

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年3月4日(04.03.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/024221 A1

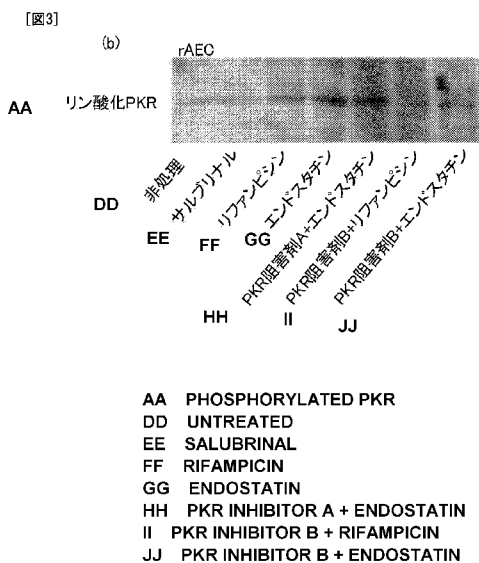
- (51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/064733
- (22) 国際出願日: 2009年8月24日(24.08.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-220518 2008年8月28日(28.08.2008) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東京医科歯科大学(National University Corporation Tokyo Medical and Dental University) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島1丁目5番4号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 七里 真義 (SHICHIRI, Masayoshi) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島1丁目5番4号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP).

- (74) 代理人: 正林 真之(SHOBAYASHI, Masayuki); 〒1700013 東京都豊島区東池袋1丁目25番8号 タカセビル本館 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR SCREENING FOR ANTIANGIOGENIC AGENT, AND METHOD FOR SCREENING FOR ANTIANGIOGENIC SIGNAL GENE

(54) 発明の名称: 血管新生抑制剤のスクリーニング方法、及び血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法



(57) Abstract: Disclosed are a method for screening for an antiangiogenic agent and a method for screening for an antiangiogenic gene, both of which are achieved by detecting an antiangiogenic signal within a short time by a simple means. The method for screening for an antiangiogenic agent comprises: a candidate compound administration step of administering a candidate compound for the antiangiogenic agent to a vascular endothelial cell or a cultured cell derived from a vascular endothelial cell; a cell-maintaining step of maintaining the vascular endothelial cell or the cultured cell derived from the vascular endothelial cell to which the candidate compound has been administered; and a signal detection step of detecting the phosphorylation of a protein that can be phosphorylated by the administration of endostatin.

(57) 要約: 血管新生抑制シグナルを短時間のうちに簡易な手段で検知することによる血管新生抑制剤のスクリーニング方法、及び血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法を提供する。本発明に係る血管新生抑制

剤のスクリーニング方法は、血管新生抑制剤の候補化合物を血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞に投与する候補化合物投与工程と、前記候補化合物を投与された前記血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞を保持する細胞保持工程と、エンドスタチンを投与することによりリン酸化されるタンパク質のリン酸化を検出するシグナル検出工程と、を有する。

WO 2010/024221 A1

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

血管新生抑制剤のスクリーニング方法、及び血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は、血管新生抑制剤のスクリーニング方法、及び血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] 血管新生とは、既存の血管から新しい血管が形成される現象であり、悪性（固形）腫瘍、糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性症、関節リウマチ等の炎症性疾患等において、その発症や進展に深く関与していることが知られている。例えば、固形腫瘍が増殖するには、血管新生によって栄養や酸素の供給と、老廃物の除去の道を確保することが必須である。また、癌治療上、重要な問題となっている転移において、その道を確保するという意味で血管新生が重要なステップとなっている。糖尿病性網膜症や加齢黄斑変性症に関しては、血管新生そのものが病態であり、放置すると失明に至る。従って、血管新生を抑制することが両疾患の予防・治療に結びつくと考えられ、その予防薬・治療薬の開発が行われている。

[0003] このように、血管新生は、種々の病変において観察され、それぞれの病態の進展を助長するので、この血管新生の抑制がこれらの病態の予防・治療の観点から注目され、血管新生を阻害する物質を検索すべく鋭意研究がなされている。その結果、現在では、多くの血管新生抑制物質が開発され、その中のいくつかの物質については、臨床上での有効性が検討されている。

[0004] 例えば、エンドスタチンやアンジオスタチン等の血管新生抑制因子は、最も有用な腫瘍休眠療法薬と位置づけられ、実験動物の固形腫瘍を顕著に退縮させ（非特許文献１）、反復投与を行っても従来の抗がん剤のような薬剤耐性を示さないため（非特許文献２）、副作用の少ない理想的な抗癌剤となる

可能性が指摘されていた。しかし、これらの因子は実用化されても抗腫瘍効果を示すのに有効な投与量を合成することは容易ではなく、且つ製造コストも高くなることから、分子量50,000に及ぶアンジオスタチンの臨床開発に断念した企業もある。

[0005] そこで、アンジオスタチンよりも低分子量（分子量約20,000）のエンドスタチンが期待を集め、米国において末期悪性腫瘍患者に対する臨床試験が行われたが、細胞内情報伝達メカニズムは不明であった。

[0006] エンドスタチンは、低血清培養下において血管内皮細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを引き起こすが（非特許文献3）、その程度は軽微である。腫瘍細胞は、遺伝子変異のみならず遺伝子発現調節制御によっても増殖能が亢進する上、多くの増殖因子や血管新生促進因子を盛んに産生・分泌し、オートクライン／パラクラインとして自己の増殖を促進させることに加え、更に、新生された血管が豊富な血流を供給しているため、このような軽微な血管内皮細胞の増殖抑制のみで、癌の原発巣・転移巣を退縮させる効果を説明することは困難であった。エンドスタチンがこうした環境下にあっても、現在報告されているような腫瘍血管新生を抑制するためには、内皮細胞に特異的に作用する、強力な細胞シグナルを惹起しなければならない。

[0007] このような細胞シグナルとしては、例えば、特許文献1に、エンドスタチンにより惹起される、各種遺伝子の発現抑制シグナルが開示されている。この発現抑制シグナルによれば、実験動物において腫瘍退縮効果を示す濃度のエンドスタチンを投与すると、血清・増殖因子・血管新生因子刺激下の培養血管内皮細胞に発現する種々の初期応答遺伝子、アポトーシス・細胞周期・細胞遊走関連遺伝子の発現が顕著に抑制される。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特開2004-075665号公報

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Cell, 88, p. 277-285, 1997

非特許文献2：Nature，390，p. 404－407，1997

非特許文献3：J. Biol. Chem.，274，p. 11721－11726，1999

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] しかしながら、培養血管内皮細胞へのエンドスタチンの投与によって、如何にしてこの発現抑制シグナルが惹起されるかについては、依然として明らかにされていなかった。特に、特許文献1には、エンドスタチンによって各種の血管新生関連遺伝子の発現が抑制されることを検知することにより血管新生抑制因子をスクリーニングする方法が開示されているが、このような方法は遺伝子発現量の低下を正確に定量して検出する必要があるため、比較的長時間の時間を要し、多種の化合物について効率よくスクリーニングするには不適であった。同様に、エンドスタチンにより発現抑制される遺伝子を検出するためにも、短時間で容易に当該シグナルを検出できる、スクリーニング方法が求められていた。

[0011] 本発明は、以上の課題に鑑みてなされたものであり、血管新生関連遺伝子の発現抑制作用の上流の情報伝達経路を解明し、これを利用することにより、短時間のうちに従来のスクリーニング方法と同様の作用を惹起できる血管新生抑制剤のスクリーニング方法、及び血管新生抑制遺伝子のスクリーニング方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、血管内皮細胞にエンドスタチンを投与した場合、特定のタンパク質のリン酸化が引き起こされ、このリン酸化を介して血管新生に関与する種々の遺伝子の発現が抑制されていること、及びこの特定のタンパク質のリン酸化を検出することにより、血管新生抑制シグナルを短時間のうちに簡易な方法で検出できることを見出し、本発明を完成するに至った。具体的には、本発明は以下のものを提供する。

[0013] (1) 血管新生抑制剤の候補化合物を血管内皮細胞又はこれに由来する

培養細胞に投与する候補化合物投与工程と、前記候補化合物を投与された前記血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞を保持する細胞保持工程と、エンドスタチンを投与することによりリン酸化されるタンパク質のリン酸化を検出するシグナル検出工程と、を有する血管新生抑制剤のスクリーニング方法。

[0014] (1) に記載の発明によれば、エンドスタチンを投与することによりリン酸化されるタンパク質のリン酸化を検出することにより、血管新生抑制剤のスクリーニングを行う。タンパク質のリン酸化は、血管新生抑制剤の候補化合物を血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞に投与した後、短時間のうちに生起する。このため、多種の候補化合物についてスクリーニングを行う場合であっても、効率よくスクリーニングを行うことができる。

[0015] (2) エンドスタチンを投与することによりリン酸化される前記タンパク質が、二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR、及び／又は真核生物翻訳開始因子eIF2 α である(1)に記載の血管新生抑制剤のスクリーニング方法。

[0016] (2) に記載の発明は、血管新生抑制剤のスクリーニング方法で、エンドスタチンを投与することによって生起するリン酸化を検出する対象となるタンパク質を特定したものである。これらのタンパク質は、血管新生抑制剤の投与によりリン酸化され、血管新生抑制シグナルが伝達されると考えられるので、これらのタンパク質をリン酸化検出の対象とすることにより、血管新生抑制剤を高い精度・確度をもってスクリーニングすることができる。

[0017] (3) 血管新生抑制剤の候補化合物を血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞に投与する候補化合物投与工程と、前記候補化合物を投与された前記血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞を保持する細胞保持工程と、タンパク質のリン酸化を検出するシグナル検出工程と、を有し、前記シグナル検出工程においてリン酸化が検出される前記タンパク質が、二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR、及び／又は真核生物翻訳開始因子eIF2 α である血管新生抑制剤のスクリーニング方法。

- [0018] (3) に記載の発明によれば、エンドスタチンを投与することによりリン酸化されるタンパク質に限定されず、他の血管新生抑制因子の投与によってリン酸化されることが予想される二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR、及び／又は真核生物翻訳開始因子eIF2 α のリン酸化を検出することにより、血管新生抑制剤のスクリーニングを行うため、幅広い種類の候補化合物について効率よくスクリーニングを行うことができる。
- [0019] (4) 前記シグナル検出工程において、ヒト二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKRのThr451又はこれに対応する二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKRのアミノ酸残基のリン酸化、及び／又はヒト真核生物翻訳開始因子eIF2 α のSer51又はこれに対応する真核生物翻訳開始因子eIF2 α のアミノ酸残基のリン酸化を検出する(2)又は(3)に記載の血管新生抑制剤のスクリーニング方法。
- [0020] ここで、「これに対応する二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKRのアミノ酸残基」とは、ヒト二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKRと相同性を持ち、これと同等の機能を有する他生物の二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKRにおいて、Thr451と対応するリン酸化部位となるアミノ酸残基を指す。同様に、「これに対応する真核生物翻訳開始因子eIF2 α のアミノ酸残基」とは、ヒト真核生物翻訳開始因子eIF2 α と相同性を持ち、これと同等の機能を有する他生物の真核生物翻訳開始因子eIF2 α において、Ser51と対応するリン酸化部位となるアミノ酸残基を指す。
- [0021] また、ここで、「ヒト二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR」、及び「ヒト真核生物翻訳開始因子eIF2 α 」とは、それぞれ、ヒトにおける二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR、及び真核生物翻訳開始因子eIF2 α を指す。
- [0022] (4) に記載の発明は、血管新生抑制剤のスクリーニング方法で、エンドスタチン等の血管新生抑制因子を投与することによって生起するリン酸化を検出する対象となるタンパク質のアミノ酸残基を特定したものである。これ

らのタンパク質のアミノ酸残基は、血管新生抑制剤の投与によりリン酸化され、血管新生抑制シグナルが伝達されと考えられるので、これらのタンパク質のアミノ酸残基をリン酸化検出の対象とすることにより、血管新生抑制剤を高い精度・確度をもってスクリーニングすることができる。

[0023] (5) 前記血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞が、毛細血管由来内皮細胞、大血管・臍帯静脈内皮細胞、及び網膜血管由来内皮細胞からなる群から選ばれる少なくとも一種である(1)から(4)のいずれかに記載の血管新生抑制剤のスクリーニング方法。

[0024] (5)に記載の発明は、血管新生抑制剤のスクリーニング方法に用いられる細胞の種類を限定したものである。これらの細胞は、入手・取り扱いが容易であり、且つエンドスタチンに対する感受性が高いので、血管新生抑制シグナルに伴う特定のタンパク質のリン酸化を容易に検出することができ、血管新生抑制剤のスクリーニング方法を効率的に行うことができる。

