

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年12月9日 (09.12.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/106515 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, C07K 16/18, G01N 33/574, A61K 39/395, 31/713, A61P 35/00

(74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目8番7号 福岡ビル9階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/007677

(22) 国際出願日: 2004年5月27日 (27.05.2004)

(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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(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2003-151302 2003年5月28日 (28.05.2003) JP

(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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社サイメディア (SCIMEDIA LTD.) [JP/JP]; 〒1100008 東京都台東区池之端2-7-17 Tokyo (JP).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 秋山 徹 (AKIYAMA, Tetsu) [JP/JP]; 〒1130032 東京都文京区弥生1-1-1 Tokyo (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 関谷 高史 (SEKIYA, Takashi) [JP/JP]; 〒1130032 東京都文京区弥生1-1-1 Tokyo (JP). 大和田 進 (OHWADA, Susumu) [JP/JP]; 〒3718511 群馬県前橋市昭和町3-39-15 Gunma (JP).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTI-BAMBI ANTIBODY AND DIAGNOSTIC OR REMEDY FOR COLON CANCER AND LIVER CANCER CONTAINING THE SAME

(54) 発明の名称: 抗BAMBI抗体、及びそれを含有する大腸癌及び肝臓癌の診断剤又は治療剤

(57) Abstract: It is intended to provide an antibody (anti-BAMBI antibody) that recognizes a polypeptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or a polypeptide having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 by deletion, substitution or addition of one to several amino acids; a process for producing the same; a remedy for colon cancer or liver cancer containing the anti-BAMBI antibody; a diagnostic containing a primer or a probe for detecting BAMBI gene; a remedy for colon cancer or liver cancer containing a vector introducing the formation of dsRNA of BAMBI, etc.

(57) 要約: 本発明は、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号1のアミノ配列に1または複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたポリペプチドを認識する抗体 (抗BAMBI抗体)、これを製造する方法、抗BAMBI抗体を含有する大腸癌又は肝臓癌治療剤、BAMBI遺伝子検出用プライマーまたはプローブを含む診断剤、BAMBIのdsRNAを生じさせるベクターを含む大腸癌または肝臓癌の治療剤等を提供する。

WO 2004/106515 A1

1

明細書

抗BAMBI抗体、及びそれを含有する大腸癌及び肝臓癌の診断剤又は治療剤

技術分野

- 5 本発明は、BAMBIタンパク質に対する抗体、その製造方法、それを含有する大腸癌及び肝臓癌の診断剤又は治療剤に関する。

背景技術

- 10 大腸癌の診断においては、CEA または CA19-9 などの腫瘍マーカーが有効であると言われてきた。例えば、特開 2000-323499 号は、血液成分から腫瘍マーカーを検出する腫瘍マーカー定量法を開示している。しかしながら、これらの腫瘍マーカーは、癌の存在と必ずしも関連して発現するとは限らず、また癌以外の要因でも異常値となることがあるため、信頼性が高いものではない。

- 15 また、大腸癌の発生には APC、RAS、p53 等の遺伝子が関係していることが判明している。しかしながら、大腸癌を特異的に検出する、実用性に耐える遺伝子診断法はまだ確立されていない。

- 20 更に、大腸癌治療のうち化学療法では癌遺伝子の転写阻害や DNA 切断等の癌細胞に細胞毒性を持つアルキル化薬や代謝拮抗薬等が検討されてきたが、これらの薬剤は、癌細胞だけに選択的に作用せず、正常細胞にも影響を及ぼし、副作用の問題がある。

大腸癌は最も発症頻度の高い腫瘍の 1 種で、日本でも近年、患者が増加しており、今後さらに増加すると予想されている。そこで、本発明は、大腸癌を適確に診断、治療できる、診断薬および治療薬を提供することを課題としている。

25

発明の開示

大腸癌は、分子レベルでの発症機構が詳しく研究されており、Wnt シグナル伝達系、K-ras、p53、TGF- β 等のシグナル伝達系における異常が高頻度に起きていることが知られている。特に、Wnt シグナル伝達系の異常は大腸癌発症の最も初期にみられ、大腸癌発症の鍵を握っていると考えられることから、本発明者ら

抑制効果を検討することにより、ICATがWntシグナルに異常のある（APC、 β -catenin、Axinの変異）大腸癌、肝癌の増殖を特異的に阻害することを見出している。他方、ICATは、正常細胞や他の機構で癌化した癌細胞には増殖抑制効果を示さない（Cancer Research Vol. 62, 3322-3326）。つまり、ICATは、Wntシグナル伝達経路の異常により亢進した転写活性化を抑制することで、大腸癌細胞の増殖を抑制していると考えられる。

ここで、Wntシグナル系の相互作用を以下に表1としてまとめた。

表1

Wntシグナル伝達関連遺伝子

シグナル伝達に対する作用	物質	作用機構
抑制	APC、Axin、GSK-3 β	β -cateninと複合体を形成して β -cateninの分解を誘導
	ICAT	β -cateninとTCFの結合を阻害
促進	β -catenin、TCF	β -cateninは転写因子Tcf/Le1と結合して転写活性を示す

10

なお、本明細書中で、APCはAdenomatosis Polyposis Coli遺伝子、DshはDishevelled、GSK-3 β はグリコーゲンシンターゼキナーゼ-3 β （glycogen synthase kinase-3 β ）、TCFはT細胞特異的転写因子（T cell-specific transcription factor）、FzはFrizzledホモログをそれぞれ意味する。

更に、本発明者らは、癌細胞の増殖に重要なWntシグナルによって転写活性化される遺伝子は、癌細胞の増殖を抑制するための標的遺伝子となりうると考え、Wntシグナルを負に制御するICATを大腸癌細胞に作用させたときに転写が抑制される遺伝子の同定を試みた。そこで、Wntシグナル伝達経路が恒常的に活性化されている大腸癌細胞株SW48細胞をcDNAサブトラクションDNAチップを用いてICATの作用で発現の低下する遺伝子を探索したところ、BAMBI遺伝子が単離された。

BAMBI（BMP and activin membrane bound inhibitor, BMP : Bone morphogenetic protein）は、最初アフリカツメガエル（Xenopus）から分離され

た推定 260 アミノ酸 (hBAMBI につき配列番号 1 参照) からなる膜貫通型タンパク質で、細胞外ドメインが TGF- β 受容体 I の細胞外ドメインと類似するが、TGF- β 受容体 I とは異なり細胞内領域にセリン/スレオニンキナーゼドメインは有していない。アフリカツメガエルの胚においては、BMP4 の発現に引き続いて BAMBI の発現が起こり、BAMBI は BMP4 により、その発現が制御されていると考えられている (Nature 401, 480-485)。ヒト BAMBI は、1996 年にクローニングされた (「NMA」と命名されていた: Int. J. Cancer 65, 460-465, 1996)。

また、BAMBI は、TGF- β 受容体 I とヘテロ二量体を形成し、更に TGF- β 受容体 II と相互作用し、正常な細胞中では TGF- β 受容体 I と TGF- β 受容体 II が複合体を形成するところ、BAMBI が同複合体の形成を妨げることにより、TGF- β シグナル伝達系を阻害すると考えられている (図 2 参照)。

TGF- β は、多くの上皮細胞の増殖抑制に関与するというユニークな生物活性をもつサイトカインである。TGF- β は、TGF- β 受容体 II に結合して TGF- β 受容体 II 分子内のセリン・スレオニンキナーゼ活性を亢進させ、該キナーゼにより TGF- β 受容体 I がリン酸化される。リン酸化をうけた TGF- β 受容体 I は、Smad2、Smad3 と結合して、リン酸化により活性の亢進した TGF- β 受容体 I 分子内セリン・スレオニンキナーゼが Smad2 および Smad3 をリン酸化する。リン酸化を受けた Smad2 と Smad3 が Smad4 と複合体を形成して核内へ移行し、標的遺伝子の転写活性化を誘導する。多くの大腸癌細胞では、TGF- β 受容体 II、Smad2 および/または Smad4 の変異が見出されており、これらの細胞では、TGF- β による増殖抑制がかからないことが分かっている。

TGF β シグナル伝達と Smad の関係を以下の表 2 にまとめる。

表 2

3 種の Smad の比較

名称	特徴
R-Smad (receptor-regulated Smad)	TGF- β と BMP の経路で特異的なシグナルを伝達する
Co-Smad (common-mediator Smad)	すべての経路に関与し、R-Smad と複合体を形成する
I-Smad (Inhibitory-Smad)	R-Smad、Co-Smad に抑制的に作用する

そこで、本発明者らは、BAMBI に対する抗体、及び BAMBI プライマーまたはプローブを作成することにより、大腸癌及び肝臓癌を検出し診断できることを見出し、更に、BAMBI に対する抗体及び BAMBI をコードする遺伝子もとに作成した siRNA を用いることにより、大腸癌及び肝臓癌の治療ができることを見出し、本発明を完成させたものである。

したがって、本発明は、次に示すような抗体、抗体の製造方法、大腸癌または肝臓癌診断薬、大腸癌または肝臓癌治療薬等を提供する。

1. 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号 1 のアミノ配列に 1 または複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたポリペプチドを認識する抗体。
2. 配列番号 1 のポリペプチドを特異的に認識する前記 (1) に記載の抗体。
3. 配列番号 1 のアミノ酸配列における連続する 50 アミノ酸残基以上を有するポリペプチドを認識する前記 (1) に記載の抗体。
4. 配列番号 1 のアミノ酸配列における 45~147 番及び/又は 177~241 番の領域のアミノ酸残基を有するポリペプチドを認識する前記 (3) に記載の抗体。
5. モノクローナル抗体である前記 (1) に記載の抗体。
6. 前記 (1) に記載の抗体を産生する形質転換細胞を培養する工程、および該細胞が産生する抗体を採取する工程を含む抗体の製造方法。
7. 前記 (1) ~ (6) のいずれかに記載の抗体を含む、大腸癌または肝臓癌診断剤。
8. 前記 (1) ~ (6) のいずれかに記載の抗体を含む、大腸癌または肝臓癌治療剤。
9. 配列番号 2 の塩基配列を有する遺伝子の任意の 15 塩基以上からなるプライマーを含む、大腸癌または肝臓癌診断剤。
10. 配列番号 2 の塩基配列を有する遺伝子断片を含むプローブを含む、大腸癌または肝臓癌診断剤。
11. 配列番号 2 の塩基配列を有する遺伝子の連続する 15~30 塩基に対応し、かつ RNA 干渉を生ずる二重鎖 RNA を含む、大腸癌または肝臓癌治療剤。
12. 上記の連続する 15~30 塩基の配列が、CCACTCTGGCACCACCATA

(配列番号 3)、CAGATGCTCTCCCGTTTGC (配列番号 4)、または CTGCTGTCTGACCTGTGAT (配列番号 5) である、前記 (11) 記載の大腸癌または肝臓癌治療剤。

