

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4682152号
(P4682152)

(45) 発行日 平成23年5月11日(2011.5.11)

(24) 登録日 平成23年2月10日(2011.2.10)

(51) Int.Cl.

C 12Q 1/02 (2006.01)
C 12Q 1/68 (2006.01)

F 1

C 12Q 1/02
C 12Q 1/68

A

請求項の数 5 (全 78 頁)

(21) 出願番号 特願2006-547537 (P2006-547537)
 (86) (22) 出願日 平成16年12月30日 (2004.12.30)
 (65) 公表番号 特表2007-517058 (P2007-517058A)
 (43) 公表日 平成19年6月28日 (2007.6.28)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2004/043837
 (87) 國際公開番号 WO2005/066371
 (87) 國際公開日 平成17年7月21日 (2005.7.21)
 審査請求日 平成18年6月30日 (2006.6.30)
 (31) 優先権主張番号 60/533,505
 (32) 優先日 平成15年12月31日 (2003.12.31)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 500273296
 ザ・ペン・ステート・リサーチ・ファンデーション
 アメリカ合衆国ペンシルバニア州16802, ユニバーシティ・パーク, オールド・メイン 304
 (74) 代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣
 (74) 代理人 100105957
 弁理士 恩田 誠
 (74) 代理人 100142907
 弁理士 本田 淳
 (74) 代理人 100149641
 弁理士 池上 美穂

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】卵巣がんの化学療法に対する抵抗性を予測および克服するための方法ならびに結腸がんの発生を予測するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

卵巣がん患者の腫瘍がシスプラチンに対して抵抗性であるかどうかを試験する方法であつて、

a . 患者から採取された生物試料中の1または複数の発現遺伝子または該発現遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であつて、該発現遺伝子がS100A10、S100A11、カルパイン2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、カルポニン2、RNPS1、eIF5、eIF2B₂、HASF2、WDR1、フューズドトウ(Fused toes)、NM23D、ADAR1、グランカルシン、NBR1、SAPK/Erk1、亜鉛フィンガータンパク質-262MYM、HYA22、MRPL4、ビネキシン覇AG-CSFR、IGFBP-7、FASTキナーゼ、TESK2、SRB1、KIAA0082、MPP10、HMT1、NAIP、eEF1₂、ARAB22A、NCOR2、またはMT1である工程、

b . 対照試料中の1または複数の対応する発現遺伝子または該発現遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であつて、該発現遺伝子がS100A10、S100A11、カルパイン2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、カルポニン2、RNPS1、eIF5、eIF2B₂、HASF2、WDR1、フューズドトウ(Fused toes)、NM23D、ADAR1、グランカルシン、NBR1、SAPK/Erk1、亜鉛フィンガータンパク質-262MYM、HYA22、MRPL4、ビネキシン覇AG-CSFR、IGFBP-7、FASTキナーゼ、TESK2、SRB20

1、KIAA0082、MPP10、HMT1、NAIP、eEF1_α ARAB22A、NCOR2、またはMT1である工程、ならびに

c. 工程(a)で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程(b)で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程
からなり、

工程(a)で検出される量が工程(b)で検出される量と比べて少なくとも20%異なることを指標として、該患者が該シスプラチンに対して抵抗性であるかどうかを試験する方法。

【請求項2】

前記発現遺伝子がMetAP2またはSPARCである、請求項1に記載の方法。 10

【請求項3】

前記検出する工程が、核酸ハイブリダイゼーション、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、または前記抗体結合によるものである、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記遺伝子産物の量が逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)で測定され、前記遺伝子産物の量がコントロール遺伝子に対する遺伝子の相対発現量として測定される、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記コントロール遺伝子が18S RNA遺伝子である、請求項4に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本出願は、その開示内容を本願明細書に援用する、2003年12月31日出願の米国仮特許出願第60/533505号に関連し、同出願に対する優先権を主張する。

(発明の分野)

本発明は、ある卵巣がん患者が化学療法に対して抵抗性であるかどうかを予測するための方法、ならびに個々の患者が結腸がんを有するかどうかを決定するための方法に関する。本発明はまた、卵巣がんを治療される患者における治療の有効性を観察するための方法にも関する。本発明はさらに、卵巣がんおよび結腸がんを治療するための方法にも関する。さらに、本発明は、腫瘍細胞、特に卵巣がん細胞または結腸がん細胞の増殖を抑制することができる化合物をスクリーニングする方法にも関する。本発明はまた、特に、従来の化学療法的治療法に対して抵抗性である卵巣がん細胞において、化学療法薬による治療または療法に対する抵抗性を低減または抑制するための方法にも関する。 30

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

卵巣がんは、婦人科の悪性腫瘍のうちで最も致死的であり、死亡率は60%である。この疾患の様々な臨床病期に対する5年生存率は、次のとおり：病期I > 90%、病期II = 80%、病期III = 20%、および病期IV = 10%；であり、この疾患の後期では生存率が著しく低下する。この疾患の進行期に対する医療標準の治療には、腫瘍縮小手術とそれに続く化学療法が含まれる。 40

【0003】

全患者の約75%が疾患の病期IIおよびIVで診断を受け、また、進行期の疾患の診断の遅れには予後不良が伴うため、大半の患者にとって、生き残る確率は低い。現在利用可能な化学療法剤に対する抵抗性は、別の主要な問題である。初期治療後に75%の患者で臨床的な完全寛解が実現されるにもかかわらず、大半の患者は、再発性の疾患を発症し、再治療を必要とするようになる。残念ながら、圧倒的多数が最終的には化学療法抵抗性を生じるようになり、その疾患に屈することになる。

【0004】

化学療法抵抗性は、いくつかの遺伝子および遺伝子産物の発現および生物活性の変化を 50

伴う複雑な現象である。応答性の個体および非応答性の個体で異なって発現される遺伝子または遺伝子ファミリーは、一般に臨床的に使用されるような、ある特定の化学療法剤またはその組合せに対してどの患者が抵抗性であるかを予測するための分子マーカーとして使用することができる。さらに、化学療法抵抗性の個体で過剰発現される遺伝子は、1または複数の化学療法剤に対するがん細胞の抵抗性を低減させ得る、阻害のための標的となり得る。

【0005】

卵巣がんと同様に、結腸直腸がんの患者の生存率は、疾患が早期に診断されたときに最も良い。がんが早期に発見された場合は、結腸がん患者の5年生存率は約90%であるが、残念ながら、サーベイランスおよび予防手段の増加にもかかわらず、がんの37%しかこのような早期には発見されていない。がんが局部的に拡大して他の臓器に影響を与えている場合は、生存率は約64%に低下し、がんが転移した後では大幅に低下する(8%)¹⁰(非特許文献1)。

【非特許文献1】Cancer Facts and Figures 2002; アメリカがん協会(American Cancer Society)発行物

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって、疾患の進行過程で早期に結腸がんおよび卵巣がんを同定することが必要であり、化学療法抵抗性のがんを同定することが特に必要である。より詳細には、がん細胞の腫瘍形成能および化学療法薬に対する抵抗性の双方に関して、がん細胞の挙動は、完全には明確にされていない特定の遺伝子のセットの発現によって媒介されているとして当技術分野で理解されているため、卵巣がんの化学療法抵抗性についての有効な分子マーカーとしての機能を果たす遺伝子および遺伝子群または遺伝子セット、ならびに卵巣がんおよび結腸がんに対する臨床的に有効な治療標的を提供するそのような遺伝子または遺伝子セットを同定することが当技術分野で必要とされている。²⁰

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、化学療法薬による治療に対する抵抗性に関する遺伝子、またはその発現が該抵抗性により修飾される遺伝子、あるいは、前記修飾された発現が抵抗性に関連し、または抵抗性を司っている遺伝子を同定するための方法および試薬を提供する。具体的には、本発明は、化学療法薬による治療に対する抵抗性に関する遺伝子、またはその発現がそのように修飾される遺伝子、あるいは、前記修飾された発現が抵抗性に関連し、または抵抗性を司っている遺伝子、ならびに、化学療法薬抵抗性の細胞、特に薬物抵抗性の卵巣がん細胞に特徴的な、複数の遺伝子の修飾された遺伝子発現パターンを提供する。本発明はさらに、1または複数の前記遺伝子の発現または活性と相互に作用し、あるいはそれらに影響を及ぼす化合物を同定するための方法も提供する。また、卵巣がん、特に従来の化学療法的治療に対して抵抗性の、または抵抗性となってしまったがんを治療するための、化学療法剤の代替として有用な、または化学療法剤と併用すると有用な前記化合物も提供される。本発明はさらに、化学療法剤に対して抵抗性の腫瘍または抵抗性となつた腫瘍を有する患者を同定するために化学療法的治療を観察するための方法および試薬も提供する。³⁰

【0008】

本発明は、化学療法剤に対して抵抗性である腫瘍細胞、最も好ましくは卵巣がん細胞の化学療法薬抵抗性を低減させ、かつ増殖を抑制、遅延、または防止する化合物を同定するための方法を提供する。この方法は、(a) 化学療法薬抵抗性細胞がその化学療法薬に対して抵抗性であり、かつその細胞が化学療法抵抗性の卵巣がん細胞で過剰発現される少なくとも1種の遺伝子を発現している期間または濃度の化学療法薬の存在下で増殖している化学療法薬抵抗性細胞を、試験化合物と接触させる工程であって、その過剰発現遺伝子が(表1に示すGenBank登録番号で特定されている)S100A10, S100A1⁴⁰

1、カルパイン2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、カルポニン2、RNPS1、eIF5、eIF2B、HSF2、WDR1、フューズドトウ(Fused toes)、NM23D、ADAR1、グランカルシン(Grancalcin)、NBR1、SAPK/Erk1、亜鉛フィンガータンパク質-262MYM、HYA22、MRPL4、ビネキシン、G-CSFR、IGFBP-7、FASTキナーゼ、TESK2、SRB1、またはKIAA0082である工程、(b)その試験化合物の存在下および不在下において1または複数の前記遺伝子または遺伝子産物の発現または活性について前記細胞を分析する工程、ならびに/あるいは、(c)その試験化合物の存在下および不在下において細胞増殖および/または遺伝子もしくは遺伝子産物のうちの少なくとも1種の発現もしくは活性を比較する工程からなり、試験化合物の存在下での遺伝子または遺伝子産物の発現または活性が、試験化合物の不在下での遺伝子発現と比べて低減している場合、または、細胞増殖がその化合物の存在下では抑制される場合、あるいはその双方の場合に、化合物が、化学療法抵抗性の腫瘍細胞の増殖を抑制する化合物として同定される。いくつかの実施形態では、特に、本明細書で特定する複数の遺伝子産物に特異的な核酸(遺伝子)プローブまたは抗体のアレイを用いて生物試料を分析することによって遺伝子発現を検出する。

【0009】

さらに、本発明は、化学療法剤に対して抵抗性である腫瘍細胞、最も好ましくは卵巣がん細胞の薬物抵抗性を低減させ、かつ増殖を抑制、遅延、または防止する化合物を同定するための方法も提供する。この方法は、(a)細胞がその化学療法薬に対して抵抗性であり、かつその細胞が化学療法感受性の細胞と比べて化学療法抵抗性の卵巣がん細胞では低いレベルで発現される遺伝子を発現している期間または濃度の化学療法薬の存在下で増殖している細胞を、試験化合物と接触させる工程であって、その遺伝子が、(表1に示すGenBank登録番号で特定されている)HMT1、NAIP、eEF1、RAB22A、NCOR2、MT1、またはMPP10である工程、b)試験化合物の存在下および不在下で細胞増殖および/または遺伝子発現もしくは遺伝子産物の活性について前記細胞を分析する工程、ならびにc)試験化合物の存在下および不在下での遺伝子の発現または遺伝子産物の活性を比較する工程からなり、(i)試験化合物の存在下での遺伝子の発現または遺伝子産物の活性が、試験化合物の不存在での遺伝子の発現または遺伝子産物の活性と比べて増大している場合、および/または(ii)細胞増殖がその化合物の存在下で抑制されている場合、および/または(iii)細胞増殖が抑制されている一方で、その遺伝子の発現および/または活性が増大している場合に、化合物は、化学療法抵抗性の腫瘍細胞の増殖を抑制する化合物として同定される。いくつかの実施形態では、特に、本明細書で特定する複数の遺伝子産物に特異的な核酸(遺伝子)プローブまたは抗体のアレイを用いて生物試料を分析することによって遺伝子発現を検出する。

【0010】

本発明は、腫瘍細胞の薬物抵抗性を低減させるため、または腫瘍細胞の増殖を抑制、遅延、もしくは防止するため、あるいはその双方のための方法を提供し、該方法は、腫瘍細胞を、その細胞が細胞遺伝子阻害因子の不在下では化学療法薬に対して抵抗性であるような期間または濃度の化学療法薬の存在下で、細胞遺伝子の少なくとも1種の阻害因子に接触させる工程であって、その細胞遺伝子が、S100A10、S100A11、カルパイン2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、カルポニン2、RNPS1、eIF5、eIF2B、HSF2、WDR1、フューズドトウ(Fused toes)、NM23D、ADAR1、グランカルシン、NBR1、SAPK/Erk1、亜鉛フィンガータンパク質-262MYM、HYA22、MRPL4、ビネキシン、G-CSFR、IGFBP-7、FASTキナーゼ、TESK2、SRB1、またはKIAA0082である工程からなる方法である。好ましい実施形態では、腫瘍細胞はヒトの腫瘍細胞であり、より好ましくは卵巣がん細胞である。特定の態様では、本発明によって同定される1または複数の遺伝子は、1または複数の前記遺伝子を標的にするように特異的に設計されたアンチセンスRNA分子またはsiRNA分子で阻害される。代替態様では、前記遺

10

20

30

40

50

伝子の遺伝子産物が、それらのタンパク質の阻害因子を用いて阻害される。

【0011】

本発明は、腫瘍細胞の薬物抵抗性を低減させるための方法を提供し、該方法は、腫瘍細胞を、その細胞が細胞遺伝子HMT1、NAIP、eEF1、RAB22A、NCOR2、MT1、またはMPP10の発現または活性を増大させる化合物の不在下では化学療法薬に対して抵抗性である期間または濃度の化学療法薬の存在下または不在下で、HMT1、NAIP、eEF1、RAB22A、NCOR2、MT1、またはMPP10の発現または活性を増大させる少なくとも1種の化合物に接触させる工程からなる方法である。好ましい実施形態では、腫瘍細胞はヒトの腫瘍細胞であり、より好ましくは卵巣がん細胞である。

10

【0012】

本発明は、腫瘍細胞の増殖を抑制、遅延、または防止するための方法も提供し、該方法は、腫瘍細胞を、細胞増殖が、細胞遺伝子HMT1、NAIP、eEF1、RAB22A、NCOR2、MT1、またはMPP10の発現または活性を増大させる化合物の存在下では、前記化合物の不在下での細胞増殖と比べて減速または抑制される期間または濃度の化学療法薬の存在下または不在下で、HMT1、NAIP、eEF1、RAB22A、NCOR2、MT1、またはMPP10の発現または活性を増大させる少なくとも1種の化合物に接触させる工程からなる方法である。好ましい実施形態では、腫瘍細胞はヒトの腫瘍細胞であり、より好ましくは卵巣がん細胞である。

【0013】

20

別の態様では、本発明は、腫瘍細胞、最も好ましくは卵巣がん細胞の増殖を抑制、遅延、または防止するための方法を提供し、該方法は、腫瘍細胞を、1または複数の化学療法剤および細胞遺伝子の少なくとも1種の阻害因子の組合せに接触させる工程であって、その細胞遺伝子が、S100A10、S100A11、カルパイン2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、カルポニン2、RNPS1、eIF5、eIF2B、WDR1、フューズドトウ(Fused toes)、NM23D、グランカルシン、SAPK/Erk1、亜鉛フィンガータンパク質-262MYM、HYA22、ビネキシン、G-CSFR、IGFBP-7、またはKIAA0082である工程からなる方法である。特定の態様では、細胞遺伝子はMetAP2であり、化学療法剤はプラチナ系であり、少なくとも1種の阻害因子はフマギリンまたはフマギリン誘導体である。別の特定の態様では、細胞遺伝子はカルパイン2であり、化学療法剤はプラチナ系であり、少なくとも1種の阻害因子はN-アセチル-ロイシル-ロイシル-ノルロイシナール(ALLN)またはその誘導体である。表1に示す細胞遺伝子の阻害因子は、例えば、表1に示す遺伝子を標的にするように特異的に設計されたsiRNA分子もしくはshRNA分子であってもよいし、小分子阻害因子でもよい。

30

【0014】

別の態様では、本発明は、腫瘍細胞、最も好ましくは卵巣がん細胞の増殖を抑制、遅延、または防止するための方法を提供し、該方法は、腫瘍細胞を、1または複数の化学療法剤および細胞遺伝子の発現または活性を増大させる少なくとも1種の化合物の組合せに接觸させる工程であって、その細胞遺伝子が、HMT1、NAIP、eEF1、RAB22A、NCOR2、MT1、またはMPP10である工程からなる方法である。好ましい実施形態では、腫瘍細胞はヒトの腫瘍細胞であり、より好ましくは卵巣がん細胞である。

40

【0015】

本発明は、卵巣がん患者の腫瘍が化学療法的治療に対して抵抗性であるかどうかを予測する方法も提供し、該方法は、(a)患者から採取した生物試料中の1または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子がS100A10、S100A11、カルパイン2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、カルポニン2、RNPS1、eIF5、eIF2B、HSF2、WDR1、フューズドトウ(Fused toes)、NM23D、ADAR1、グランカルシン、NBR1、SAFK/Erk1、亜鉛フィンガータンパク質-262M

50

Y M、H Y A 2 2、M R P L 4、ビネキシン、G - C S F R、I G F B P - 7、F A S T キナーゼ、T E S K 2、S R B 1、またはK I A A 0 0 8 2である工程、(b) 工程(a)で検出される1または複数の発現遺伝子または遺伝子産物に対応して、非腫瘍組織試料、最も好ましくは腫瘍の元の組織に由来する非腫瘍組織試料、または化学療法に良く反応した患者に由来する組織試料を含む対照試料中の1または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子がS 1 0 0 A 1 0、S 1 0 0 A 1 1、カルパイン2、S P A R C、M e t A P 2、K L K 6、A R A 9、カルポニン2、R N P S 1、e I F 5、e I F 2 B 、H S F 2、W D R 1、フューズドトウ(F u s e d t o e s)、N M 2 3 D、A D A R 1、グランカルシン、N B R 1、S A P K / E r k 1、亜鉛フィンガータンパク質-262M YM、H Y A 2 2 10
、M R P L 4、ビネキシン、G - C S F R、I G F B P - 7、F A S T キナーゼ、T E S K 2、S R B 1、またはK I A A 0 0 8 2である工程、ならびに(c) 工程(a)で測定された発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程(b)で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程からなり、工程(a)で検出される量が工程(b)で検出される量より少なくとも20%多い場合は、その患者が化学療法に対して抵抗性であると予測される方法である。特定の態様では、生物試料は腫瘍試料である。特定の態様では、対照試料は化学療法に反応性のがん患者から得た生物試料である。いくつかの実施形態では、特に、本明細書で特定する複数の遺伝子産物に特異的な核酸(遺伝子) プローブまたは抗体のアレイを用いて生物試料を分析することによって、遺伝子発現を検出する。

【 0 0 1 6 】

20

特定の態様では、この方法は、がん患者から得た生物試料で発現されるM e t A P 2の測定量が、化学療法薬に反応性の個体または卵巣がんではない個体から得た卵巣組織で検出される量より多いとき、患者がプラチナ系の化学療法に対して抵抗性であることを予測する。

