5680
5690
5700
5710
5720
5730
5740
5750
5760
5770
5780
5790
5800
5810
5820
5830
5840
5850
5860
5870
5880
5890
5900
5910
5920
5930
5940
5950
5960
5970
5980
5990
6000
6010
6020
6030
6040
6050
6060
6070
6080
6090
6100
6110
6120
6130
6140
6150
6160
6170
6180
6190
6200
6210
6220
6230
6240
6250
6260
6270
6280
6290
6300
6310
6320
6330
6340
6350
6360
6370
6380
6390
6400
6410
6420
6430
6440
6450
6460
6470
6480
6490
6500
6510
6520
6530
6540
6550
6560
6570
6580
6590
6600
6610
6620
6630
6640
6650
6660
6670
6680
6690
6700
6710
6720
6730
6740
6750
6760
6770
6780
6790
6800
6810
6820
6830
6840
6850
6860
6870
6880
6890
6900
6910
6920
6930
6940
6950
6960
6970
6980
6990
7000
7010
7020
7030
7040
7050
7060
7070
7080
7090
7100
7110
7120
7130
7140
7150
7160
7170
7180
7190
7200
7210
7220
7230
7240
7250
7260
7270
7280
7290
7300
7310
7320
7330
7340
7350
7360
7370
7380
7390
7400
7410
7420
7430
7440
7450
7460
7470
7480
7490
7500
7510
7520
7530
7540
7550
7560
7570
7580
7590
7600
7610
7620
7630
7640
7650
7660
7670
7680
7690
7700
7710
7720
7730
7740
7750
7760
7770
7780
7790
7800
7810
7820
7830
7840
7850
7860
7870
7880
7890
7900
7910
7920
7930
7940
7950
7960
7970
7980
7990
8000
8010
8020
8030
8040
8050
8060
8070
8080
8090
8100
8110
8120
8130
8140
8150
8160
8170
8180
8190
8200
8210
8220
8230
8240
8250
8260
8270
8280
8290
8300
8310
8320
8330
8340
8350
8360
8370
8380
8390
8400
8410
8420
8430
8440
8450
8460
8470
8480
8490
8500
8510
8520
8530
8540
8550
8560
8570
8580
8590
8600
8610
8620
8630
8640
8650
8660
8670
8680
8690
8700
8710
8720
8730
8740
8750
8760
8770
8780
8790
8800
8810
8820
8830
8840
8850
8860
8870
8880
8890
8900
8910
8920
8930
8940
8950
8960
8970
8980
8990
9000
9010
9020
9030
9040
9050
9060
9070
9080
9090
9100
9110
9120
9130
9140
9150
9160
9170
9180
9190
9200
9210
9220
9230
9240
9250
9260
9270
9280
9290
9300
9310
9320
9330
9340
9350
9360
9370
9380
9390
9400
9410
9420
9430
9440
9450
9460
9470
9480
9490
9500
9510
9520
9530
9540
9550
9560
9570
9580
9590
9600
9610
9620
9630
9640
9650
9660
9670
9680
9690
9700
9710
9720
9730
9740
9750
9760
9770
9780
9790
9800
9810
9820
9830
9840
9850
9860
9870
9880
9890
9900
9910
9920
9930
9940
9950
9960
9970
9980
9990
10000

【0022】

【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例1（ヒト脳腫瘍検体の調整）

慶應義塾大学病院において外科的治療を受けた11人の患者からヒト脳腫瘍組織、及び隣接正常部を採取した。手術前にすべての患者からインフォームドコンセントを書面により得た。研究プロトコルは慶應義塾大学医学部のIRBHUにより承認された。すべての患者に対する脳腫瘍の組織学的診断は術後に行われ、グリオーマの診断を得たものをヒト脳腫瘍検体とした。採取したヒト非癌部脳組織と脳腫瘍組織は液体窒素中又はドライアイスを入れたアセトン中で凍結し、必要に応じてO. C. T. コンパウンドに埋胞し、 -70°C から -80°C の間で保存し、ヒト脳腫瘍において非癌部脳組織と比較し顕著に発現が亢進している遺伝子又はタンパク質を同定するために用いた。