5

図面の簡単な説明

図 1 は、Wnt シグナル伝達系の概要図である。

図 2 は、TGF β 受容体 I 及び TGF β 受容体 II と BAMBI との相互作用を示す概略図である。

図 3 は、TCF-4DNA 結合領域の電気泳動移動度シフトアッセイの結果である。

10 イントロン 1 に存在する TCF-4 結合配列 5 カ所を合成し (TBE1-5) 放射能標識して GST-TCF と結合するかどうかをゲルシフトアッセイにより検証した。その結果、TBE1-5 は GST-TCF と特異的に結合し、GST とは結合しないこと、反応液中に大過剰の非放射能標識 TBE1-5 が存在すると GST-TCF4 の結合が検出できなくなること、変異を導入した TBE1-5 にはこのような効果がないことが確認された。

15 図 4 は、大腸癌細胞株 SW48 細胞にアデノウイルスベクターを用い、ICAT、TCF-4 ドミナントネガティブ変異体を発現させ、RNA を抽出し、BAMBI や β -ACTIN に対する特異的プライマーを用い準定量的 RT-PCR 分析を行った結果であり、BAMBI の発現は β -catenin-TCF を介した転写活性化によって抑制された。

20 図 5 は、 β -catenin-TCF を介した転写活性化による BAMBI の発現変化について検討した結果である。左側は、SW48 細胞にアデノウイルスを用いて ICAT、TCF-4 ドミナントネガティブ変異体を発現させ、抗 BAMBI-N 末端抗体、抗 α -Tublin 抗体を用いて、細胞抽出液のイムノブロッティングを行った結果である。また、Total RNA を抽出し、BAMBI や G3PDH 特異的プローブを用いてノーザンブロットを行った。右側は、COS-1 細胞にアデノウイルスを用いて β -catenin-S33Y を発現させ、細胞抽出液を調製し、抗 BAMBI-N 末端抗体あるいは抗 α -Tublin 抗体を用いたイムノブロッティングを行った結果である。

25

図 6 は、 β -catenin-TCF-を介した BAMBI プロモーターの転写活性化について検討した結果である。BAMBI プロモーターの β -catenin を介した活性化に対する TCF-4 と ICAT のドミナントネガティブ変異体の作用を検討した。COS-1 細胞

にルシフェラーゼレポータープラスミド (pTOP-tk-luciferase または-575-luc) をトランスフェクトし、ルシフェラーゼ活性を測定した。

図 7 は、大腸癌における BAMBI の発現について、抗 β -catenin 抗体、抗 BAMBI-N 末端抗体と C 末端抗体を用いてヒト大腸癌組織と周辺の非癌組織の二重染色を行って調べた結果である。

図 8 は、準定量的 RT-PCR により調べた大腸癌組織および肝臓癌組織における BAMBI の発現を示す。準定量的 RT-PCR により、BAMBI と AXIN の発現量を調べた (N, 非癌組織 ; T, 癌組織) 。

図 9 は、BAMBI は TGF- β による増殖抑制効果の阻害を示す。図に示したプラスミドを DC-145 細胞にトランスフェクトし、TGF- β 存在下あるいは非存在下に 400 μ g/ml ジェネティシン含有培地で 3 週間培養しコロニーフォーメーションアッセイを行った結果である。

図 10 は、BAMBI による TGF- β を介した転写の活性化を示す。ルシフェラーゼレポーター遺伝子上流に PAI-1 プロモーターの TGF- β 応答配列を含む p3TP-lux レポーターを使い、DU145 細胞における TGF- β を介した転写活性化への BAMBI-GFP の作用を調べた結果である。

図 11 は、抗 BAMBI アミノ末端ラビットポリクローナル抗体 (200 倍希釈) 及び抗 BAMBI マウスモノクローナル抗体 6G (10 倍希釈、100 倍希釈) が BAMBI タンパク質を認識することを実証する、ウエスタンブロットティングの結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

1. BAMBI タンパク質を認識する抗体

本発明に係る「抗体」は、抗原である BAMBI タンパク質を認識する (あるいは結合し得る) 抗体分子全体又はその断片を意味し、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。本明細書中、「BAMBI タンパク質」は、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチド、又は配列番号 1 のアミノ配列に 1 または複数個 (例えば、1 ~ 30 個、1 ~ 20 個、1 ~ 10 個、1 ~ 5 個、1 ~ 2 個から選択) のアミノ酸が欠失、置換または付加されたポリペプチド、又

はこれらの断片（例えば、アミノ酸残基を10～70個、20～60個、30～50個含む断片）を意味する。本発明の抗体は、抗体変異体を含む。「抗体変異体」とは、元の抗体から1またそれ以上（例えば、1～30個、1～20個、1～10個、1～5個、1～2個から選択）のアミノ酸残基が改変された、抗体の変異体をいう。アミノ酸配列がどのように改変されたとしても元となった抗体と同様に BAMBI タンパク質を特異的に認識することができれば、本発明の範囲内に含まれる。このような変異体は、抗体の重鎖若しくは軽鎖の可変ドメインのアミノ酸配列と少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、そして、最も好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列相同性または類似性を有するアミノ酸配列と100%よりも少ない配列相同性、または類似性を有する。

また、本発明の抗体は、ヒト抗体、ヒト型化抗体、キメラ抗体、および抗体断片（例えば、Fab、F(ab')₂、及びFv）を含む。上記「ヒト型化抗体」とはマウス等のヒトにとって異種の抗体を改変して、H鎖とL鎖の相補性決定部以外の一次構造をヒトの抗体の対応する一次構造で置き換えた抗体を言う。「キメラ抗体」とは、異種抗体由来のFab領域とFc領域とを有する抗体を意味する。

本発明において、「抗体断片」とは、全長抗体の一部を指し、一般に、抗原結合領域または可変領域のことである。例えば、抗体断片にはFab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片が含まれる。抗体のパパイン消化により、Fab断片と呼ばれる、それぞれ1つの抗原結合部位を有する2つの同じ抗原結合断片、及び、残りの容易に結晶化するために「Fc」と呼ばれる断片が生じる。また、ペプシン消化により2つの抗原結合部位を有し、抗原を交差結合し得るF(ab')₂断片、及び、残りの別な断片(pFc'と呼ばれる)が得られる。その他の断片としては、diabody (diabodies)、線状抗体、一本鎖抗体分子、及び抗体断片より形成された多特異性抗体が含まれる。

ここで、「Fv」断片は最小の抗体断片であり、完全な抗原認識部位と結合部位を含む。この領域は1つの重鎖及び軽鎖の可変ドメインが非共有結合により強く連結されたダイマーである(V_H-V_Lダイマー)。各可変ドメインの3つの

CDRが相互作用し、 V_H-V_L ダイマーの表面に抗原結合部位を形成する。6
つのCDRは、抗体に抗原結合部位を付与するものである。しかしながら、1
つの可変ドメイン（または、抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半
5 分）であっても、全結合部位よりは低い親和性ではあるが、抗原を認識し結合す
る能力を有する。

また、Fab断片（F(ab)とも呼ばれる）はさらに、軽鎖の定常ドメイン、
及び、重鎖の細胞の定常ドメイン（CH1）を含む。Fab'断片はFab断片
と、抗体のヒンジ領域からの1またはそれ以上のシステインを含む重鎖CH1ド
メインのカルボキシ末端由来の数個の残基を付加的に有する点で異なる。本発明
10 の抗体は、種々の方法のいずれかによって製造することができる。

なお、本明細書において、上記のようなBAMBIタンパク質に対する抗体を「抗
BAMBI抗体」と称する。

以下、抗BAMBI抗体の調製方法について説明する。

(1) 抗原の調整：

15 本発明の抗BAMBI抗体の調製に用いる免疫原として、例えば、配列番号1のア
ミノ酸配列を有するポリペプチドまたは、配列番号1記載のポリペプチドの複数
のアミノ酸を欠失、付加、置換させたポリペプチドを挙げることができる。もち
ろん、配列番号1のアミノ酸配列を有するhBAMBIタンパク質以外にも、他の種
20 のBAMBIタンパク質を免疫原として用いることもできる。更に、BAMBIのエピト
ープ部位が含まれた断片を用いることもでき、例えば、hBAMBIのアミノ酸45～
147番の領域とアミノ酸177～241番の領域とを含む断片を挙げることができる。
本発明の抗体の製造のために用いられる免疫原としては、マウス、ヒト等の細胞
から精製された天然型のBAMBIタンパク質でもよいし、遺伝子工学的に生産され
たBAMBIタンパク質又はその断片でもよい。また、本発明の抗体の製造にもちい
25 る免疫原は、そのアミノ酸配列を指定することにより市販のタンパク質合成装置
を用いて合成することもできる。

(2) モノクローナル抗体の作製

(i) 抗体産生細胞の採取

前記のようにして作製したタンパク質又はペプチドを抗原として、哺乳動物、例えばラット、マウス、ウサギなどに投与する。抗原の動物 1 匹当たりの投与量は、アジュバントを用いないときは 0.1~100mg であり、アジュバントを用いるときは 1~100 μ g である。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント (FCA)、フロイント不完全アジュバント (FIA)、水酸化アルミニウムアジュバント等が挙げられる。免疫は、主として静脈内、皮下又は腹腔内等に注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは 2~5 週間間隔で、1~10 回、好ましくは 2~5 回免疫を行う。そして、最終の免疫日から 1~60 日後、好ましくは 1~14 日後に抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞等が挙げられるが、脾臓細胞又は局所リンパ節細胞が好ましい。

(ii) 細胞融合

ハイブリドーマを得るため、抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行う。抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞として、マウスなどの動物の一般に入手可能な株化細胞を使用することができる。使用する細胞株としては、薬剤選択性を有し、未融合の状態では HAT 選択培地 (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを含む) で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが好ましい。ミエローマ細胞としては、例えば X63Ag. 8. 653、NSI/1-Ag4-1、NS0/1 などのマウスミエローマ細胞株、YB 2/0 などのラットミエローマ細胞株が挙げられる。

次に、上記ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを細胞融合させる。細胞融合は、血清を含まない DMEM、RPMI-1640 培地などの動物細胞培養用培地中で、 1×10^6 ~ 1×10^7 個/ml の抗体産生細胞と 2×10^5 ~ 2×10^6 個/ml のミエローマ細胞とを混合し (抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞比 2 : 1 ~ 3 : 1 が好ましい)、細胞融合促進剤存在のもとで融合反応を行う。細胞融合促進剤として、平均分子量 1000~6000 ダルトンのポリエチレングリコール等を使用することができる。また、電気刺激 (例えばエレクトロポレーション) を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

(iii) ハイブリドーマの選別及びクローニング

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。その方法として、細胞懸濁液を例えばウシ胎児血清含有 RPMI-1640 培地などで適当に希釈後、マイクロタイタープレート上に 3×10^5 個/well 程度まき、各ウエルに選択培地を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。その結果、選択培地で培養開始後、14 日前後から生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