【 0 0 1 7 】

本発明はまた、卵巣がん患者の腫瘍が化学療法的治療に対して抵抗性であるかどうかを予測する方法も提供し、該方法は、(a) 患者から採取した生物試料中の1または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子がH M T 1、N A I P、e E F 1 、R A B 2 2 A、N C O R 2、M T 1、またはM P P 1 0である工程、(b) 工程(a)で検出される1または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子がH M T 1、N A I P、e E F 1 、R A B 2 2 A、N C O R 2、M T 1、またはM P P 1 0である工程、ならびに(c) 工程(a)で測定された発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程(b)で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程からなり、工程(a)で検出される量が工程(b)で検出される量より少なくとも20%、より好ましくは少なくとも50%少ない場合は、その患者が化学療法に対して抵抗性であると予測される方法である。特定の態様では、対照試料は化学療法に反応性のがん患者から得た生物試料である。特定の態様では、生物試料は腫瘍試料である。いくつかの実施形態では、特に、本明細書で特定する複数の遺伝子産物に特異的な核酸(遺伝子) プローブまたは抗体のアレイを用いて生物試料を分析することによって、遺伝子発現を検出する。

30

【 0 0 1 8 】

40

本発明はさらに、卵巣がん患者、特に化学療法的治療を受けている卵巣がん患者における疾患の進行を観察するための方法を提供し、該方法は、(a) 患者から採取した生物試料中の1または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子が、S 1 0 0 A 1 0、S 1 0 0 A 1 1、カルパイン2、S P A R C、M e t A P 2、K L K 6、A R A 9、カルポニン2、R N P S 1、e I F 5、e I F 2 B 、H S F 2、W D R 1、フューズドトウ(F u s e d t o e s)、N M 2 3 D、A D A R 1、グランカルシン、N B R 1、S A P K / E r k 1、亜鉛フィンガータンパク質-262M YM、H Y A 2 2、M R P L 4、ビネキシン、G - C S F 50

R、IGFBP-7、FASTキナーゼ、TESK2、SRB1、またはKIAA0082である工程、(b)その後の採取により患者から得た生物試料を用いて工程(a)を繰り返す工程、ならびに(c)工程(a)で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程(b)で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程からなり、工程(a)で採取した生物試料に対する、その後採取した生物試料中の発現遺伝子または遺伝子産物の量の変化を検出することによって疾患の進行を観察し、その際、工程(b)で検出された発現遺伝子または発現遺伝子の産物の量が、工程(a)で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量と比べて多いときに疾患の進行が検出される方法である。いくつかの実施形態では、患者は、工程(a)における遺伝子発現量の検出と工程(b)におけるその量の検出との間に化学療法的治療または他の治療を受ける。特定の態様では、生物試料は腫瘍試料である。好ましい実施形態では、特に、本明細書で特定する複数の遺伝子産物に特異的な核酸(遺伝子)プローブまたは抗体のアレイを用いて生物試料を分析することによって、遺伝子発現を検出する。
10

【0019】

本発明はさらに、卵巣がん患者、特に化学療法的治療を受けている卵巣がん患者における疾患の進行を観察するための方法を提供し、該方法は、(a)患者から採取した生物試料中の1または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子が、HMT1、NAIP、eEF1、RAB22A、NCOR2、MT1、またはMPP10である工程、(b)その後の採取により患者から得た生物試料を用いて工程(a)を繰り返す工程、ならびに(c)工程(a)で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程(b)で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程からなり、工程(a)で採取した生物試料に対する、後で採取した生物試料中の発現遺伝子または遺伝子産物の量の変化を検出することによって疾患の進行を観察し、その際、工程(b)で検出された発現遺伝子または発現遺伝子の産物の量が、工程(a)で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量と比べて少ないかまたは等しいときに疾患の進行が検出される方法である。いくつかの実施形態では、患者は、工程(a)における遺伝子発現量の検出と工程(b)におけるその量の検出との間に化学療法的治療または他の治療を受ける。特定の態様では、生物試料は腫瘍試料である。いくつかの実施形態では、特に、本明細書で特定する複数の遺伝子産物に特異的な核酸(遺伝子)プローブまたは抗体のアレイを用いて生物試料を分析することによって、遺伝子発現を検出する。
20

【0020】

さらに、本発明は、患者のがん、特に卵巣がんまたは結腸がんを治療する薬剤としての、薬剤組成物の有効性を観察するための方法を提供し、該方法は、(a)患者から採取した生物試料中の1または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子が、S100A10、S100A11、カルパイン2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、カルボニン2、RNP S1、eIF5、eIF2B、HSF2、WDR1、フューズドトウ(Fused toes)、NM23D、ADAR1、グランカルシン、NBR1、SAPK/Erk1、亜鉛フィンガータンパク質-262MYM、HYA22、MRPL4、ビネキシン、G-CSFR、IGFBP-7、FASTキナーゼ、TESK2、SRB1、またはKIAA0082である工程、(b)ある量の薬剤組成物をその患者に投与する工程、(c)その後の採取により患者から得た生物試料を用いて工程(a)を繰り返す工程、ならびに(d)工程(a)で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程(c)で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程からなり、工程(a)で採取した生物試料に対する、後で採取した生物試料中の発現遺伝子または遺伝子産物の量の変化を検出することによって、薬剤組成物の有効性を観察し、その際、工程(c)で検出された発現遺伝子または発現遺伝子の産物の量が、工程(a)で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量より少ないと、および、薬剤組成物の存在下で腫瘍の増殖が低減されている(すなわち、減速され、遅延され、または抑制されている)場合に、その薬剤組成物が有効で
40
50

あるとする方法である。特定の態様では、生物試料は腫瘍試料である。いくつかの実施形態では、特に、本明細書で特定する複数の遺伝子産物に特異的な核酸（遺伝子）プローブまたは抗体のアレイを用いて生物試料を分析することによって、遺伝子発現を検出する。

【0021】

本発明は、患者のがん、特に卵巣がんを治療する薬剤としての、薬剤組成物の有効性を観察するための方法も提供し、該方法は、(a) 患者から採取した生物試料中の1または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子が、HMT1、NAIP、eEF1、RAB22A、NCOR2、MT1、またはMPP10である工程、(b) ある量の薬剤組成物をその患者に投与する工程、(c) その後の採取により患者から得た生物試料を用いて工程(a)を繰り返す工程、ならびに(d) 工程(a)で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程(c)で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程からなり、工程(a)で採取した生物試料に対して、後で採取した生物試料中の発現遺伝子または遺伝子産物の量の変化を検出することによって薬剤組成物の有効性を観察し、その際、工程(c)で検出された発現遺伝子または発現遺伝子の産物の量が、工程(a)で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量より多いとき、および薬剤組成物の存在下で腫瘍の増殖が低減されている（すなわち、減速され、遅延され、または抑制されている）場合に、その薬剤組成物が有効であるとする方法である。特定の態様では、生物試料は腫瘍試料である。いくつかの実施形態では、特に、本明細書で特定する複数の遺伝子産物に特異的な核酸（遺伝子）プローブまたは抗体のアレイを用いて生物試料を分析することによって、遺伝子発現を検出する。10

【0022】

本発明は結腸がんを発見する方法も提供し、該方法は、(a) 動物、好ましくはヒトから生物試料を得る工程、(b) 生物試料中の1または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子が、S100A10、S100A11、カルパイン2、SPARC、またはMetAP2である工程、(c) 非腫瘍結腸組織試料を含む対照試料中で検出される1または複数の発現遺伝子または遺伝子産物の量を検出する工程、ならびに(d) 工程(b)から得られる1または複数の発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程(c)での量と比較する工程からなり、工程(c)での量と比べて工程(b)での量に差がある場合に結腸がんが検出される方法である。検出される差は、工程(c)で採取した生物試料に対する、工程(a)で採取した生物試料における1または複数の前記遺伝子の過剰発現でもよく、1または複数の前記遺伝子の不足または過小発現でもよい。例えば、S100A10、S100A11、SPARC、および/またはMetAP2の量が、工程(c)での量と比べて工程(b)において多い場合、ならびに/あるいはカルパイン2の量が、工程(c)での量より工程(b)において少ない場合は、結腸がんが発見される。いくつかの実施形態では、動物は、ヒト、好ましくは結腸がんを有するヒトである。好ましくは、生物試料は、結腸のスクリーニング作業をするための組織試料として当技術分野で一般に使用される、結腸組織試料、より好ましくはポリープ、さらにより好ましくは腺腫様（adematous）ポリープである。いくつかの実施形態では、特に、本明細書で特定する複数の遺伝子産物に特異的な核酸（遺伝子）プローブまたは抗体のアレイを用いて生物試料を分析することによって、遺伝子発現を検出する。30

【0023】

さらに別の実施形態では、本発明は、動物、好ましくはヒトにおけるがんおよび/または化学療法薬抵抗性を診断するための方法を提供し、該方法は、2もしくは複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物量の変化のパターンを検出する工程からなる方法である。ある特定の実施形態では、これらの発現遺伝子は、表1に示される遺伝子である。一般に、本発明のこれらの方法は、(a) 動物、好ましくはヒトから生物試料を得る工程、(b) その生物試料中の、表1に示される2もしくは複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程、(c) 対照試料中40

で検出される 2 もしくは複数の発現遺伝子または遺伝子産物の量を検出する工程、ならびに (d) 工程 (b) から得られる 2 もしくは複数の発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程 (c) での量と比較することによって、2 もしくは複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量の変化のパターンを決定する工程からなり、そのパターンが、がん、例えば、結腸がんもしくは卵巣がん、または薬物抵抗性、例えばシスプラチンに対する抵抗性と関連づけられる。いくつかの実施形態では、特に、本明細書で特定する複数の遺伝子産物に特異的な核酸 (遺伝子) プローブまたは抗体のアレイを用いて生物試料を分析することによって、遺伝子発現を検出する。

【0024】

本発明は、卵巣がんの動物における化学療法薬抵抗性を検出するための方法も提供し、該方法は、(a) 動物から採取した生物試料中の複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子が、S100A10、S100A11、カルパイン2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、カルボニン2、RNPS1、eIF5、eIF2B、HSF2、WDR1、フューズドトウ (Fused toes)、NM23D、ADAR1、グランカルシン、NBR1、SAPK/Erk1、亜鉛フィンガータンパク質-262MYM、HYA22、MRPL4、ビネキシン、G-CSFR、IGFBP-7、FASTキナーゼ、TESK2、SRB1、またはKIAA0082である工程、(b) 工程 (a) で検出される複数の発現遺伝子または遺伝子産物に対応する、非腫瘍卵巣組織または化学療法に反応性の患者に由来する腫瘍組織を含む対照試料中の前記複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子がS100A10、S100A11、カルパイン2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、カルボニン2、RNPS1、eIF5、eIF2B、HSF2、WDR1、フューズドトウ (Fused toes)、NM23D、ADAR1、グランカルシン、NBR1、SAPK/Erk1、亜鉛フィンガータンパク質-262MYM、HYA22、MRPL4、ビネキシン、G-CSFR、IGFBP-7、FASTキナーゼ、TESK2、SRB1、またはKIAA0082である工程、ならびに、(c) 工程 (a) で測定された発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程 (b) で測定された発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程からなり、工程 (a) で検出される量が工程 (b) で検出される量より少なくとも 20 % 多い場合は、その患者が化学療法に対して抵抗性であると予測される方法である。本明細書で提示するように、工程 (a) で検出される量が工程 (b) で検出される量より少なくとも 20 % 多い複数の前記遺伝子は、化学療法薬に対して抵抗性である腫瘍試料に特異的な遺伝子発現パターンを定義づける。特定の態様では、対照試料は化学療法に反応性のがん患者から得た生物試料である。好ましくは、1 または複数の前記遺伝子の発現は、工程 (b) で検出される対照試料よりも、工程 (a) で検出される腫瘍試料において多い。好ましい実施形態では、動物はヒトであり、最も好ましくはヒトのがん患者である。本明細書で開示するように、本発明はさらに、遺伝子発現パターンであって、該パターンが検出されたときに前記化学療法薬に対する抵抗性が予測される遺伝子発現パターンも提供する。好ましい実施形態では、特に、本明細書で特定する複数の遺伝子産物に特異的な核酸 (遺伝子) プローブまたは抗体のアレイを用いて生物試料を分析することによって、遺伝子発現を検出する。

【0025】

都合のよいことに、本明細書で特定するいくつかの遺伝子は、これまで卵巣がんまたは結腸がんのいずれにも関連が認識されたことはなく、これらの疾患を治療処置するための新規な標的となる可能性がある。

【0026】

本発明の具体的な好ましい実施形態は、特定の好ましい実施形態に関する以下のより詳細な記述および特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0027】

10

20

30

40

50

本発明は、腫瘍細胞の増殖を抑制、遅延、または防止する方法を提供し、該方法は、腫瘍細胞を、その細胞が抵抗性を有する濃度の化学療法薬の存在下で、1または複数の表1に示す細胞遺伝子の発現または活性を修飾する少なくとも1種の修飾因子に接触させる工程からなり、腫瘍細胞を前記遺伝子発現修飾因子に接触させることにより腫瘍細胞の薬物抵抗性が低減、抑制、遅延、または防止される。腫瘍細胞は、例えば、卵巣がんでよい。1実施形態では、腫瘍細胞は、*in vivo*で（例えば、患者から取り出されていない細胞として）接触させてよい。

【0028】

本明細書では、「生物試料」という用語は、それだけには限らないが、動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトから得た組織または体液を含む。例えば、生物試料は、生検材料、骨髄試料、血液、血漿、血清、もしくはそれらの細胞画分、尿、唾液、涙、または生物供給源に由来する細胞でよい。1実施形態では、哺乳動物は、がん、特に卵巣がんまたは結腸がんに罹患していることが疑われるヒト、または、罹患していると以前に診断されたヒト、あるいは、それらのがんについてスクリーニングする必要があるヒトである。いくつかの実施形態では、生物試料は腫瘍試料である。

10

【0029】

本明細書では、「卵巣がん」という用語は、一般に上皮性卵巣がんを意味するものと理解されたい。上皮性卵巣がんは、卵巣組織に由来する全ての診断されたヒトのがんの約80%を占める。生殖細胞系由来の卵巣がんおよび卵巣明細胞がんを含む残りのがんは稀であり、しばしば誤診される。本明細書で開示する遺伝子発現の変化がこれら少数派の腫瘍のタイプでも認められる場合は、本発明の方法および組成物はそれらに適用される。

20

【0030】

本明細書では、遺伝子発現または遺伝子産物の活性の「修飾因子」は、遺伝子発現または遺伝子産物の活性を増大または低減させることができる任意の化学化合物、核酸分子、ペプチド、またはポリペプチドでよい。いくつかの実施形態では、本発明の修飾因子は、化学療法剤に対して抵抗性である腫瘍細胞において発現または活性が低減される1または複数の細胞遺伝子の発現または活性を増大させる化合物であり、このような修飾因子を本明細書では「活性化因子」と呼ぶ。他の実施形態では、修飾因子は、1または複数の細胞遺伝子、特に、化学療法剤に対して抵抗性である腫瘍細胞において発現が増大される遺伝子の発現または活性の阻害因子であり、このような修飾因子を本明細書では「阻害因子」と呼ぶ。

30

【0031】

本明細書では、「阻害因子」は、遺伝子産物の活性を低減させ、または遺伝子の発現を直接阻害することができる、任意の化学化合物、核酸分子、ペプチド、または遺伝子産物に対する抗体などのポリペプチドでよい。本発明の阻害因子は、例えば、遺伝子にコードされているタンパク質の活性を直接的または間接的に阻害することができる。直接的な阻害は、例えば、タンパク質に結合し、該結合によりそのタンパク質が受容体など所期の標的に結合するのを防ぐことによって達成されうる。間接的な阻害は、例えば、受容体や結合相手などタンパク質の所期の標的に結合し、該結合によりそのタンパク質の活性を妨害または低減させることによって達成されうる。さらに、本発明の阻害因子は遺伝子の発現を低減または抑制することにより、特に、遺伝子発現（転写、プロセッシング、翻訳、翻訳後修飾）に干渉することにより、例えば、遺伝子のmRNAに干渉し、その遺伝子産物の翻訳を妨害することによって、または遺伝子産物の翻訳後修飾によって、あるいは、細胞内局在の変化を引き起こすことによって、遺伝子を阻害することもできる。

40

【0032】

本明細書では、「活性化因子」は、（例えば、遺伝子産物を安定化させること、遺伝子産物のタンパク質分解を防止すること、または、遺伝子産物の酵素活性もしくは結合活性を増大させること、あるいは遺伝子発現を直接活性化することによって）、遺伝子産物の活性を増大させることができる、任意の化学化合物、核酸分子、ペプチド、またはポリペプチドでよい。本発明の活性化因子は、遺伝子にコードされているタンパク質の活性を直

50

接的または間接的に増大させることができる。直接的な活性化は、例えば、タンパク質に結合し、それによりそのタンパク質が受容体など所期の標的に結合するのを促進することによって達成されうる。間接的な活性化は、例えば、受容体や結合相手などタンパク質の所期の標的に結合し、活性を増大させる、例えば、その標的の有効濃度を高めることによって達成されうる。さらに、本発明の活性化因子は、遺伝子の発現を増大させることにより、例えば、遺伝子発現（転写、プロセッシング、翻訳、翻訳後修飾）を増大させることにより、例えば、遺伝子のmRNAを安定化し、もしくは、そのmRNA転写物の分解を妨害することによって、または遺伝子産物の翻訳後修飾によって、あるいは、細胞内局在の変化を引き起こすことによって、遺伝子を活性化することができる。

【0033】

10

本明細書で記述するように、化学療法抵抗性の卵巣腫瘍細胞におけるいくつかの遺伝子の発現は、化学療法感受性の卵巣腫瘍細胞における該遺伝子の発現と実質的に異なる。表1は、以下の実施例で記述する方法を用いて同定したそれらの遺伝子のリストを提供する。この表には、幅広く使用される化学療法剤であるシスプラチニンに対して感受性または抵抗性の細胞における、これらの遺伝子の発現パターンもまとめて示す。

【0034】

【表1】

表1

GenBank 登録番号	名称	染色体位置	タンパク質情報	細胞株で検証された発現パターン
BC015973	S100A10 p11 CLP11 カルバクチン1 軽鎖 42C	1q21.3	細胞外 96アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに 上昇
BC001410	S100A11 S100C カルギザリン	1q21.3	細胞外 105アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに 上昇
AF261089	カルパイン2 CANPL2 MCANP	1q41-q42.11	細胞質及び 細胞膜 700アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに 上昇
BC004974	SPARC オステオネクチン BM-40	5q31.3- q33.1	細胞外 303アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに 上昇
BC013782	MetAP2 p67eIF2 MNPEP	12q22	細胞質 478アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに 上昇
BC015525	KLK6 ザイム ニューロシン プロテアーゼM	19q13.33	細胞外 244アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに 上昇
AF222689	HMT1 HMT2 ANM1 HCP1	19q13.33	核 361アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに 低下
U31913	ARA9 XAP2	11q13.3	細胞質 330アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに 上昇
D83735	カルボニン2	19p13.3	細胞質 309アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに 上昇
U19251	NAIP	5q13.1-13.2	細胞質 1403アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに 低下
BC005291	eEF1ε p18	6p24.3- p25.1	細胞質 174アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに 低下
AF015608	RNPS1	16p13.3	細胞質	シスプラチン抵抗性の増大とともに 上昇
U49436	eIF5	14q32.32	細胞質	シスプラチン抵抗性の増大とともに 上昇

10

20

30

40

GenBank 登録番号	名称	染色体位置	タンパク質情報	細胞株で検証された発現パターン
	eIF5A		431アミノ酸	
BC013590	eIF2Bε	3q27.1	細胞質 721アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに 上昇
M65217	HSF2 HSTF2	6q22.31	細胞質および核 536アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに 上昇
AB010427	WDR1 NORI-1	4p16.1	細胞質 606アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに 上昇
BC001134	フューズドトウ (Ft1)	16q12.2	未知 292アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに 上昇
BC004880	NM23D mn23-H4	16p13.3	ミトコンドリアの 膜間腔 187アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに 上昇
U10439	ADAR1	1q21.1- q21.2	核 1226アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに 上昇
BC005214	グランカルシン	2q24.2	細胞質／膜 217アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに 上昇
BC009808	NBR1	17q21.1- q21.31	966アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに 上昇
L36870	SAPK/Erk1 JNKK1 MEK4 MKK4 MAPKK4	17p11.2-p12	細胞質 399アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに 上昇
AB007885	亜鉛フィンガー タンパク質—262 MYM	1p32-p34.3	未知	シスプラチン抵抗性の増大とともに 上昇