[0025] (6) 前記シグナル検出工程において、リン酸化特異的抗体を用いたイムノブロッティング法、 ^{32}P オートラジオグラフィー法、リン酸化特異的抗体を用いた免疫染色法、ゲルシフト法、及び特異的抗体とリン酸化特異的抗体とを用いた免疫沈降法からなる群から選ばれる少なくとも一種を用いて前記タンパク質のリン酸化を検出する(1)から(5)のいずれかに記載の血管新生抑制剤のスクリーニング方法。

[0026] ここで、「特異的抗体」とは、シグナル検出工程において検出の目的となる特定のタンパク質に対し、リン酸化／非リン酸化を問わず特異的に結合することができる抗体を指し、「リン酸化特異的抗体」とは、リン酸化された当該特定のタンパク質に対し、特異的に結合することができる抗体を指す。

[0027] (6)に記載の発明は、血管新生抑制剤のスクリーニング方法において、特定のタンパク質のリン酸化を検出するための具体的手法について規定したものである。これらの手法は、タンパク質のリン酸化を効率よく、且つ高い精度・確度をもって検出することができるので、血管新生抑制剤のスクリーニング方法を、効率よく、且つ高い精度・確度をもって検出することができ

る。

[0028] (7) 血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞において、血管新生抑制シグナル遺伝子の候補遺伝子の発現量を変化させる発現量変更工程と、前記候補遺伝子の発現量を変化させた前記血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞を保持する細胞保持工程と、エンドスタチンを投与することによりリン酸化されるタンパク質のリン酸化を、前記細胞において検出するシグナル検出工程と、を有する血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法。

[0029] ここで、「血管新生抑制シグナル遺伝子」とは、エンドスタチン及びこれと相同性を有する血管新生抑制因子の下流因子をコードする遺伝子であって、エンドスタチン及びこれと相同性を有する血管新生抑制因子の投与により活性化又は不活性化される、血管新生関連遺伝子の発現抑制シグナルのシグナル経路を構成する因子をコードする遺伝子を指す。

[0030] (8) エンドスタチンを投与することによりリン酸化される前記タンパク質が、二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR、及び／又は真核生物翻訳開始因子eIF2 α である(7)に記載の血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法。

[0031] (9) 血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞において、血管新生抑制シグナル遺伝子の候補遺伝子の発現量を変化させる発現量変更工程と、前記候補遺伝子の発現量を変化させた前記血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞を保持する細胞保持工程と、タンパク質のリン酸化を検出するシグナル検出工程と、を有し、前記シグナル検出工程においてリン酸化が検出される前記タンパク質が、二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR、及び／又は真核生物翻訳開始因子eIF2 α である、血管新生抑制剤のスクリーニング方法。

[0032] (10) 前記シグナル検出工程において、ヒト二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKRのThr451又はこれに対応する二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKRのアミノ酸残基のリン酸化、及び／又はヒト真

核生物翻訳開始因子 e I F 2 α の S e r 5 1 又はこれに対応する真核生物翻訳開始因子 e I F 2 α のアミノ酸残基のリン酸化を検出する（８）又は（９）に記載の血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法。

[0033] （１１） 前記発現量変更工程が、血管内皮細胞若しくはこれに由来する培養細胞において、血管新生抑制シグナル遺伝子の候補遺伝子を過剰発現する過剰発現工程、又は血管内皮細胞若しくはこれに由来する培養細胞において、血管新生抑制シグナル遺伝子の候補遺伝子の発現を抑圧する発現抑圧工程である、（７）から（１０）のいずれかに記載の血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法。

[0034] （１２） 前記血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞が、毛細血管由来内皮細胞、大血管・臍帯静脈由来内皮細胞、及び網膜血管由来内皮細胞からなる群から選ばれる少なくとも一種である（７）から（１１）のいずれかに記載の血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法。

[0035] （１３） 前記シグナル検出工程において、リン酸化特異的抗体を用いたイムノブロッティング法、 32 Pオートラジオグラフィー法、リン酸化特異的抗体を用いた免疫染色法、ゲルシフト法、及び特異的抗体とリン酸化特異的抗体とを用いた免疫沈降法からなる群から選ばれる少なくとも一種を用いて前記タンパク質のリン酸化を検出する（７）から（１２）のいずれかに記載の血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法。

[0036] （７）から（１３）に記載の発明は、（１）から（６）に記載の発明を血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法の発明として捉えたものである。従って、（７）から（１３）に記載の発明によれば、（１）から（６）に記載の発明と同等の効果をすることができる。

[0037] 特に、（１１）に記載の発明においては、発現量変更工程において血管新生抑制シグナル遺伝子の候補遺伝子の過剰発現又は発現抑制を行うことにより、シグナル検出工程において生起しうる血管新生抑制シグナルを検出する。この手法を採用することにより、血管新生抑制シグナルを促進する機能を有する遺伝子又は抑制する機能を有する遺伝子をスクリーニングすることが

できる。

発明の効果

- [0038] 本発明の血管新生抑制剤のスクリーニング方法によれば、エンドスタチンを投与することによりリン酸化されるタンパク質のリン酸化を検出することにより、血管新生抑制剤のスクリーニングを行うため、多種の候補化合物についてスクリーニングを行う場合であっても、効率よくスクリーニングを行うことができる。
- [0039] また、本発明の血管新生抑制剤のスクリーニング方法によれば、エンドスタチンを投与することによりリン酸化されるタンパク質に限定されず、他の血管新生抑制因子の投与によってリン酸化されることが予想される二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR、及び／又は真核生物翻訳開始因子eIF2 α のリン酸化を検出することにより、血管新生抑制剤のスクリーニングを行うため、幅広い種類の候補化合物について効率よくスクリーニングを行うことができる。
- [0040] 同様に、本発明の血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法によれば、エンドスタチンを投与することによりリン酸化されるタンパク質のリン酸化を検出することにより、血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニングを行うため、多種の候補遺伝子についてスクリーニングを行う場合であっても、効率よくスクリーニングを行うことができる。
- [0041] また、本発明の血管新生抑制剤のスクリーニング方法によれば、エンドスタチンを投与することによりリン酸化されるタンパク質に限定されず、他の血管新生抑制因子の投与によってリン酸化されることが予想される二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR、及び／又は真核生物翻訳開始因子eIF2 α のリン酸化を検出することにより、血管新生抑制剤のスクリーニングを行うため、幅広い種類の候補化合物について効率よくスクリーニングを行うことができる。

図面の簡単な説明

- [0042] [図1]本発明の試験例1に係る抗体マイクロアレイの結果を示す図面である。

[図2] 本発明の試験例 2 に係る定量的ウェスタンブロッティング法の結果を示す図面である。

[図3] 本発明の試験例 3 に係るウェスタンブロッティング法の結果を示す図面である。

[図4] 本発明の試験例 4 に係る蛍光抗体法の結果を示す図面である。

[図5] P K R 遺伝子の発現量を示す図面である。

[図6] I D₁ 遺伝子の発現量を示す図面である。

[図7] I D₃ 遺伝子の発現量を示す図面である。

[図8] i n t e g r i n α v 遺伝子の発現量を示す図面である。

[図9] F l t 遺伝子の発現量を示す図面である。

[図10] E p h r i n A 1 遺伝子の発現量を示す図面である。

[図11] 本発明の試験例 7 に係るリアルタイム定量的 R T - P C R 法の結果を示す図面である。

発明を実施するための形態

[0043] 以下、本発明の実施形態について詳細に説明する。

[0044] <血管新生抑制剤のスクリーニング方法>

以下、本発明の血管新生抑制剤のスクリーニング方法について説明する。

[0045] 本発明の血管新生抑制剤のスクリーニング方法は、血管新生抑制剤の候補化合物を血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞に投与する候補化合物投与工程と、当該候補化合物を投与された当該血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞を保持する細胞保持工程と、エンドスタチンを投与することによりリン酸化されるタンパク質のリン酸化を検出するシグナル検出工程と、を有する。

[0046] また、本発明の血管新生抑制剤のスクリーニング方法は、血管新生抑制剤の候補化合物を血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞に投与する候補化合物投与工程と、当該候補化合物を投与された当該血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞を保持する細胞保持工程と、二本鎖 R N A 依存性タンパク質キナーゼ P K R、及び／又は真核生物翻訳開始因子 e I F 2 α のリン酸化

を検出するシグナル検出工程と、を有するものでもある。

[0047] [候補化合物投与工程]

候補化合物投与工程においては、血管新生抑制剤の候補化合物を血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞に投与する。候補化合物は、一種のみ単独で投与してもよいし、二種以上を併用して投与してもよい。

[0048] (候補化合物)

候補化合物としては、特に限定されるものではなく、低分子化合物であってもよいし、高分子化合物であってもよい。低分子化合物としては、創薬の過程において製造された多数の化合物を挙げることができ、これらの化合物を血管新生抑制剤の化合物ライブラリーとして、血管新生抑制剤のスクリーニングに用いることができる。また、高分子化合物としては、タンパク質を例示することができ、例えば、血管新生の抑制と関連性の高い細胞における特異的 cDNA を発現することにより得られる分泌タンパク質のライブラリーや、血管新生の抑制と関連する特定のシグナルを受けて、発現量が亢進する性質を有する分泌タンパク質のライブラリー等を血管新生抑制剤のスクリーニングに用いることができる。

[0049] これらの中でも、血管新生抑制剤としての用途が見出された場合に、大量合成や患者への投与が容易であるという観点から、低分子化合物を用いることが好ましい。

[0050] (血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞)

血管新生抑制剤のスクリーニングに用いることができる、血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞としては、特に限定されるものではなく、どのようなものを用いてもよい。具体的には、ヒト血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞である、皮膚毛細血管由来内皮細胞、臍帯静脈内皮細胞、腫瘍組織より分離した血管内皮細胞、及び網膜血管内皮細胞、並びにこれらに由来する株化細胞；マウス血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞である、腎由来血管内皮細胞株、リンパ節由来内皮細胞株、脾臓由来血管内皮細胞株、及び ES 細胞由来血管内皮細胞；ラット血管内皮細胞又はこれに由来する培

養細胞である、肺動脈由来初代培養内皮細胞又はこれに由来する培養細胞株、大動脈由来初代培養内皮細胞、及び腫瘍組織より分離した血管内皮細胞を用いることができる。これらの細胞の中でも、入手・取り扱いの容易であること、腫瘍血管新生や網膜血管新生等の病態をより正確に反映すること、及びエンドスタチンに対する感受性が高いことから、ヒト毛細血管由来内皮細胞、腫瘍組織より分離した血管内皮細胞、臍帯静脈内皮細胞、及び網膜血管内皮細胞が好ましい。

[0051] (投与方法)

血管新生抑制剤のスクリーニングにおいて、候補化合物を投与するための投与方法としては、特に限定されるものではなく、従来公知の方法を採用することができる。具体的には、候補化合物を溶解した溶液を、血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞を培養するための培養液に添加し、候補化合物の存在下で継続的に細胞を保持してもよいし、比較的高濃度の候補化合物を培養液に添加し、短時間のうちに候補物質を添加した培養液を除去してもよい。これらの投与方法は、血管新生抑制剤のスクリーニング方法での取得を目的とする化合物の想定される性質によって、適宜選択すればよい。

[0052] [細胞保持工程]

細胞保持工程においては、候補化合物を投与された血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞を保持する。候補化合物を投与された細胞を保持することで、予想される血管新生抑制シグナルのシグナル伝達が行われる結果、エンドスタチンの投与によりリン酸化されるタンパク質のリン酸化や、二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR、及び／又は真核生物翻訳開始因子eIF2 α のリン酸化を促進することができ、後述するシグナル検出工程におけるリン酸化タンパク質の検出感度を向上させることができる。

[0053] 細胞を保持する際の条件としては、特に限定されるものではなく、当該細胞を培養するための通常の条件を用いればよい。具体的には、2%以上17%以下の二酸化炭素の存在下において、33℃以上38℃以下の条件で保持することができる。また、保持する際の培地は、使用する細胞の種類に応じ