【0023】

実施例2（組織からのRNA抽出）

10

組織片（約 125mm^3 ）はTRIzol又はSepasol-RNA I中でポリトロンにより破碎された（最高速度で5秒間×2回）。クロロホルムを添加後、 $15,000\times g$ で10分間遠心し、RNAを含んだ水層を採取した。イソプロピルアルコールを用いて総RNAを沈殿させ、70%エタノールで1度洗浄し、それをDEPC処理 H_2O に溶解した。総RNAは1.5ユニットのDnase Iで処理し、再度、TRIzol/クロロホルム抽出を行った後に、エタノール沈殿し、DEPC処理 H_2O に懸濁した。その後、Rneasy Mini Kitを使い、低分子の核酸を除去した。総RNAの質はアガロースゲルから28Sと18SリボソームRNAの比で確認した。精製した総RNAは70%エタノール中で -80°C に使用まで保存した。

【0024】

20

実施例3（cDNAの合成と標識したcRNAの合成）

cDNAの合成はSuperScript Choice Systemを用いて行った。5マイクログラムの精製した総RNAとT7プロモーター配列を有するオリゴdTプライマーを用いて、200ユニットのSuperScript II 逆転写酵素で 42°C 1時間反応させ（1st strandのcDNAを合成した後に2nd strandのcDNAを合成し）、フェノール/クロロホルムで抽出し、Phase Lock Gelにて精製した。合成したcDNAをテンプレートにし、MEGAscript T7キットを用いてcRNAを合成した。2マイクロリットルのT7ポリメラーゼを含む酵素ミックスと7.5mMのATP、GTPと5.625mMのCTP、UTP及び1.875mMのBio-11-CTP、Bio-16-UTPとcDNAを 37°C 、6時間反応させた。未反応や短いオリゴヌクレオチドはCHROMASPINを用いて除去した。得られたcRNAはエタノール沈殿により回収した。cRNAの性質は電気泳動により確認した。精製したcRNAは使用まで70%エタノール中で -80°C で保存した。

30

【0025】

実施例4（脳腫瘍患者の癌、非癌部における遺伝子発現解析）

脳腫瘍患者の原発癌の遺伝子発現は高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて試験した。チップへハイブリダイゼーションするにあたり、cRNAを40mMトリス-酢酸緩衝液（pH 8.1）、100mM酢酸カリウム、30mM酢酸マグネシウム中で 95°C 、35分間反応させ、断片化を行った。ハイブリダイゼーションは200 μl 中、0.1M MES pH 6.7（2-（N-Morpholino）ethanesulfonic acid）、1M NaCl、0.01% Polyoxylene（10）octylphenyl ether、20 μg herring sperm DNA、100 μg アセチル化bovine serum albumin、10 μg 断片化したcRNA、ビオチン化したコントロールオリゴヌクレオチド（biotin-5'-CTGAACGGTAGCATCTTGAC-3'）を含むサンプルで 45°C 、12時間行った。チップを0.1M MES pH 6.7、0.1M NaCl、0.01% Polyoxylene（10）octylphenyl ether緩衝液で洗浄後、ビオチン化した抗streptavidin抗体とチップを反応させた後に、streptavidin-R-phycoerythrinによりシグナルを増幅させるように処理した。各ピクセルの蛍光強度はHP社製レーザースキャナー（Gene Array Scann

40

50

er G2500A)にて測定し、発現強度と信頼度(Present/Absent Call)をAffymetrixのソフトウェアMicroarray Suite ver. 4.0により算出した。この実験により、ヒト脳腫瘍患者の約11,000遺伝子の発現を測定した。

【0026】

実施例5 (Gene Chip解析)