10

20

30

40

GenBank 登録番号	名称	染色体位置	タンパク質情報	細胞株で検証された発現パターン
D88153	HYA22	3p21.3	未知	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
AB049635	MRPL4 CGI-28	19p13.2	ミトコンドリア	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
AF037261	ビネキシンβ	8p21.3	細胞骨格に結合	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
M59818	G-CSFR	1p35-34.3	細胞膜または可溶形態 836アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
BC015710	RAB22A	20q13.32	膜に結合 194アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに低下
BC017201	IGFBP-7 MAC25 FSTL2	4q12	分泌型 282アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
BC011770	FASTキナーゼ	7q36.1	細胞質 549アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
AB057597	TESK2	1p34.1	核／細胞骨格に結合	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
BC022087	SRB1 CLA1 CD36L1	12q24.31	細胞膜	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
BC031890	KIAA0082	6p21.1	未知 836アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに上昇
NM_006312	NCOR2	12q24	核 2517アミノ酸	シスプラチン抵抗性の増大とともに低下
BC032338	MT1	16q13	主に核、分泌も可	シスプラチン抵抗性の増大とともに低下
X98494	MPP10	2p12-2p13.2	主に細胞質、 分泌も可	シスプラチン抵抗性の増大とともに低下

表1において太字で表されている染色体位置は、卵巣がんに関連していることが報告されている（ペジョイク（P e j o i c）、1995年、Ann. Med. 第27巻、73～78ページ）。

【0035】

1実施形態では、表1に示す細胞遺伝子の阻害因子は、例えば、小分子阻害因子、抗体、アンチセンス核酸などの核酸、低分子干渉RNA（s i R N A）分子、またはショートヘアピンRNA（s h R N A）分子でよい。さらに、このような阻害因子は、本明細書で記述する方法または当技術分野で公知の方法を用いて特異的に設計することもできる。例

10

20

30

40

50

えば、表1に示す遺伝子によってコードされるタンパク質に対する抗体、特に中和抗体、好ましくはモノクローナル抗体を、例えば、本願明細書に援用するハーロウ(Harlow)およびレーン(Lane)による「Antibodies: A Laboratory Manual」(コールドスプリングハーバー出版(Cold Spring Harbor Press)、1988年)に記載されている従来手段によって作製することができる。

【0036】

特定の実施形態では、本発明の阻害因子は、表1に示す遺伝子である標的遺伝子をコードするmRNAに結合するsiRNAである。

好ましい実施形態では、本発明により提供されるいくつかの阻害因子は、低分子干渉RNA(siRNA)の種類である。「低分子干渉RNA」または「siRNA」という用語は、本明細書では、例えば、バス(Bass)、2001年、Nature第411巻、428~429ページ；エルバシールら(Elbashir et al.)2001年、Nature第411巻、494~498ページ；クロイツェルら(Kreutzer et al.)、国際公開公報第00/44895号パンフレット；ゼルニッカ-ゴーツら(Zernicka-Goetz et al.)、国際公開公報第01/36646号パンフレット；ファイア(Fire)、国際公開公報第99/32619号パンフレット；プラエティンクら(Plaetinck et al.)、国際公開公報第00/01846号パンフレット；メローおよびファイア(Mello and Fire)、国際公開公報第01/29058号パンフレット；デシャン-デパイレット(Deschamps-Depaillette)、国際公開公報第99/07409号パンフレット、ならびに、リラ(Li et al.)、国際公開公報第00/44914号パンフレットで開示されているように、RNA干渉、すなわち「RN Ai」の能力を有する2本鎖核酸分子を意味する。本明細書では、siRNA分子は、RNAのみを含むこれらの分子に限定される必要はなく、RN Aiの能力または活性を有する化学的に改変されたヌクレオチドおよび非ヌクレオチドもさらに包含する。

【0037】

低分子干渉RNAを媒介としたRN Aiは、様々な系で研究されている。ファイアら(Fire et al.)は、線虫(*C. elegans*)におけるRN Aiを最初に観察した(1998年、Nature第391巻、806ページ)。ウィアニー(Wianny)およびゴーツ(Goetz)は、マウス胚でのdsRNAによって媒介されるRN Aiについて記述している(1999年、Nature Cell Biol.第2巻、70ページ)。ハ蒙ドら(Hammond et al.)は、dsRNAでトランスフェクションしたショウジョウバエ細胞でのRN Aiについて記述している(2000年、Nature第404巻、293ページ)。エルバシールら(Elbashir et al.)は、ヒト胚性腎臓細胞およびHeLa細胞などの培養した哺乳動物細胞に21ヌクレオチドの合成RNAの2重鎖を導入することによって誘導されるRN Aiについて記述している(2001年、Nature第411巻、494ページ)。これらの研究は、21ヌクレオチドからなるsiRNA2重鎖が、2ヌクレオチドの3'オーバーハングを含むときに最も高活性であることを示した。さらに、siRNAの1方または双方の鎖を2' - デオキシヌクレオチドまたは2' - O - メチルヌクレオチドで置換するとRN Ai活性が失われるが、siRNAの3'末端ヌクレオチドをデオキシヌクレオチドで置換することは許容されることが示された。siRNA2重鎖の中央部にミスマッチ配列があっても、RN Ai活性を無効にすることが示された。さらに、これらの研究は、標的RNAの切断部位の位置が、siRNAガイド配列の3'末端ではなく5'末端によって定められていることも示している(エルバシールら(Elbashir et al.)、2001年、EMBO J.第20巻、6877ページ)。他の研究は、siRNA2重鎖の標的に相補的な鎖上の5'リン酸がsiRNA活性に必要であること、およびそのsiRNA上の5'リン酸部分を維持するために細胞内でATPが利用されることを示した。(ニッカネン(Nykanen et al.)、2001年、Cell第1050

7巻、309ページ)。しかし、5'リン酸を欠いているsiRNA分子を外因的に導入すると活性を有しており、これは、siRNA構築物の5'リン酸化がin vivoで起こり得ることを示唆している。一部の応用例では、化学的に改変したsiRNAを血流に直接注入することができる。

【0038】

いくつかの実施形態では、本発明は、本発明の少なくとも1種のsiRNA分子をコードする核酸配列を、siRNA分子の発現が可能な方式で含む発現ベクターを提供する。例えば、このベクターは、2重鎖を含むsiRNA分子の双方の鎖をコードする配列を含むことができる。ベクターが、自己相補的であり、したがってsiRNA分子を形成する単一の核酸分子をコードする配列を含んでいてもよい。このような発現ベクターの非限定的な例は、ポールら(Paul et al.)2002年、Nature Biotechnology 第19巻、505ページ；宮岸および多比良(Miyagishi and Taira)、2002年、Nature Biotechnology 第19巻、497ページ；リーら(Lee et al.)、2002年、Nature Biotechnology 第19巻、500ページ；ならびにノビナラ(Novina et al.)、2002年、Nature Medicine、オンライン出版、2003年6月3日に記載されている。
10

【0039】

いくつかの実施形態では、本発明によるsiRNA分子は、特にリポソームなど、被験者に投与するための送達ビヒクル、担体および希釈剤ならびにそれらの塩を含んでよく、また、薬剤組成物中に存在してよい。核酸分子を送達するための方法は、例えば、アクタル(Akhtar et al.)、1992年、Trends Cell Bio. 第2巻、139ページ；Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics、アクタル(Akhtar)編、1995年；マウラーら(Maurer et al.)、1999年、Mol. Membr. Biol. 第16巻、129～140ページ；ホフランドおよびファン(Hofland and Huang)、1999年、Handb. Exp. Pharmacol. 第137巻、165～192ページ；ならびにリーら(Lee et al.)、2000年、ACS Symp. Ser. 第752巻、184～192ページに記載されており、これら全てを本願明細書に援用する。ベイグルマンら(Beigelman et al.)の米国特許第6395713号およびサリバンら(Sullivan et al.)の国際公開公報第94/02595号パンフレットは、核酸分子を送達するための一般的な方法をさらに記載している。これらのプロトコールは、実質的にどんな核酸分子を送達するのにも利用することができる。核酸分子は、それだけには限らないが、リポソームへの封入、イオン浸透法、または、ヒドロゲル、シクロデキストリン、生分解性のナノカプセル、および生体接着性ミクロスフェアなど他の送達ビヒクルへの組み込み、あるいは、タンパク質性のベクター(例えば、オヘアおよびノルマン(O'Hare and Normand)、国際公開公報第00/53722号パンフレットを参照のこと)など、当業者に公知の様々な方法によって細胞に投与することができる。
20
30
40

【0040】

あるいは、直接注射することによって、または薬剤注入ポンプを使用することによって、核酸／ビヒクルの組合せを局所的に送達させることができる。本発明の核酸分子の直接注射は、皮下であれ、筋肉内であれ、皮内であれ、標準の針とシリングによる方法を用いても、コンリーら(Conry et al.)、1999年、Clin. Cancer Res. 第5巻、2330～2337ページ、およびバリーら(Barry et al.)、国際公開公報第99/31262号パンフレットに記載されている方法などの無針技術によっても行うことができる。当技術分野の多くの実施例により、浸透圧ポンプ(チュンら(Chun et al.)、1998年、Neuroscience Letters 第257巻、135～138頁；ダルディンら(D'Aldin et al.
50

.)、1998年、*Mol. Brain Research* 第55巻、151~164ページ；ドライデンら (Dryden et al.)、1998年、*J. Endocrinol.* 第157巻、169~175ページ；ギルニカルら (Ghirnikar et al.)、1998年、*Neuroscience Letters* 第247巻、21~24ページ)、または直接注入 (ブローダスら (Broaddus et al.)、1997年、*Neurosurg. Focus* 第3巻、第4論文) によるオリゴヌクレオチドの送達方法が記載されている。他の送達経路としては、それだけには限らないが、経口送達 (錠剤または丸剤の形態などで) および / または髄腔内送達 (ゴールド (Gold)、1997年、*Neuroscience* 第76巻、1153~1158ページ) が挙げられる。核酸の送達および投与に関するより詳細な記述は、サリバンら (Sullivan et al.) による国際公開公報第94/02595号パンフレット、ドラパーら (Draper et al.) による国際公開公報第93/23569号パンフレット、ベイグルマンら (Beigelman et al.) による国際公開公報第99/05094号パンフレット、およびクリムクら (Klimuk et al.) による国際公開公報第99/04819号パンフレットに提供されており、これら全てを本願明細書に援用する。
10

【0041】

あるいは、本発明のある種の siRNA 分子を、細胞内部で真核生物プロモーターから発現させることができる (例えば、アイザントおよびウェイントロープ (Izant and Weintraub)、1985年、*Science* 第229巻、345ページ；マクギャリーおよびリンドキスト (McGarry and Lindquist)、1986年、*Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 第83巻、399ページ；スキャンロンら (Scanlon et al.)、1991年、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 第88巻、10591~5ページ；カシャニ - サベットら (Kashani-Sabet et al.)、1992年、*Antisense Res. Dev.* 第2巻、3~15ページ；ドロプリックら (Dropulic et al.)、1992年、*J. Virol.* 第66巻、1432~41ページ；ウィーラシングラ (Weerasinghe et al.)、1991年、*J. Virol.* 第65巻、5531~4ページ；オジヤングラ (Ojwang et al.)、1992年、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 第89巻、10802~6ページ；30 チエンら (Chen et al.)、1992年、*Nucleic Acids Res.* 第20巻、4581~9ページ；サーバーら (Sarver et al.)、1990年、*Science* 第247巻、1222~1225ページ；トンプソンら (Thompson et al.)、1995年、*Nucleic Acids Res.* 第23巻、2259ページ；グッドら (Good et al.)、1997年、*Gene Therapy* 第4巻、45ページ；宮岸ら (Miyagishi et al.)、2001年、*Nucleic Acids Research* 第29巻、2502ページ；ならびにクンケルおよびペーダースン (Kunkel and Pederson)、1989年、*Nucleic Acids Research* 第17巻、7371ページを参照のこと)。適切なDNA / RNAベクターを用いて、真核細胞内で任意の核酸を発現することは、当業者には認識されよう。このような核酸の活性は、該核酸を核酸酵素によって一次転写物から遊離されることにより増強することができる (ドレイパーら (Draper et al.) 国際公開公報第93/23569号パンフレット；サリバンら (Sullivan et al.) 国際公開公報第94/02595号パンフレット；大川ら (Ohkawa et al.)、1992年、*Nucleic Acids Symp. Ser.* 第27巻、15~6ページ；多比良ら (Tairai et al.)、1991年、*Nucleic Acids Res.* 第19巻、5125~30ページ；ベンチュラら (Ventura et al.)、1993年、*Nucleic Acids Res.* 第21巻、3249~55ページ；チョーリラら (Chowriera et al.)、1994年、*J. Biol. Chem.* 第269巻、40 50

25856ページ)。

【0042】

本発明の別の態様では、本発明のRNA分子は、DNAベクターまたはRNAベクター中に挿入された転写単位(例えば、クチュールら(Couture et al.)、1996年、TIG第12巻、510ページを参照のこと)から発現させることができる。これらの組換えベクターは、DNAプラスミドでもウイルスベクターでもよい。siRNAを発現するウイルスベクターは、例えば、それだけには限らないが、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはアルファウイルスをベースとして構築することができる。別の実施形態では、pol IIIベースの構築物を用いて、本発明の核酸分子を発現させる(例えば、トンプソン(Thompson)、米国特許第5902880号および同第6146886号を参照のこと)。siRNA分子を発現することができる組換えベクターは、前述したように送達され、標的細胞中に存在し続けてもよい。あるいは、核酸分子の一過性発現を提供するウイルスベクターを使用することもできる。このようなベクターは、必要に応じて繰り返し投与することができる。発現されると、siRNA分子は標的mRNAと相互に作用し、RNai反応が生じる。siRNA分子発現ベクターの送達は、静脈内投与もしくは筋肉内投与によって、被験者から取り出した標的細胞に投与した後、被験者に該細胞を再導入することによって、または所望の標的細胞中への導入を可能にすると考えられる他の任意の手段によってなど、全身的に行うことができる(総説は、例えば、クチュールら(Couture et al.)、1996年、TIG.第12巻、510ページを参照のこと)。

【0043】

1実施形態では、本発明は、少なくとも1種の本発明のsiRNA分子をコードする核酸配列を含む発現ベクターを提供する。この発現ベクターは、siRNA2重鎖の一方もしくは双方の鎖をコードするものでもよいし、または、自己ハイブリダイズしてsiRNA2重鎖となる単一の自己相補鎖をコードしてもよい。siRNA分子をコードしている核酸配列は、siRNA分子の発現を可能にする方式で、作動可能なように連結させることができる(例えば、ポールら(Paul et al.)、2002年、Nature Biotechnology第19巻、505ページ;宮岸および多比良(Miyagiishi and Taira)、2002年、Nature Biotechnology第19巻、497ページ;リーら(Lee et al.)、2002年、Nature Biotechnology第19巻、500ページ;ならびにノビナラ(Novina et al.)、2002年、Nature Medicine、オンライン出版、6月3日を参照のこと)。本明細書では、「作動可能なように連結される」という用語は、そのように記述されるフランкиング配列が通常の機能を果たすように構成または組み立てられている、フランкиング配列の配置を意味する。したがって、コード配列に作動可能なように連結したフランкиング配列は、コード配列の複製、転写、および/または翻訳を実施することができるようになるであろう。例えば、プロモーターがコード配列の転写を指示することができるとき、コード配列はそのプロモーターに作動可能なように連結している。フランкиング配列は、正しく機能する限り、コード配列に連続的である必要はない。したがって、例えば、翻訳されないが転写される介在配列がプロモーター配列とコード配列の間に存在してもよく、このようなプロモーター配列もコード配列に「作動可能なように連結している」とみなすことができる。

【0044】

別の態様では、本発明は発現ベクターを提供し、該発現ベクターは、a)転写開始領域(例えば、真核生物のpol I、II、またはIII開始領域)、b)転写終結領域(例えば、真核生物のpol I、II、またはIII終結領域)、ならびにc)本発明のsiRNA分子のうちの少なくとも1種をコードしている核酸配列を含み、前記配列が、siRNA分子の発現および/または送達を可能にする方式で前記開始領域および前記終結領域に作動可能なように連結している。このベクターは、本発明のsiRNAをコードする配列の5'側もしくは3'側に作動可能なように連結された、タンパク質のオープン

リーディングフレーム(ORF)、および/またはイントロン(介在配列)を任意選択で含んでよい。

【0045】

s i R N A 分子配列の転写は、真核生物の R N A ポリメラーゼ I (pol I) 、 R N A ポリメラーゼ I I (pol I I) 、または R N A ポリメラーゼ I I I (pol I I I) のプロモーターから駆動することができる。 pol I I または pol I I I プロモーターからの転写物は、全ての細胞において高レベルで発現されるが；ある種の細胞における所与の pol I I プロモーターのレベルは、近隣に存在する遺伝子調節配列(エンハンサー、サイレンサーなど)の性質に応じて変わる。原核生物の R N A ポリメラーゼ酵素が適切な細胞で発現される場合には、原核生物の R N A ポリメラーゼプロモーターも使用される(エルロイ・ステインおよびモス(Elroy-Stein and Moss)、1990年、 Proc . Natl . Acad . Sci . USA 第87巻、6743~7ページ；ギャオおよびファン(Gao and Huang)1993年、 Nucleic Acids Res . 第21巻、2867~72ページ；リーバーら(Lieber et al.)、1993年、 Methods Enzymol . 第217巻、47~66ページ；ジョウラ(Zhou et al.)、1990年、 Mol . Cell Biol . 第10巻、4529~37ページ)。数人の研究者が、これらのプロモーターから発現される核酸分子が哺乳動物細胞中で機能できることを実証している(例えば、カシャニ・サベットら(Kashani-Sabet et al.)、1992年、 Antisense Res . Dev . 第2巻、3~15ページ；オジヤングら(Ojwang et al.)、1992年、 Proc . Natl . Acad . Sci . USA 第89巻、10802~6ページ；チェンら(Chen et al.)、1992年、 Nucleic Acids Res . 第20巻、4581~9ページ；ユラ(Yu et al.)、1993年、 Proc . Natl . Acad . Sci . USA 第90巻、6340~4ページ；リューリエラ(L'Huillier et al.)、1992年、 EMBO J . 第11巻、4411~8ページ；リスジーウィツツラ(Lisziewicz et al.)、1993年、 Proc . Natl . Acad . Sci . U.S.A 第90巻、8000~4ページ；トンプソンら(Thompson et al.)、1995年、 Nucleic Acids Res . 第23巻、2259ページ；サレンジャーおよびチェフら(Sullenger and Cech)、1993年、 Science 第262巻、1566ページ)。より詳細には、U6低分子核内(snRNA)、転移R N A(t R N A)、およびアデノウイルスVA R N Aをコードする遺伝子に由来するものなどの転写単位は、細胞で s i R N A など所望の R N A 分子を高濃度で生じさせるのに有用である(トンプソンら(Thompson et al.)、1995年、 Nucleic Acids Res . 第23巻、2259ページ；クチュールら(Couture et al.)、1996年、 TIG 第12巻、510ページ；ヌーンバーグら(Noonberg et al.)、1994年、 Nucleic Acid Res . 第22巻、2830ページ；ヌーンバーグら(Noonberg et al.)、米国特許第5624803号；グッドら(Good et al.)、1997年、 Gene Ther . 第4巻、45ページ；ベイグルマンら(Beigelman et al.)、国際公開公報第96/18736号パンフレット)。上記の s i R N A 転写単位は、それだけには限らないが、プラスミドD N Aベクター、ウイルスD N Aベクター(アデノウイルスペクターやアデノ随伴ウイルスペクターなど)、またはウイルスR N Aベクター(レトロウイルスペクターやアルファウイルスペクターなど；総説は、クチュールら(Couture et al.)、1996年、 TIG 第12巻、510ページを参照のこと)などの、哺乳動物の細胞中に導入するための様々なベクター中に組み入れることができる。