次に、増殖してきたハイブリドーマの培養上清中に、BAMBI タンパク質に反応する抗体が存在するか否かをスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは、通常の方法に従えばよく、特に限定されるものではない。例えば、ハイブリドーマとして生育したウエルに含まれる培養上清の一部を採集し、酵素免疫測定法、放射性免疫測定法等によってスクリーニングすることができる。融合細胞のクローニングは、限界希釈法等により行う。そして、最終的に、BAMBI タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体を産生する細胞であるハイブリドーマを樹立する。

15 (iv) モノクローナル抗体の採取

樹立したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法として、通常の細胞培養法又は腹水形成法等を採用することができる。細胞培養法においては、ハイブリドーマを 10%ウシ胎児血清含有 RPMI-1640 培地、MEM 培地又は無血清培地等の動物細胞培養培地中で、通常の培養条件 (例えば 37°C、5% CO₂ 濃度) で 7 ~14 日間培養し、その培養上清から抗体を取得する。腹水形成法の場合は、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種系動物の腹腔内にハイブリドーマを約 1×10^7 個投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、1~2 週間後に腹水を採取する。上記抗体の採取方法において抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。

(3) BAMBI タンパク質に対するポリクローナル抗体の作製

前記の通り調製された抗原を哺乳動物、例えばラット、マウス、ウサギなどに投与する。抗原の動物 1 匹当たりの投与量は、アジュバントを用いないときは

0.1~100mgであり、アジュバントを用いるときは10~1000 μ gである。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)、水酸化アルミニウムアジュバント等が挙げられる。免疫は、主として静脈内、皮下又は腹腔内等に注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは2~5週間間隔で、1~10回、好ましくは2~5回免疫を行う。そして、最終の免疫日から6~60日後に、酵素免疫測定法(ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)又はEIA(enzyme immunoassay))、放射性免疫測定法(RIA; radioimmuno assay)等で抗体価を測定し、最大の抗体価を示した日に採血し、抗血清を得る。

10 次いで、抗血清中のポリクローナル抗体を、BAMBIタンパク質で固定されたアフィニティカラムにかけてBAMBIタンパク質と反応する抗体(カラム吸着画分)を採取する。BAMBIタンパク質に対する抗血清中のポリクローナル抗体の反応性はELISA法などで測定することができる。

15 なお、ヒト型化抗体は、免疫原(抗原)をヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト哺乳動物に免疫し、既存の一般的な抗体産生方法によって取得することができる。用いるヒト型化抗体産生非ヒト哺乳動物、特にヒト型化抗体産生トランスジェニックマウスの作製方法は公知である(Nature Genetics 7:13-21(1994); Nature Genetics 15:146-156(1997);特表平4-504365号公報;特表平7-509137号公報;国際出願公開WO94/25585号公報; Nature 368:856-859(1994);特表平6-500233号公報等)。

2. 大腸癌または肝臓ガン治療剤

25 さらに、抗BAMBI抗体は、抗体医薬として用いることもできる。本発明の治療剤として用いる抗体としては、例えば、好ましくはヒトキメラ抗体またはヒト化抗体を用いることができる。本発明の治療剤は、抗BAMBI抗体を有効成分として含有するもので、大腸癌または肝臓癌の治療(または予防)に有効である。本発明の治療剤は患者(ヒトあるいは非ヒト動物)に応じて、投与量、剤型、投与方法を適宜選択することが出来る。例えば、本発明の治療剤は、経口、非経口、局

所その他の適当な経路で投与することができる。一般に有効成分である抗体の投与量は、1日あたり約1mgから約3000mg、好ましくは、5mgから2000mgの間であるが、患者の体重および症状や個々の投与経路によって変動し得る。治療する患者の薬物に対する感受性の差異、薬剤の処方仕方、投与期間および投与間隔によっても投与量に変動が生じてくるので、場合によっては前記範囲の下限より低い投与量が適当なこともある。

本発明の抗体は、単独または薬学的あるいは薬剤学的に許容される担体または希釈剤と共に投与することができ、またその投与は1回または数回に分けて行うことができる。より具体的に述べると、本発明の治療剤は、たとえば各種の薬剤学的に許容される不活性担体と併用して錠剤、カプセル、粉末剤、噴霧剤、水性懸濁液、注射液、エリキシル、シロップ等の形態とすることができる。これらの担体には、固体希釈剤または賦形剤、無菌水性媒体、各種の非毒性有機溶媒等が含まれる。一般に本発明の治療上有効な抗体は、上記のような形態で約5重量%から70重量%の濃度範囲で投与される。経口投与の場合、微晶質セルロース、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸ジカリウム、グリシンのような種々の賦形剤を、澱粉、アルギン酸やある種のケイ酸複塩のような種々の崩壊剤、ポリビニルピロリドン、蔗糖、ゼラチン、アラビアゴムのような顆粒形成結合剤と共に使用することができる。また、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、タルク等の滑沢剤も錠剤形成に非常に有効である。経口投与用として水性懸濁液および/またはエリキシルにしたい場合、必要であれば乳化剤および/または懸濁化剤も併用し、水、エタノール、プロピレングリコール、グリセリン等、およびそれらを組み合わせた希釈剤と共に使用することができる。非経口投与の場合、本発明の有効成分をゴマ油または落花生油のいずれかに溶解するか、あるいはプロピレングリコール水溶液に溶解した溶液を使用することができる。水溶液は必要に応じて適宜に緩衝し（好適にはpH8以上）、液体希釈剤をまず等張にする必要がある。このような水溶液は静脈内注射に適し、油性溶液は関節内注射、筋肉注射および皮下注射に適する。

3. 本発明の抗BAMBI抗体を含有する診断剤

本発明の抗 BAMB I 抗体、特にモノクローナル抗体は、BAMB I タンパク質の検出及び定量ができるので大腸癌又は肝臓癌の診断に用いることができる。この抗体を用いて大腸癌又は肝臓癌の診断をする方法は、例えば、(a) 本発明のモノクローナル抗体またはその断片と試料とを反応させる工程；及び (b) 工程 (1) で形成した抗原抗体複合体と、検出のための標識抗体とを反応させる工程を含む。本発明の診断剤を用いる診断方法は、抗体を用いるアッセイ、即ち免疫アッセイであれば、いずれの方法でもよく、例えば、酵素免疫測定法 (E L I S A)、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法 (R I A)、発光免疫測定法、酵素抗体法、蛍光抗体法、免疫比濁法、ラテックス凝集反応、ラテックス比濁法、赤血球凝集反応、粒子凝集反応又はウエスタンブロット法等が挙げられる。

本発明の検出及び/又は定量法に供される試料としては、血液、血清、血漿、リンパ球培養上清、尿、髄液、唾液、汗、腹水、羊水、又は細胞あるいは臓器の抽出液等、BAMB I タンパク質が含まれる可能性のある生体試料であれば特に限定されない。本発明の検出及び/又は定量法を酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法又は発光免疫測定法等の標識抗体を用いた免疫測定法により実施する場合には、サンドイッチ法又は競合法により行うこともでき、サンドイッチ法の場合には固相化抗体及び標識抗体のうち少なくとも1種が本発明のモノクローナル抗体であればよい。

標識抗体とは、標識物質で標識された抗体を意味し、これらの標識抗体は、試料 (例えば、血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等) 中に含まれる抗原 (即ち、エボラウイルスの核タンパク質) を検出または定量するために用いることができる。本発明で用いることができる標識物質は、抗体に物理的結合又は化学的結合等により結合させることによりそれらの存在を検出可能にするものであれば特に限定されない。標識物質の具体例としては、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が挙げられ、より具体的には、ペルオキシダーゼ、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、または化学発光物質が挙げられる。標識物質と抗体との結合法は、グルタルアルデヒド法、マレイミド法、ピリジルジスルフィド法又は過ヨウ素酸法等の公知の方法を用いることができる。

ここで、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すことができるが、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すことができないため、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生じる。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を反応させるのが一般的である。必要に応じてさらに該基質に依存する種々の発色物質が用いられる。

固定化抗体は、試料（例えば、血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等）中に含まれる抗原を検出、定量、分離または精製するために用いることができる。抗体を固定化するのに使用できる不溶性担体としては、例えば、（1）ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂あるいはナイロン樹脂等からなるプラスチックや、ガラス等に代表されるような水に不溶性の物質からなるプレート、試験管若しくはチューブ等の内容積を有するもの、ビーズ、ボール、フィルター、あるいはメンブレン等、並びに（2）セルロース系担体、アガロース系担体、ポリアクリルアミド系担体、デキストラン系担体、ポリスチレン系担体、ポリビニルアルコール系担体、ポリアミノ酸系担体あるいは多孔性シリカ系担体等のようなアフィニティークロマトグラフィーに用いられる不溶性担体を挙げるることができる。

4. 本発明の抗 BAMB1 抗体を用いる大腸癌又は肝臓癌診断用キット

本発明の診断用キットは、本発明の抗 BAMB1 抗体、好ましくはモノクローナル抗体を含むものである。ここで用いる抗体は、上記した固定化抗体とや標識抗体

でもよい。例えば、本発明の抗体を一次抗体として使用する場合、本発明のキットには、抗原抗体結合反応により形成された複合体を検出するための二次抗体を含めてもよい。本発明のキットには、該キットを効率的かつ簡便に利用できるようにするために、これら抗体以外に種々の補助剤を含めてもよい。補助剤として

5 は、例えば固体状の二次抗体を溶解させるための溶解剤、不溶化担体を洗浄するために使用される洗浄剤、抗体の標識物質として酵素を使用した場合に酵素活性を測定するための基質、その反応停止剤などの免疫学的測定試薬のキットとして通常使用されるものが挙げられる。

本発明は、さらに、BAMBI をコードする遺伝子をもとに設計したプライマーを用いて、PCR 法、RT-PCR 法等の核酸増幅法を用いて、BAMBI mRNA を検出すること

10 による、大腸癌・肝臓癌の診断剤・診断方法、更には、BAMBI をコードする遺伝子の断片をもとに設計したプローブを含む診断剤・診断法を包含する。

本発明で用いるプライマーとしては、例えば、配列番号 2 記載の塩基配列中、連続する 15 塩基以上、好ましくは、20 塩基以上 50 塩基以下のプライマーを用

15 いることができる。プライマーセットとして、好ましくは、フォワードプライマーとリバースプライマーの間の距離が 500 塩基以下となるように設計することができる。必要に応じて、プライマーには、標的である BAMBI 遺伝子と相補的でない配列部分を含めることも可能であり、また、例えば、タグ配列を付加することもできる。

本発明で用いるプローブとしては、BAMBI に特徴的な配列を含む BAMBI 遺伝子断片、好適には、塩基長 50~150bp のものを用いる。プローブは、例えば、放射性標識として ^{32}P で標識することができる。また、必要に応じ、プローブを蛍光標識、発光標識または酵素標識等することもできる。当業者であれば、用いた標識物質に適切な検出方法で、BAMBI 遺伝子を検出することができる。更に、プロ