て、適宜選択することができるが、例えば、DMEM培地、MEM培地、RPMI培地、及びHAM培地を挙げることができる。

- [0054] 細胞保持工程において、細胞を保持する時間としては、1分以上8時間以下であることが好ましく、3分以上6時間以下であることがより好ましく、10分以上60分以下であることが更に好ましい。1分未満である場合には、細胞内における目的とするタンパク質のリン酸化が十分に進行しないおそれがあり、シグナル検出工程において検出するシグナルの感度が低下するおそれがある。8時間を超える場合には、血管新生抑制剤のスクリーニング方法に要する時間が長時間化することにより、スクリーニングの効率が低下するおそれがあるほか、受容体及びその他の因子の脱感作により目的とするタンパク質のリン酸化の程度が低下するおそれがあり、好ましくない。

- [0055] [シグナル検出工程]

シグナル検出工程においては、エンドスタチンを投与することによりリン酸化されるタンパク質のリン酸化を検出する。シグナル検出工程を経ることにより、血管新生抑制剤の候補化合物のうちで、血管新生抑制シグナルを生起する化合物を特定することができる。

- [0056] また、シグナル検出工程においては、エンドスタチンを投与することによりリン酸化されるタンパク質に限定されず、二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR、及び／又は真核生物翻訳開始因子eIF2 α のリン酸化を検出する。シグナル検出工程を経ることにより、幅広い種類の血管新生抑制剤の候補化合物について効率よくスクリーニングを行うことができる。

- [0057] (エンドスタチンを投与することによりリン酸化されるタンパク質)

本発明においては、エンドスタチンを投与することによりリン酸化されるタンパク質のリン酸化を検出することにより、血管新生抑制シグナルの活性化を検出する。エンドスタチンを投与することによりリン酸化されるタンパク質としては、特に限定されるものではなく、エンドスタチンの下流において、血管新生関連遺伝子の発現制御に関与する任意の血管新生抑制シグナル因子を利用することができる。

[0058] このような血管新生抑制シグナル因子としては、例えば、二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR、及び／又は真核生物翻訳開始因子eIF2 α を挙げることができ、そのリン酸化部位としては、ヒト二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKRのThr451又はThr446、及び／若しくはヒト真核生物翻訳開始因子eIF2 α のSer51、又は、これらのヒトのタンパク質と相同性を有し、これらのヒトのタンパク質と同等の機能を有する他生物の二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR若しくは真核生物翻訳開始因子eIF2 α において、ヒトのタンパク質におけるそれぞれのリン酸化部位と対応するアミノ酸残基を挙げることができる。なお、二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKRにおけるリン酸化部位の中でもThr451が好ましく、真核生物翻訳開始因子eIF2におけるリン酸化部位 α の中でもSer51が好ましい。

[0059] このようなリン酸化部位における血管新生抑制シグナル因子のリン酸化を検出の対象とすることにより、血管新生抑制剤を高い精度・確度をもってスクリーニングすることができる。

[0060] (二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR、及び真核生物翻訳開始因子eIF2 α)

シグナル検出工程においては、エンドスタチンによりリン酸化されるタンパク質に限定されず、二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR、及び／又は真核生物翻訳開始因子eIF2 α のリン酸化を検出することによっても、血管新生抑制シグナルの活性化を検出することができる。二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR及び／又は真核生物翻訳開始因子eIFのリン酸化を検出することにより、血管新生抑制剤を高い精度・確度をもってスクリーニングすることができる。ここで、二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKRにおけるリン酸化部位の中でもThr451が好ましく、真核生物翻訳開始因子eIF2 α におけるリン酸化部位の中でもSer51が好ましい。

[0061] 従来、血管新生に関与する種々の遺伝子について、その発現量の変化を見

る方法では、非特異的な変化が多く、誤った結果になることが多かった。本発明者らは、これらの遺伝子の発現量の特異的な変化を反映する指標として、タンパク質量のリン酸化量の変化に着目し、「リン酸化抗体マイクロアレイ」技術を用いて、リン酸化されるタンパク質を網羅的に検索し、リン酸化されるタンパク質のリン酸化の度合を検討した。なお、当該「リン酸化抗体マイクロアレイ」技術を用いることで、血管新生に関与する重要なリン酸化タンパク質量の変化を正確に捉えることができる。そして、本発明者らは、このようなタンパク質のリン酸化の度合を指標として検討した結果、二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR及び／又は真核生物翻訳開始因子eIF2 α がリン酸化されるならば、ヒトの血管内皮細胞においても血管新生に関係する遺伝子の発現が抑制されることを見出した。

[0062] なお、二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR、及び／又は真核生物翻訳開始因子eIF2 α のリン酸化を生起する血管新生抑制剤としては、リファンピシン、エンドスタチン、アンジオスタチン等を挙げることができる。

[0063] なお、本発明の発明者が、以下に示す実施例において示すとおり、エンドスタチン等により生起される血管新生抑制シグナルは、二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKRをコードするmRNA量を増加させることにより、PKRの発現量を増加させる作用を有する。このため、シグナル検出工程においてこのPKRのリン酸化を検出する場合には、血管新生抑制シグナルによってPKRのリン酸化が亢進されるのみならず、リン酸化されるべきPKRのタンパク質量自体も増加されるため、シグナル検出工程において、リン酸化PKRを容易に検出することが可能となる。

[0064] (リン酸化の検出方法)

エンドスタチンを投与することによりリン酸化される上記タンパク質におけるリン酸化、二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR及び真核生物翻訳開始因子eIF2のリン酸化の検出方法としては、特に限定されるものではなく、タンパク質のリン酸化の検出方法として従来公知の手法を採用す

ることができる。具体的には、リン酸化特異的抗体を用いたイムノブロッティング法、 ^{32}P オートラジオグラフィー法、リン酸化特異的抗体を用いた免疫染色法、ゲルシフト法、及び特異的抗体とリン酸化特異的抗体とを用いた免疫沈降法を挙げることができる。これらの中でも、操作の簡便性・検出の容易性から、イムノブロッティング法及び免疫染色法が特に好ましい。

[0065] 上記の検出方法は、従来公知の手法で行うことが好ましい。例えば、イムノブロッティング法であれば、候補化合物を投与し、上述の条件で保持した細胞の全細胞抽出液を取得し、必要に応じて界面活性剤の存在下で変性させた後、タンパク質電気泳動を行い、分離したタンパク質をナイロンメンブレン等のタンパク質吸着膜に転写する。このタンパク質吸着膜に対して、抗リン酸化PKR抗体を一次抗体として作用させることによりリン酸化PKRを検出することができる。

[0066] ^{32}P オートラジオグラフィー法においては、 γ - ^{32}P -ATPを細胞に投与した後に候補化合物を投与し、 ^{32}P により標識されたリン酸化PKRを細胞内で生成させる。その後、この細胞についてイムノブロッティング法と同様の方法で、タンパク質電気泳動及びタンパク質吸着膜への転写を行い、タンパク質吸着膜に吸着され、 ^{32}P により標識されたリン酸化PKRを検出する。

[0067] リン酸化特異的抗体を用いた免疫染色法においては、候補化合物で処理を行った細胞をホルムアルデヒド等を用いて固定し、必要に応じて界面活性剤により処理した後、抗リン酸化PKR抗体を一次抗体として、一次抗体に対する蛍光標識抗体を二次抗体として細胞に作用させることにより、顕微鏡下でリン酸化PKRが検出可能となる。

[0068] ゲルシフト法においては、候補化合物で処理した細胞について、イムノブロッティング法と同様の方法で、タンパク質電気泳動及びタンパク質吸着膜への転写を行い、分離したタンパク質をナイロンメンブレン等のタンパク質吸着膜へ転写する。このタンパク質吸着膜に対して、抗PKR抗体を一次抗体として作用させることによりPKRを検出することができる。PKRを検

出することにより、リン酸化されたタンパク質のバンドのシフトを可視化することができるため、タンパク質のリン酸化を検出できる。

[0069] 特異的抗体とリン酸化特異的抗体とを用いた免疫沈降法においては、候補化合物を投与された細胞から得られた全細胞抽出液について、これに含まれるタンパク質を特異的抗体又はリン酸化特異的抗体と反応させる。その後、沈降した反応物をタンパク質電気泳動及びタンパク質吸着膜への転写を行い、リン酸化特異的抗体又は特異的抗体を一次抗体として作用させることにより、リン酸化タンパク質を検出することができる。

[0070] 本発明の血管新生抑制剤のスクリーニング方法によれば、エンドスタチンを投与することによりリン酸化されるタンパク質や、二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR及び／又は真核生物翻訳開始因子eIF2のリン酸化を検出することにより、血管新生抑制剤のスクリーニングを行う。上述したとおり、標的タンパク質は、血管新生抑制剤の候補化合物を血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞に投与した後、短時間のうちにリン酸化される。このため、多種の候補化合物についてスクリーニングを行う場合であっても、効率よくスクリーニングを行うことができる。

[0071] <血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法>

以下、本発明の血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法について説明する。なお、血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法についての説明においては、血管新生抑制剤のスクリーニング方法と同様の事項については、説明を省略することがある。

[0072] 本発明の血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法は、血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞において、血管新生抑制シグナル遺伝子の候補遺伝子の発現量を変化させる発現量変更工程と、当該候補遺伝子の発現量を変化させた当該血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞を保持する細胞保持工程と、エンドスタチンを投与することによりリン酸化されるタンパク質のリン酸化を検出するシグナル検出工程と、を有する。

[0073] また、本発明の血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法は、血

管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞において、血管新生抑制シグナル遺伝子の候補遺伝子の発現量を変化させる発現量変更工程と、当該候補遺伝子の発現量を変化させた当該血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞を保持する細胞保持工程と、タンパク質のリン酸化を検出するシグナル検出工程と、を有し、当該シグナル検出工程においてリン酸化が検出される当該タンパク質が、二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR、及び／又は真核生物翻訳開始因子eIF2 α であるものでもある。

[0074] [発現量変更工程]

発現量変更工程においては、血管新生抑制シグナル遺伝子の候補遺伝子の発現量を変化させる。発現量を変化させた候補遺伝子が、血管新生抑制シグナルを促進／抑制する因子をコードする血管新生抑制シグナル遺伝子であった場合、血管新生抑制シグナルが増強され、エンドスタチンの投与によりリン酸化されるタンパク質や、二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR、及び／又は真核生物翻訳開始因子eIF2 α のリン酸化が促進される。このため、候補遺伝子の発現量を変化させた状態で、エンドスタチンの投与によりリン酸化されるタンパク質や、二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR、及び／又は真核生物翻訳開始因子eIF2 α のリン酸化を検出することにより、血管新生抑制シグナル遺伝子をスクリーニングすることができる。

[0075] (候補遺伝子)

血管新生抑制シグナル遺伝子の候補遺伝子としては、特に限定されるものではないが、例えば、血管内皮細胞において発現している遺伝子を挙げることができる。このような遺伝子は、種々の血管内皮細胞におけるcDNAライブラリーとして、ライブラリーの形態で取得することができる。血管内皮細胞におけるcDNAライブラリーの製造方法としては、従来公知の方法を用いることができ、例えば、血管内皮細胞からmRNAを抽出し、逆転写酵素を用いることによりcDNAに変換後、必要に応じて制限酵素処理を施し、所定のベクターに導入する手法を挙げることができる。

[0076] (過剰発現工程)

発現量変更工程は、血管新生抑制シグナル遺伝子の候補遺伝子を過剰発現する過剰発現工程であってもよい。発現量変更工程を過剰発現工程とした場合において、本発明の血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法を行った場合、得られうる血管新生抑制シグナル遺伝子は、血管新生抑制シグナルを増強する作用を持つ遺伝子である。

[0077] 血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞に血管新生抑制シグナル遺伝子の候補遺伝子を過剰発現する手法としては、特に限定されるものではなく、従来公知の手法を採用することができる。具体的には、プラスミド、コスミド、及びウイルス等のベクターに候補遺伝子を導入し、これを細胞にトランスフェクションさせる方法を挙げることができる。

[0078] (発現抑圧工程)

発現量変更工程は、血管新生抑制シグナル遺伝子の候補遺伝子の発現を抑圧する発現抑圧工程であってもよい。発現量変更工程を発現抑圧工程とした場合において、本発明の血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法を行った場合、得られうる血管新生抑制シグナル遺伝子は、血管新生抑制シグナルを抑制する作用を持つ遺伝子である。

[0079] 血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞において、血管新生抑制シグナル遺伝子の候補遺伝子の発現を抑圧する方法としては、特に限定されるものではないが、例えば、RNA干渉法等を挙げることができる。