【0046】

別の実施形態では、本発明は、本発明の s i R N A 分子のうちの少なくとも1種をコードする核酸配列を、その s i R N A 分子の発現を可能にする方式で含む発現ベクターを提

供する。特定の実施形態では、発現ベクターは、a) 転写開始領域、b) 転写終結領域、ならびにc) s i R N A 分子の少なくとも1本の鎖をコードしている核酸配列を含み、その配列は、s i R N A 分子の発現および/または送達を可能にする方式で開始領域および終結領域に作動可能なように連結している。

【0047】

別の実施形態では、発現ベクターは、a) 転写開始領域、b) 転写終結領域、c) オープンリーディングフレーム、ならびにd) s i R N A 分子の少なくとも1本の鎖をコードしている核酸配列を含み、該配列は、オープンリーディングフレームの3'末端に作動可能なように連結しており、かつ、該配列は、s i R N A 分子の発現および/または送達を可能にする方式で、開始領域、オープンリーディングフレーム、および終結領域に作動可能なように連結している。

10

【0048】

さらに別の実施形態では、発現ベクターは、a) 転写開始領域、b) 転写終結領域、c) イントロン、ならびにd) 少なくとも1種のs i R N A 分子をコードしている核酸配列を含み、該配列は、核酸分子の発現および/または送達を可能にする方式で、開始領域、イントロン、および終結領域に作動可能なように連結している。

【0049】

別の実施形態では、発現ベクターは、a) 転写開始領域、b) 転写終結領域、c) イントロン、d) オープンリーディングフレーム、ならびにe) s i R N A 分子の少なくとも1本の鎖をコードしている核酸配列を含み、該配列は、オープンリーディングフレームの3'末端に作動可能なように連結しており、かつ、該配列は、s i R N A 分子の発現および/または送達を可能にする方式で、開始領域、イントロン、オープンリーディングフレーム、および終結領域に作動可能なように連結している。

20

【0050】

1実施形態では、S P A R C を阻害するs i R N A に腫瘍細胞を接触させることによって、腫瘍細胞の増殖を抑制する。あるいは、腫瘍細胞が抵抗性を示す濃度の化学療法薬の存在下で、腫瘍細胞をs i R N A と接触させてよい。S P A R C の阻害因子であるs i R N A 分子の例には、例えば、

A A T C C T G T C C A G G T G G A A G T A (配列番号1) ;

A A G C T C C A C C T G G A C T A C A T C (配列番号2) ; および

A A T G A C A A G T A C A T C G C C C T G (配列番号3) ;

30

が挙げられる。

【0051】

別の実施形態では、M e t A P 2 / p 6 7 を阻害するs i R N A に腫瘍細胞を接触させることによって、腫瘍細胞の増殖を抑制する。あるいは、腫瘍細胞が抵抗性を示す濃度の化学療法薬の存在下で、腫瘍細胞をs i R N A と接触させてよい。M e t A P 2 / p 6 7 の阻害因子であるs i R N A 分子の例には、例えば、

A A A G A T C A G C A T T G G A A G A T A (配列番号4) ;

A A G C A C A T C G A C A A G T T A G A A (配列番号5) ; および

A A A C A G T G C C G A T T G T G A A A G (配列番号6) ;

40

が挙げられる。

【0052】

別の実施形態では、カルパイン2を阻害するs i R N A に腫瘍細胞を接触させることによって、腫瘍細胞の増殖を抑制する。あるいは、腫瘍細胞が抵抗性を示す濃度の化学療法薬の存在下で、腫瘍細胞をs i R N A と接触させてよい。カルパイン2の阻害因子であるs i R N A 分子の例には、例えば、

A A G G C A T A C G C C A A G A T C A A C (配列番号7) ;

A A A C T T C T T C C T G A C G A A T C G (配列番号8) ; および

A A A C G C T A T T C A A G A T A T T T A (配列番号9) ;

50

が挙げられる。

【0053】

別の実施形態では、S100A10を阻害するsiRNAに腫瘍細胞を接触させることによって、腫瘍細胞の増殖を抑制する。あるいは、腫瘍細胞が抵抗性を示す濃度の化学療法薬の存在下で、腫瘍細胞をsiRNAと接触させてよい。S100A10の阻害因子であるsiRNA分子の例には、例えば、

A A A T G G A A C A C G C C A T G G A A A (配列番号59) ;
 A A A T T C G C T G G G G A T A A A G G C (配列番号60) ; および
 A A T A A T G A A G G A C C T G G A C C A (配列番号61)

10

が挙げられる。

【0054】

本発明は、腫瘍細胞の増殖を抑制、遅延、または防止するための方法であって、1または複数の化学療法剤と、表1に示す遺伝子である細胞遺伝子の少なくとも1種の阻害因子との組合せに、腫瘍細胞を接触させる工程からなる方法も提供する。好ましくは、腫瘍細胞は卵巣がん細胞である。化学療法剤は当技術分野で公知であり、例えば、シスプラチニン、パクリタキセル、カルボプラチニン、エトポシド、ヘキサメチルアミン、メルファラン、およびアントラサイクリン類が含まれる。

【0055】

1実施形態では、表1に示す細胞遺伝子の阻害因子は、小分子の阻害因子でよい。本明細書では、「小分子」という用語は、分子量が約1500g/mol未満の分子を指す。小分子は、例えば、有機小分子、ペプチド、またはペプチド様分子でよい。例として、本発明の方法に適した小分子阻害因子は、PD147631、(25,35)-トランス-エポキシスクシニル-L-ロイシルアミド-3メチルブタンエチルエステル(E-64-d)、N-アセチル-ロイシル-ロイシル-ノルロイシナール(ALLN)、N-アセチル-Leu-Leu-Met-アール(ALLMまたはC₁₉H₃₅N₃O₄S)、MDL18270などのカルパイン阻害因子；あるいは、TNP-470(AGM1470またはC₁₉H₂₈CINO₆としても知られている)、フマギリン(C₂₆H₃₄O₇)、シス-フマギリン(クォンら(Kwon et al.)、2000年、J. Antibiot.第53巻、799~806ページを参照のこと)、フマガロン(ジョウラ(Chou et al.)、2003年、J. Med. Chem.第46巻、3452~3454ページを参照のこと)、オバリシン(C₁₆H₂₄O₄)などのMetAP-2阻害因子でよい。ハンラ(Han et al.)、2000年、Bioorganic & Medicinal Chem. Letters第10巻、39~43ページも参照のこと。

20

【0056】

1実施形態では、表1に示す細胞遺伝子の阻害因子は、上記に定義した阻害因子でよい。例えば、表1に示す特定の遺伝子に対する複数の阻害因子、1または複数の特定の遺伝子をそれぞれ阻害する阻害因子の組合せ、または表1に示す複数の遺伝子を阻害する阻害因子、あるいはそれらの任意の組合せなど、阻害因子の任意の組合せを使用することができる。

40

【0057】

特定の実施形態では、本発明の方法は、MetAP2の阻害因子とプラチナ系の化学療法薬との組合せに腫瘍細胞を接触させる工程からなる。化学療法薬の主成分がシスプラチニンまたはカルボプラチニンであり、任意選択でタキソールまたはシクロホスファミドと組み合わされる場合、該化学療法薬は「プラチナ系」である。MetAP2の阻害因子は、例えば、フマギリンもしくはフマギリンの誘導体、または、それだけには限らないが配列番号4、配列番号5、配列番号6などのMetAP2のsiRNAでよい。

【0058】

50

本発明は、卵巣がん患者の腫瘍が化学療法的治療に対して抵抗性であるかどうかを予測するための方法も提供する。これらの実施形態では、該方法は、(a)患者から得た生物試料中の、1または複数の表1に示されている発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程、(b)対照試料中の、1または複数の表1に示されている発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程、(c)工程(a)で測定された発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程(b)で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程からなり、工程(a)で検出された量が工程(b)で検出された量と少なくとも20%異なる場合は、その患者が化学療法に対して抵抗性であると予測される。1実施形態では、検出される量は、表1に示す遺伝子のmRNAの量でもよいし、表1に示す遺伝子によってコードされるタンパク質の量でもよい。別の実施形態では、対照試料は、反応性の被験者または正常な被験者、すなわち、治療法に反応する個体、または卵巣がんなどのがんに罹患していない個体から得た生物試料である。特定の態様では、生物試料は腫瘍試料である。10

【0059】

1実施形態では、工程(a)および工程(b)で発現される遺伝子は、S100A10、S100A11、カルパイン2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、カルポニン2、RNPS1、eIF5、eIF2B、HSF2、WDR1、フューズドトウ(Fused toes)、NM23D、ADAR1、グランカルシン、NBR1、SAPK/Erk1、亜鉛フィンガータンパク質-262MYM、HYA22、MRPL4、ビネキシン、G-CSFR、IGFBP-7、FASTキナーゼ、TESK2、SRB1、KIAA0082のうちの1または複数であり、工程(a)で発現される遺伝子の量が工程(b)で発現される遺伝子の量より少なくとも約20%多い場合は、患者の腫瘍が化学療法的治療に対して抵抗性であると予測される。20

【0060】

特定の実施形態では、工程(a)および工程(b)で発現される遺伝子は、ビネキシン、G-CSFR、KLK6、SPARC、HYA22、カルパイン2、SAPK/Erk1、SRB1、ADAR1、MRPL4、eIF5、eIF2B、WDR1、NM23D、亜鉛フィンガータンパク質-262MYM、RNPS1、S100A10、S100A11、MetAP2のうちの1または複数であり、工程(a)で発現される遺伝子の量が工程(b)で発現される遺伝子の量より少なくとも約20%多い場合は、患者の腫瘍が化学療法的治療に対して抵抗性であると予測される。30

【0061】

別の実施形態では、工程(a)および工程(b)で発現される遺伝子は、HMT1、NAIP、eEFP1、RAB22A、NCOR2、MPP10、MT1のうちの1または複数であり、工程(a)で発現される遺伝子の量が工程(b)で発現される遺伝子の量より少なくとも約20%、好ましくは50%少ない場合は、患者の腫瘍が化学療法的治療に対して抵抗性であると予測される。

【0062】

特定の実施形態では、工程(a)および工程(b)で発現される遺伝子は、HMT1、eEFP1、NAIP、RAB22A、MT1のうちの1または複数であり、工程(a)で発現される遺伝子の量が工程(b)で発現される遺伝子の量より少なくとも約20%、好ましくは50%少ない場合は、患者の腫瘍が化学療法的治療に対して抵抗性であると予測される。40

【0063】

したがって、本明細書で開示するように、本発明は、1または複数の遺伝子発現パターンまたは遺伝子産物活性のパターンを提供し、該パターンは、差次的に(すなわち、より多い量またはより少ない量で)発現される複数の遺伝子か、または、前記遺伝子によってコードされるタンパク質生成物が正常(すなわち、非腫瘍、または化学療法感受性の)細胞と比べて化学療法薬抵抗性の卵巣腫瘍細胞で差次的な活性を有する複数の遺伝子を含む。差次的な遺伝子発現またはタンパク質生成物の活性の前記パターンは、生物試料、最も50

好ましくは腫瘍試料中の化学療法薬抵抗性の細胞を検出するために、本発明の方法に従つて使用され、したがって、著しい罹患率および死亡率を伴う効果の無い治療過程を臨床医が開始する前に、個体から得た腫瘍の薬物抵抗性を予測するのに有用である。

【0064】

本発明の方法の実施に際して、本明細書で特定する遺伝子のうちの1または複数の発現に関する患者の腫瘍試料を評価できることが、当業者には理解されよう。本明細書で特定する複数の遺伝子の各々は、個々の卵巣がん患者から単離した個々の腫瘍についてある比率で、最も好ましくは高い比率で、本明細書で開示する方法を用いて検出される差次的な遺伝子発現を示すことが予想される。本発明の予測方法を用いて得られる結果の信頼性は、本明細書で開示する差次的な遺伝子発現を示す前記遺伝子の分析される遺伝子数の増加とともに高まることも予想される。10

【0065】

1実施形態では、本発明の方法は、実際に患者を化学療法剤で治療する前に、化学療法を用いた治療が必要なヒト患者をスクリーニングするために使用することができる。したがって、本発明の方法は、特定の化学療法剤を用いて患者を治療することが無効か否かを医療提供者が判断するのを可能にするために、患者をスクリーニングするのに使用することができる。本発明の方法に基づいて化学療法に対して抵抗性ではないと予測される患者は、化学療法および／または表1に示す遺伝子の阻害因子を用いた治療の候補者である。本発明の方法に基づいて化学療法に対して抵抗性であると予測される患者は、特に外科治療、および／または表1に示す遺伝子の阻害因子を併用する化学療法的治療、あるいは別の治療方法の候補者とすることができる。20

【0066】

本発明の方法の実施に際して、本明細書で詳細に記述するように、例えば、ノーザンプロットやドットプロットなどのハイブリダイゼーションアッセイにより、またはポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）などの増幅方法、より好ましくはmRNAのcDNAへの逆転写を加え（RT-PCR）、さらに好ましくは定量的リアルタイムRT-PCRとして当技術分野で公知の技術を用いて、生物試料中で発現されている、本明細書で特定する遺伝子のうちの任意のものをコードするmRNAの量を検出することによって、遺伝子発現を検出する。他の手法には前記1または複数の遺伝子のタンパク質生成物の量を検出することが挙げられるが、非限定的な例として、タンパク質に特異的な抗血清、より好ましくは抗体、さらに好ましくは、本明細書で特定する任意の特定の遺伝子に対して特異的なモノクローナル抗体を用いて生物試料を分析することによって検出される。タンパク質生成物の酵素活性または抗原活性に関して生物試料を分析することによって、タンパク質発現レベルを測定することもできる。本発明はまた、化学療法薬に抵抗性の腫瘍、特に卵巣腫瘍および結腸腫瘍において過剰発現または過小発現される遺伝子の発現を検出するための遺伝子アレイまたは抗体アレイも提供し、該アレイは、アレイ中の核酸プローブもしくは抗体の配置が、腫瘍試料が化学療法薬に抵抗性であるときに認識可能な、好ましくは機械可読なパターンを生じ、かつ／または腫瘍試料が化学療法薬に感受性のときに認識可能な異なるパターンを生じる。30

【0067】

例えば、本発明の方法によれば、患者から得た生物試料で発現されるMetAP2の量を測定し、卵巣がんに罹患しており化学療法に反応した人、または卵巣がんに罹患しており化学療法に反応しなかった人のいずれかで発現されるMetAP2の量と比較する。本明細書では、化学療法的治療が腫瘍のサイズを縮小し、または腫瘍の増殖を止める効果を示した場合、その人が化学療法に「反応」したとする。さらに、「反応性の患者」という用語は、外科的切除後に化学療法で治療され、少なくとも6ヶ月、疾患の臨床徵候が無いままである患者を意味するものとする。患者のMetAP2の量が、卵巣がんに罹患し化学療法に反応した人で発現されるMetAP2の量と等しいかまたはそれより少ない場合、その患者は、ある種の化学療法剤（例えば、プラチナ系化合物）に反応性であると予測される。患者のMetAP2の量が、卵巣がんに罹患し化学療法に反応した人で発現され4050

るMetAP2の量より多い場合、その患者は、化学療法剤に対して抵抗性であると予測される。同様に、患者のMetAP2の量が、がんに罹患しているが化学療法に反応しなかつた人で発現されるMetAP2の量より多い場合も、その患者は、化学療法剤に対して抵抗性であると予測される。

【0068】

表1および下記の実施例で示すように、卵巣がんでのMetAP2発現の増大は、プラチナ系の化学療法剤であるシスプラチンに対する抵抗性の増大に関連がある。したがって、1実施形態では、本発明の方法は、がん患者から得た生物試料で発現されるMetAP2の測定量が、反応性の個体で検出された所定の量より多い場合に、患者の腫瘍がプラチナ系の化学療法に対して抵抗性であると予測することができる。別の実施形態では、本発明の方法は、がん患者から得た生物試料で発現されるMetAP2の測定量が、反応性の個体で検出された所定の量と同等であるが、S100A10、S100A11、カルパイン2、SPARC、KLK6、ARA9、カルポニン2、RNPS1、eIF5、eIF2B、HSF2、WDR1、フューズドトウ(Fused toes)、NM23D、ADAR1、グランカルシン、NBR1、SAPK/Erk1、亜鉛フィンガータンパク質-262MYM、HYA22、MRPL4、ビネキシン、G-CSFR、IGFBP-7、FASTキナーゼ、TESK2、SRB1、もしくはKIAA0082のうち1または複数の遺伝子の発現が、反応性の患者よりも過剰に発現しているか、かつ/またはHMT1、NAIP、eEFP1、RAB22A、NCOR2、MT1、MPP10遺伝子のうちの1または複数の発現が反応性の患者での発現と比べて低下している場合に、患者の腫瘍がプラチナ系の化学療法に対して抵抗性であると予測することができる。10

【0069】

本発明はさらに、卵巣がん患者、特に化学療法的治療を受けている卵巣がん患者における疾患の進行を観察するための方法を提供し、該方法は、(a)患者から採取した生物試料中の1または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子が、S100A10、S100A11、カルパイン2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、カルポニン2、RNPS1、eIF5、eIF2B、HSF2、WDR1、フューズドトウ(Fused toes)、NM23D、ADAR1、グランカルシン、NBR1、SAPK/Erk1、亜鉛フィンガータンパク質-262MYM、HYA22、MRPL4、ビネキシン、G-CSFR、IGFBP-7、FASTキナーゼ、TESK2、SRB1、KIAA0082、MPP10、HMT1、NAIP、eEFP1、RAB22A、NCOR2、またはMT1である工程、(b)その後の採取により患者から得た生物試料を用いて工程(a)を繰り返す工程、ならびに(c)工程(a)で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程(b)で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程からなり、工程(a)で採取した生物試料に対する、その後採取した生物試料中の発現遺伝子または遺伝子産物の量の差異を検出することによって、疾患の進行を観察する方法である。特定の態様では、生物試料は腫瘍試料である。30

【0070】

本明細書で説明するように、工程(a)および(b)で発現される1または複数の遺伝子がS100A10、S100A11、カルパイン2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、カルポニン2、RNPS1、eIF5、eIF2B、HSF2、WDR1、フューズドトウ(Fused toes)、NM23D、ADAR1、グランカルシン、NBR1、SAPK/Erk1、亜鉛フィンガータンパク質-262MYM、HYA22、MRPL4、ビネキシン、G-CSFR、IGFBP-7、FASTキナーゼ、TESK2、SRB1またはKIAA0082であり、工程(b)で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量が、工程(a)での発現遺伝子または遺伝子産物の量と比べて多いとき、疾患の進行が検出される。いくつかの実施形態では、患者は、工程(a)での遺伝子発現量と工程(b)での検出量との検出の間の期間、化学療法的治療または他の治療を受ける。4050

【0071】

本明細書で説明するように、工程(a)および(b)で発現される1または複数の遺伝子がHMT1、NAIP、eEF1、RAB22A、NCOR2、MT1またはMPP10であり、工程(b)で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量が、工程(a)での発現遺伝子または遺伝子産物の量より少ないと、疾患の進行が検出される。

【0072】

いくつかの実施形態では、患者は、工程(a)での遺伝子発現量と工程(b)での検出量との検出の間の期間、化学療法的治療または他の治療を受ける。いくつかの実施形態では、検出量は、表1に示す遺伝子のmRNAの量でもよいし、表1に示す遺伝子によってコードされるタンパク質の量でもよい。10

【0073】

患者の卵巣がんの進行を観察するための本発明の方法は、例えば、患者が、化学療法的治療計画などのある種の治療計画に対して陽性に反応しているか陰性に反応しているかを判定するのに使用することができる。