腫瘍組織と隣接正常組織において異なる(発現をする)遺伝子群を同定するため、Gene Chip解析を行った。(オリゴ)DNAチップの感受性を考慮し、average difference (発現レベルに相当)が20以下のものは20に繰り上げた。遺伝子毎に3検体のヒト正常脳組織のaverage differenceの平均を求め、求めた平均の値と各々11検体のヒト脳腫瘍組織のaverage differenceを比較した。脳腫瘍組織の11検体の全てにおいて、正常脳組織の平均と比較して3倍以上の発現量(average differenceの比)を示した遺伝子を選び出した。その結果、図1に示すように、glutamate pyruvate transaminase (GPT)、Homo Sapiens Clone 23933 (Human Clone 23933)、Gタンパク質結合型レセプター(EDG4)、Nucleoplasmin-3 (NPM3)、vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1)、KIAA0197 (NUP160)、DKFZ p586E0518 (BAZ1A)、SWI/SNF 複合体155Kda サブユニット(BAF155) (SMARCC1)、BAC クローンRG158O17 (CAPRI)、Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 (ITIH1)、GM2 activator (GM2A)、KIAA0709 (uPARAP)、wild-type p53 activated fragment-1 (WAF1)、NFkB human nuclear factor kappa-B DNA結合サブユニット(NF-kappa-B)、death adaptor molecule RAIDD (RAIDD)、Tenascin Cの16個の遺伝子を選び出した。

【0027】

実施例6 (ESTスクリーニング)

次に、ESTデータベースを用いて、実施例5のGene Chip解析で得られたEDG4、GM2A、SMARCC1、WAF1、uPARAP、Human Clone 23933、NF-kappa-B、NPM3、CAPRI、RAIDD、NUP160、GPT、ITIH1、VCAM1、BAZ1A、Tenascin Cの16個の遺伝子の各配列情報に基づいてホモロジー検索を行い、相同なESTが存在する組織・細胞を集計したスクリーニングの結果の一部を図2に示す。図2中、「未分化組織」は腫瘍細胞とみなすことができるから、「未分化組織/total」が大きいほど、腫瘍細胞において高発現する遺伝子ということができ、「未分化組織/Normal brain」が大きいほど、脳腫瘍において高発現する遺伝子ということが出来る。表1に、上記16個の遺伝子を「未分化組織/total」と「未分化組織/Normal brain」の大きさ別に表した。

【0028】

【表1】

未分化組織/total 未分化組織/Normal brain			
	>0.3	>0.2	>0.1
>3	3, 4, 5, 8, 16	7, 11, 13, 15	10
>2		2	14
>1		9	1, 6, 12

10

【0029】

実施例7 (uPARAPの発現を検出するためのRT-PCR)

次にuPARAP (Endo180) 遺伝子の各正常組織、各種細胞株、グリオーマ細胞株及び組織並びに他の腫瘍細胞株における発現特異性をRT-PCR法により調べてみた。脳、心臓、肺、胃、小腸、結腸、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、胎盤、筋肉の各正常組織由来のRNA (全てクローンテック社製より購入)、線維芽細胞、1088EBV-B (ヒトB細胞)、1362TIL (ヒト腫瘍浸潤T細胞)、293UT (ヒト腎細胞) の4種の細胞株由来のRNA、4種のグリオーマ細胞株 (U87MG、T98G、GI1、U251) 及び4種のグリオーマ組織 (GB13、GB17、GB16、GB4) 由来のRNA、並びに、悪性黒色腫細胞株 (SKmel23、624mel)、腎細胞癌細胞株 (RCC7、Saito)、肺癌細胞株 (LU99、EBC1)、肝癌細胞株 (KU7)、前立腺癌細胞株 (PC3) 及び白血病細胞株 (HL60、Molt4) の各細胞株由来から、トータルRNAをTrizol (Gibco BRL社製) を使用して単離した。このトータルRNAを、各10µgずつ使用し、トリ骨髄芽球ウイルス逆転写酵素XL (TAKARA社製) と、プライマーとしてオリゴ (dT) を用いて、全反応量100µl、42℃でRT-PCRの鑄型となるcDNAのパネルを作製した。