25 ーブをビオチン化したものを用いることもでき、これをアビジン蛍光色素で処理し蛍光検出する方法も可能である。

5. 二重鎖 RNA を含有する大腸癌又は肝臓癌治療剤等

更に、本発明には、RNA干渉 (RNAi) により、BAMBI の mRNA を特異的に分解することによる大腸癌または肝臓癌の治療剤が含まれる。特に好適には、21~25塩基長の RNA 干渉を生ずる二重鎖 RNA、例えば、dsRNA (double strand RNA)、siRNA (small interfering RNA) 又は shRNA (short hairpin RNA) が好ましく用いられ、リポソームなどの送達システムにより所望の部位に局所送達させることも可能であり、また上記二重鎖 RNA が生成されるようなベクターを用いてこれを局所発現させることができる。このような二重鎖 RNA は BAMBI の発現を抑えるリサーチツールとしても利用できる。このような二重鎖 RNA (dsRNA、siRNA 又は shRNA) の調製方法、使用方法などは、多くの文献から公知である (特表 2002-516062 号; 米国公開許第 2002/086356A 号; Nature Genetics, 24 (2), Feb., 180-183; Genesis, 26 (4), April, 240-244; Nature, Spe. 21, 407:6802, 319-20; Genes & Dev., Vol. 16, (8), Apr. 16, 948-958; Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 99 (8), 16 Apr., 5515-5520; Science, 296 (5567), 19 Apr., 550-553; Proc Natl. Acad. Sci. USA, Apr. 30, 99:9, 6047-6052; Nature Biotechnology, Vol. 20 (5), May, 497-500; Nature Biotechnology, Vol. 20 (5), May, 500-508; Nucleic Acids Res., May 15, 30:10, e46 等参照)。

更に、本発明の抗 BAMBI 抗体は、大腸癌・肝臓癌細胞への薬物輸送システムとしても利用することができる。例えば、抗 BAMBI 抗体に薬剤封入体を結合した、抗 BAMBI 抗体-薬剤封入体複合体を用いることができる。薬剤としては、抗癌性低分子薬剤や、高分子毒素を使用でき、MTX、アドリアマイシン、ジフテリアトキシン、リシン等を挙げ得ることができる。

実施例

以下、本発明を実施例に基づいてより具体的に説明する。

25 [参考例 1]

hBAMBI、 β -catenin 発現アデノウイルスベクター、hBAMBI 発現ベクターの調製

(1) プラスミドと組換えウイルスの構築

hBAMBI-ルシフェラーゼレポータープラスミドの構築のため、プロモーター領

域、エクソン、イントロンの全長を含むヒト BAC クローン RPCI-13-43N24 を BACPAC Resources から購入した。最長の 7.3kb の構築物またはその欠失変異体構築物は、pGL3-プロモーター・ベクター (Promega) 中にある適当な制限酵素切断部位内にそれぞれの DNA 断片をクローニングして作製した。

- 5 TCF/LEF 結合配列の点変異体は Pyrobest DNA ポリメラーゼ (TAKARA) を用いて標準的な PCR 法により作製した。プライマーは以下のものを使用した。(置換した塩基は下線で記載されている) :

TBE1 : 5'-GCTGCAGAGGATTGATTAGCGGTAG-3' (配列番号 6) および

5'-CTACCGCTAATCAATCCTCTGCAGC-3' (配列番号 7) ;

- 10 TBE2 : 5'-CTCTGTGTCTAGTTAAATGTATCTCTG-3' (配列番号 8) および 5'-CAGAGATACATTAACTAGACACAGAG-3' (配列番号 9) ;

TBE3 : 5'-CTCTAAGTGTAGTTATATCTCTGAATG-3' (配列番号 10) および 5'-CATTCAAGATATAACTACACTTAGAG-3' (配列番号 11) ;

TBE4 : 5'-CTGAAAATATAGAAAGCGGGCAGAAC-3' (配列番号 12) および 5'-

- 15 GTTCTGCCCGCTTTCTTATATTTCCAG-3' (配列番号 13) ;

TBE5 : 5'-CTAAAAGTTCATGCAGTAAATTTGGG-3' (配列番号 14) および 5'-CCCAAATTAACTGCATGAACTTTTAG-3' (配列番号 15) 。

pTOP-tk-ルシフェラーゼと pFOP-tk-ルシフェラーゼは V. Korinek and H. Clevers (University Medical Center, Utrecht, The Netherlands) より提供を受けた。myc タグを付加した Icat と LacZ を導入したアデノウイルスは既述の方法で作製した (Sekiya et al. Cancer Res. 62, 3322-3326 (2002))。33 位のセリンをチロシンに置換した安定型 β -catenin を発現するアデノウイルスベクターは、pAdenoXTM 発現システム (Clontech) を使い、製品添付のマニュアルに従って作製した。GFP-融合全長 hBAMBI 発現ベクターである pEGFP-N3-hBAMBI は pEGFP-

25 N3 ベクター (Clontech) に RT-PCR 産物をクローニングすることにより作製した。詳細には、ヒト大腸癌細胞 SW48 より抽出した total RNA に対し逆転写を行い、hBAMBI の ORF 全長を増幅するためのプライマー 5'-

CATGAATTCCGCCACCATGGATCGCCACTCCAGCTAC-3' (配列番号 16) および 5'-

CATCTCGAGTACGAACACCAGCAACCCGTGC-3' (配列番号 17) を用いて PCR により増幅

し、全長 hBAMBI を得た。該増幅産物には両末端に EcoRI 切断部位と XhoI 切断部位が付加されているので、それらを制限酵素処理し、pEGFP-N3 ベクター (Clontech) のマルチクローニングサイトの EcoRI、SalI サイトに挿入し、pEGFP-N3-hBAMBI を構築した。この pEGFP-N3-hBAMBI 構築物は hBAMBI 遺伝子と GFP 遺伝子がインフレームで連結されており、これをほ乳動物細胞で発現させると、カルボキシ末端に GFP タンパク質の付加された全長 hBAMBI タンパク質を発現する。

hBAMBI (hBAMBIDN) のアミノ酸 20~131 番の欠損した欠失変異体についても同様に GFP 発現ベクターを構築した。

10 [参考例 2]

GST-TCF4 融合タンパク質の調製

電気泳動移動度シフト分析 (EMSA)

GST-TCF4 融合タンパク質は、以下のプライマーを用いて、ヒト TCF4 の 265 番~496 番のアミノ酸をコードする配列の PCR 産物を用いて作製した：

- 15 5'-CATGAATTCGCTTCCGTGTCCAGGTTCCCTCC-3' (配列番号 18) および
5'-CATCTCGAGCTAGCCTAGCAGGTTCCGGGAGGG-3' (配列番号 19)。

PCR 産物を pGEX-5X-1 (Pharmacia) にクローニングした。GST 及び GST-TCF4 は大腸菌 DH-5 α 株から精製した。DNA 結合アッセイは既出の方法に従って行った (Tago et al. Gene & Development Vol. 14, p. 1741-1749)。

- 20 使用したプローブはそれぞれ以下のような組み合わせでアニーリングさせた：

- 5'-GCTGCAGAGGCTTTGTTAGCGGTAG-3' (配列番号 20) および
5'-CTACCGCTAACAAAGCCTCTGCAGC-3' (配列番号 21)、
5'-CTCTGTGTCTCTTTGAATGTATCTCTG-3' (配列番号 22) および
5'-CAGAGATACATTCAAAGAGACACAGAG-3' (配列番号 23)、
25 5'-CTCTAAGTGTCTTTGTATCTCTGAATG-3' (配列番号 24) および
5'-CATTCAGAGATACAAAGACACTTAGAG-3' (配列番号 25)、
5'-CTGGAAATATCAAAGCGGGCAGAAC-3' (配列番号 26) および
5'-GTTCTGCCCCGCTTTGATATTTCCAG-3' (配列番号 27)、
5'-CTAAAAGTTCATGCCTTTGAATTTGGG-3' (配列番号 28) および

5' -CCCAAATTCAAAGGCATGAACTTTTAG-3' (配列番号 29)。

変異型 hBAMBI-ルシフェラーゼ構築物の作製に使用したオリゴヌクレオチドを、変異型競合分子として使用した。

[参考例 3]

5 細胞及び病理サンプルの調製

全ての細胞は単層で適切な培地を用いて培養した。COS-1、DU-145、HepG2、Alexander 細胞は DMEM 培地 (NISSUI)、SW48、SW480 細胞は Leibovitch's L-15 培地 (SIGMA)、HCT116 細胞は McCoy's 5A 培地 (SIGMA) にそれぞれ 10%ウシ胎児血清 (FCS) を添加して培養した。全ての細胞は 37°C に設定したインキュベーター内で 5%CO₂ 保湿条件下で培養した。癌組織や対照の非癌組織サンプルは患者のインフォームドコンセントを得た上で、外科手術の際に摘出した。

[参考例 4]

大腸癌細胞株 SW48 にアデノウイルスベクターを用いて ICAT や DN-TCF4 を発現させ、準定量的 RT-PCR またはイムノブロットにより mRNA またはタンパク質の発現量の変化を測定した。

更に、 β -catenin S33Y は、 β -catenin の 33 番目のセリン残基がチロシン残基に置換されたもので、活性型変異 β -catenin である。かかる変異は大腸癌細胞で認められている。これを 293 細胞にアデノウイルスを用いて発現させ、BAMBI の発現量を測定した。

20 (1) 準定量的 RT-PCR

総 RNA は、NucleoSpin (MACHEREY-NAGEL) を用いて抽出した。総 RNA (1 レーンあたり 20 μ g) をホルムアルデヒド含有 1%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、Hybond-N⁺ (Amersham Pharmacia Biotech) に転写した。対象の遺伝子特有の ³²P-標識 cDNA プローブをハイブリダイズさせ、AS1500 (FUJI FILM) で検出した。図 4 に結果を示している。

(2) イムノブロットティング

イムノブロットティングは前述の方法で行った (Matsumine et al. 1996)。そして、(1) ICAT は BAMBI の発現を抑制する、(2) TCF4 のドミナントネガティブ変異体 (DN-TCF4) も BAMBI の発現を抑制する、さらに、(3) 活性型変

異 β -catenin の作用により BAMBI の発現は亢進する、ということを見出した。
図 5 に結果を示す。

[参考例 5]

<BAMBI プロモーターの解析>

- 5 BAMBI プロモーターをルシフェラーゼに連結したレポーター構築物を作成し、
ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を測定した。

(1) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

- 10 BAMBI プロモーターの β -catenin を介した活性化に対する TCF-4 と ICAT のド
ミナントネガティブ変異体の作用を、COS-1 細胞にルシフェラーゼレポータープ
ラスミド (pTOP-tk-luciferase または -575-luc) をトランスフェクトしてルシ
フェラーゼ活性を測定することにより、検討した。

- 細胞はトランスフェクション 18 時間前に 12 ウェルディッシュに播いた。トラ
ンスフェクションは Lipofectamin PLUS (Invitrogen) を用いて製品添付のプロト
コルに従って行った。ルシフェラーゼアッセイは Dual-Luciferase Reporter
15 Assay System (Promega) を用いて製品添付のプロトコルに従って行った。