【0074】

例えば、患者がある種の治療計画を開始した後のある時点で該患者から採取した生物試料において、S100A10、S100A11、カルパイン2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、カルポニン2、RNPS1、eIF5、eIF2B、HSF2、WDR1、フューズドトウ(Fused toes)、NM23D、ADAR1、グランカルシン、NBR1、SAPK/Erk1、亜鉛フィンガータンパク質-262MYM、HYA22、MRPL4、ビネキシン、G-CSFR、IGFBP-7、FASTキナーゼ、TESK2、SRB1、またはKIAA0082の発現が、その治療計画が開始される前または開始時点で採取した生物試料での発現遺伝子の量と比べて、同じかまたは多い場合、患者は陰性に反応している。別の例では、患者がある種の治療計画を開始した後のある時点で該患者から採取した生物試料において、HMT1、NAIP、eEF1、RAB22A、NCOR2、MT1、またはMPP10の発現が、その治療計画が開始される前または開始時点で採取した生物試料での発現遺伝子の量と比べて、同じかまたは少ない場合、患者は陰性に反応している。このような場合、医療提供者は、その治療計画が有効ではないと判断することができる。20

【0075】

あるいは、患者がある種の治療計画を開始した後のある時点で該患者から採取した生物試料におけるS100A10、S100A11、カルパイン2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、カルポニン2、RNPS1、eIF5、eIF2B、HSF2、WDR1、フューズドトウ(Fused toes)、NM23D、ADAR1、グランカルシン、NBR1、SAPK/Erk1、亜鉛フィンガータンパク質-262MYM、HYA22、MRPL4、ビネキシン、G-CSFR、IGFBP-7、FASTキナーゼ、TESK2、SRB1、またはKIAA0082の発現が、その治療計画が開始される前または開始時点で採取した生物試料での発現遺伝子の量と比べて少ない場合、患者は陽性に反応しており、治療の変更は必要とされない。さらに、患者がある種の治療計画を開始した後のある時点で該患者から採取した生物試料におけるHMT1、NAIP、eEF1、RAB22A、NCOR2、MT1、またはMPP10の発現が、その治療計画が開始される前または開始時点で採取した生物試料での発現遺伝子の量と比べて多い場合、患者は陽性に反応している。3040

【0076】

さらに、本発明は、患者のがんを治療するための薬剤としての薬剤組成物の有効性を観察するための方法を提供し、該方法は、(a)患者から採取した生物試料中の1または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子が、S100A10、S100A11、カルパイン2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、カルポニン2、RNPS1、eIF5、eIF2B、HSF2、WDR1、フューズドトウ(Fused toes)、NM23D、A50

D A R 1、グランカルシン、N B R 1、S A P K / E r k 1、亜鉛フィンガータンパク質 - 2 6 2 M Y M、H Y A 2 2、M R P L 4、ビネキシン、G - C S F R、I G F B P - 7、F A S T キナーゼ、T E S K 2、S R B 1、またはK I A A 0 0 8 2 である工程、(b) ある量の薬剤組成物を患者に投与する工程、(c) その後の採取により患者から得た生物試料を用いて工程 (a) を繰り返す工程、ならびに (d) 工程 (a) で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程 (c) で検出される発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程からなり、工程 (a) で採取した生物試料に対する、その後採取した生物試料中の発現遺伝子または遺伝子産物の量の変化を検出することによって薬剤組成物の有効性を観察する方法である。薬剤組成物を用いた治療後に採取した生物試料での遺伝子発見が、薬剤組成物を用いた治療の前に採取した生物試料での遺伝子発見より多いかまたは等しく、かつ、薬剤組成物を用いた治療の間、腫瘍の成長が減速、遅延、および抑制されなかった場合、その薬剤組成物はその患者のがんの治療には無効であるとみなすことができる。例えば、S 1 0 0 A 1 0 のm R N A の量が、患者を薬剤組成物で治療した後に得た試料においてより多い場合は、その患者はその薬剤組成物を用いたさらなる治療に対して抵抗性であると予測される。したがって、その薬剤組成物は、その患者のがんに対して無効であるとみなされる。特定の態様では、生物試料は腫瘍試料である。10

【 0 0 7 7 】

本発明は、患者のがんを治療するための薬剤としての薬剤組成物の有効性を観察するための方法をさらに提供し、該方法は、(a) 患者から採取した生物試料中の 1 または複数の発現遺伝子または該遺伝子によってコードされる遺伝子産物の量を検出する工程であって、その発現遺伝子が、H M T 1、N A I P、e E F 1 、R A B 2 2 A、N C O R 2、M T 1、またはM P P 1 0 である工程、(b) ある量の薬剤組成物を患者に投与する工程、(c) その後の採取により患者から得た生物試料を用いて工程 (a) を繰り返す工程、ならびに (d) 工程 (a) で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量を工程 (c) で検出された発現遺伝子または遺伝子産物の量と比較する工程からなり、工程 (a) で採取した、すなわち、薬剤組成物を用いて治療する前に採取した生物試料に対する、薬剤組成物を用いて治療した後に採取した生物試料中の発現遺伝子または遺伝子産物の量の変化を検出することによって薬剤組成物の有効性を観察する方法である。後で採取した(すなわち、薬剤組成物を用いた治療の後に採取した) 生物試料での 1 または複数の前記遺伝子の遺伝子発見が、先に採取した生物試料(すなわち、薬剤組成物を用いる治療の前に採取した生物試料) での遺伝子発見より低いかまたはそれに等しく、かつ、薬剤組成物を用いた治療の間、腫瘍の成長が減速、遅延、および抑制されなかった場合、その薬剤組成物はその患者のがんの治療には無効であるとみなすことができ、その患者は、その薬剤組成物を用いたさらなる治療に対して抵抗性であると予測される。したがって、その薬剤組成物は、その患者のがんに対して無効であるとみなされる。特定の態様では、生物試料は腫瘍試料である。2030

【 0 0 7 8 】

本明細書では、「薬剤組成物」とは、結腸がんや卵巣がんなどのがんを治療するために使用される、または前記がんを治療する能力について試験される化合物(例えば、タンパク質、ペプチド、ペプチドミメティック、非ペプチド性有機分子、無機低分子、または核酸分子) を含む任意の配合物でよい。40

【 0 0 7 9 】

本発明は、腫瘍細胞、特に化学療法抵抗性の腫瘍細胞、最も具体的には化学療法抵抗性の卵巣がん細胞の増殖を抑制する化合物を同定するための方法も提供する。これらの実施形態では、この方法は、(a) 化学療法抵抗性の卵巣がん細胞において過剰発現される 1 または複数の遺伝子を発現する細胞を試験化合物と接触させる工程であって、その遺伝子が、S 1 0 0 A 1 0、S 1 0 0 A 1 1、カルパイン 2、S P A R C、M e t A P 2、K L K 6、A R A 9、カルポニン 2、R N P S 1、e I F 5、e I F 2 B 、H S F 2、W D R 1、フューズドトウ(F u s e d t o e s)、N M 2 3 D、A D A R 1、グランカルシン、N B R 1、S A P K / E r k 1、亜鉛フィンガータンパク質 - 2 6 2 M Y M、H Y50

A 2 2、M R P L 4、ビネキシン、G - C S F R、I G F B P - 7、F A S T キナーゼ、T E S K 2、S R B 1、またはK I A A 0 0 8 2である工程、(b) 試験化合物の存在下および不在下での遺伝子の発現を検出する工程、ならびに(c) 試験化合物の存在下での遺伝子発現を試験化合物の不在下での遺伝子発現と比較する工程からなり、試験化合物の存在下での遺伝子の発現が試験化合物の不存下での遺伝子発現と比べて低減されている場合、化合物は化学療法抵抗性の腫瘍細胞の増殖を抑制する化合物として同定される。特定の態様では、生物試料は腫瘍試料である。いくつかの実施形態では、この化合物は、化学療法薬の存在下で腫瘍細胞の増殖を抑制することができる。

【 0 0 8 0 】

さらに、本発明は、腫瘍細胞、特に化学療法抵抗性の腫瘍細胞、最も具体的には化学療法抵抗性の卵巣がん細胞の増殖を抑制する化合物を同定する方法を提供し、該方法は、(a) 化学療法抵抗性の卵巣がん細胞において通常より低いレベルで発現される 1 または複数の遺伝子を発現する細胞を試験化合物に接触させる工程であって、その遺伝子が、H M T 1、N A I P、e E F 1 、R A B 2 2 A、N C O R 2、M T 1、またはM P P 1 0 である工程、(b) その試験化合物の存在下および不在下でのその遺伝子の発現を検出する工程、ならびに(c) その試験化合物の存在下および不在下でのその遺伝子の発現を比較する工程からなり、試験化合物の存在下での遺伝子の発現が試験化合物の不存下での遺伝子発現と比べて増大している場合、化合物は化学療法抵抗性の腫瘍細胞の増殖を抑制する化合物として同定される。1 実施形態では、この化合物は、化学療法薬の存在下で腫瘍細胞の増殖を抑制することができる。

10

20

【 0 0 8 1 】

実施された実験および得られた結果を含めて、以下の実施例は単に例示のために提供されるにすぎず、本発明を限定するものとして解釈すべきではない。

【 実施例 1 】

【 0 0 8 2 】

M T T 細胞増殖アッセイ

標準のM T T 細胞増殖アッセイを用いて、5種の卵巣がん細胞株(O V C A 4 2 9、O V C A 4 3 3、O V C A 4 3 2、H E Y、およびH E Y A 8)を、シスプラチニへの感受性のレベルに従って順位付けした。

【 0 0 8 3 】

30

イーグルの最少培地(M E M 、インビトロジエンコーポレーション社(I n v i t r o g e n C o r p .) [米国カリフォルニア州カールズバッド(C a r l s b a d)所在]から入手)、5%ウシ胎児血清(F B S、加熱して不活性化)、1%抗生物質/抗真菌剤混合物(インビトロジエン社(I n v i t r o g e n))中で細胞を増殖させた。M T T 原液(5 m g / m L; カルビオケム社(C A L B I O C H E M) [米国カリフォルニア州サンディエゴ(S a n D i e g o)所在])を、H B S S(ハンクス平衡塩類溶液)中に色素を溶解させて調製し、前記混合物をろ過し、1 m l の分注物として-2 0 で保存した。各9 m l の培地に対して1 m l のM T T 原液を使用した(総体積は10 m l である)。細胞を光から保護するために、プレートを不透明なカバーで覆った。

【 0 0 8 4 】

40

5、2 5、5 0、1 0 0、および2 0 0 μ M のシスプラチニで、4、8、および2 4 時間、各細胞株を処理した。9 6 ウェルプレートでのシスプラチニ処理の9 6 時間後にM T T アッセイを実施した。細胞から培地を除去し、新鮮なM T T 培地2 0 0 μ l を細胞に添加し、また、対照となる空のウェルにも添加した。通常の細胞培養条件のもとで、3 ~ 4 時間、細胞をインキュベートした。次に、細胞が代謝活性の指標であるホルマザン結晶を形成しているかどうか確認した。培地を除去し、2 - プロパノール2 0 0 μ l をウェルおよび対照ウェルに添加した。全ての結晶を均等に溶解した後、暗所、室温で2 0 分間、細胞をインキュベートした。マイクロプレートリーダーで5 7 0 n m にて結果を読み取った。

【 0 0 8 5 】

50

図39(上側パネル)は、様々な濃度のシスプラチニ曝露した4時間後の、これらの検討で使用した5種類の卵巣がん細胞株についてのMTTアッセイの結果を示す。使用したシスプラチニ濃度および処理時間の全範囲にわたって各細胞株の成績を考慮した後に、抵抗性のレベルの高いほうから低いほうへ、細胞をO V C A 4 2 9 < O V C A 4 3 3 < H E Y A 8 < O V C A 4 3 2 < H E Yの順番に順位付けした(下側パネル)。

【0086】

前述とほぼ同じようにして、特定の遺伝子に対するsiRNAまたは薬物阻害因子に細胞を曝露することを含むMTTアッセイを実施した。細胞をsiRNAで48時間前処理してから、0、3.12、6.25、12.5、25、50、100、および200μMのシスプラチニで24時間処理した。薬物併用治療の実験(フマギリンまたはALLN)については、濃度を段階的に上げた試験対照の薬物と0、3.12、6.25、12.5、25、50、100、および200μMのシスプラチニとの併用治療に細胞を24時間曝露させた。
10

【実施例2】

【0087】

cDNAマイクロアレイ、ノーザンプロット、および定量的リアルタイムPCR解析
実施例1で特徴付けした細胞株を用いてマイクロアレイ解析を実施した。各細胞株から細胞ペレットを集め、1mlのTRI試薬(モレキュラーリサーチセンターインコーポレイテッド社(Molecular Research Center, Inc)[米国オハイオ州シンシナティ(Cincinnati)所在]から入手)またはTrizol(登録商標)(インビトロジエン(Invitrogen)社)中にペレットを溶解させることによって、細胞からRNAを単離した。次に、試料を5分間放置した。1-プロモ-3-クロロプロパン(BCP)100μlを試料に添加して、相分離を行った。15秒間振とうした後、室温で15分間、試料をインキュベートし、続いて、13,000RCF、4~25で16分間遠心分離した。ピペットで上清を取り出し、新しい微小遠心チューブ中に入れた。次に、上清を500μlの新しいイソプロパノールと混合することによってRNAを沈殿させ、室温で10分間インキュベートし、13,000RCF、4~25で9分間遠心分離した。次に、上清をチューブから除去し、該チューブに1mlの7.5%エタノールを加え、ボルテックス(渦流混合)処理し、次いで13,000RCFにて4~25で6分間遠心分離することによって、ペレットを洗浄した。液体を除去し、ペレットを約8分間、風乾させた。次に、ペレットをRNaseフリーの水に溶解し、すぐに使用する場合は氷中に置き、または-80で保存した。
20

【0088】

5000を超える配列確認済みのcDNAクローンを含むマイクロアレイ(リサーチジエネティックスインコーポレイテッド社(Research Genetics Inc.)から入手)を用いて、これらの細胞における遺伝子発現を調べた;マイクロアレイ解析は全て、製造業者の取扱説明書に従って実施した。各クローンは卵巣組織で発現することが周知のものである。最も抵抗性の高い細胞株(O V C A 4 2 9)での遺伝子発現を、他の細胞株での遺伝子発現を比較する際の標準として用いた。データの解析から、O V C A 4 2 9は、より感受性の高い細胞株と比較して、196種の遺伝子をより高いレベルで発現し、83種の遺伝子をより低いレベルで発現していることが明らかになった。
40

【0089】

遺伝子を、以下の基準を満たす場合にのみさらに解析するために選別した;基準とはすなわち、2連の(duplicate)メンブレンで検出した際に標準と比べて発現に少なくとも2倍の差があること、標準(O V C A 4 2 9)と比較して、4種の細胞株のうち3種で差次的な発現が検出されること、および発現レベルが各細胞株のシスプラチニ感受性と一致していることである。過剰発現された遺伝子は、O V C A 4 2 9細胞で最も強く発現され、最も抵抗性の低い細胞株H E Yにおいて最低レベルの発現に到達するまで発現は次第に弱くなつた(また、O V C A 4 2 9細胞で低いレベルで発現された遺伝子については逆であった)。
50

【0090】

他の細胞株と比較した際、最も抵抗性の高い細胞株（O V C A 4 2 9）において差次的に（より高いレベルまたはより低いレベルで）発現された遺伝子のノーザンプロット解析および定量的リアルタイムP C R解析を用いて、マイクロアレイデータを検証し、さらに解析するための目的遺伝子を特定した。特定した遺伝子を表2に示す。表2は、遺伝子の名称、細胞株における発現パターンの概要、および発現解析の結果を表す図面を示す。

【0091】

【表2】

表2

GenBank 登録番号	GeneCard cDNA id #	名称	細胞株で 検証された 発現パターン	図
BC015973	756595	S100A10 p11 CLP11 カルパクチン1 軽鎖 42C	シスプラチニ抵抗性 の増大とともに上昇	1
BC001410	810612	S100A11 S100C カルギザリン	シスプラチニ抵抗性 の増大とともに上昇	2
AF261089	549728	カルパイン2 CANPL2 mCANP	シスプラチニ抵抗性 の増大とともに上昇	6
BC004974	250654	SPARC オステオネクチン BM-40	シスプラチニ抵抗性 の増大とともに上昇	4
BC013782	39093	MetAP2 p67eIF2 MNPEP	シスプラチニ抵抗性 の増大とともに上昇	8

10

20

30

GenBank 登録番号	GeneCard cDNA id #	名称	細胞株で 検証された 発現パターン	図
BC015525	809784	KLK6 ザイム ニューロシン プロテアーゼM	シスプラチン抵抗性 の増大とともに上昇	17
AP222689	246120	HMT1 HMT2 ANM1 HCP1	シスプラチン抵抗性 の増大とともに低下	18
U31913	814731	ARA9 XAP2	シスプラチン抵抗性 の増大とともに上昇	19
D83735	713886	カルポニン2	シスプラチン抵抗性 の増大とともに上昇	20
U19251	1046522	NAIP	シスプラチン抵抗性 の増大とともに低下	21
BC005291	306921	eEF1 ϵ P18	シスプラチン抵抗性 の増大とともに低下	13
AF015608	897594	RNPS1	シスプラチン抵抗性 の増大とともに上昇	22
U49436	884867	eIF5 Eif5A	シスプラチン抵抗性 の増大とともに上昇	10
BC013590	1630998	Eif2B ϵ	シスプラチン抵抗性 の増大とともに上昇	12

10

20

30

40

GenBank 登録番号	GeneCard cDNA id #	名称	細胞株で 検証された 発現パターン	図
M65217	669443	HSF2 HSTF2	シスプラチン抵抗性 の増大とともに上昇	23
AB010427	714196	WDR1 NORI-1	シスプラチン抵抗性 の増大とともに上昇	24
BC001134	321247	フューズドトウ (Ft1)	シスプラチン抵抗性 の増大とともに上昇	25
BC004880	203003	NM23D nm23-H4	シスプラチン抵抗性 の増大とともに上昇	26
U10439	950367	ADAR1	シスプラチン抵抗性 の増大とともに上昇	27
BC005214	34140	グランカルシン	シスプラチン抵抗性 の増大とともに上昇	7
BC009808	882511; M17S2	NBR1	シスプラチン抵抗性 の増大とともに上昇	28
L36870	726147	SAPK/Erk 1 JNKK1 MEK4 MKK4 MAPKK4	シスプラチン抵抗性 の増大とともに上昇	14

10

20

30

40

GenBank 登録番号	GeneCard cDNA id #	名称	細胞株で 検証された 発現パターン	図
AB007885	427980	亜鉛フィンガーフィンガーテンパク質-262 MYM	シスプラチニン抵抗性 の増大とともに上昇	29
D88153	123980	HYA22	シスプラチニン抵抗性 の増大とともに上昇	31
AB049635	824568	MRPL4 CGI-28	シスプラチニン抵抗性 の増大とともに上昇	30
AF037261	1636620	ビネキシンβ	シスプラチニン抵抗性 の増大とともに上昇	32
M59818	809639	G-CSFR	シスプラチニン抵抗性 の増大とともに上昇	33
BC015710	838636	RAB22A	シスプラチニン抵抗性 の増大とともに低下	36
BC017201	68605	IGFBP-7 MAC25 FSTL2	シスプラチニン抵抗性 の増大とともに上昇	35
BC011770	345077	FASTキナーゼ	シスプラチニン抵抗性 の増大とともに上昇	16

10

20

30

40

GenBank 登録番号	GeneCard cDNA id #	名称	細胞株で 検証された 発現パターン	図
AB057597	845441	TESK2	シスプラチン抵抗性 の増大とともに上昇	15
BC022087	756687	SRB1 CLA1 CD36L1	シスプラチン抵抗性 の増大とともに上昇	34
BC031890	825293	KIAA0082	シスプラチン抵抗性 の増大とともに上昇	37
NM_006312	743230; NCOR2	NCOR2	シスプラチン抵抗性 の増大とともに低下	38
BC032338	297392	MT1	シスプラチン抵抗性 の増大とともに低下	51
X98494	825214	MPP10	シスプラチン抵抗性 の増大とともに低下	52