[0080] 本発明の血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法によれば、エンドスタチンを投与することによりリン酸化されるタンパク質のリン酸化を検出することにより、血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニングを行う。標的タンパク質は、血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞において血管新生抑制シグナル遺伝子の発現量を変化させた後、短時間のうちにリン酸化される。このため、多種の候補遺伝子についてスクリーニングを行う場合であっても、効率よくスクリーニングを行うことができる。

[0081] 更に、本発明の血管新生抑制剤のスクリーニング方法によれば、エンドス

タチンを投与することによりリン酸化されるタンパク質のリン酸化に限定されず、他の血管新生抑制因子の投与によってリン酸化されることが予想される二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR、及び／又は真核生物翻訳開始因子eIF2 α のリン酸化を検出することにより、血管新生抑制剤のスクリーニングを行うため、多種の候補化合物についてスクリーニングを行う場合であっても、効率よくスクリーニングを行うことができる。

実施例

[0082] 以下、本発明の実施例について、図面を参照して詳細に説明する。なお、本発明は、以下に示す実施例に何ら限定されるものではない。

[0083] <試験例1>

リファンピシンはエンドスタチン類似の血管新生抑制作用を有することが知られており、リファンピシンを血管内皮細胞に投与することによってリン酸化されるタンパク質を検索することにより、エンドスタチンを血管内皮細胞に投与することによってリン酸化されるタンパク質の候補タンパク質を得ることができると考えられる。

[0084] リファンピシンの投与によりリン酸化が誘導されるタンパク質を検索するため、抗体マイクロアレイ技術を用いて、リファンピシン処理により特異的にリン酸化されたタンパク質を検出した。ラット大動脈由来内皮細胞（rAEC）を10%ウシ胎児血清添加DMEM培地中の40 μ g/mlのリファンピシンの存在下又は非存在下、37℃で10分間保持した後、全細胞抽出液を、特徴づけが行われている630種のシグナルタンパク質に対する抗体を固定した「Kinex（登録商標）抗体マイクロアレイ」（Kinexus Bioinformatics社製）を用いて解析した。得られた結果において、リファンピシンの投与によりリン酸化が特に亢進したタンパク質とその亢進量を示す結果を図1に示す。

[0085] 図1より、ラット大動脈由来内皮細胞をリファンピシンで処理することにより、Bad、eIF2 α 、PKR1を始めとする種々のタンパク質のリン酸化が亢進していることが分かる。

[0086] <試験例 2>

抗体マイクロアレイ技術においては、抗体の交差反応や、タンパク質複合体の形成等に伴うエピトープと抗体との相互作用の遮断により、擬陽性が生じることが知られている。実施例 1 でリン酸化が確認された複数のタンパク質につき、定量的にウェスタンブロッティング法を行うことにより、これらのリン酸化の亢進の事実を確かめた。

[0087] ラット大動脈由来内皮細胞 (r A E C) を 10%ウシ胎児血清添加 D M E M 培地中の $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ のリファンピシンの存在下又は非存在下、 37°C で 10 分間保持した後、A T F 2、e I F 2 α 、P K C δ 、S T A T 1、及び S T A T 5 A に対する抗リン酸化タンパク質抗体を用い、定量的ウェスタンブロッティング法により、全細胞抽出液中のリン酸化タンパク質の存在量を調べた。結果を図 2 に示す。

[0088] 図 2 より、試験例 1 の抗体マイクロアレイでリン酸化が亢進していることが示されたタンパク質のうち、少なくとも、A T F 2、e I F 2 α 、P K C δ 、及び S T A T 5 A については、定量的ウェスタンブロッティング法によっても、タンパク質のリン酸化が亢進していることが分かる。一方、S T A T 1 については、定量的ウェスタンブロッティング法ではリン酸化の亢進が示されず、S T A T 1 についての試験例 1 の抗体マイクロアレイでの結果が再現性の無いものであることが分かった。

[0089] <試験例 3>

ヒト網膜血管内皮細胞 (h R E C) 又はヒト臍帯静脈内皮細胞 (h U V E C) を、10%ウシ胎児血清/増殖因子添加 H a m F 1 2 K 培地中の $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ リファンピシン又は $1.0 \times 10^{-9}\text{M}$ エンドスタチンで処理し、 37°C で 10 分間から 240 分間保持した。保持後の全細胞抽出液について、抗リン酸化 P K R 抗体を用いてウェスタンブロッティング法を行い、P K R のリン酸化の経時変化を調べた。結果を図 3 (a) に示す。

[0090] 同様に、マウス大動脈由来内皮細胞 (r A E C) を、サルブリナル ($20 \mu\text{M}$) で処理した系；リファンピシン ($40 \mu\text{g}/\text{ml}$) で処理した系；エ

ンドスタチン ($1.0 \times 10^{-9} \text{M}$) で処理した系; P K R 阻害剤 A (2-アミノプリン、 10mM) で処理した後エンドスタチン ($1.0 \times 10^{-9} \text{M}$) で処理した系; P K R 阻害剤 B (8-(イミダゾール-4-イルメチレン)-6H-アゾリジノ [5, 4-g] ベンゾジアゾール-7-オン、 $0.3 \mu \text{M}$) 処理した後リファンピシン ($40 \mu \text{g}/\text{ml}$) で処理した系; 及び P K R 阻害剤 B (同上、 $0.3 \mu \text{M}$) で処理した後エンドスタチン ($1.0 \times 10^{-9} \text{M}$) で処理した系において、処理後の細胞を 37°C で 4 時間又は 8 時間保持した。それぞれの全細胞抽出液について、抗リン酸化 P K R 抗体を用いてウェスタンブロッティング法を行い、P K R のリン酸化の程度を調べた。結果を図 3 (b) に示す。

[0091] 図 3 (a) に示すとおり、P K R はヒト網膜血管内皮細胞及びヒト臍帯静脈内皮細胞において、リファンピシン又はエンドスタチンでの処理により、リン酸化が亢進していることが分かった。従って、試験例 1 で確認されたリファンピシン処理による P K R のリン酸化は、特異的なものであることが分かる。なお、図 3 (b) に示すとおり、ラット大動脈由来初代培養血管内皮細胞においても、リファンピシン又はエンドスタチンは P K R をリン酸化したが、同細胞を特定の P K R 阻害剤 (8-(イミダゾール-4-イルメチレン)-6H-アゾリジノ [5, 4-g] ベンゾジアゾール-7-オン) で処理した後、リファンピシン又はエンドスタチンで処理した場合においては、P K R のリン酸化の亢進が認められなかった。

[0092] <試験例 4>

ヒト臍帯静脈内皮細胞を、HamF12K 培地中の $40 \mu \text{g}/\text{ml}$ リファンピシン又は $1.0 \times 10^{-9} \text{M}$ エンドスタチンで処理し、 37°C で 30 分間保持した。保持後の細胞について、抗リン酸化 P K R 抗体を一次抗体として用いた免疫染色を行い、リン酸化 P K R の細胞内における存在を調べた。

[0093] 同様の実験は、P K R 阻害薬の構造類似体を添加したヒト臍帯静脈内皮細胞 (P K R negative) を $40 \mu \text{g}/\text{ml}$ のリファンピシンで処理した系、P K R 阻害剤 B (8-(イミダゾール-4-イルメチレン)-6H

ーアゾリジノ [5, 4-*g*] ベンゾジアゾール-7-オン、 $0.3 \mu\text{M}$) で前処理後のヒト臍帯静脈内皮細胞を $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ リファンピシン又は $1.0 \times 10^{-9} \text{M}$ エンドスタチンで処理した系においても行った。以上の結果を図 4 に示す。

[0094] 図 4 より、リファンピシン又はエンドスタチンでヒト臍帯静脈内皮細胞を処理した場合、細胞内において、PKR のリン酸化が亢進していることが分かる。この PKR のリン酸化は、特異的 PKR 阻害剤で予め処理したヒト臍帯静脈内皮細胞を、リファンピシン又はエンドスタチンで処理した場合には、認められなかった。

[0095] <試験例 5>

ヒト臍帯静脈内皮細胞を、HamF12K 培地中の $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ リファンピシン又は $1.0 \times 10^{-8} \text{M}$ エンドスタチンにより処理し、 37°C で 4 時間から 8 時間保持した。保持後、全細胞抽出液について、PKR mRNA を TaqMan プローブを用いたリアルタイム定量的 RT-PCR 法を行い、PKR mRNA を定量した。同様の操作は、リファンピシン又はエンドスタチンの処理に先立って、PKR siRNA をトランスフェクトしたヒト臍帯静脈内皮細胞についても行った。結果を図 5 に示す。

[0096] 図 5 より、リファンピシン又はエンドスタチンにより処理されたヒト臍帯静脈内皮細胞においては、PKR の発現量が増加していることが分かる。

[0097] このような結果は、リファンピシン又はエンドスタチンの投与による、タンパク質としての PKR の発現量の増加を示唆するものである。血管新生抑制シグナルにより、このようにタンパク質としての PKR の発現量が増大することにより、リン酸化されるべき PKR の量も増大し、結果的により多くのリン酸化 PKR が生成するものと考えられる。このため、実際に血管新生抑制剤のスクリーニング方法や、血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法を実施する際には、シグナル検出工程において PKR のリン酸化を検出することにより、感度よくスクリーニングを実施できるものと考えられる。

[0098] <試験例 6>

ヒト臍帯静脈内皮細胞を、HamF12K培地中の $40\mu\text{g/ml}$ リファンピシン又は $1.0 \times 10^{-8}\text{M}$ エンドスタチンにより処理し、 37°C で4時間から8時間保持した。保持後、全細胞抽出液において、エンドスタチンにより発現抑制されることが知られているID₁遺伝子、ID₃遺伝子、integrin α_v 遺伝子、Flt遺伝子、及びEphrin A1遺伝子について、それぞれTaqManプローブを用いたリアルタイム定量的RT-PCR法による定量系を確立して、これらのmRNAの発現量を調べた。同様の操作は、リファンピシン又はエンドスタチンの処理に先立って、PKR siRNAをトランスフェクトしたヒト臍帯静脈内皮細胞についても行った。結果を図6から図10に示す。

[0099] 図6から図10より、ID₁遺伝子、ID₃遺伝子、integrin α_v 遺伝子、Flt遺伝子、及びEphrin A1遺伝子の発現は、リファンピシン処理又はエンドスタチン処理により低下していることが分かる。PKR siRNAによってPKRをノックアウトした場合においては、リファンピシン又はエンドスタチンの処理に伴うこれらの遺伝子発現の低下が起こっていないことから、リファンピシン又はエンドスタチンの処理に伴うこれらの遺伝子発現の低下は、PKR依存的であることが分かった。

[0100] <試験例 7>

eIF2 α の脱リン酸化の阻害剤として知られるサルブリナルが、エンドスタチンにより発現抑制される遺伝子群の発現量のどのような影響を与えるかについて、リアルタイム定量的RT-PCR法を用いて調べた。ヒト臍帯静脈内皮細胞を、HamF12K培地中の $20\mu\text{M}$ サルブリナルで処理し、 37°C で4時間から8時間保持した。保持後、全細胞抽出液において、ID₁遺伝子、ID₃遺伝子、integrin α_v 遺伝子、Flt遺伝子、及びEphrin A1遺伝子について、それぞれTaqManプローブを用いたリアルタイム定量的RT-PCR法による定量系を確立して、これらのmRNAの発現量を調べた。結果を図11に示す。

[0101] 図11より、サルブリナルにより $eIF2\alpha$ の脱リン酸化を阻害して、 $eIF2\alpha$ の活性を亢進させた場合、 ID_1 遺伝子、 ID_3 遺伝子、 $integrin_{\alpha_v}$ 遺伝子、 Flt 遺伝子、及び $Ephrin A1$ 遺伝子の mRNA の発現は低下することが分かる。この事実より、リファンピシン又はエンドスタチンの処理により生じるこれらの遺伝子の発現低下は、 $eIF2\alpha$ の脱リン酸化阻害によっても再現可能であることが分かる。