その結果、(1) BAMBI プロモーターは β -catenin S33Y により活性化され、
DC-TCF4 および ICAT により不活性化されることが見出された。図 6 に結果を示
す。

[実施例 1]

- 20 抗 BAMBI 抗体による大腸癌の検出

(1) 抗 BAMBI 抗体の調製

- 25 N 末端及び C 末端に対する抗体は、hBAMBI のアミノ酸 45~147 番の領域とアミ
ノ酸 177~241 番の領域をそれぞれ含む GST 融合タンパク質を大腸菌で発現させ
たものを、ウサギ (ニュージーランドホワイト種) に免疫し、免疫後の血清を抗
原を用いアフィニティ精製することにより作製した。 β -catenin に対するマウ
スモノクローナル抗体は、Transduction Laboratories から購入した。 α -
tubulin に対するマウスモノクローナル抗体は OncogeneTM から購入した。

(2) 抗 BAMBI 抗体を用いた免疫組織化学法 (Immunohistochemical analysis)

パラフィン包埋組織切片の免疫染色は標準の方法で行った。概略は、キシレンで切片の脱パラフィンを行い、特級エタノール/蒸留水により水和した。クエン酸バッファー (pH 6.0) にスライドガラスをいれ、15 分間超音波処理してから、標識抗原とともに 4℃で一晩、インキュベートした。染色パターンは RITC 標識抗マウス抗体および FITC 標識抗ウサギ抗体を使ってそれぞれ可視化した。切片は共焦点顕微鏡で観察し写真撮影した。

その結果、BAMBI の発現は大腸癌で高く、正常部で低いことが見出された。図 7 に結果を示す。

[実施例 2]

10 (1) 準定量的 RT-PCR

大腸癌 18 症例、肝臓癌 10 症例につき RT-PCR で BAMBI の発現を検討した。総 RNA は癌組織と対照の非癌組織から NucleoSpin (MACHEREY-NAGEL) を用いて抽出した。第 1 鎖 cDNA はランダムヘキサマーと Superscript II 逆転写酵素

(Invitrogen) を使って合成した。PTC-2000 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) を用いて PCR には、各種サンプルの cDNA 1 μ l をそれぞれの反応で使用した。PCR に用いたプライマーは、以下の通りである：

hBAMBI プライマー：5'-CAGGGGTGAGGCCTCAGGAC-3' (配列番号 30) および 5'-CAAATTCAGCTCCCTTGGATGC-3' (配列番号 31) ；

Axin2：5'-GCCAGCCGGCACCATCTGTG-3' (配列番号 32) および 5'-CGAAGCCCACTGGCCGATTC-3' (配列番号 33) ；

β アクチン (β -ACTIN)：5'-ACACTGTGCCCATCTACGAG-3' (配列番号 34) および 5'-AGTCCTGCTTGCTGATCCAC-3' (配列番号 35) 。

PCR 条件は最初の熱変性 94℃3 分に続いて、94℃30 秒、62℃30 秒、72℃30 秒のサイクルを、hBAMBI については 30 サイクル、Axin2 については 32 サイクル、 β -ACTIN については 23 サイクル実施した。全ての PCR 反応は反応液 25 μ l、開始時の熱変性は 94℃3 分間で行い、続いて 94℃30 秒、62℃30 秒、72℃1 分のサイクルで増幅反応を行った。PCR 産物は 1%アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色で検出した。

その結果、大腸癌 18 例中 13 例で、肝臓癌では 10 例中 3 例で BAMBI の発現亢進がみられた。図 8 に結果を示す。

[実施例 3]

前立腺癌 Du145 (BAMBI の発現が低い) に BAMBI を発現させ TGF- β 存在下または非存在下でフォーカスアッセイを行った。さらに得られたフォーカスをピックアップして培養し、TGF- β による転写活性化誘導の強度をルシフェラーゼアッセイにより測定した。

コロニー形成アッセイは次のように行った。DU145 細胞は、播種 1 日前に Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いて製品添付のプロトコルに従って、対象のプラスミドでトランスフェクトした。細胞 (5×10^5 細胞) は 10cm ディッシュに播き、400mg/ml G418 (GIBCO) で選択し、1ng/ml TGF- β 1 添加または非添加の状態

10 で培養した。培地交換と TGF- β 1 刺激は 5 日おきに行った。播種 3 週間後、コロニーは、メチレンブルーで染色するか、次の実験に用いるために単離した。

その結果、Du145 細胞の増殖は TGF- β の作用により強く抑制されたが、BAMBI を発現すると TGF- β による増殖抑制が阻害されること、BAMBI を発現している Du145 細胞は TGF- β シグナルに感受性が高く、標的遺伝子の転写活性化が亢進

15 することが分かった。図 9 に結果を示す。

[実施例 4]

BAMBI を高発現している大腸癌細胞 Alexander と肝癌細胞株 HepG2 に BAMBI の RNAi を発現させルシフェラーゼアッセイを行った。

20

以下の siRNA をコードする DNA オリゴヌクレオチドを pSUPER (Brummelkamp et al.) にサブクローニングして用いた:

siRNA-1; CCACTCTGGCACCACCATA (配列番号 3)

siRNA-4; CAGATGCTCTCCCGTTTGC (配列番号 4)

25 siRNA-9; CTGCTGTCTGACCTGTGAT (配列番号 5)。

図 10 に結果を示す。

その結果、shRNA の RNAi により BAMBI の発現が低下した。BAMBI の発現が低下すると癌細胞は TGF- β シグナルへの感受性が増大して標的遺伝子の転写活性化が亢進することが示唆された。

[実施例 5]

293T 細胞に pEGFP-C2 (GFP)、pEGFP-N3-hBAMBI (BAMBI-GFP) をトランスフェクションしたのから Lysate を回収し、ウェスタンブロッティングを行った。

5 各レーンにロードしたタンパク量は 30 μ g に統一した。

抗体としては、抗 BAMBI アミノ末端ラビットポリクローナル抗体 (200 倍希釈)、抗 BAMBI マウスモノクローナル抗体 6G (10 倍希釈、100 倍希釈) を使用した。抗 BAMBI アミノ末端ラビットポリクローナル抗体及び抗 BAMBI マウスモノクローナル 6G は次のようにして作製した。

10 (抗 BAMBI アミノ末端ラビットポリクローナル抗体の作製)

抗 BAMBI-N 末抗体の作製には GST 融合型 hBAMBI aa45-147、抗 BAMBI-C 末抗体の作製には aa177-241 500 mg をそれぞれ ADJUVANT COMPLETE FREUND (DIFCO) と混合し、それぞれ 2 匹ずつのニュージーランドホワイト

15 種のウサギ皮内に注射することにより初回免疫を行った。その後、2 週間おきに、抗 BAMBI-N 末抗体の作製には GST 融合型 hBAMBI aa45-147、抗 BAMBI-C 末抗体の作成には aa177-241 200mg をそれぞれ ADJUVANT INCOMPLETE FREUND (DIFCO) と混合し、ウサギ皮内に注射することにより追加免疫を行った。約 5 回の追加免疫の後、ウサギの耳動脈から約 50 ml の血液を採血し、

20 ションを行った。翌日、3000 rpm、4°C で 10 分間遠心を行った後、上清を分注し、これを抗 BAMBI 抗血清とした。抗血清は、まず GST とビーズを結合させた粒子を充填したカラムに通すことにより、GST と結合する抗体を除去した。続いて、抗原をビーズに結合させた粒子を充填したカラムに通すことにより、抗原に特異的に結合する抗体をカラムに吸着させた。その後、吸着した抗体を溶出し、これを抗 BAMBI ポリクローナル抗体とした。

25

(抗 BAMBI マウスモノクローナル 6G の作製)

__BALB/C マウス 3 匹に GST 融合型 hBAMBI aa45-147 を、初回 200 μ g、以後 2 週間おきに 50 μ g を 2 回、背部皮下に免疫した。アジュバントは、初回フロイント完全アジュバント(FCA)、以後フロイント不完全アジュバント(FIA)を

- 抗原と 1:1 で混合して免疫した。尾静脈採血して血清を採取し、最も血清力価の高い個体について、最終免疫日から 25 日後屠殺し脾臓細胞を採取した。ミエローマ細胞は P3U1(P3X63 Ag8U.1)を用い、脾細胞：ミエローマ細胞=5:1 で混合し、Polyethylene glycol Solution Hybri-Max, 50%(W/V)(SIGMA)を用いて細胞融合した。マイクロタイタープレート上に 2×10^5 個(脾細胞)/well でまき、HAT Media Supplement (50×) Hybri-Max(SIGMA)により抗体産生ハイブリドーマを得た。スクリーニングは、融合後 11 日目に、培養上清の一部を採集し、GST あるいは GST 融合型 hBAMBI aa45-147 を固相化した EIA プレートを用いて ELISA を行い、GST 融合型 hBAMBI aa45-147 にのみ反応する well を選択した。クローニングは限界希釈法により計 3 回行った。そして、最終的に、BAMBI タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体を産生する細胞であるハイブリドーマを樹立した。ハイブリドーマを 10%ウシ胎児血清含有 RPMI-1640 培地中で 26 日間培養し、その培養上清から抗 BAMBI モノクローナル抗体を取得した。
- 15 ウェスタンブロッティングの結果を図 1 1 に示す。図 1 1 に示されるように、抗 BAMBI マウスモノクローナル抗体 6G は、BAMBI タンパク質を特異的に認識したことが分かる。

産業上の利用可能性

- 20 本発明の抗 BAMBI 抗体は、大腸癌又は肝臓癌治療剤の有効成分として利用することができる。また、本発明は、抗 BAMBI 抗体、BAMBI 検出用プライマー、または BAMBI 検出用プローブを用いることで、従来の確な検出の困難であった大腸癌または肝臓癌の検出を可能とする実用上優れたものである。さらに、本発明は、BAMBI を発現するタイプの大腸癌であるかどうかを確認することができるので、
- 25 BAMBI を抑制することによる治療方法が有効であるか否かの指標とすることができる。

本発明は、抗 BAMBI 抗体、または BAMBI 遺伝子を基にした二本鎖 RNA を用いた RNA 干渉を利用し、従来困難であった大腸癌または肝臓癌の治療を可能とするも