* GeneCardはイスラエル国レホボト所在のワイスマン研究所(Weizmann Institute of Science)の登録商標であり、割り当てられる数値は隨時変更される可能性がある。

ノーザンプロット解析

マイクロアレイ解析で特定した発現パターンを確認するために、Northern Max (登録商標) 法 (アンビオンコーポレーション社 (Ambion Corp.) [米国テキサス州オースティン (Austin) 所在] を用いてノーザンプロット解析を実施し、製造業者の取扱説明書に従って Strip-EZ (登録商標) DNA 標識キット (アンビオン社 (Ambion)) を用いてDNAプローブを標識した。

【0092】

定量的リアルタイムPCR

卵巣がん細胞株から単離した1 μg の細胞内全RNA、1 μg のオリゴdT、および水と一緒に混合して最終体積12 μlとし、この混合物を70 ℃で10分間インキュベートし、次いで、5 μl の2×反応混合液 (Reaction Mix)、2 μl のDTT、および1 μl の酵素Superscript (商標) II (インビトロジェン社 (Invitrogen)) をこの混合物に加えることによって、cDNAを合成した。次に、この反応混合物を42 ℃で60分間インキュベートした。1:4~1:256のcDNA希釈液を調製した。「Qiagen QuantiTect SYBR Green PCR

10

20

30

40

50

R Handbook」(キアゲンコーポレーション社(Qiagen Corp.)[米国カリフォルニア州バレンシア(Valencia)所在]を用いて、最終体積50 μl / ウェルとなるようにマスターミックス(Master mix)を調製した。使用したプレートの各ウェルに対して、25 μlの2×Quantitect(登録商標)SYBR Green PCR Master Mix(キアゲン社(Qiagen))、0.3 μMの順行(フォワード)プライマー、0.3 μMの逆行(リバース)プライマー、およびRNaseフリー水を加えて最終体積45 μlとした。

【0093】

各遺伝子用のマスターミックスを完全に混合し、適切な体積量を分取して、PCRチューブまたはプレート中に以下のように入れた。すなわち、鑄型無し(対照)=遺伝子のマスターミックス45 μl + H₂O 5 μl; 緩衝液ブランク=H₂O 25 μl + SYBRミックス25 μl; 試験試料=遺伝子のマスターミックス45 μl + cDNA(上記のように希釈したもの)5 μlとした。

【0094】

ABI Prism(登録商標)7700(アプライドバイオシステムズインコーポレイテッド社(Applied Biosystems, Inc.)[米国カリフォルニア州フォスター市(Foster City)所在]配列検出システム、またはMJリサーチ(MJ Research)社([米国マサチューセッツ州ウォルサム(Waltham)所在])のOpticon(登録商標)IIシステムを用いて、以下のようにして配列検出を実施した: PCRの最初の活性化工程は、95で15分間実施した。試料を94で15秒間変性させ、53(Opticon IIシステムを使用するときは55)で30秒間アニーリングし、72で30秒間伸長させた(データはこの工程の間に取得した)。PCR反応を50サイクル繰り返した。以下の工程、すなわち95で15秒、60で20秒、95で20秒の工程を追加することによって、融解曲線解析の準備をした。

【0095】

さらに、プラチナ系の化学療法剤を用いた治療を受けたことがある化学療法感受性(すなわち反応性)および化学療法抵抗性(すなわち非反応性)の卵巣がん患者から得た組織試料からRNAを調製した。50~100 mgの組織試料を1 mlのTRI試薬またはTrizol中で組織が液化されるまでホモジナイズすることによって、RNAを単離した。次に、試料を5分間放置した。BCP 100 μlを試料に添加して、相分離を行った。15秒間振とうした後、室温で15分間、試料をインキュベートし、続いて、13,000 × g(相対遠心力、RCF)、4~25で9分間遠心分離した。ピペットで上清を取り出し、新しい微小遠心チューブ中に入れた。次に、上清を500 μlの新しいイソプロパノールと混合することによってRNAを沈殿させ、室温で20分間インキュベートし、13,000 RCF、4~25で9分間遠心分離した。次に、上清をチューブから除去し、該チューブに1 mlの75%エタノールを加え、ボルテックス混合し、次いで13,000 RCF、4~25で6分間遠心分離することによって、ペレットを洗浄した。液体を除去し、ペレットを約8分間、風乾させた。次に、ペレットをRNaseフリーの水に溶解し、すぐに使用する場合は氷中に置き、または-80で保存した。

【0096】

化学療法感受性の患者と化学療法抵抗性の患者との間の遺伝子発現の変化を検出するために、表3に示す遺伝子に対するプライマーを用いた定量的リアルタイムPCRを実施した。18S RNAの発現を用いて発現遺伝子の値を補正した。結果を以下の表3に示す。これらの結果は、細胞株由来のRNAを用いて行った実験から得られた観察結果を裏付けている。

【0097】

【表3】

表3

遺伝子名 登録番号	GenBank 登録番号	化学療法感受性の患者における 発現(倍)	化学療法抵抗性の患者における 発現(倍)	差(倍)
ビネキシンβ	AF037261	1.4	2.8	2.0
G-CSFR	M59818	1.7	2.6	1.5
KLK6	BC015525	0.3	3.3	11.0
SPARC	BC004974	3.6	6.0	1.7
HYA22	D88153	1.75	2.4	1.4
MRPL4	AB049635	0.3	0.8	2.7
eIF5	U49436	0.8	1.3	1.6
RAB22A	BC015710	0.15	0.075	2.0*
MT1	BC032338	0.9	0.6	1.5*
MYM	AB007885	0.6	1.5	2.5
RNPS1	AF015608	0.7	1.4	2.0
S100A11	BC001410	1.0	2.0	2.0
MetAP2	BC013782	0.175	0.21	1.2
S100A10	BC015973	0.15	0.25	1.7

遺伝子名 登録番号	GenBank 登録番号	化学療法感受性の患者における 発現(倍)	化学療法抵抗性の患者における 発現(倍)	差(倍)
SAPK	L36870	0.40	0.95	2.4
カルパイン2	AF261089	0.12	0.19	1.6
NM23D	BC004880	0.70	1.3	1.9
NIAP	U19251	4	2	2.0*
SRB1	BC022087	0.08	0.13	1.6
WDR1	AB010427	1.5	5	3.3
HMT1	AF222689	0.19	0.05	3.8*
eEF1,	BC005291	0.65	0.15	4.3*
eIF2B,	BC013590	0.40	0.75	1.9
ADARI	U10439	0.65	0.8	1.2

* この差は化学療法抵抗性の患者における遺伝子発現の低下を反映している

リアルタイムPCRによって遺伝子発現を検証するために、以下のプライマー配列を用いた。

【0098】

250654（この遺伝子は、特異的な分子ビーコンプローブを用いて最初に検証したが、その後の検討はSYBRグリーンを用いて実施した）

分子ビーコンを用いた検証：

ビーコン：F A M - C G C G T A T G A A C T G G G C T T A T G T G A C G C G - D A
B C Y L (配列番号13)

隣接順行プライマー：C T G G G C T C T G C C T T A A A C A C (配列番号14)

10

20

30

40

50

隣接逆行プライマー：G C T C C C A A A A G T T T G A A C C A (配列番号 15)

内部順行プライマー：T T G C C T G A G G C T G T A A C T G A (配列番号 16)

内部逆行プライマー：G C T C C C A A A A G T T T G A A C C A (配列番号 62)

S Y B R グリーンの場合：

順行：C C A C T T C T T T G C C A C A A A G T (配列番号 17)

逆行：G A A T T C G G T C A G C T C A G A G T (配列番号 18)

8 1 0 6 1 2 (この遺伝子は、特異的な分子ビーコンプローブを用いて検証した)

ビーコン：F A M - C G C C T G G G T G G G T T G A A G G A G G C G - D A B C Y L (配列番号 19)

隣接順行プライマー：A T C G A G T C C C T G A T T G C T G T (配列番号 20)

10

隣接逆行プライマー：G C C T G C A T G A G G T G G G T T A G T (配列番号 21)

内部順行プライマー：C T T G C C A T G A C T C C C T T C C T C (配列番号 22)

内部逆行プライマー：G C C T G C A T G A G G T G G G T T A G T (配列番号 63)

3 9 0 9 3

順行：G C A G A A G C A C A T C G A C A A G T (配列番号 23)

逆行：G C C T G C A T G A G G T G G G T T A G T (配列番号 24)

8 8 2 5 1 1

順行：T A A C C A C G T C C T G C T G A A G T (配列番号 25)

逆行：G C T T T A A G A A A G T T C C T T A A T C A A C (配列番号 26)

20

9 5 0 3 6 7

順行：G C A C A G C G G A G T G G T A A G A (配列番号 27)

逆行：C A G A G G A G T C A G A C A C A T T G (配列番号 28)

3 4 1 4 0

順行：G T A T A C T T A C T T C A G T G C T G T T (配列番号 29)

逆行：C A T T C T T G C T A T A A A C G T T T A A C A (配列番号 30)

7 2 6 1 4 7

順行：C T C T G T G A C T T C G G C A T C A (配列番号 31)

逆行：C A G A C A T C A G A G C G G A C A T (配列番号 32)

30

4 2 7 9 8 0

順行：A A G A A C T G G G T T C A G T G G A A A (配列番号 33)

逆行：G A G A G T G C A T G G T C T T G A G T (配列番号 34)

1 2 3 9 8 0

順行：A G C C A C C A G C T A A G T A C C T T (配列番号 35)

逆行：C A T C G A T T T C A A C C G G A A C A A (配列番号 36)

8 2 4 5 6 8

順行：G T G T G T G A C C T C C A T G T T A (配列番号 37)

逆行：A G C A C A C C A T T A C A G A C A A G T (配列番号 38)

40

1 6 3 6 6 2 0

順行：G G A A C C A G T T T C T G C A G G A A A (配列番号 39)

逆行：C T C C A G C A G C A C C T C A A T G (配列番号 40)

8 0 9 6 3 9

順行：A T C C A A G T T A T G T G G T T T C T T (配列番号 41)

逆行：C A C C T C C C T G G C T T C T G A A (配列番号 42)

7 5 6 6 8 7

順行：G A T C C A T G A A G C T A A T G T A C A A (配列番号 43)

逆行：A C G G G C A G A A G C C T T C G T T (配列番号 44)

8 4 5 4 4 1

順行：C C T G A G G T T C T C C G A G A T G (配列番号 45)

50

逆行 : T C C A G C C C G A A A T T C T C T G (配列番号 4 6)
 6 8 6 0 5
 順行 : C A A G A G G C G G G A A G G G T A A A (配列番号 4 7)
 逆行 1 : C A G C C G C T C G G G T A G G T (配列番号 4 8)
 逆行 2 : C A C T A T G G A A G G A C C T T G C T (配列番号 4 9)
 8 3 8 6 3 6
 順行 : G G A T A C A G G T G T A G G T A A A T C (配列番号 5 0)
 逆行 : T C C C A G A T T A G G A A T T T A T G T A (配列番号 5 1)
 3 4 5 0 7 7
 順行 : C T T C T G G A A C A G G C G A A G A (配列番号 5 2)
 逆行 1 : G C T G G C C C A G A C G A C G A A (配列番号 5 3)
 逆行 2 : G C A G A C A C A C G T G G A T G G T (配列番号 5 4)
 8 2 5 2 1 4
 順行 : G A T G A A G T T A A A T C C T C C T T T G (配列番号 5 5)
 逆行 : C C T C T T C T G T G C T G T C A C T T T (配列番号 5 6)
 2 9 7 3 9 2
 順行 : C C T G C A A G A A G A G C T G C T G (配列番号 5 7)
 逆行 : C A C A G C T G T C C T G G C A T C A (配列番号 5 8)
 8 9 7 5 9 4
 順行 : A G C A C C A G C A C T G G C T C A T C A A (配列番号 1 0 9)
)
 逆行 : A G A G C C A G A A G A G C T G C T A (配列番号 1 1 0)
 7 1 3 8 8 6
 順行 : A A C C G A C A A G T G T G A C A A C T (配列番号 1 1 1)
 逆行 : T G T G C C T T G C G G G C A G T A (配列番号 1 1 2)
 8 8 4 8 6 7
 順行 : C A C C A C C A C C A C C A A A T G A A (配列番号 1 1 3)
 逆行 : C A T C C A T T C G A C G C C T T T G A (配列番号 1 1 4)
 3 2 1 2 4 7
 順行 : C C A G C A G C A C A G T C A A C A A A (配列番号 1 1 5)
 逆行 : T G G T A G C T T C T G C T T C A C A A A (配列番号 1 1 6)
 1 6 3 0 9 9 8
 順行 : C C A G A G C T G C A C T C A T T C C C (配列番号 1 1 7)
 逆行 : C A C T G T T G G T G A T A A A G C A A T T (配列番号 1 1 8)
)
 7 5 6 5 9 5
 順行 : G G A T A A A G G C T A C T T A A C A A A A G (配列番号 1 1 9)
)
 逆行 : C C A C T T T G C C A T C T C T A C A C (配列番号 1 2 0)
 5 4 9 7 2 8
 順行 : G A G C C G A G G A G G T T G A A A G (配列番号 1 2 1)
 逆行 : C T C C T C T T G G G T C T A T A G T G T (配列番号 1 2 2)
 2 0 3 0 0 3
 順行 : G A C C C T G G T G G C G G T G A A (配列番号 1 2 3)
 逆行 : G G T G C C T G C A G C A T C T T C A (配列番号 1 2 4)
 8 1 4 7 3 1
 順行 : G G A G A G C C C T G G C A C G T A (配列番号 1 2 5)
 逆行 : C C T T C A T C T G C A G G T T C T T G (配列番号 1 2 6)
 7 1 4 1 9 6
 順行 : A C G A C G G A C A C A T T A T T A C T (配列番号 1 2 7)
 10

逆行 : T C C A T G C T G C A G C T G A T G A (配列番号 128)
8 0 9 7 8 4

順行 : C C T T C G G C A A A G G G A G A G T (配列番号 128)
逆行 : C T G G A T G A G T T C A G A G A G T T T T (配列番号 130)
8 2 5 2 9 3

順行 : G C C T C G A C A G G C A G A G A T (配列番号 131)

逆行 : C T T G T A G C T G A A G A T G T C A A T (配列番号 132)
2 4 6 1 2 0

順行 : C T C T A T G C C C G G G A C A A G T (配列番号 133)

逆行 : A A G A C A T G T C G A A G C C A T A C A (配列番号 134)

,

シスプラチニに対して抵抗性の卵巣がん細胞で上方制御または下方制御される遺伝子の概要

E F ハンドタンパク質をコードしている遺伝子

カルシウムにより活性化される E F ハンドタンパク質をコードする 5 種の遺伝子、すなわち、S 100A10、S 100A11、SPARC、カルパイン 2、およびグランカルシンが同定された。4 種の遺伝子のうちの 2 種、すなわち S 100A10 および S 100A11 は、第 1 染色体の 1q21 に互いに隣接して位置している（ペイヨヴィッチ（Pejovic）、1995 年、Ann. Med. 第 27 卷、73~78 ページ；リーディンガーら（Ridinger et al.）、1998 年、Biophysica et Biophysica Acta 第 1448 卷、254~263 ページ）。第 1 染色体のこの領域は、卵巣がんにおける染色体再編成の温床の 1 つとして報告されている（ペイヨヴィッチ（Pejovic）、1995 年、Ann. Med. 第 27 卷、73~78 ページ）。S 100A10 および S 100A11 の正確な生物学的機能は分かっていない。S 100A10 および S 100A11 はいずれも、より抵抗性の高い卵巣がん細胞株においてより高いレベルで発現される（それぞれ図 1 および図 2 を参照のこと）。図 3 は、S 100A10 および S 100A11 の mRNA も、化学療法に対する反応性の高い患者と比較すると、抵抗性がより高い患者では上昇していることを示す。

【0099】

SPARC（オステオネクチンおよび BM40 としても知られている）は分泌タンパク質である（レーンおよびセージ（Lane and Sage）、1994 年、FASEBJ. 第 8 卷、163~173 ページ）。SPARC は、腫瘍性卵巣の間質で高度に発現されることが示されており（ペイリーら（Paley et al.）、2000 年、Gynecologic Oncology 第 78 卷、336~341 ページ）、また、卵巣がん細胞でアポトーシスを誘発することが示されている（イウラ（Yiu et al.）、2001 年、Am. J. Pathol. 第 159 卷、609~622 ページ）。しかし、高レベルの SPARC が、黒色腫（レッダラ（Ledda et al.）、1997 年、J. Invest. Dermatol. 第 108 卷、210~214 ページ）および結腸直腸がん（ポルトラ（Porte et al.）、1995 年、Int. J. Cancer 第 64 卷、70~5 ページ）において検出されており、また、前立腺がん（トーマスら（Thomas et al.）、2000 年、Clin. Cancer Res. 第 6 卷、1140~9 ページ）および神経膠芽腫（ゴレムビースキーら（Golembieski et al.）、1999 年、Int. J. Dev. Neurosci. 第 17 卷、463~72 ページ）において細胞の遊走および浸潤を促進することも報告されている。SPARC の過剰発現は、乳がん細胞の運動性および浸潤の増大にも寄与する（ブリッグスら（Briggs et al.）、2002 年、Oncogene 第 21 卷、7077~91 ページ）。本明細書で示すように、SPARC は、化学療法抵抗性のより高い卵巣がん細胞株においてはより高いレベルで発現されることが発見された（図 4）。図 5 で示すように、腫瘍が再発していた患者から採取した試料においても、SPARC の mRNA は増加していた。

10

20

30

40

50

【0100】

カルパイン2はカルシウム活性化プロテアーゼである。カルパイン2活性の阻害因子が、ヒトの急性リンパ球性白血病および非ホジキンリンパ腫、ならびに固形腫瘍細胞においてアポトーシスを誘発することが最近報告された（ファンおよびワン（Huang and Wang）、2001年、*TRENDS in Molecular Medicine* 第7巻、355ページ）。カルパイン2のmRNAレベルは、化学療法抵抗性のより高い卵巣がん細胞株で上昇していた（図6）。

【0101】

グランカルシンは、EFハンドタンパク質のペントEFハンドサブファミリーに属する、最近報告されたCa²⁺結合タンパク質であり、Ca²⁺が結合すると膜に移行する（ロリークラ（Lollie et al.）、2001年、*J. Biol. Chem.* 第276巻、17762～9ページ）。グランカルシンmRNAは、シスプラチニンを用いた治療に対して反応性がより高い細胞株と比べて、シスプラチニンに対する抵抗性がより高い細胞株において増加していることが発見された（図7）。

【0102】

タンパク質の翻訳および翻訳制御に関するタンパク質をコードする遺伝子

MetAP2：メチオニニアミノペプチダーゼ2（eIF-2が結合したp67としても知られている）の発現は、卵巣がんに関連づけられたことはなかった。この遺伝子によってコードされているタンパク質は、2つの機能を有しているようである。同タンパク質は、新しく合成されたタンパク質から最初のメチオニンを除去し（りおよびチャン（Li and Chang）、1996年、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 第227巻、152～9ページ）、また、真核生物の開始因子2（eIF-2；GTP結合タンパク質）にも結合し、そのリン酸化を阻害する（ウーラ（Wuet al.）、1993年、*J. Biol. Chem.* 第268巻、10796～10801ページ）。MetAP2に対する抗体を用いると、MetAP2の発現は、抵抗性の最も高い細胞株OVC429で増大されており、Hey（シスプラチニン感受性が最も高い細胞株；図8を参照のこと）で下方制御されているようである。さらに、シスプラチニン系の化学療法に対する抵抗性のレベルが異なる3名の患者から得た組織試料でMetAP2のmRNA発現を調べると、MetAP2は、化学療法に対する抵抗性が中間レベルの患者（CAP2；図9）および低レベルの患者（CAP1；図9）と比較して、最も抵抗性の高い患者（図9のCAP3）から得た試料において最も増大しているようであった。MetAP2を特異的標的とする薬物TNP-470は、現在、いくつかのヒトの腫瘍における血管新生阻害剤として臨床試験中である（クルガーおよびフィッグ（Kruger and Figg）、2000年、*Expert Opin. Investig. Drugs* 第9巻、1383～96ページ）。さらに、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてMetAP2の細胞内レベルを低下させると、アポトーシスを誘発することが示されている（ダッタおよびダッタ（Datta and Datta）、1999年、*Expert Cell Res.* 第246巻、376～83ページ）。これらの観察結果は、このタンパク質が卵巣がん治療の重要な標的となり得ることを示唆する。