20

【0030】

uPARAP検出用には、センスプライマーとして (5'-GAGCAACAGCGGGCTATGG-3'; 配列番号1) を、アンチセンスプライマーとして (5'-TC TGGCGCCTCCGGTA A A-3'; 配列番号2) を、コントロールとしてのGAPDH検出用には、センスプライマーとして (5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3'; 配列番号3) とアンチセンスプライマー (5'-TCCACCCACCCCTGT T GCTGT A-3'; 配列番号4) を用いた。0.5µlのcDNAテンプレートを、2.5µlのPCR緩衝液を10倍希釈した25µlの反応液中で、2µlのdNTP (デオキシリボヌクレオチド3リン酸) 混合物、0.15µlのEXTaq (TAKARA社製)、及び0.5µlの各プライマーを用いて増幅した。PCRは、サーマルサイクラー (Perkin-Elmer社製) を用いて、uPARAPについては、最初94.0℃で4分間熱変性させ、以後94.0℃で1分間熱変性させて、62.2℃で1分間アニーリングし、72.0℃で1分間伸張反応させるというサイクルで、30サイクル繰り返し行い、GAPDHについては、最初94.0℃で4分間熱変性させ、以後94.0℃で1分間熱変性させて、58.0℃で1分間アニーリングし、72.0℃で1分間伸張反応させるというサイクルで、25サイクル繰り返し行った。得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動 (2.0%) にかき、エチジウムブロマイド (EtBr) で染色し、紫外線照射によりバンドを検出した。RT-PCRの結果を図3に示す。図3に示すように、uPARAPは、U87MG、T98G (ヒトグリオーマ細胞株)、GB13、GB17、GB4 (グリオーマ組織)、腎細胞癌細胞株 (RCC7)、肺癌細胞株 (LU99)、白血病細胞株 (HL60)、1362TIL (ヒト腫瘍浸潤T細胞) 及び精巣、線維芽細胞、小腸及び肺において発現が認められた。なお、小腸及び肺における発現は、混在した

30

40

50

線維芽細胞やマクロファージによるものと考えられる。これらの結果から、uPARAP遺伝子は、腫瘍、特に脳腫瘍の遺伝子診断薬として有用であると考えられる。

【0031】

実施例8 (uPARAPの定量的PCR解析)

リアルタイム定量PCRを用いた解析は、標的mRNA量とPCRプロダクト量との間に比例関係が成立する指数関数的増幅領域での速度論的解析に基づいた定量法である。RNA調整時に生じるサンプル間での質的差、逆転写効率の差はリアルタイム定量PCRにおける変動要因の1つなので、これらの変動を標的mRNA相対量に対して標準化する方法として常に一定レベルで発現しているGAPDHをスタンダードとした。合成したcDNA 1 μ lをテンプレートにし、5 μ lのSYBR Green (2本鎖DNAに特異的に結合し発光する色素)、4 μ lのdNTP混合物、3 μ lのMgCl₂、0.5 μ lのAmp Erase、0.25 μ lのAmpli Taq Gold、各0.5 μ lのプライマーを含んだ50 μ lの反応系でPCRを行った。uPARAP及びGAPDH増幅用のプライマーとしては、RT-PCRにおけると同様なプライマーを用いた。PCRは、50℃2分、95℃10分、そして95℃15秒と60℃1分を45サイクルの条件で行った。SYBR Greenの蛍光の増大はDNA濃度に比例することからPCRプロダクト量を測定して、サイクル数に対する増幅曲線を作成した。