請求の範囲

- [請求項1] 血管新生抑制剤の候補化合物を血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞に投与する候補化合物投与工程と、
- 前記候補化合物を投与された前記血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞を保持する細胞保持工程と、
- エンドスタチンを投与することによりリン酸化されるタンパク質のリン酸化を検出するシグナル検出工程と、を有する血管新生抑制剤のスクリーニング方法。
- [請求項2] エンドスタチンを投与することによりリン酸化される前記タンパク質が、二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR、及び／又は真核生物翻訳開始因子eIF2 α である請求項1に記載の血管新生抑制剤のスクリーニング方法。
- [請求項3] 血管新生抑制剤の候補化合物を血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞に投与する候補化合物投与工程と、
- 前記候補化合物を投与された前記血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞を保持する細胞保持工程と、
- タンパク質のリン酸化を検出するシグナル検出工程と、を有し、
- 前記シグナル検出工程においてリン酸化が検出される前記タンパク質が、二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR、及び／又は真核生物翻訳開始因子eIF2 α である血管新生抑制剤のスクリーニング方法。
- [請求項4] 前記シグナル検出工程において、ヒト二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKRのThr451又はこれに対応する二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKRのアミノ酸残基のリン酸化、及び／又はヒト真核生物翻訳開始因子eIF2 α のSer51又はこれに対応する真核生物翻訳開始因子eIF2 α のアミノ酸残基のリン酸化を検出する請求項2又は3に記載の血管新生抑制剤のスクリーニング方法。

- [請求項5] 前記血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞が、毛細血管由来内皮細胞、大血管・臍帯静脈由来内皮細胞、及び網膜血管由来内皮細胞からなる群から選ばれる少なくとも一種である請求項1から4のいずれかに記載の血管新生抑制剤のスクリーニング方法。
- [請求項6] 前記シグナル検出工程において、リン酸化特異的抗体を用いたイムノブロットング法、 ^{32}P オートラジオグラフィー法、リン酸化特異的抗体を用いた免疫染色法、ゲルシフト法、及び特異的抗体とリン酸化特異的抗体とを用いた免疫沈降法からなる群から選ばれる少なくとも一種を用いて前記タンパク質のリン酸化を検出する請求項1から5のいずれかに記載の血管新生抑制剤のスクリーニング方法。
- [請求項7] 血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞において、血管新生抑制シグナル遺伝子の候補遺伝子の発現量を変化させる発現量変更工程と、
前記候補遺伝子の発現量を変化させた前記血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞を保持する細胞保持工程と、
エンドスタチンを投与することによりリン酸化されるタンパク質のリン酸化を検出するシグナル検出工程と、を有する血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法。
- [請求項8] エンドスタチンを投与することによりリン酸化される前記タンパク質が、二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR、及び／又は真核生物翻訳開始因子eIF2 α である請求項7に記載の血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法。
- [請求項9] 血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞において、血管新生抑制シグナル遺伝子の候補遺伝子の発現量を変化させる発現量変更工程と、
前記候補遺伝子の発現量を変化させた前記血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞を保持する細胞保持工程と、
タンパク質のリン酸化を検出するシグナル検出工程と、を有し、

前記シグナル検出工程においてリン酸化が検出される前記タンパク質が、二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKR、及び／又は真核生物翻訳開始因子eIF2 α である、血管新生抑制剤のスクリーニング方法。

[請求項10]

前記シグナル検出工程において、ヒト二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKRのThr451又はこれに対応する二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKRのアミノ酸残基のリン酸化、及び／又はヒト真核生物翻訳開始因子eIF2 α のSer51又はこれに対応する真核生物翻訳開始因子eIF2 α のアミノ酸残基のリン酸化を検出する請求項8又は9に記載の血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法。

[請求項11]

前記発現量変更工程が、血管内皮細胞若しくはこれに由来する培養細胞において、血管新生抑制シグナル遺伝子の候補遺伝子を過剰発現する過剰発現工程、又は血管内皮細胞若しくはこれに由来する培養細胞において、血管新生抑制シグナル遺伝子の候補遺伝子の発現を抑圧する発現抑圧工程である、請求項7から10のいずれかに記載の血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法。

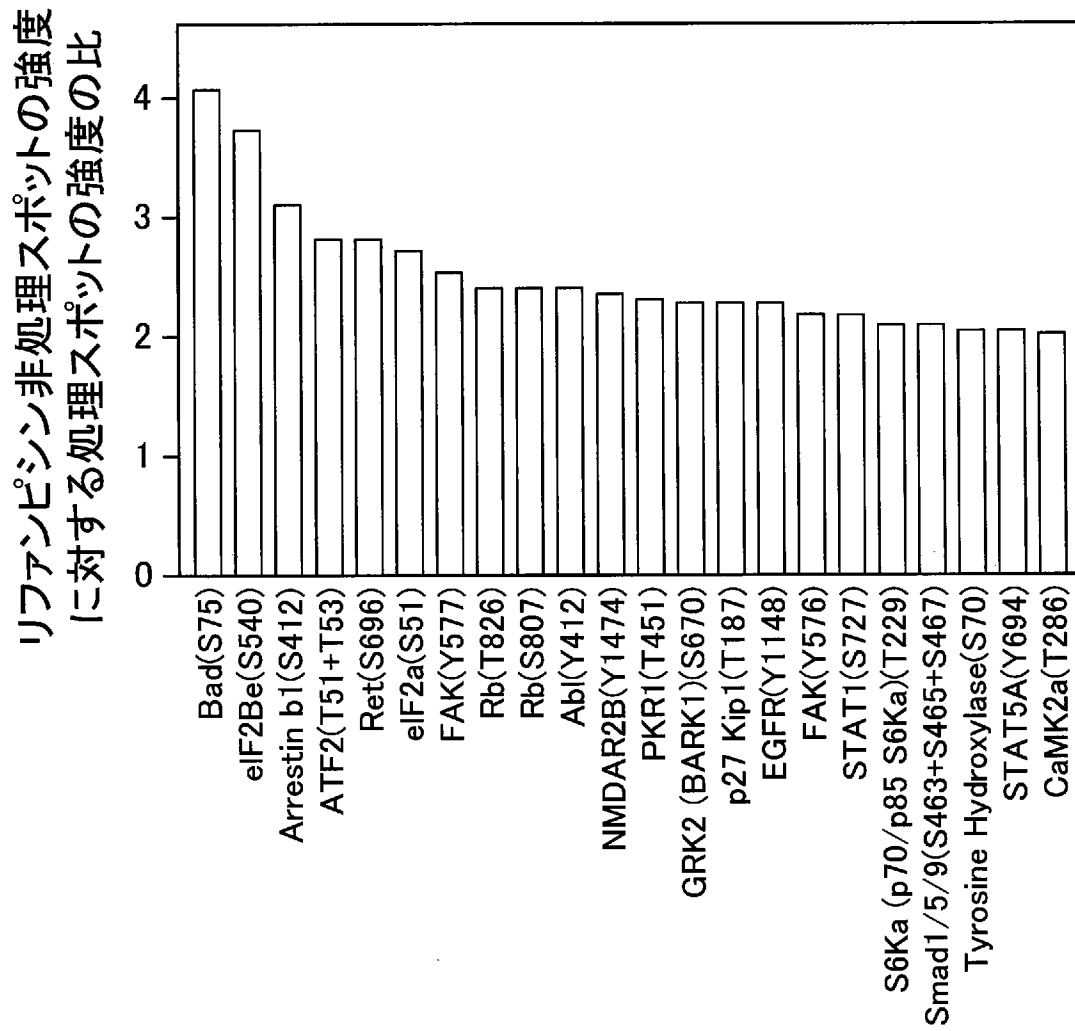
[請求項12]

前記血管内皮細胞又はこれに由来する培養細胞が、毛細血管由来内皮細胞、大血管・臍帯静脈由来内皮細胞、及び網膜血管由来内皮細胞からなる群から選ばれる少なくとも一種である請求項7から11のいずれかに記載の血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法。

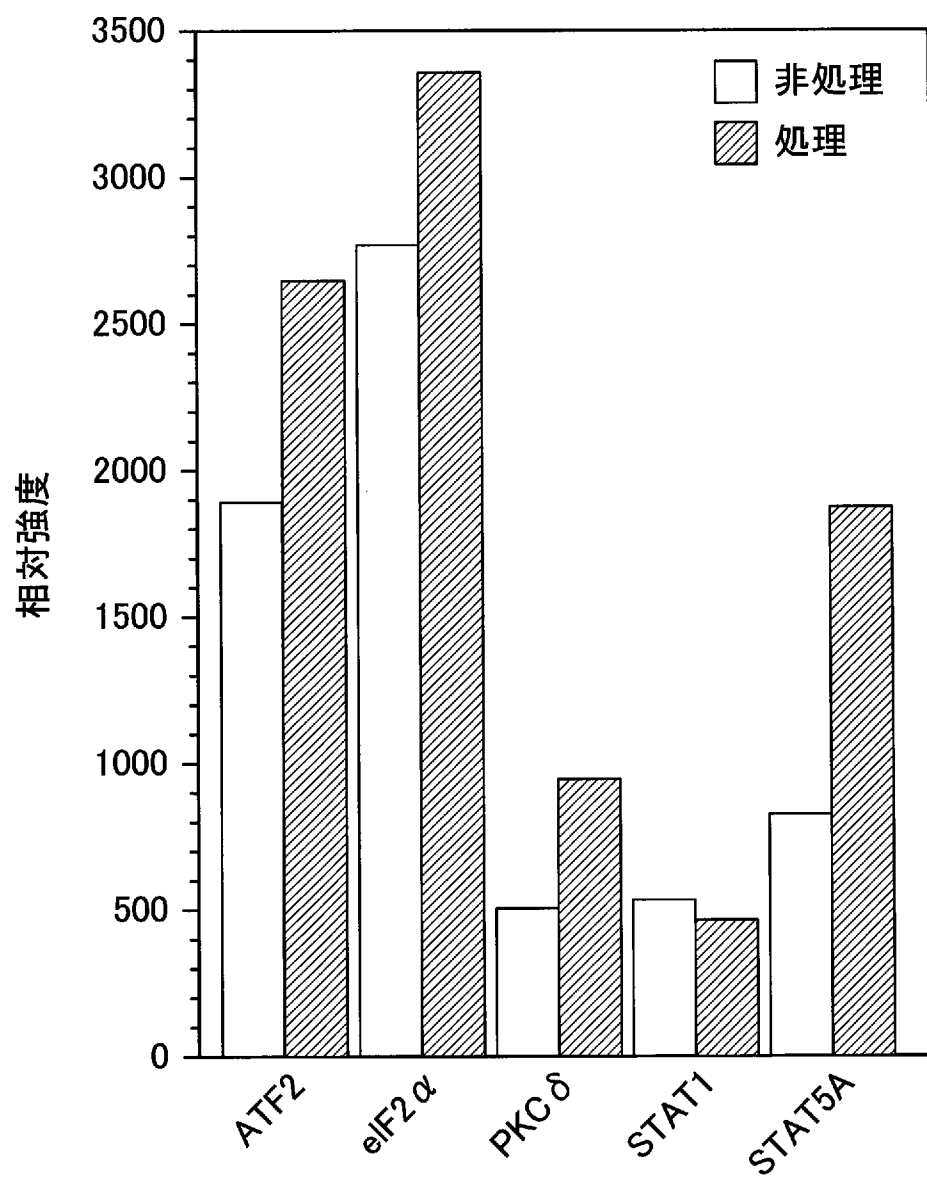
[請求項13]

前記シグナル検出工程において、リン酸化特異的抗体を用いたイムノブロットング法、³²Pオートラジオグラフィー法、リン酸化特異的抗体を用いた免疫染色法、ゲルシフト法、及び特異的抗体とリン酸化特異的抗体とを用いた免疫沈降法からなる群から選ばれる少なくとも一種を用いて前記タンパク質のリン酸化を検出する請求項7から12のいずれかに記載の血管新生抑制シグナル遺伝子のスクリーニング方法。