【0103】

eIF5は、GTPアーゼ活性化タンパク質として機能する、翻訳開始およびタンパク質合成の別の中心的タンパク質である（ポーリンら（Paulin et al.）、2001年、*Current Biol.* 第11巻、55～9ページ；ダスラ（Das et al.）、2001年、*J. Bio. Chem.* 第276巻、6720～6ページ）。2種類の転写物が検出され、どちらの発現レベルも、シスプラチニンに対する抵抗性が最も高レベルの卵巣がん細胞株（図10）および抵抗性のより高い患者（図11）において上昇していた。

【0104】

eIF2BのmRNAは、シスプラチニンに対して最も高い抵抗性を示す卵巣がん細胞株において上方制御されている（図12）。この遺伝子によってコードされるタンパク質

10

20

30

40

50

は、5つのサブユニットからなるグアニンヌクレオチド交換因子複合体の調節性のサブユニットである（プラウド（Proud）、2001年、Prog. Mol. Subce 11. Biol. 第26巻、95～114ページ）。

【0105】

eEF1イプシロンのmRNAは、シスプラチンに対して最も高い抵抗性を示す卵巣がん細胞株において下方制御されていた（図13）。eEFは、ポリペプチドのアセンブリに関与している（ブラウンおよびプラウド（Brown and Proud）、2002年、Eur. J. Biochem. 第269巻、5360～8ページ）。

【0106】

キナーゼ：

10

SAPK/Erkキナーゼ1は、JNK1、JNK2、およびp38を活性化するがErk1およびErk2は活性化しない2重特異性キナーゼである（クエンダ（Cuenda）、2000年、Int. J. Biochem. Cell Biol. 第32巻、581～7ページ）。この遺伝子およびそのタンパク質は、これまで卵巣がんには関連づけられていなかった。この遺伝子のmRNAレベルは、感受性のより高い細胞株と比べて、抵抗性のより高い細胞株において上昇していることが見出された（図14）。

【0107】

TESK2：このセリン／トレオニンキナーゼは、主に細胞核内に位置している。しかし、不活性なときは細胞質に移動する。TESK2はコフィリンを（Ser3で）特異的にリン酸化するが、コフィリンは、アクチン脱重合因子とともに、アクチンフィラメントの脱重合および切断を促進することにより、アクチンフィラメントの迅速な代謝回転およびアクチンに基づく再編成において極めて重要な役割を果たしているタンパク質である（十島（Toshima）、2001年、J. Biol. Chem. 第276巻、31449～58ページ）。卵巣がんに対する関連は、これまで報告されていなかった。TESK2のmRNAは、抵抗性のより高い細胞株において増大されている（図15）。

20

【0108】

FASTキナーゼ：これは、Fasによって媒介されるアポトーシスに関与していると考えられているFas活性化セリン／トレオニンキナーゼである（ティアンら（Tian et al.）、1995年、J. Exp. Med. 第182巻、865～74ページ）。FASTキナーゼのmRNAは、化学療法抵抗性のより高い細胞株において増大されている（図16）

30

その他：

KLK6：これは、ザイムおよびニューロシンとしても知られているセリンプロテアーゼである。この遺伝子は、ヒトのカリクレイン遺伝子ファミリーに属し、この遺伝子ファミリーは、すでに前立腺がんのマーカーとして使用されている前立腺特異抗原（PSA）などの良く知られた分子も含み、また、卵巣がんのマーカーとしても調査されている（ディアマンディス（Diemandis）、2000年、Clinical Biochem. 第33巻、579～83ページ）。正常な対照と比べて、卵巣がん患者においてKLK6の血清レベルが上昇していることが報告されている（ディアマンディス（Diemandis）、2000年、Clinical Biochem. 第33巻、579～83ページ）。この遺伝子の発現レベルは、試験した化学療法抵抗性のより高い細胞株において上昇していた（図17）。この遺伝子が、卵巣がんにおいて染色体再編成の頻度の高い別の領域に位置していることも注目に値する（ペイヨヴィッチ（Pejovic）、1995年、Ann. Med. 第27巻、73～78ページ）。HMT1（PRMT1としても知られている）：この遺伝子は、タンパク質のアルギニンN-メチルトランスフェラーゼをコードし、そのバリエント2種の発現は、乳がんで下方制御されていることが発見された（スコーリスら（Scorlis et al.）、2000年、Biochem. Biophys. Res. Commun. 第278巻、349～59ページ）。

40

【0109】

HMT1発現は、シスプラチンに対する抵抗性がより高い細胞において下方制御されて

50

いた（図18を参照のこと）。HMT1が、KLLK6をコードしている遺伝子が存在するのと同じ染色体領域内の第19染色体上の19q13.3に位置していることに注目することも興味深い。

【0110】

ARA9（アリール炭化水素受容体相互作用タンパク質（AIP）およびXAP2としても知られている）は、AHR媒介シグナル伝達においてある役割を果たしていると考えられている（カズラウスカスら（Kazlauskas et al.）、2002年、J. Biol. Chem. 第277巻、11795～801ページ）。この遺伝子に由来するmRNAは、シスプラチニに対する抵抗性がより高い細胞株において増加していた（図19）。ARA9も、卵巣がんに関連づけられている染色体再編成の頻度の高い別の領域である第11染色体上（11q13.3）に位置している（ペイヨヴィッチ（Pejovic）、1995年、Ann. Med. 第27巻、73～78ページ）。

【0111】

カルポニン2は、筋上皮がんにおいて研究されてきたが（モスンジャックら（Mossunjac et al.）、2000年、Diagn. Cytopathol. 第23巻、151～5ページ）卵巣がんでは研究されていない。カルポニン2の発現は、シスプラチニ感受性のより高い卵巣がん細胞株と比べて、抵抗性のより高い細胞株においてわずかに増加していた（図20）。

【0112】

神経細胞アポトーシス阻害タンパク質（NAP）は、シスプラチニ抵抗性の最も高い細胞株においてわずかに下方制御されていることが分かった（図21）。NAPは、卵巣がんと関連づけられたことはなかった（タムら（Tamm et al.）、2000年、Clin. Cancer Res. 第6巻、1796～1803ページ）。

【0113】

mRNA結合タンパク質S1（RNPS1）は、mRNA前駆体スプライシングの一般的な活性化因子であり、アポトーシスの促進に関与しているASAPおよびSART3腫瘍拒絶抗原との複合体を形成することができる（シュベルクら（Schwerk et al.）、2003年、Mol. Cell Biol. 第23巻、2981～90ページ；原田ら（Harada et al.）、2001年、Int. J. Cancer 第93巻、623～8ページ）。RNPS1のレベルは、シスプラチニ抵抗性の細胞株において上昇していることが分かった（図22）。

【0114】

熱ショック転写因子（HSF2）は、熱ショックタンパク質の遺伝子の発現を調節する（マシューラ（Mathew et al.）、1998年、Mol. Cell Biol. 第18巻、5091～8ページ）。HSF2は、その調節サブユニットPR65との結合についてタンパク質ホスファターゼ2A（PP2A）の触媒サブユニットと競合することもできるようであり、新規のPP2A調節タンパク質として作用すると考えられている（ホンら（Hong et al.）、2000年、Biochem. Biophys. Res. Commun. 第272巻、84～9ページ）。HSF2のmRNAレベルは、抵抗性のより高い細胞株において上昇していた（図23）。

【0115】

WDR1：WD反復タンパク質は全ての真核生物に存在し、シグナル伝達、転写、および増殖を含めて、多種多様な細胞機能の調節において重要な役割を果たしている（リら（Li et al.）、2000年、Biochem. Biophys. Res. Commun. 第274巻、117～23ページ）。しかし、WDR1の正確な機能は分かっていない。この遺伝子のmRNAは、感受性のより高い細胞株と比べて、抵抗性のより高い細胞株において増加していた（図24）。

【0116】

Ft1：この遺伝子のオープンリーディングフレームは、ユビキチン結合酵素に対する類似性を示しており、マウスでは、Rb関連p130遺伝子の近くに位置している（レシ

10

20

30

40

50

エラ (Lesche et al.)、1997年、Mamm. Genome 第8巻、879~83ページ)。細胞遺伝学的には、Ft1は、ヒトのがんにおいて繰り返し改変される領域である第16染色体の16q12.2領域に位置している。卵巣がんのこの染色体領域では、ヘテロ接合性の喪失が報告されている。Ft1のmRNAレベルは、シスプラチニに対する抵抗性がより高い細胞株において上昇していた(図25)。

【0117】

NME4 (nm23-h4としても知られている)は、腎細胞がんで中程度に過剰発現され、結腸直腸がんで強く過剰発現されるヌクレオシドリリン酸キナーゼである(ハイアーラ (Hayter et al.)、2001年、Anticancer Res. 第21巻、2821~5ページ)。NME4のmRNAは、抵抗性のより高い細胞株において上昇していた(図26)。

10

【0118】

ADAR1 : ADAR1などのアデノシンデアミナーゼによりアデノシンからイノシンへとRNAが編集されると、別のスプライシング部位が作られたり、コドンが変わったりするので、タンパク質の機能に変化が生じる(ワンら (Wang et al.)、2000年、Science 第290巻、1765ページ)。ADAR1遺伝子が、S100A10およびS100A11と同じ頻繁に再編成される染色体領域内である、第1染色体上の1q21.1~q21.2に位置していることに注目することも興味深い(ペイヨヴィッヂ (Pejovic)、1995年、Ann. Med. 第27巻、73~78ページ)。ADAR1のmRNAは、シスプラチニに対する抵抗性がより高い細胞株において上昇していた(図27)。

20

【0119】

NBR1 : NBR1の正確な分子機能は分かっていない。(当業者には、本発明の方法における遺伝子の有用性は、ある遺伝子の機能特性についての詳細または正確な概念に依存するものではないことが理解されよう。)マッピング研究により、NBR1遺伝子はBRCA1遺伝子と非常に近接して位置していることが明らかになった(ホワイトハウスら (Whitehouse et al.)、2002年、Eur. J. Biochem. 第269巻、538~45ページ)。NBR1の卵巣がんとの関連は報告されていない。NBR1のmRNAは、シスプラチニに対する抵抗性が最も高い細胞株OVC429において増大していた(図28)。

30

【0120】

亜鉛フィンガータンパク質262/MYM : MYM亜鉛結合モチーフを含むタンパク質をコードする遺伝子ファミリーのメンバーである(Smedley et al.)、1999年、Genomics 第60巻、244~7ページ)。このタンパク質は卵巣がんと関連づけられたことはなかったが、この遺伝子のmRNAは、試験した他の細胞株と比べて、化学療法抵抗性の最も高い細胞株において増大していた(図29)。

【0121】

MRPL4 : この遺伝子およびそのタンパク質は、卵巣がんに関連づけられたことはなかった。しかし、この遺伝子は、卵巣がんで頻繁に再編成される領域である第19染色体の19p13.2に位置している(ペイヨヴィッヂ (Pejovic)、1995年、Ann. Med. 第27巻、73~78ページ)。MRPL4のmRNAは、化学療法抵抗性の細胞株において増大していた(図30)。

40

【0122】

HYA22 : この遺伝子およびそのタンパク質は、卵巣がんに関連づけられたことはなかった。しかし、この遺伝子は、卵巣がんでの染色体再編成に関連した領域である第3染色体の3p21.3に位置している(ペイヨヴィッヂ (Pejovic)、1995年、Ann. Med. 第27巻、73~78ページ；プロトボボフら (Protopopov et al.)、2003年、Cancer Res. 第63巻、404~12ページ；センченコラ (Senchenko et al.)、2003年、Oncogen 50

e 第22巻、2984～92ページ)。HYA22のmRNAは、シスプラチンに対する感受性がより高い細胞株と比べて、抵抗性がより高い細胞株において増大していた(図31)。

【0123】

ビネキシン：SCAM-1としても知られており、この遺伝子は、ビネキシン、CAP/ポンシン、およびArgBP2も含むタンパク質ファミリーに属するアダプタータンパク質をコードする(木岡ら(Kioka et al.)、2002年、Cell Structure and Function 第27巻、1～7ページ)。ビネキシンが卵巣がんに関係していることは従来技術では知られていなかった。ビネキシンのmRNAは、化学療法抵抗性の細胞株において増大されていた(図32)。

10

【0124】

G-CSFR：顆粒球コロニー刺激因子受容体(G-CSFR)は、原発性の卵巣がんのほぼいたるところで発現される。しかし、そのリガンドのG-CSFの発現は、研究事例の半分でしか同じ細胞内でみとめられず、自己分泌系の存在が示唆された(サバレーゼら(Savarese et al.)、2001年、Cancer Letters 第162巻、105～15ページ)。研究事例の別の3分の1では、G-CSFは間質に局在し、受容体を発現しているがん細胞に対して間葉細胞がリガンドを提供できる傍分泌系が存在し得ることが示唆された(サバレーゼら(Savarese et al.)、2001年、Cancer Letters 第162巻、105～15ページ)。予備的な遡及評価から、自己分泌系を発現している卵巣がん患者と比べて、傍分泌ループのみを発現している患者の方が、全体的な生存率が悪いことが示唆された(サバレーゼら(Savarese et al.)、2001年、Cancer Letters 第162巻、105～15ページ)。G-CSFおよびその受容体は、正常な卵巣および一部の両性の卵巣腫瘍においても共発現され得る。G-CSFRのmRNAは、化学療法抵抗性の細胞株において増大していた(図33)。

20

【0125】

SRB1：CLA-1としても知られており、この遺伝子は、負に帯電したリポソームおよびアポトーシス細胞の双方を認識する受容体をコードしている。腫瘍細胞は、アポトーシス細胞およびアポトーシス小体の取込みおよび除去に関与していることが報告されている(深澤ら(Fukasawa et al.)、1996年、Exp. Cell Res. 第222巻、246～50ページ)。これらの観察結果の生物学的意義は良く理解されていない。SRB1の発現と卵巣がんとの関連に関する開示はこれまでなかった。SRB1のmRNAは、化学療法抵抗性の細胞株において増大していた(図34)。

30

【0126】

IGFBP-7：最近同定された、IGF結合タンパク質のメンバーであり、このタンパク質は、比較的低い親和力でIGF-IおよびIGF-IIに結合する(オー(Oh)、1998年、Breast Cancer Res. Treat. 第47巻、283～93ページ)IGFBP-7のmRNAは、化学療法抵抗性の細胞株において増大していた(図35)。

40

【0127】

RAB22Aは、Rasタンパク質のRABサブファミリーに属している(カピラ(Kauppi et al.)、2002年、J. Cell Science 第115巻、899～911ページ)。RAB22AのmRNAは、化学療法抵抗性の細胞株において減少し、シスプラチンに対する反応性がより高い細胞株において増大していた(図36)。

【0128】

KIAA0082：KIAA0082は、公表された情報が無い完全長遺伝子である。この遺伝子のmRNA発現は、シスプラチンに対して抵抗性である細胞株において増大していた(図37)。

【0129】

50

N C O R 2：これは、甲状腺ホルモン受容体に対する特異的な相互作用ドメインを有するS M R Tに近縁なコリプレッサータンパク質である（ジェプセンおよびローゼンフェルド（J e p s e n a n d R o s e n f e l d）、2002年、*J . C e l l S c i e n c e* 第115巻、689～98ページ）。この遺伝子に対するm R N A発現は、シスプラチンに対して感受性の細胞株と比べて、化学療法抵抗性の細胞株において低下していた（図38）。

【0130】

M T 1：メタロチオネイン1L（M T 1）の正確な生理的役割はわかっていないが、以前の研究により、シスプラチンに対して抵抗性であるヒト卵巣がん細胞においてM Tレベルが上昇していること（アンドリューおよびハウエル（A n d r e w s a n d H o w e l l）、1990年、*Cancer Cells* 第2巻、35～43ページ）、ならびにM T遺伝子でトランスフェクトされた細胞がシスプラチンに対して抵抗性となったこと（中野ら（N a k a n o e t a l . ）、2003年、*A n t i c a n c e r R e s .* 第23巻、299～304ページ）が報告されている。M Tは、細胞質でシスプラチニ捕捉し、それによってシスプラチニに対する細胞の抵抗力を増大させる働きをすると考えられている（中野ら（N a k a n o e t a l . ）、2003年、*A n t i c a n c e r R e s .* 第23巻、299～304ページ）。逆説的に、M T 1のm R N Aレベルは、シスプラチニに対する感受性が最も高い細胞（H e y）において著しく上昇しているようであった（図51）。

【0131】

M P P 1 0：M期リントンパク質（M P P 1 0）は、大部分は細胞質タンパク質であるが、分泌されることも可能であり、ヒトのU 3核内低分子リボ核タンパク質の構成成分である。このタンパク質の大半は、フィブリラリンと共に局在化しており（バセルガラ（B a s e r g a e t a l . ）、1997年、*N u c l e i c A c i d s S y m p . S e r .* 第36巻、64～7ページ）、r R N Aのプロセッシングに関与している。この遺伝子または該遺伝子の産物と卵巣がんとの関連は報告されていなかった。M P P 1 0の発現レベルは、シスプラチニに対する感受性が高くなるにつれ上昇した（図52）。

【実施例3】

【0132】

治療標的としてのS P A R Cのin vitro試験

S P A R Cは、試験した他の細胞株と比べて、シスプラチニ抵抗性の最も高い細胞株（O V C A 4 2 9）において最も高いレベルで発現された（図4）。このタンパク質が、接着を調節し、組織の再構築ならびに腫瘍の進行および侵襲性を促進する血管新生において重要な役割を果たし得るカルシウム結合性糖タンパク質であることは、当技術分野で公知である（レッダラ（L e d d a e t a l . ）、1997年、*J . I n v e s t . D e r m a t o l .* 第108巻、210～214ページ）。

【0133】

腫瘍縮小手術を受ける前の個体、および患者の腫瘍が再発していたときは手術から9カ月後の時点の個体から得たヒトの腹水試料においてS P A R C発現を試験した（図5；S P A R Cについて観察される2種の転写物は、差次的なポリアデニル化に起因して生じる；レッダラ（L e d d a e t a l . ）、1997年、*J . I n v e s t . D e r m a t o l .* 第108巻、210～214ページ）。手術後のS P A R C発現レベルは大きく上昇しており、この患者の不良転帰と相關した。この観察結果は、他の形態の固形がんを研究している他のグループによって得られた研究結果とも一致しており（ゴレムビエスキーラ（G o l e m b i e s k i e t a l . ）、1999年、*I n t . J . D e v . N e u r o s c i .* 第17巻、463～72ページ；ブリッグスら（B r i g g s e t a l . ）、2002年、*Oncogene* 第21巻、7077～91ページ；ファンおよびワン（H u a n g a n d W a n g ）、2001年、*T R E N D S i n M o l e c u l a r M e d i c i n e* 第7巻、355ページ；ロリークラ（L o l l i k e e t a l . ）、2001年、*J . B i o l . C h e m .* 第276巻、17762～950

ページ)、S P A R C 発現の増大から、卵巣がんだけでなく他のタイプの固形がんにおける化学療法的治療の成功および疾患の進行を予測することができる事が示唆された。

【0134】

最も抵抗性が高い卵巣がん細胞株であるO V C A 4 2 9においてS P A R C タンパク質発現レベルを低下させると、シスプラチニン抵抗性が低減されるかどうかを試験するために、S P A R C のメッセージの異なる領域を標的とするように3種のs i R N A を設計した。使用したS P A R C のs i R N A は以下の：