10

【0032】

uPARAPの正常脳に対する各組織及び細胞の相対的発現量を図4及び5に示す。uPARAPの相対的発現量 (図4及び5のuPARAP Rel.) は、 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ で求めることができる。 $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T_A} - \Delta C_{T_B}$ 、A: 比較サンプル; B: 基準サンプル; $\Delta C_T = (\text{threshold cycle for uPARAP amplification, 図4及び5のuPARAPの値}) - (\text{threshold cycle for GAPDH amplification, 図4及び5のGAPDHの値})$ 。また、例えば図4におけるtestisの脳に対するuPARAP Rel. は次の計算により求めることができる。 $\Delta C_{T, \text{testis}} = 38.29 - 20.85 = 17.44$, $\Delta C_{T, \text{brain}} = 41.56 - 18.61 = 22.95$, $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T, \text{testis}} - \Delta C_{T, \text{brain}} = 17.44 - 22.95 = -5.51$, $2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{5.51} = 45.58$

20

【0033】

【発明の効果】

本発明によると、非癌部脳組織と脳腫瘍組織の遺伝子発現を比較し、癌部において発現が著しく変化している遺伝子群を選択することができ、これらの遺伝子群を利用して脳腫瘍に対する新規治療薬剤の探索及び診断薬の創製を行うことが可能となる。

30

【0034】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KEIO UNIVERSITY

<120> Diagnostic and therapeutic pharmaceutical for brain cancer

<130> 000000367

10

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

20

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence:uPARAP sense
primer

<400> 1

~~gag~~caacagc ~~ggg~~ctatgg

19

40

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:uPARAP
antisense primer

10

<400> 2

tctggcgccct ccggtaaa

18

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:GAPDH sense
primer

30

<400> 3

tgaacgggaa gctcactgg

19

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence::GAPDH
antisense primer