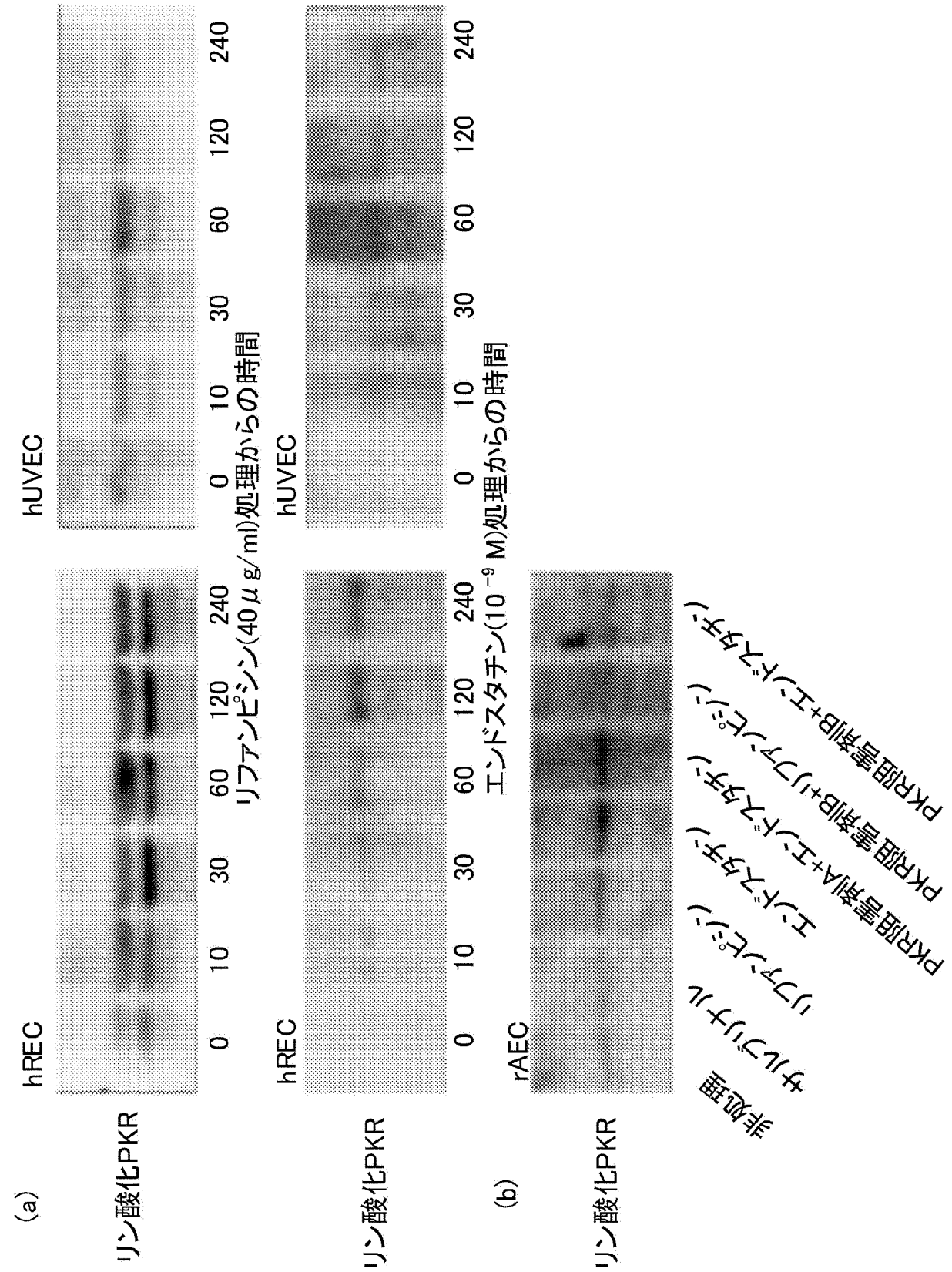
[図1]



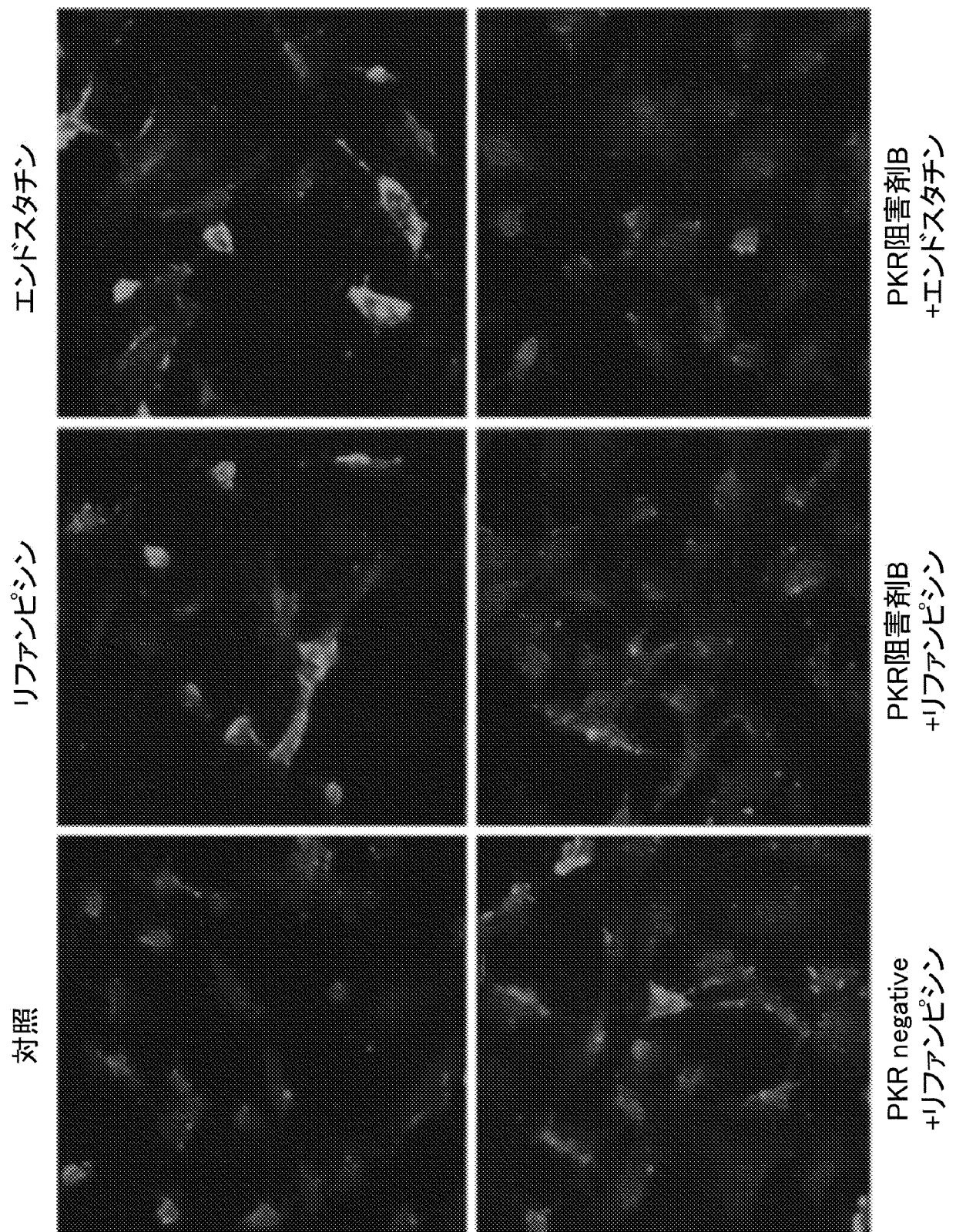
[図2]



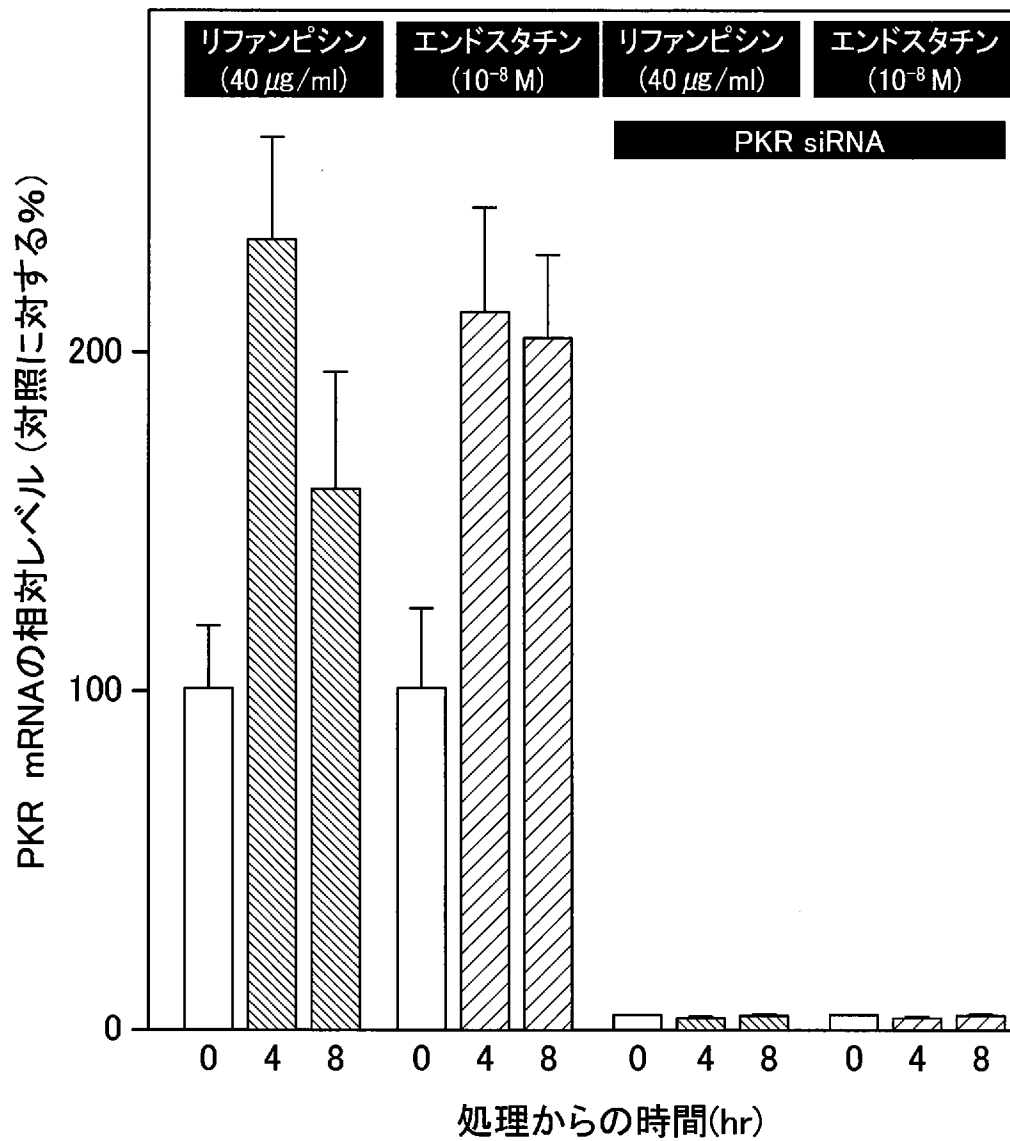
[図3]



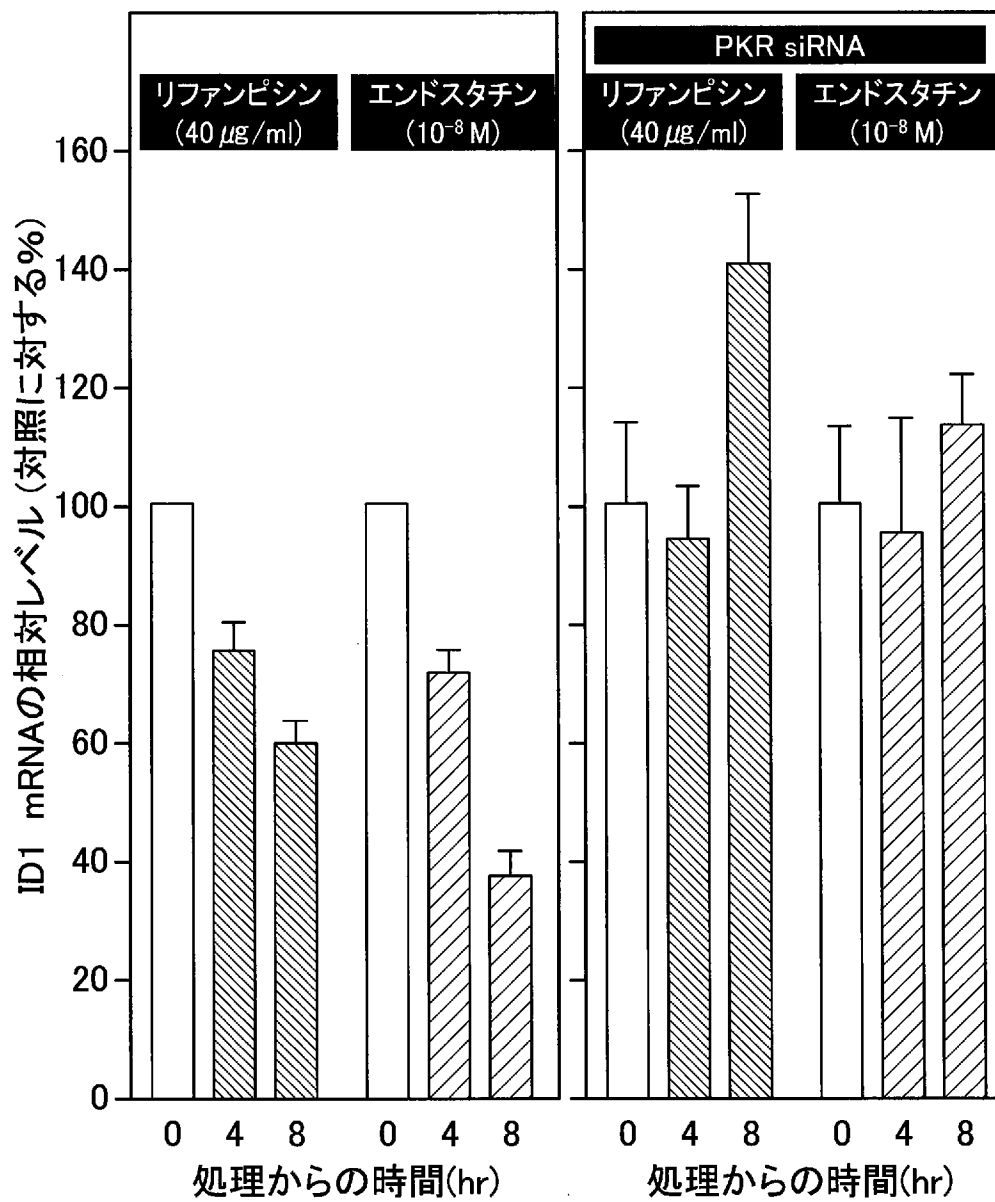
[図4]