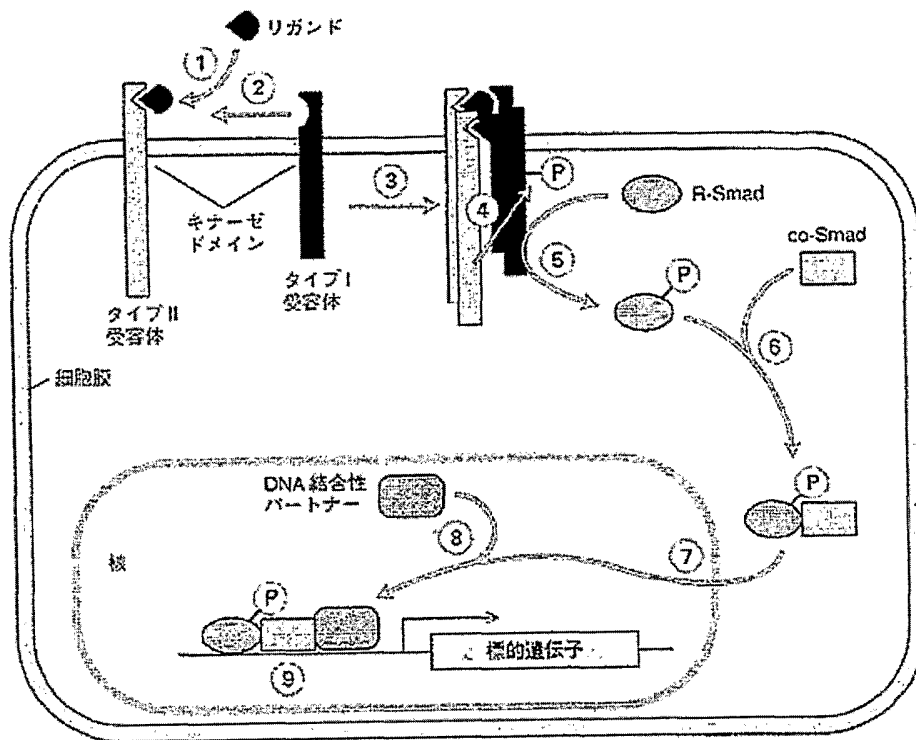
のである。特に、BAMBIにより、TGF- β の増殖抑制効果が低下していた場合、本発明の治療剤により、増殖抑制効果の改善が期待できるものである。

請求の範囲

1. 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号 1 のアミノ配列に 1 または複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたポリペプチドを認識する抗体。
5
2. 配列番号 1 のポリペプチドを認識する前記請求項 1 に記載の抗体。
3. 配列番号 1 のアミノ酸配列における連続する 50 アミノ酸残基以上を有するポリペプチドを認識する前記請求項 1 に記載の抗体。
4. 配列番号 1 のアミノ酸配列における 45～147 番及び／又は 177～241 番の
10 領域のアミノ酸残基を有するポリペプチドを認識する前記請求項 3 に記載の抗体。
5. モノクローナル抗体である前記請求項 1～4 のいずれかに記載の抗体。
6. 前記請求項 1 に記載の抗体を産生する形質転換細胞を培養する工程、および該細胞が産生する抗体を採取する工程を含む抗体の製造方法。
7. 前記請求項 1～6 のいずれかに記載の抗体を含む、大腸癌または肝臓癌診
15 断剤。
8. 前記請求項 1～6 のいずれかに記載の抗体を含む、大腸癌または肝臓癌治療剤。
9. 配列番号 2 の塩基配列を有する遺伝子の任意の 15 塩基以上からなるプライマーを含む、大腸癌または肝臓癌診断剤。
- 20 10. 配列番号 2 の塩基配列を有する遺伝子断片を含むプローブを含む、大腸癌または肝臓癌診断剤。
11. 配列番号 2 の塩基配列を有する遺伝子の連続する 15～30 塩基に対応し、かつ RNA 干渉を生ずる二重鎖 RNA を含む、大腸癌または肝臓癌治療剤。
12. 上記の連続する 15～30 塩基の配列が、CCACTCTGGCACCACCATA
25 (配列番号 3)、CAGATGCTCTCCGTTTGC (配列番号 4)、または
CTGCTGTCTGACCTGTGAT (配列番号 5) である、請求項 11 記載の大腸癌または肝臓癌治療剤。

13. 配列番号2の塩基配列を有する遺伝子の連続する15~30塩基に対応し、かつRNA干渉を生ずる二重鎖RNAを発現可能な形で含有するベクターを含む、請求項11または12記載の大腸癌または肝臓癌治療剤。

図 1



TGF シグナル伝達経路

図 2

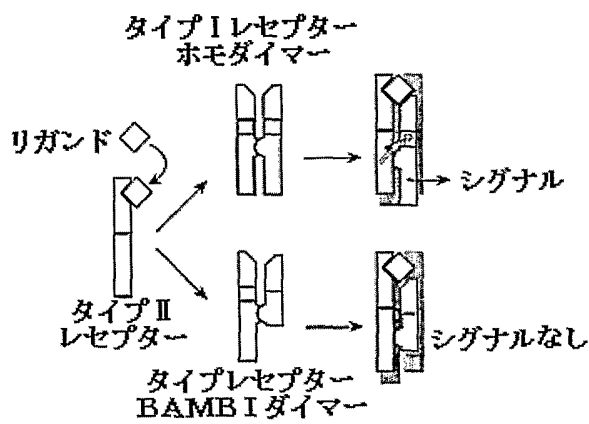
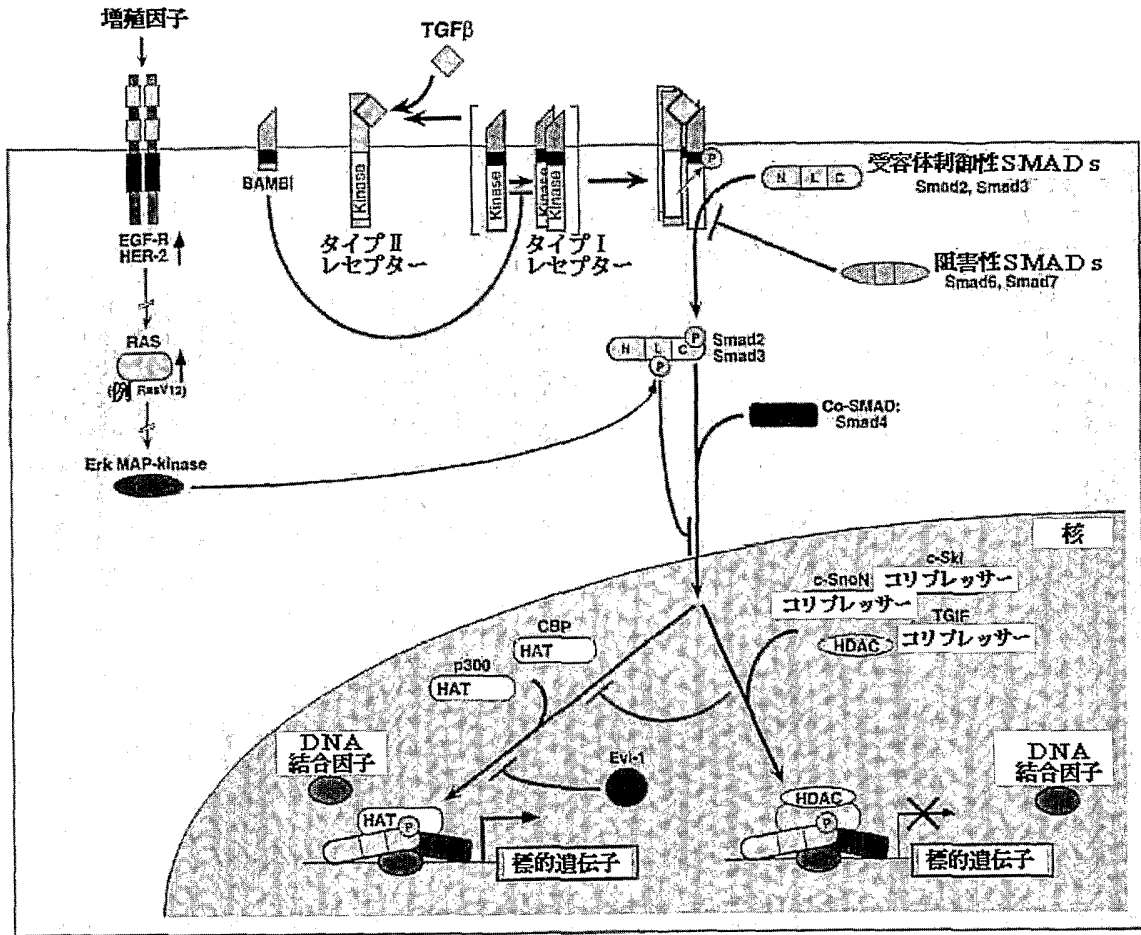