<400> 4

tccaccaccc tgttgctgta

20

10

【図面の簡単な説明】

【図 1】 ヒト脳腫瘍に発現する遺伝子群の Gene Chip 解析の結果を示す図である。

【図 2】 ヒト脳腫瘍に高発現する 16 個の遺伝子の EST スクリーニングの結果を示す図である。

【図 3】 uPARAP の発現を検出するための RT-PCR の結果を示す図である。

【図 4】 uPARAP の定量的 PCR 解析の結果を示す図である。

【図 5】 uPARAP の定量的 PCR 解析の結果を示す図である。

20

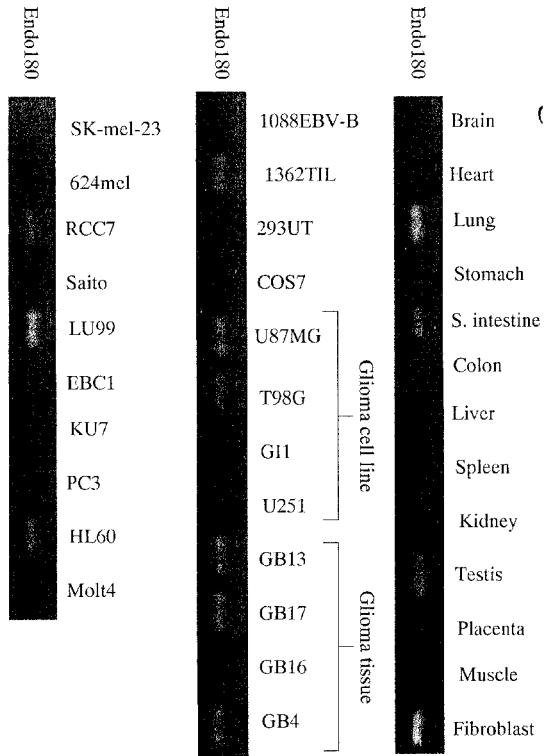
【図 1】

No	Name	hs number	normal 1	normal 2	normal 3	tumor 1	tumor 2	tumor 3	tumor 4	tumor 5	tumor 6	tumor 7	tumor 8	tumor 9	tumor 10	tumor 11	avg
1	EDG4	122575	-3.4	-44.3	142.2	303.1	373.8	643.8	817.8	409.9	492.2	479.9	335.1	397.4	318.8	397.9	493.6
2	GM2A	289082	71.3	-73.6	-31.4	254.4	255.4	861.9	313.7	242.7	201.2	875.1	156.7	325.9	508.0	233.5	399.9
3	SMARCC1	172300	-21.2	-48.6	91.8	314.3	261.6	318.7	521.3	425.5	560.7	401.9	109.0	588.2	218.1	333.8	366.6
4	WAF1	179555	407.6	-230.4	-62.3	761.5	2984.9	722.8	1216.9	942.3	1341.7	666.2	1103.1	170.5	319.3	246.6	953.3
5	uPARAP	7835	163.1	196.4	-3.4	826.9	710.8	828.8	702.1	1250.4	1848.6	1258.9	694.1	753.7	1027.7	922.5	966.0
6	Human clone 23933	239483	10.9	-41.1	106.3	135.4	474.8	254.7	273.9	242.6	478.4	177.6	102.5	312.0	181.6	254.1	254.1
7	ME16	83428	34.4	29.2	-40.4	120.5	832.0	180.3	62.2	181.2	127.7	174.1	188.2	193.8	325.7	166.3	228.8
8	NPM3	30691	98.0	203.8	-262.3	324.3	131.2	181.5	293.0	197.8	168.6	151.1	232.8	276.5	187.9	64.5	205.4
9	CAPRI	184257	48.5	188.7	-174.0	304.4	133.2	86.5	407.2	134.8	134.3	127.5	168.4	153.0	146.3	286.6	189.3
10	RAIDD	155566	62.8	-27.1	-28.5	107.0	148.9	103.9	154.9	189.3	225.5	96.5	255.4	199.6	87.5	214.2	199.3
11	NUP160	22559	46.6	-16.7	0.0	128.7	145.8	189.6	215.9	148.2	148.1	155.0	63.6	173.7	202.9	228.5	156.8
12	GPT	103502	116.4	-26.3	-8.2	192.0	402.4	152.8	302.7	298.4	134.6	632.8	150.4	312.5	507.4	280.3	306.0
13	ITIH1	2777	53.1	-60.0	107.7	205.2	271.6	223.0	122.5	162.2	200.5	201.9	238.4	327.9	237.9	243.4	221.3
14	VCAM1	109225	59.7	2.9	-16.3	123.2	110.6	171.4	72.0	377.3	148.1	88.6	169.8	354.9	239.2	388.8	204.5
15	BAZ1A	8858	46.8	18.3	-4.5	87.9	192.4	180.3	257.4	64.5	92.2	168.7	87.1	206.6	573.8	171.5	187.5
16	Tenascin C	289114	72.0	-0.2	-2.2	98.2	323.2	68.9	101.6	120.9	75.3	316.9	79.9	77.1	255.3	116.1	148.6