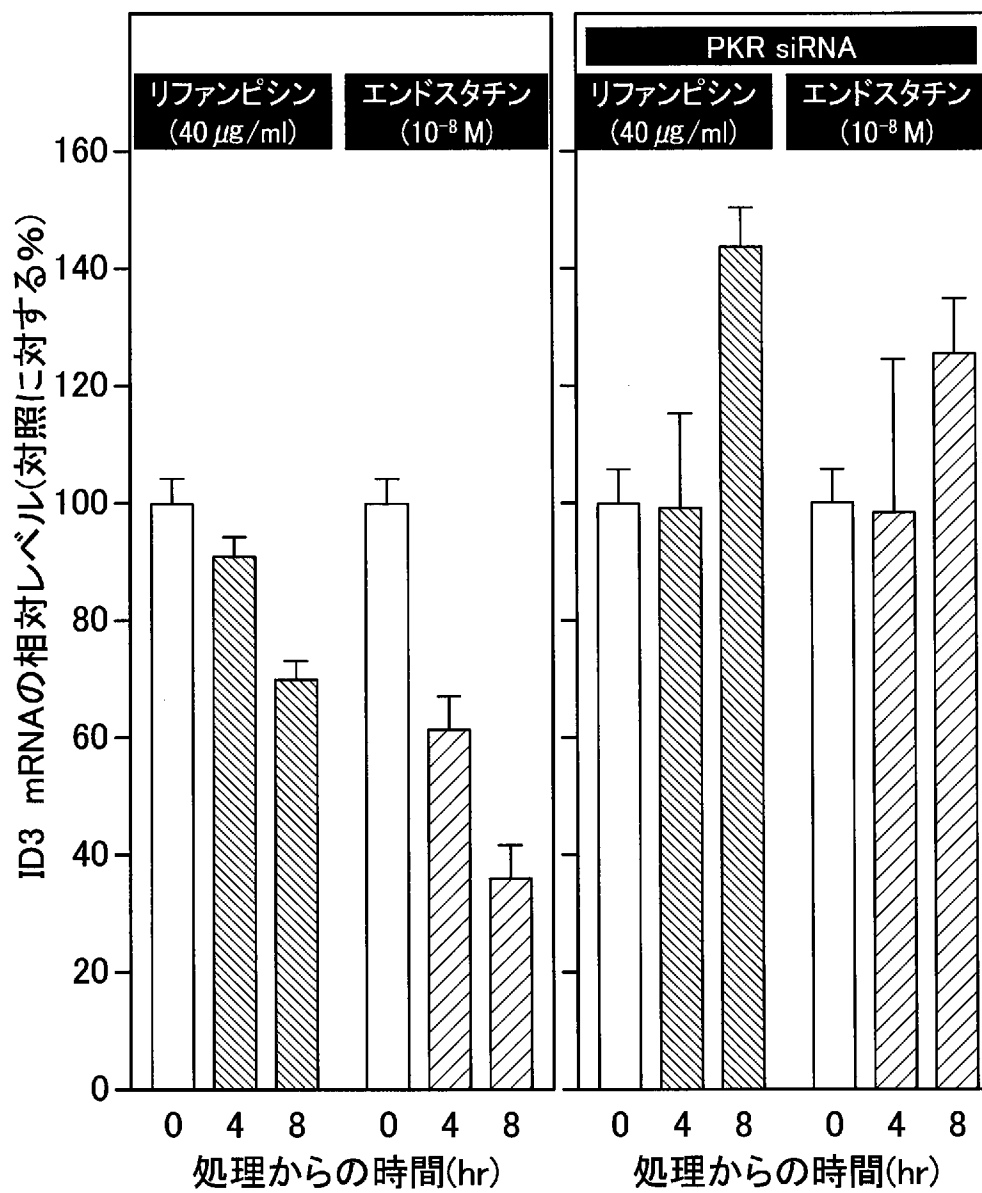
[図5]



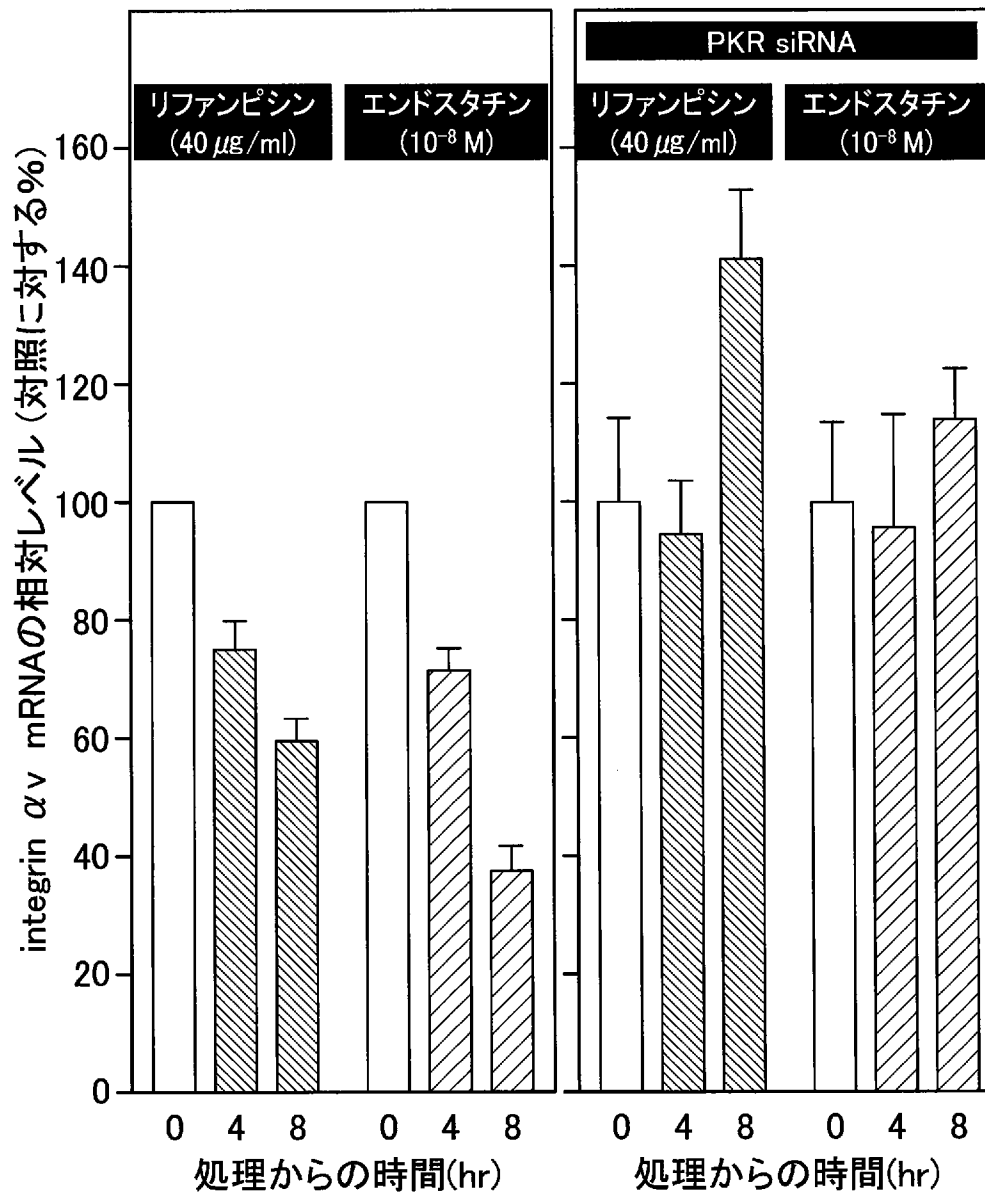
[図6]



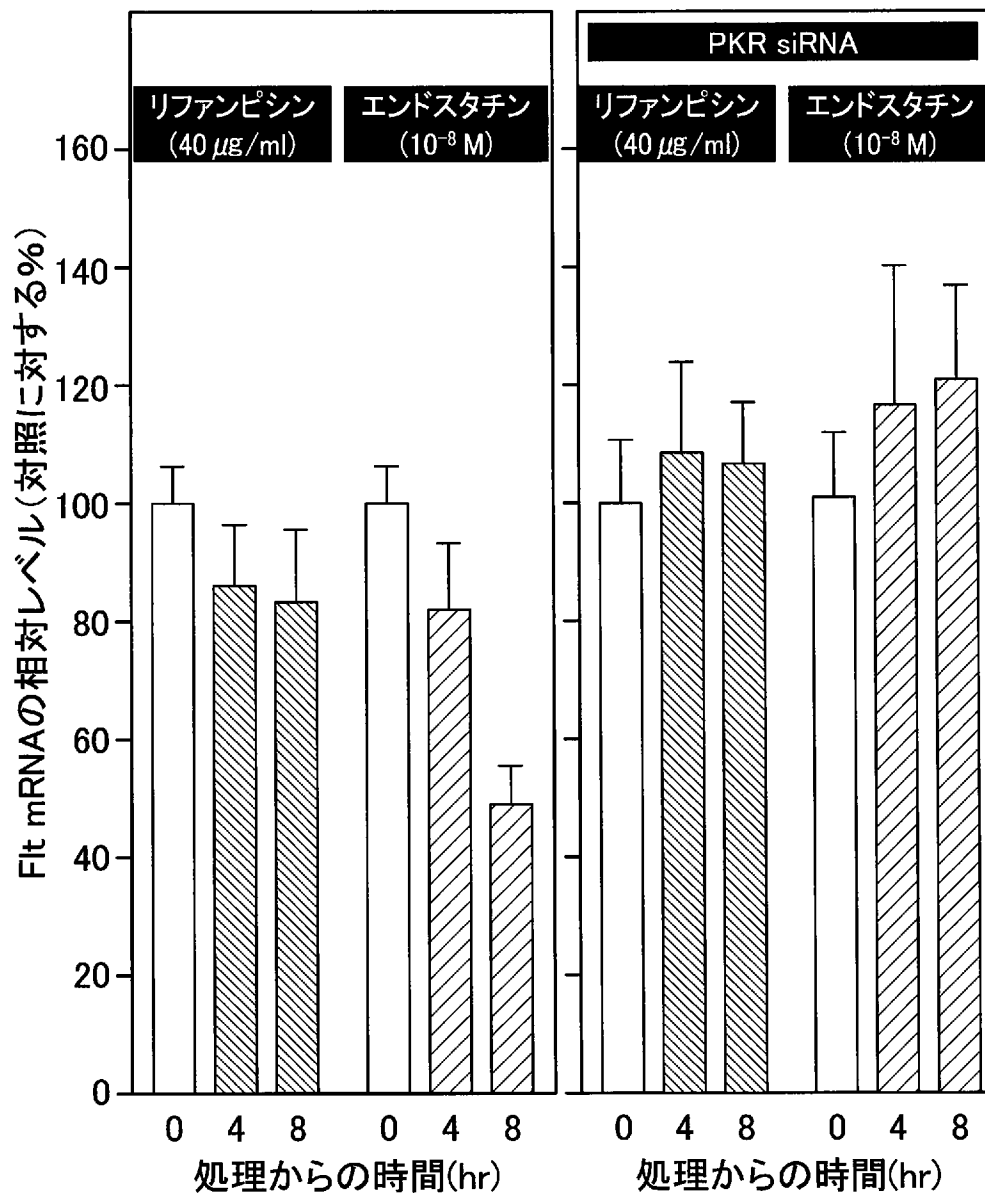
[図7]