図 3

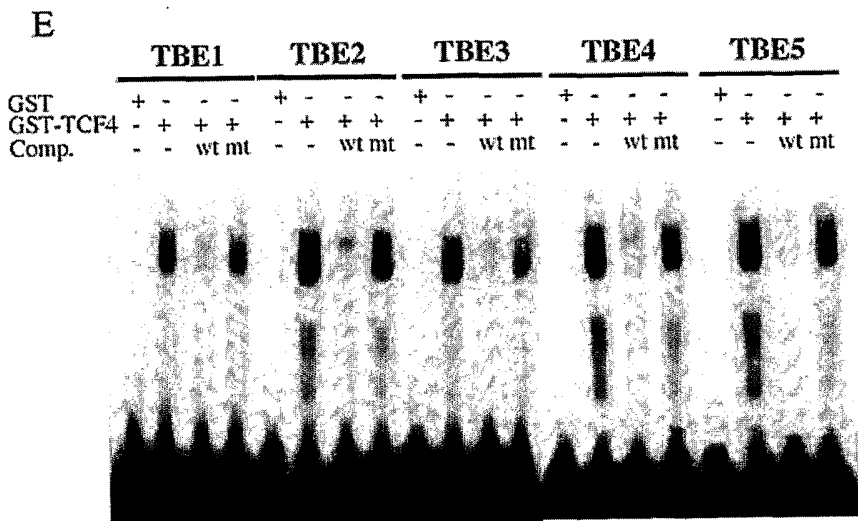


図 4

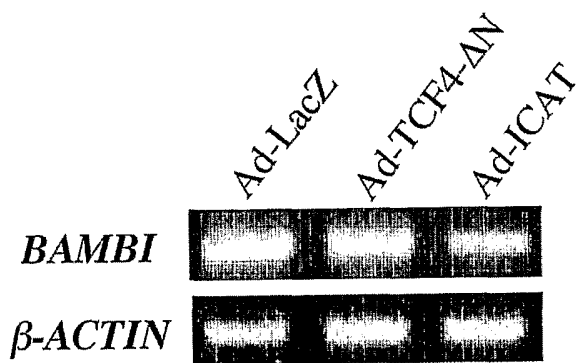


図 5

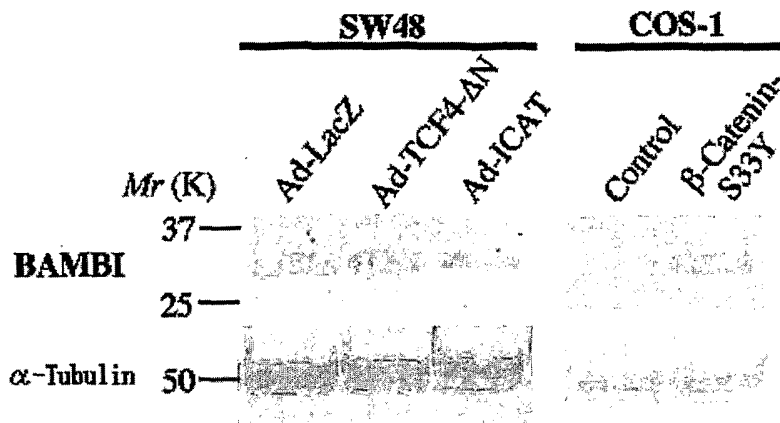


図 6

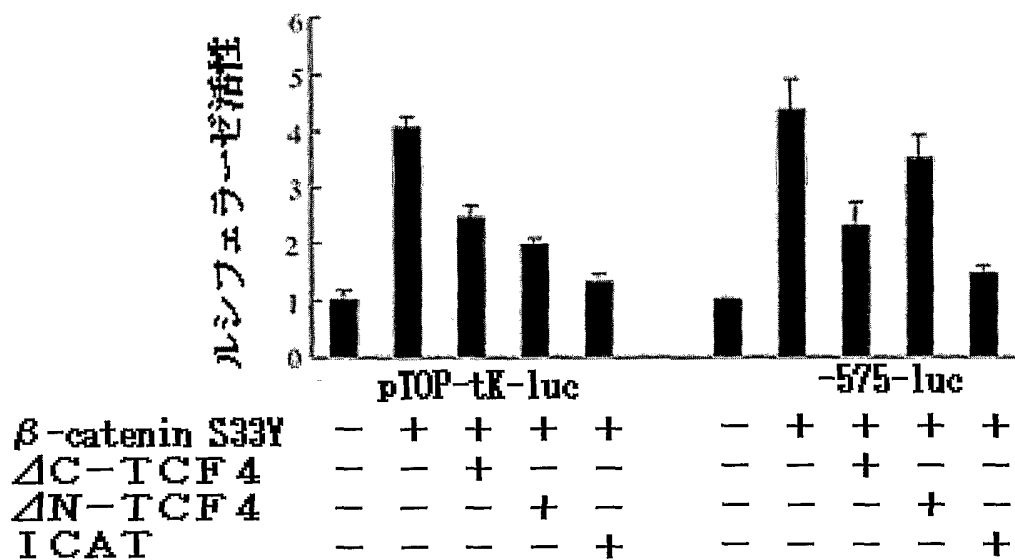


図 7

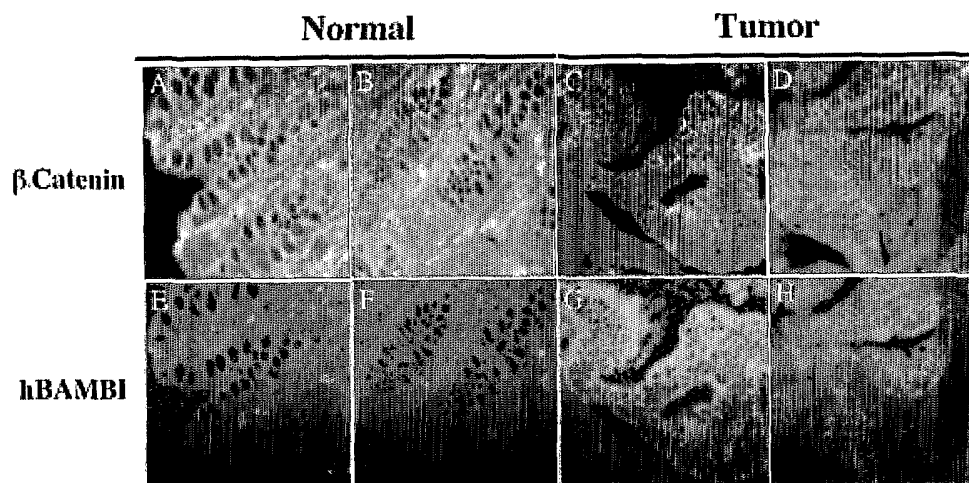


図 8

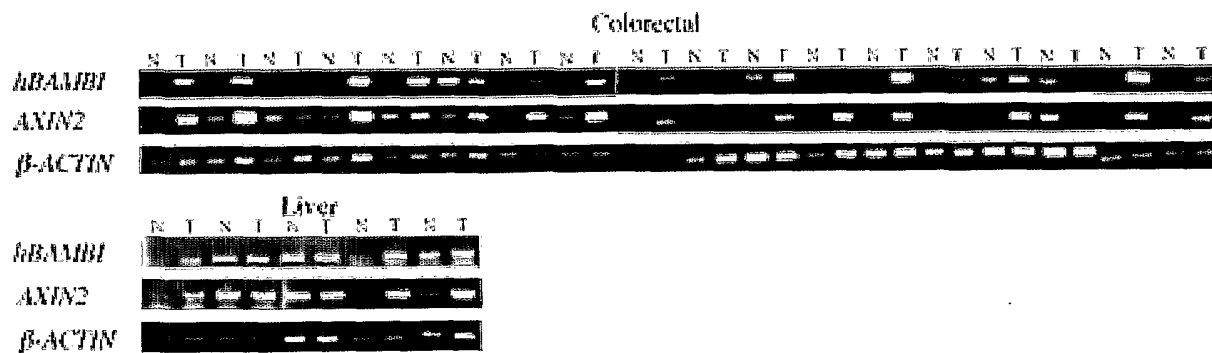


図 9

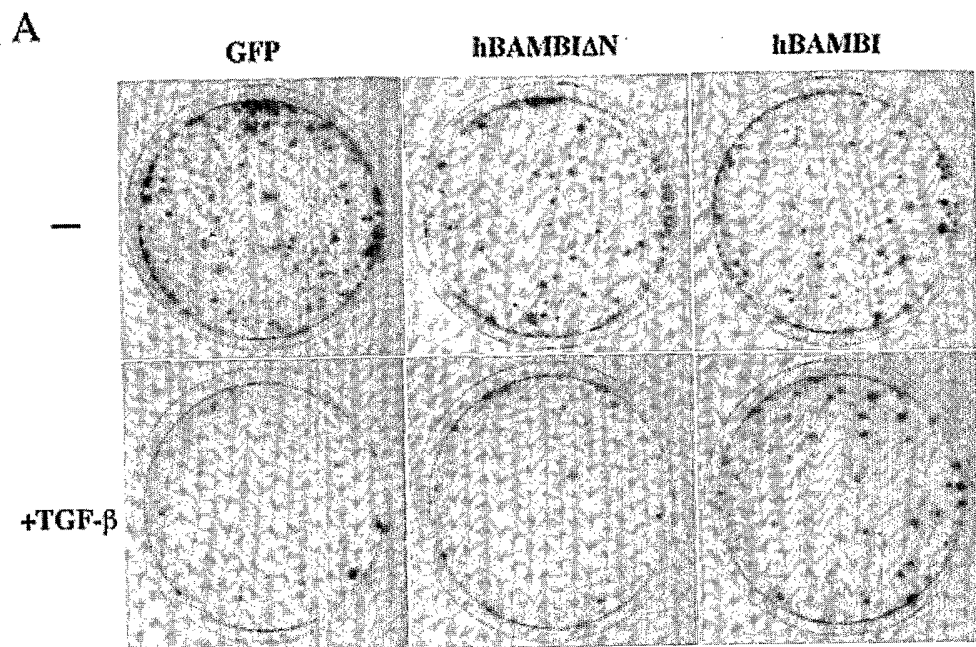


図 10

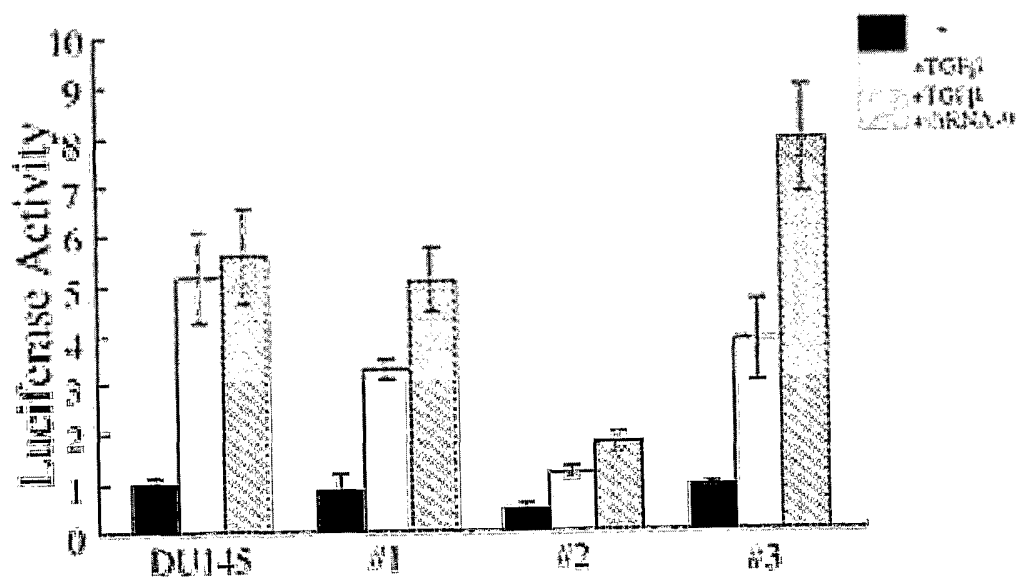
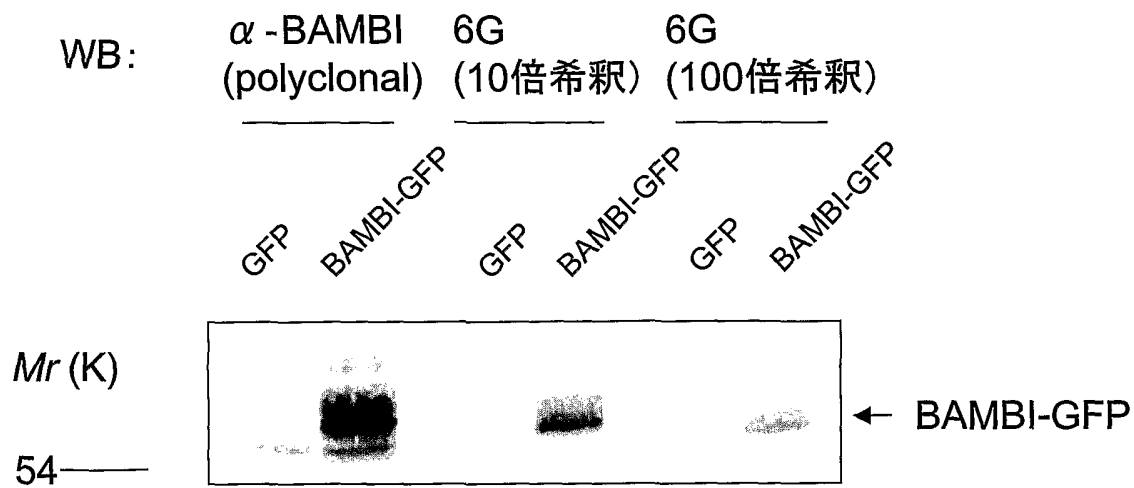