【図 2】

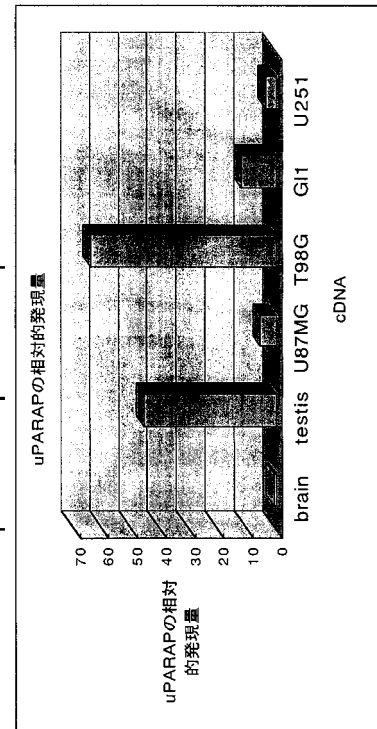
No	Name	1. Normal brain	2. cancer	3. testis	4. embryo	5. germ cell	total	未分化組織	未分化組織/total	未分化組織/Normal brain
1	EDG4	5	3	0	1	4	48	8	0.167	1.600
2	GM2A	26	59	8	1	0	244	68	0.279	2.615
3	SMARCC1	14	98	11	14	11	348	134	0.385	9.571
4	WAF1	24	228	7	2	5	602	242	0.402	10.083
5	uPARAP	8	39	2	8	9	174	58	0.333	7.250
6	Human clone 23933	3	2	0	1	0	19	3	0.158	1.000
7	NFκB	3	32	5	2	8	163	47	0.288	15.667
8	NPM3	0	16	2	6	7	50	31	0.620	∞
9	CAPRI	32	32	5	3	4	208	44	0.212	1.375
10	RAIDD	3	5	2	2	0	63	9	0.143	3.000
11	NUP160	3	18	3	2	3	110	26	0.236	8.667
12	GPT	3	2	1	1	0	21	4	0.190	1.333
13	ITIH1	0	23	0	1	0	114	24	0.211	∞
14	VCAM1	7	13	0	1	0	105	14	0.133	2.000
15	BAZ1A	2	34	9	0	4	199	47	0.236	23.500
16	Tenascin C	19	109	1	12	5	381	127	0.333	6.684

【図 3】



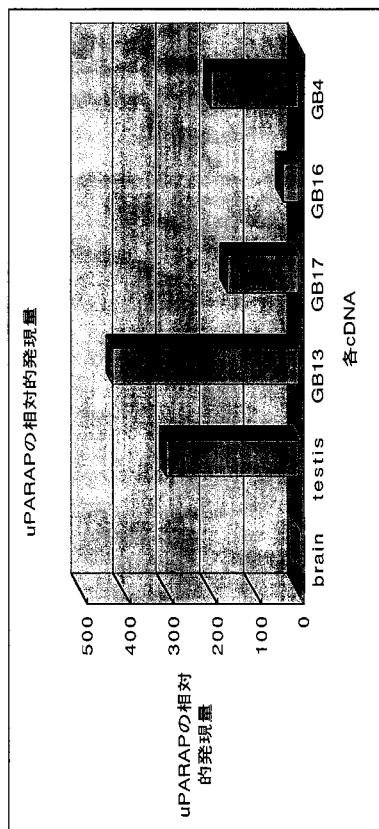
【図 4】

	uPARAP	GAPDH	uPARAP Rel.
brain	41.56	18.61	1.00
testis	38.29	20.85	45.58
U87MG	37.97	17.48	5.50
T98G	35.16	18.21	64.38
Gli1	38.48	19.12	12.05
U251	40.04	19.02	3.83



【図 5】

	uPARAP	GAPDH	uPARAP Rel.
brain	35.43	16.04	1.00
testis	31.63	20.49	304.46
GB13	28.12	17.48	429.16
GB17	30.24	18.21	164.32
GB16	33.29	19.12	37.33
GB4	30.75	19.02	201.93



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/15	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 33/53	M
// C 1 2 N 15/09	G 0 1 N 33/566	
	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	C 1 2 N 15/00	A

(72)発明者 河瀬 斌
東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内

(72)発明者 岡部 尚文
神奈川県横浜市栄区庄戸 5 - 4 - 3

(72)発明者 浜田 健嗣
神奈川県藤沢市鵠沼海岸 1 - 8 - 1 6 レオパレスマリーナ 2 0 5

F ターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02
4B024 AA01 AA12 BA63 CA04 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12 EA04
GA11 HA12
4B063 QA18 QA19 QQ08 QQ13 QQ43 QR08 QR42 QR56 QS25 QS34
QX02
4C084 AA17 NA14 ZB262
4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 CC02 CC22 CC23
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26