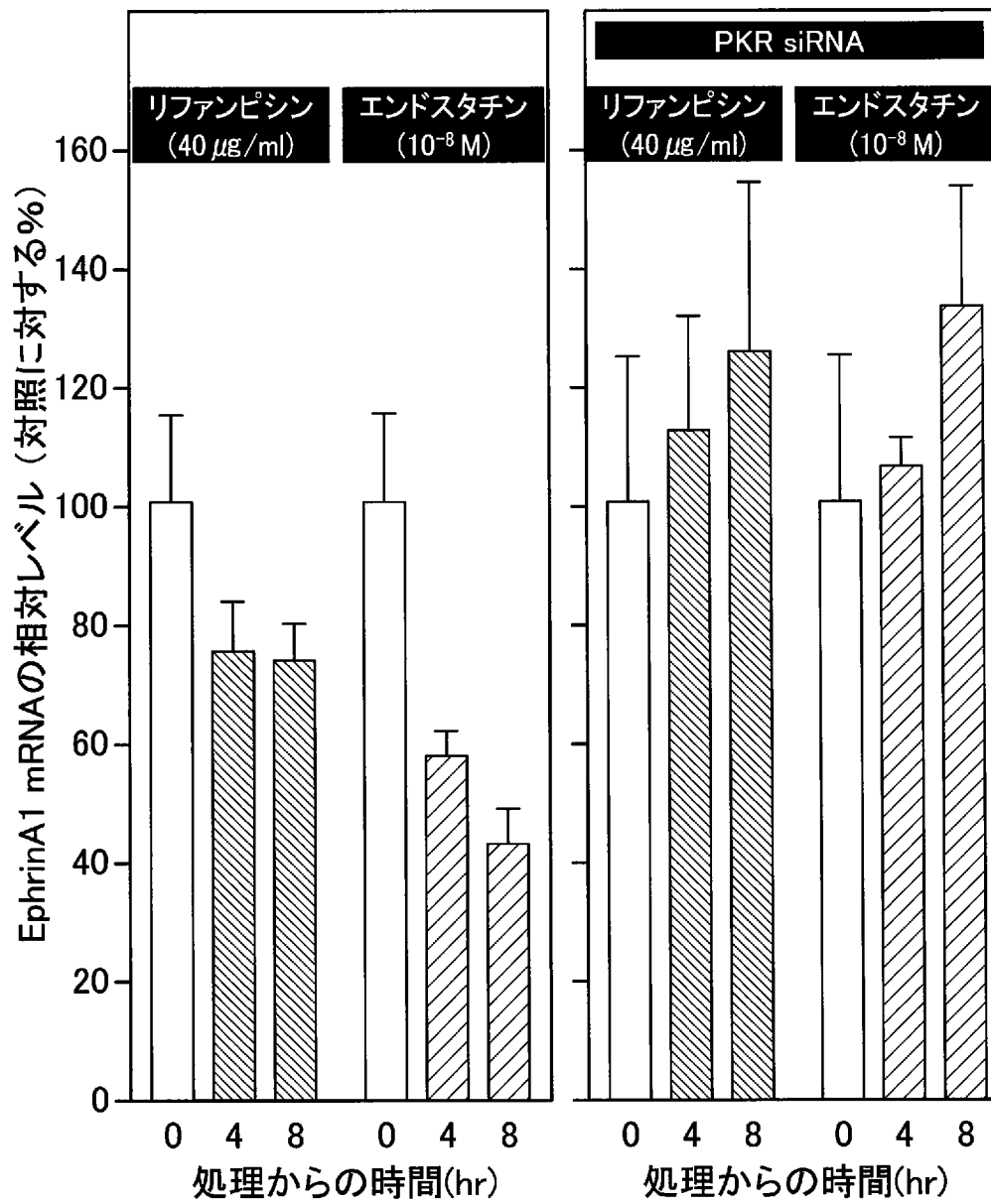
[図8]



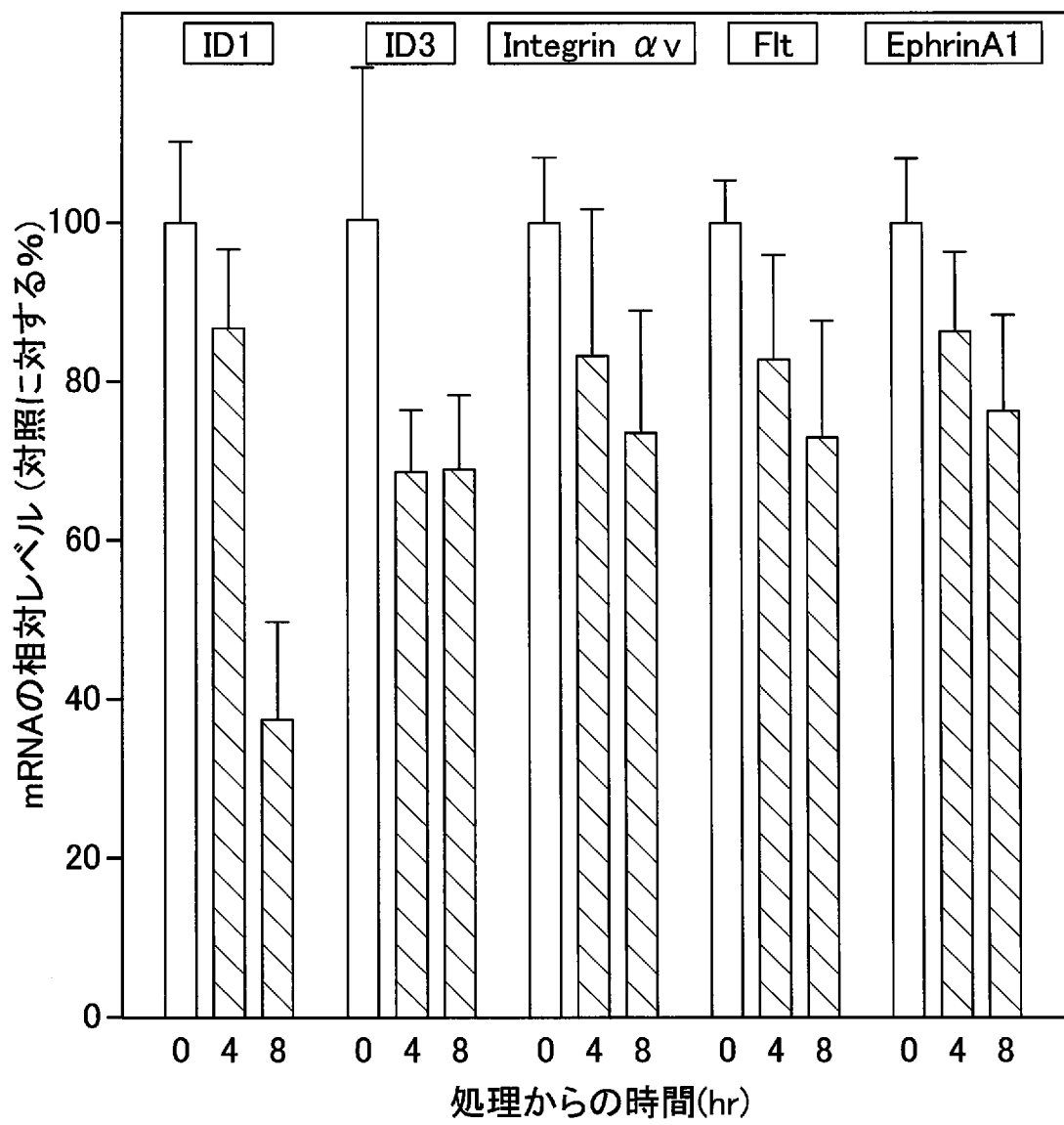
[図9]



[図10]



[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/064733

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/53(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/53, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 2003/038096 A1 (Shun'ichiro KUBOTA), 08 May 2003 (08.05.2003), (Family: none)	1, 5, 6/2-4, 7-13
Y/A	JIANG, H. et al., Upregulation of survivin by leptin/STAT3 signaling in MCF-7 cells, Biochem. Biophys.Res.Comm., 2008, Vol.368, No.1, p.1-5	7, 11-13/1-6, 8-10
Y/A	KIM, Y.M. et al., Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1, J.Biol.Chem., 2002, Vol.277, No.31, p.27872-9	7, 11-13/1-6, 8-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 October, 2009 (05.10.09)

Date of mailing of the international search report

20 October, 2009 (20.10.09)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/064733

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	NONY, P.A. et al., 15S-Lipoxygenase-2 mediates arachidonic acid-stimulated adhesion of human breast carcinoma cells through the activation of TAK1, MKK6, and p38 MAPK, J.Biol.Chem., 2005, Vol.280, No.36, p.31413-9	7, 11-13/1-6, 8-10
Y/A	PRADERVAND, S. et al., Small proline-rich protein 1A is a gp130 pathway- and stress-inducible cardioprotective protein, EMBO J, 2004, Vol.23, No.22, p.4517-25	7, 11-13/1-6, 8-10
A	MASAYOSHI SHICHIRI et al., "Antiangiogenesis signals by endostatin", FASEB JOURNAL, 2001.04, vol.15, p.1044-1053	1-13
A	JP 2004-075665 A (Japan Science and Technology Corp.), 11 March 2004 (11.03.2004), & US 2006/0035878 A1 & EP 1516620 A1 & EP 2016944 A2 & WO 2004/000307 A1 & DE 60325855 D & KR 10-2007-0008719 A	1-13
A	LING, Y. et al., Endostar, a novel recombinant human endostatin, exerts antiangiogenic effect via blocking VEGF-induced tyrosine phosphorylation of KDR/Flk-1 of endothelial cells, Biochem. Biophys.Res.Comm., 2007, Vol.361, No.1, p.79-84	1-13

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. G01N33/53, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 日本国公開実用新案公報 日本国実用新案登録公報 日本国登録実用新案公報 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 1 9 7 1 - 2 0 0 9 年 1 9 9 6 - 2 0 0 9 年 1 9 9 4 - 2 0 0 9 年			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		関連する 請求項の番号
X/A	WO 2003/038096 A1 (久保田 俊一郎) 2003.05.08, (ファミリーなし)	1, 5, 6/ 2-4, 7-13	
Y/A	JIANG, H. et al., Upregulation of survivin by leptin/STAT3 signaling in MCF-7 cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2008, Vol. 368, No. 1, p. 1-5	7, 11-13 /1-6, 8-10	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 0 5 . 1 0 . 2 0 0 9		国際調査報告の発送日 2 0 . 1 0 . 2 0 0 9	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 白形 由美子 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y / A	KIM, Y. M. et al., Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1, J. Biol. Chem., 2002, Vol. 277, No. 31, p. 27872-9	7, 11-13 /1-6, 8-10
Y / A	NONY, P. A. et al., 15S-Lipoxygenase-2 mediates arachidonic acid-stimulated adhesion of human breast carcinoma cells through the activation of TAK1, MKK6, and p38 MAPK, J. Biol. Chem., 2005, Vol. 280, No. 36, p. 31413-9	7, 11-13 /1-6, 8-10
Y / A	PRADERVAND, S. et al., Small proline-rich protein 1A is a gp130 pathway- and stress-inducible cardioprotective protein, EMBO J, 2004, Vol. 23, No. 22, p. 4517-25	7, 11-13 /1-6, 8-10
A	MASAYOSHI SHICHIRI et al., "Antiangiogenesis signals by endostatin", FASEB JOURNAL, 2001.04, vol. 15, p. 1044-1053	1-13
A	JP 2004-075665 A (科学技術振興事業団) 2004.03.11, & US 2006/0035878 A1 & EP 1516620 A1 & EP 2016944 A2 & WO 2004/000307 A1 & DE 60325855 D & KR 10-2007-0008719 A	1-13
A	LING, Y. et al., Endostar, a novel recombinant human endostatin, exerts antiangiogenic effect via blocking VEGF-induced tyrosine phosphorylation of KDR/Flk-1 of endothelial cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2007, Vol. 361, No. 1, p. 79-84	1-13