図 1 1



2/12

His Asp Gly Ser Arg Asn Leu Ile Thr Lys Val Gln Glu Leu Thr Ser
 130 135 140

Ser Lys Glu Leu Trp Phe Arg Ala Ala Val Ile Ala Val Pro Ile Ala
 145 150 155 160

Gly Gly Leu Ile Leu Val Leu Leu Ile Met Leu Ala Leu Arg Met Leu
 165 170 175

Arg Ser Glu Asn Lys Arg Leu Gln Asp Gln Arg Gln Gln Met Leu Ser
 180 185 190

Arg Leu His Tyr Ser Phe His Gly His His Ser Lys Lys Gly Gln Val
 195 200 205

Ala Lys Leu Asp Leu Glu Cys Met Val Pro Val Ser Gly His Glu Asn
 210 215 220

Cys Cys Leu Thr Cys Asp Lys Met Arg Gln Ala Asp Leu Ser Asn Asp
 225 230 235 240

Lys Ile Leu Ser Leu Val His Trp Gly Met Tyr Ser Gly His Gly Lys
 245 250 255

Leu Glu Phe Val
 260

<210> 2

<211> 1521

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

ctggcgcggg cgggagctgc ggcggatacc cttgcgtgct gtggagacc tactctcttc 60
 gctgagaacg gccgctagcg gggactgaag gccgggagcc cactcccgac ccggggctag 120
 cgtgctgcc tagagtcgag cggggcaagg gagccagtgg ccgccgacgg gggaccggga 180
 aacttttctg ggctcctgga gagccctgta gccgcgctcc atgctccggc agcggcccga 240
 aaccagccc cgccgctgac ggagcccgcc gctccgggca gggcccatgc cctgcgcgct 300
 ccgggggtcg tagctgccgc cgagccgggg ctccggaagc cggcgggggc gcccgggccg 360
 tgcggggcgt caatggatcg ccactccagc tacatcttca tctggctgca gctggagctc 420
 tgcgcatgg ccgtgctgct caccaaaggt gaaattcgat gctactgtga tgctgcccac 480

3/12

tgtgtagcca ctggttatat gtgtaaact gagctcagcg cctgcttctc tagacttctt 540
 gatcctcaga actcaaattc cccactcacc catggctgcc tggactctct tgcaagcacg 600
 acagacatct gccaaagccaa acaggcccga aaccactctg gcaccaccat acccaccattg 660
 gaatgctgtc atgaagacat gtgcaattac agagggctgc acgatgttct ctctcctccc 720
 aggggtgagg cctcaggaca aggaaacagg tadcagcatg atggtagcag aaaccttacc 780
 accaagggtc aggagctgac ttcttccaaa gagttgtggt tccgggcagc ggtcattgcc 840
 gtgcccattg ctggagggct gatttttagtg ttgcttatta tgttggccct gaggatgctt 900
 cgaagtgaaa ataagaggct gcaggatcag cggcaacaga tgctctcccg tttgcactac 960
 agctttcacg gacaccattc caaaaagggg caggttgcaa agttagactt ggaatgcatg 1020
 gtgccggtca gtgggcacga gaactgctgt ctgacctgtg ataaaatgag acaagcacgac 1080
 ctgagcaacg ataagatcct ctgccttgtt cactggggca tgtacagtgg gcacgggaag 1140
 ctggaattcg tatgacggag tcttatctga actacactta ctgaacagct tgaaggcctt 1200
 ttgagttctg ctggacagga gcactttatc tgaagacaaa ctcatthaat catctttgag 1260
 agacaaaatg acctctgcaa acagaatott ggatatttct tctgaaggat tatttgcaca 1320
 gacttaaata cagttaaagtg tgttatttgc ttttaaaatt ataaaaagca aagagaagac 1380
 tttgtacaca ctgtcaccag gttatttgc atccaagggg gctggaattg agtacctaaa 1440
 taaacaaaaa tgtgccctat gtaagcttct acatcttgat ttattgtaaa gatttaaaag 1500
 aaatatatat atttgtctg a 1521

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 3

ccactctggc accaccata

19

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 4

cagatgctct cccgtttgc

19

4/12

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 5

ctgctgtctg acctgtgat

19

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 6

gctgcagagg attgattagc ggtag

25

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 7

ctaccgctaa tcaatcctct gcagc

25

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5/12

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 8

ctctgtgtct agttaaagt atctctg

27

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 9

cagagataca ttaactaga cacagag

27

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 10

ctctaagtgt agttatatct ctgaatg

27

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 11

cattcagaga tataactaca cttagag

27

6/12

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 12

ctggaaatat agaaagcggg cagaac

26

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 13

gttctgcccg ctttctatat ttccag

26

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 14

ctaaaagttc atgcagttaa atttggg

27

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 15

7/12

cccaaattta actgcatgaa ctttag

27

<210> 16

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 16

catgaattcc gccacatgg atgccactc cagctac

37

<210> 17

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 17

catctcgagt acgaacacca gcaaccctg c

31

<210> 18

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 18

catgaattcg cttcctgtc caggttcct cc

32

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

8/12

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 19

catctcgagc tagcctagca ggttcgggga ggg

33

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 20

gctgcagagg ctttgtagc ggtag

25

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 21

ctaccgctaa caaagcctct gcagc

25

<210> 22

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 22

ctctgtgtct ctttgaatgt atctctg

27

9/12

<210> 23

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 23

cagagataca ttcaaagaga cacagag

27

<210> 24

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 24

ctctaagtgt cttgtatct ctgaatg

27

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 25

cattcagaga tacaagaca cttagag

27

<210> 26

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10/12

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 26

ctggaaatat caaaggcggg cagaac

26

<210> 27

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 27

gttctgcccg cctttgatat ttccag

26

<210> 28

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 28

ctaaaagttc atgcctttga atttggg

27

<210> 29

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 29

cccaaattca aaggcatgaa cttttag

27

<210> 30

<211> 20

11/12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 30

caggggtgag gcctcaggac

20

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 31

caaattccag ctcccttgga tgc

23

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 32

gccagccggc accatctgtg

20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 33

12/12

cgaagcccac tggccgattc

20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 34

acactgtgcc catctacgag

20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 35

agtccctgcttgctgatccac

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007677

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C07K16/18, G01N33/574, A61K39/395, A61K31/713,
A61P35/00

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)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C07K16/18, G01N33/574, A61K39/395, A61K31/713,
A61P35/00

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

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

GenBank/DDBJ/EMBL/GenSeq, SwissProt/PIR/GenSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 02/059377 A2 (EOS BIOTECHNOLOGY, INC.), 01 August, 2002 (01.08.02), Seq. ID NOS: 133, 134 & CA 2440703 A	1-6 7-13
X Y	Winfried G.J. et al., "Expression of nma, a novel gene, inversely correlates with the metastatic potential of Human melanoma cell lines and Xenografts", Int. J. Cancer, 1996, Vol.165, No.4, pages 460 to 465	1-6 7-13
Y	D. Onichtchouk et al., "Silencing of TGF- β signalling by the pseudoreceptor BAMBI", NATURE, 1999, Vol.401, pages 480 to 485	7-13

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
30 August, 2004 (30.08.04)

Date of mailing of the international search report
14 September, 2004 (14.09.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007677

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	M.J. Calonge et al., "Smad4/DPC4 Silencing and Hyperactive Ras Jointly Disrupt Transforming Growth Factor- β Antiproliferative Responses in Colon Cancer Cells", J. Biol.Chem., 1999, Vol.274, No.47, pages 33637 to 33643	7-13
Y	K. MIYAZONO, "Signal transduction and carcinogenesis: Mechanism of TGF- β signalling", Molecular Medicine (Tokyo), 1998, Vol.35, No.6, pages 746 to 752	7-13
Y	WO 99/32619 A1 (The Carnegie institute of Washington), 01 July, 1999 (01.07.99), All references & JP 2002-516062 A & EP 1042462 A1 & CA 3211999 A & US 2003/51263 A1 & US 2003/55020 A1 & US 2003/56235 A1 & US 6506559 B	11-13
P,X	T. SEKIYA et al., "Identification of BMP and activin Membrane-bound INhibitor (BAMBI), and Inhibitor of Transforming Growth Factor- β Signaling, as a target of the β -Catenin Pathway in Colorectal Tumor Cells", J. Biol. Chem., February, 2004, Vol.279, No.8, pages 6840 to 6846	1-13
P,X	WO 2003/055443 A2 (ALCON, INC.), 10 July, 2003 (10.07.03), All references & US 2003/134308 A1	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl⁷ C12N15/09, C07K16/18, G01N33/574, A61K39/395, A61K31/713, A61P35/00

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 (IPC))
 Int. Cl⁷ C12N15/09, C07K16/18, G01N33/574, A61K39/395, A61K31/713, A61P35/00

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

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)
 GenBank/DDBJ/EMBL/GenSeq, SwissProt/PIR/GenSeq

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 請求の範囲の番号
X Y	WO 02/059377 A2 (EOS BIOTECHNOLOGY, INC.), 2002.08.01, Seq ID NO:133, Seq ID NO:134, &CA 2440703 A	1-6 7-13

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 30.08.2004
 国際調査報告の発送日 14.9.2004

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 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)
 田中 耕一郎

4B 9636

電話番号 03-3581-1101 内線 9636

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 請求の範囲の番号
X	Winfried G. J. et al.,	1-6
Y	"Expression of <i>nma</i> , a novel gene, inversely correlates with the metastatic potential of Human melanoma cell lines and Xenografts" Int. J. Cancer, 1996, Vol65, No.4, pp460-465	7-13
Y	D. Onichtchouk et al, "Silencing of TGF- β signalling by the pseudoreceptor BAMBI" NATURE, 1999, Vol.401, pp480-485	7-13
Y	M. J. Calonge et al., "Smad4/DPC4 Silencing and Hyperactive Ras Jointly Disrupt Transforming Growth Factor- β Antiproliferative Responses in Colon Cancer Cells" J. Biol. Chem., 1999, Vol.274, No.47, pp33637-33643	7-13
Y	K. Miyazono, "Signal transduction and carcinogenesis : Mechanism of TGF- β signalling" Molecular Medicine(Tokyo), 1998, Vol.35, No.6, pp746-752	7-13
Y	WO 99/32619 A1 (The Carnegie institute of Washington) , 1999.07.01, 文献全体 &JP 2002-516062 A &EP 1042462 A1 &CA 3211999 A &US 2003/51263 A1 &US 2003/55020 A1 &US 2003/56235 A1 &US 6506559 B	11-13
PX	T. Sekiya et al., "Identification of BMP and activin Membrane-bound INhibitor (BAMBI), and Inhibitor of Transforming Growth Factor- β Signaling, as a target of the β -Catenin Pathway in Colorectal Tumor Cells" J. Biol. Chem., Feb. 2004, Vol.279, No.8, pp6840-6846	1-13
PX	WO 2003/055443 A2 (ALCON, INC.) , 2003.07.10, 文献全体 &US 2003/134308 A1	1-6