1 標的配列：A A T C C T G T C C A G G T G G A A G T A (配列番号1)
)

2 標的配列：A A G C T C C A C C T G G A C T A C A T C (配列番号2
)

3 標的配列：A A T G A C A A G T A C A T C G C C C T G (配列番号3
)

であった。

【0135】

本明細書で記述するs i R N A 実験は、s i P O R T (商標) L i p i d プロトコール(アンビオン社(A m b i o n))を用いて実施した。実験を実施する時点で細胞が30~70%コンフルエントになるように、トランスフェクションの24時間前に、10%F B S 含有M E M 培地中に細胞を播種した。F B S または抗生素質を含まない培地を用いて、s i P O R T およびs i R N A の複合体を調製した。s i P O R T については、6ウェルのプレートにはウェル当たり4マイクロリットル、96ウェルプレートにはウェル当たり0.5マイクロリットルとなるように培地に加え、ボルテックス処理して混合し、室温で25分間インキュベートした。s i R N A については、培地中で希釈した1~25n M (通常は12.5n Mを使用)の濃度のs i R N A を使用した。s i P O R T をs i R N A 混合物に加え、穏やかに混合し、室温で20分間インキュベートした。無血清培地で細胞を洗浄した後、プレートに細胞を加えた(96ウェルプレートを使用する場合は、4.5×10⁴の密度で細胞を播いた; 6ウェルプレートを使用する場合は、1~5×10⁵の密度で細胞を播種した)。s i P O R T / s i R N A 複合体を各プレート/ウェルに加え、プレートを穏やかに振り動かして細胞表面全体に複合体を行き渡らせた。通常の細胞培養条件のもとで4時間インキュベーションした後、10%F B S を含有する追加の培地を細胞に加えた。48時間後に、全R N A を抽出した。

【0136】

供給業者(アンビオン(A m b i o n)社)の取扱い説明書に従って、s i R N A 構築物で細胞をトランスフェクトした。6ウェルプレートの場合は、ウェル当たり12.5n Mのs i R N A をトランスフェクションに使用した。s i R N A のO D ₂₆₀ の測定を1:100の希釈率で2連にて実施した。測定値を平均し、次に希釈係数を掛け、次いで40を掛けて(O D ₂₆₀ の値1は40 μ g / m l のR N A に等しい)、μ g / m l の単位でのs i R N A の最終濃度を得た。その数値を14(平均的な21m e r のd s R N A 1ナノモル中のR N A のμ g 数)で割って、μ Mの単位でのs i R N A の最終濃度を得、次に、濃度がn Mとなるように変換した。

【0137】

これらの研究の結果を図48に示す。3種類のs i R N A は全て、これらの細胞においてS P A R C のm R N A レベルを低減させた。s i P O R Tのみ、またはs i R N A # 2 のセンス鎖のみで処理した細胞は、S P A R C のm R N A 発現の有意な低減を示さなかった。しかし、3種のs i R N A 全てを一緒に含む併用処理ではいくらか効果を示された(図48)。

【0138】

S P A R C のs i R N A の存在下でO V C A 4 2 9 細胞がシスプラチニンに抵抗する能力についても調べた。細胞は、s i P O R Tのみで処理するか、あるいは、s i R N A # 2 のセンス鎖のみ、または完全なs i R N A # 2 でトランスフェクトした。トランスフェク

20

30

40

50

ション後48時間の間、これらの細胞を回復させ、次に、段階的に濃度を上げたシスプラチニン、または対応する濃度の対照のDMSOで処理した。細胞を薬物に24時間曝露させ、その後薬物を取り除き、さらに72時間、細胞を回復させた。次に、細胞生存率に対するこの処理の効果をMTTアッセイによって評価した。結果を図49に示す；図50は、細胞に対する効果を定量化した後のこれらの結果を示す。このデータは、シスプラチニンに曝露させる前に完全なsiRNA #2で細胞を処理すると、細胞の抵抗性のレベルが半分に低減することを示唆した（siPORTのみ、またはセンス鎖のみで処理した対照ではIC₅₀が25～50μMであるのに対し、siRNA #2で処理した後はIC₅₀が～12.5μMとなった）。

【0139】

10

これらの実験の結果は、SPARCが卵巣がんの治療標的およびマーカーであることを示した。

【実施例4】

【0140】

治療標的としてのMetAP2/p67のin vitro試験

MetAP-2/p67は、いずれも細胞増殖に重要な機能を有する二機能性タンパク質である（りおよびチャン（Li and Chang）、1996年、Biochem. Biophys. Res. Commun. 第227巻、152～9ページ；ウーラ（Wu et al.）、1993年、J. Biol. Chem. 第268巻、10796～10801ページ）。一方の役割では、このタンパク質は真核生物の開始因子2（eIF-2）に結合してそのリン酸化を阻害し、また、他方の役割では、このタンパク質のC末端ドメインが、いくつかの細胞性タンパク質からのN末端メチオニンの加水分解を触媒する酵素活性を有している（ウーラ（Wu et al.）、1993年、J. Biol. Chem. 第268巻、10796～10801ページ）。eIF-2のリン酸化によりeIF-2の翻訳レパートリーが改変されて、様々なメッセージが様々なリン酸化状態で翻訳されるのが可能となる。さらに、メチオニンアミノペプチダーゼ活性は、一般にタンパク質の機能にとって重要であり、N末端メチオニンの除去が行われないと不活性なタンパク質が生成されることが多い（りおよびチャン（Li and Chang）、1996年、Biochem. Biophys. Res. Commun. 第227巻、152～9ページ）。

20

【0141】

30

アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）に由来するフマギリン、およびその合成アナログのTNP-470は、MetAP-2に共有結合してそのメチオニンアミノペプチダーゼ活性を阻害するが、近縁のMetAP-1の活性は阻害しない（グリフィスら（Griffith et al.）、1998年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 第95巻、15183～8ページ）。いくつかの異なる種類の細胞をフマギリンで処理すると、MetAP-2の発現が増大されたことに注目することも重要である（ワンら（Wang et al.）、2000年、J. Cell. Biochem. 第77巻、465～73ページ）；これらの細胞は、MetAP-2の発現レベルを上昇させることによって、MetAP-2の機能喪失に適応していると考えられる。

40

【0142】

本明細書で記述する実験は、OVC429が、シスプラチニンに対する感受性が最も高い細胞株HeYと比べて約7倍多くのMetAP-2を発現することを示した（図8）。ノーザンプロット解析も、MetAP-2発現のレベルが、臨床的にシスプラチニン系化学療法に対する抵抗性がより高い患者でも上昇していることを裏付けた。図9は、最も抵抗性の高い患者（CAP3）のMetAP-2のmRNAレベルが、最も抵抗性の低い患者（CAP1）の約3倍高かったことを示す。シスプラチニン系化学療法に対する抵抗性が中程度のレベルの患者も、中程度のレベルのMetAP-2 mRNAを示した。

【0143】

50

M T T によるアッセイを実施した。該アッセイでは、フマギリンのみ、シスプラチンのみ、および様々な濃度のシスプラチンとフマギリンの組合せを用いて、4、8、および24時間、O V C A 4 2 9 細胞を処理した。結果を図40、41、および42に示す。図40（上側パネル）は、フマギリンの濃度上昇がO V C A 4 2 9 細胞の生存率に与える効果を示す。細胞死がいくらか認められたが、細胞の80%までは、フマギリンが極めて高濃度でも生存していた。シスプラチンのみで細胞を処理すると（下側パネル）、シスプラチンのI C₅₀は約100μMとなった。段階的にレベルを上げたシスプラチンに加えて0.1μg/m1のフマギリンが存在すると、I C₅₀は約50μMに低下した。しかし、10μg/m1のフマギリンの存在下で細胞をシスプラチンで処理すると、細胞生存率が高まり、I C₅₀は約200μMとなった。

10

【0144】

インキュベーション時間の長さにかかわらず、0.1μg/m1のフマギリンの存在下ではシスプラチンの効果が増大されたが、10μg/m1のフマギリンの存在下で細胞をシスプラチンで処理したときは逆の効果が増大された（図41および42）。これらの観察結果から、フマギリンが低濃度であるときに好ましいバランスが保たれ、フマギリンがシスプラチンと相乗的に作用してより多くの細胞の死滅をもたらすことが示唆された。

【0145】

M e t A P - 2 発現を抑制する効果を測定するために、M e t A P - 2 メッセージの異なる領域を標的とするように3種類のs i R N Aを設計した（図43）。これらのM e t A p - 2 のs i R N Aは、

20

1 標的配列：A A A G A T C A G C A T T G G A A G A T A (配列番号4)
2 標的配列：A A G C A C A T C G A C A A G T T A G A A (配列番号5)
3 標的配列：A A A C A G T G C C G A T T G T G A A A G (配列番号6)

であった。

【0146】

図44は、O V C A 4 2 9 におけるM e t A P - 2 の発現レベルに対するs i R N A # 1の効果を示す。対照の細胞は、同じs i R N Aのセンス鎖のみでトランスフェクションするか、または、トランスフェクション剤（s i P o r t（商標）脂質）で処理した。s i R N A # 1で細胞をトランスフェクションすると、トランスフェクション効率が100%ではなかったにもかかわらず、M e t A P - 2 の発現レベルは半分に低減された。これらの細胞のG A P D H 発現レベルに対する効果はほとんど認められず、この処理によって遺伝子発現が一様に影響されるわけではないことが示された。さらに、s i R N A # 2 および# 3で細胞を処理しても、M e t A P - 2 発現は低減されなかった。

30

【0147】

s i R N A # 1、# 1のセンス鎖のみ、またはs i P o r t 脂質のみでO V C A 4 2 9 細胞を処理することによって、M e t A P - 2 の発現が妨害されたときの、シスプラチンに対するO V C A 4 2 9 の抵抗性を試験した。s i R N Aとともに48時間インキュベーションした後、様々な濃度のシスプラチン、または対応する濃度のその溶媒すなわちD M S Oに、細胞を24時間曝露させた。この実験の結果を定量化し、図45に示す。これらの結果は、s i R N A # 1が存在すると、O V C A 4 2 9 のI C₅₀が25μMから約3μMに低下することを示した。図46は、M T T アッセイを実施した後の96ウェルプレートの写真を示す。

40

【0148】

総合すると、これらの結果は、M e t A P - 2 が卵巣がんにおける治療処置の有用な標的であることを示した。

【実施例5】

【0149】

50

治療標的としてのカルパイン2およびS100A10のin vitro試験、ならびにOVCA429細胞におけるS100A11発現の低減

549728(カルパイン2)

前述の方法を用いて、カルパイン2メッセージの異なる領域を標的とするように3種類のsiRNAを設計した。これらのカルパイン2のsiRNAは

#1 AA GGC ATA CGC CAA GAT CAA C(配列番号7);
#2 AA ACT TCT TCC TGA CGA ATC G(配列番号8); および
#3 AA ACG CTA TTC AAG ATA TTT A(配列番号9)

であった。

10

【0150】

前述したようにして、各siRNAをOVCA429細胞に導入した。図53は、これらの配列を用いたOVCA429細胞におけるノックダウン実験の結果を示す。前述のプロトコールを用いることによって、配列#1および#3は、遺伝子の発現レベルを約50%低下させた。さらに、siRNA#3を含むOVCA429細胞を様々な濃度のシスプラチニンで処理した。通常、シスプラチニンに24時間曝露させた後のOVCA429細胞のIC₅₀は、シスプラチニン約25μMである。図54に示すように、カルパイン2のsiRNA#3は、IC₅₀を3.12μMに低減させ、それによって、シスプラチニンに対する細胞の感受性を数倍増大させた。同様に、シスプラチニンの存在下または不在下で、濃度を段階的に上げたカルパイン阻害因子I(ALLN)でOVCA429細胞を処理した。図55に示すように、ALLNはシスプラチニンの存在下でこれらの細胞のIC₅₀を12.5μMに低減させた。したがって、カルパイン2のsiRNA#3は、シスプラチニンに対するOVCA429細胞の感受性に対してALLNより大きな効果を有していた。

20

【0151】

756595(S100A10)

S100A10メッセージに対して3種類のsiRNA:

#1 AA ATG GAA CAC GCC ATG GAA A(配列番号59);
#2 AA ATT CGC TGG GGA TAA AGG C(配列番号60); および
#3 AA TAA TGA AGG ACC TGG ACC A(配列番号61)

を作製した。

30

【0152】

図56で示すように、siRNA#3は、OVCA429細胞のIC₅₀をシスプラチニン25μMから6.25μMに低減させ、それによって、細胞のシスプラチニン感受性を増大させた。

【0153】

810612(S100A11) 前述の方法を用いて、S100A11メッセージの異なる領域を標的とするように3種類のsiRNAを設計した。これらのS100A11のsiRNAは、

#1 AA AGG ATG GTT ATA ACT ACA C(配列番号10);
#2 AA GAA ACT GGA CAC CAA CAG T(配列番号11); および
#3 AA TCT GAT TGG TGG CCT AGC T(配列番号12)

であった。

40

【0154】

前述したようにして、各siRNAをOVCA429細胞に導入した。図57は、前述の方法を用いることによって、siRNA#1および#2がOVCA429細胞における遺伝子の発現レベルをそれぞれ50%および25%低下させたことを示す。

【実施例6】

【0155】

50

結腸がんにおけるMetAP-2、SPARC、カルパイン2、S100A10、およびS100A11の発現

市販の、5名の個体から単離された、非腫瘍組織および隣接する腫瘍組織から得られた対応する結腸cDNAセットをBDバイオサイエンスインコーポレイテッド社 (BD Biosciences, Inc.) [米国カリフォルニア州サンホゼ (San Jose) 所在] から入手した。

【0156】

正常結腸組織および腫瘍結腸組織におけるMetAP-2、SPARC、S100A10、S100A11、およびカルパイン2の発現レベルを決定するために、定量的リアルタイムPCR実験を実施した。図58は、5対の対応する結腸cDNAにおけるMetAP-2の発現レベルを示す。このデータは、患者らのうち2名の腫瘍cDNAにおける発現レベルが、対応する非腫瘍cDNAと比べて著しく上昇していたことを示している（患者BおよびC；図58）。別の1名の患者の腫瘍cDNAにおける発現レベルは、対応する非腫瘍cDNAと比べてわずかしか上昇していなかった（患者A；図58）。OVCA429における発現レベルを参照として使用した。以前の報告により、MetAP-2阻害因子TNP-470によって、ヒト結腸がんの肝臓転移を防ぐことができる事が示されている（田中ら（Tanaka et al.）、1995年、Cancer Res. 第55巻、836～9ページ）。

【0157】

図59は、SPARCのmRNA発現レベルが、5つの対応腫瘍試料のうちの4つにおいて、対応する非腫瘍cDNAと比べて上昇していたことを示す。図60は、S100A11のmRNA発現レベルが、全ての対応腫瘍試料において、対応する非腫瘍cDNAと比べて上昇していたことを示す。図61は、S100A10のmRNA発現レベルが、5つの対応腫瘍試料のうちの4つにおいて、対応する非腫瘍cDNAと比べて上昇していたことを示す。図62は、カルパイン2のmRNA発現レベルが、全ての対応腫瘍試料において、対応する非腫瘍cDNAと比べて上昇していたことを示す。

【0158】

総合すると、これらの観察結果は、MetAP-2、ならびにSPARC、S100A11、S100A10、およびカルパイン2が、結腸がん患者のための治療標的であることを示唆している。

【実施例7】

【0159】

血清中の分泌タンパク質を検出するためのサンドイッチELISA

96ウェルマイクロタイプレートのウェルを、目的の遺伝子産物に対して作製した抗体でコーティングした。一定量の精製した組換え標的遺伝子産物を段階希釈し、定量のための検量線を作成するのに使用する。次に、一定量の患者の血清を各ウェルに添加する。蒸発を最小限に抑えるためにプレートにカバーをかけ、数時間から一晩、4℃でインキュベートする。抗原を取り除き、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) でウェルを3回洗浄する。300μlのブロッキング溶液（魚類ゼラチンの3% (w/v) PBS溶液）を各ウェルに加え、室温で2時間インキュベートする。ブロッキング溶液を取り除き、PBSで3回、ウェルを洗浄する。次に、ホースラディッシュペルオキシダーゼに結合させた適切な抗体を各ウェルに加え（ウェル当たり100μl）、室温で1～2時間インキュベートする。次に、抗体を取り除き、NP-40溶液（NP-40の0.05% (v/v) PBS溶液）でウェルを3回洗浄する。室温で30分間、ABTS（ロックランドダイムノケミカルズ（Rockland Immunochemicals）社）を（ウェル当たり100μlで）各ウェルに加え、マイクロプレートリーダーを用いて405nmでの吸光度を測定することによって、結合を検出する。ペルオキシダーゼの代わりにアルカリ性リン酸塩結合体を使用する場合は、結合を検出するために、ABTSの代わりにpNPP（ロックランドダイムノケミカルズ（Rockland Immunochemicals）社）を使用する。

10

20

30

40

50

【0160】

精製タンパク質を用いて作成した検量線から検出限界を決定した後、がんに罹患していない数人の被験者、およびがんまたは良性の病態であると診断された数人の患者を試験して、目的の特定の遺伝子産物について予想される濃度範囲を決定する。がん患者についての予想範囲から、卵巣がん患者または疾患を再発している患者を、応答性の患者またはがんではない健康な被験者から特定または区別するために使用することができる境界が決まる。

【実施例8】

【0161】

s i R N A を介した遺伝子発現の「ノックダウン」：

10

上述のプロトコールに従って、いくつかの遺伝子に対して特異的な s i R N A が、卵巣がん細胞株においてそれぞれの遺伝子を低減させる（または「ノックダウンする」）能力について試験した。各例において、試験対象の s i R N A と G C 含有量が一致する対照の（非特異的な）s i R N A（ダーマコンインコーポレイテッド社（D h a r m a c o n , I n c ）[米国コロラド州ラフィエット（L a f a y e t t e ）所在]から入手）に対して、いくつかの s i R N A を試験した。いくつかの例では、陰性対照（処理なし）も含めた。発現ノックダウンのレベルは s i R N A の種類によって変動した。特定の遺伝子および特定の遺伝子それぞれに対する s i R N A 配列について以下に述べる。

【0162】

1 . S A P K / E r k 1 (L 3 6 8 7 0) に対して 2 種類の s i R N A を作製した：

20

L 3 6 8 7 0 (7 2 6 1 4 7)

標的配列 # 1 (配列番号 6 4) : A A A T G G G A C G A G G A G C T T A T G (コード配列の第 3 2 0 塩基対から始まる)

標的配列 # 2 (配列番号 6 5) : A A G C G C A T C A C G A C A A G G A T A (コード配列の第 8 3 1 塩基対から始まる)

いずれの配列も S A P K の発現を低減させるのに成功し、配列 # 2 は m R N A レベルを 6 0 % 低減させた。

【0163】

2 . e E F 1 (B C 0 0 5 2 9 1) に対して 3 種類の s i R N A を作製した：

B C 0 0 5 2 9 1 (3 0 6 9 2 1)

30

標的配列 # 1 (配列番号 6 6) : A A C A G G A T T G A C T A C T A T A G C (コード配列の第 1 2 3 塩基対から始まる)

標的配列 # 2 (配列番号 6 7) : A A T A C A G G G T C A C T C A A G T A G (コード配列の第 2 2 7 塩基対から始まる)

標的配列 # 3 (配列番号 6 8) : A A A T A T C T T A A T G T G T C T C C G C (コード配列の第 4 1 2 塩基対から始まる)

標的配列 # 1 および # 2 は、e E F 1 の発現を低減させるのに成功し、配列 # 1 は m R N A レベルを 6 5 % 低減させた。

【0164】

3 . G - C S F R (M 5 9 8 1 8) に対して 3 種類の s i R N A を作製した：

40

M 5 9 8 1 8 (8 0 9 6 3 9)

標的配列 # 1 (配列番号 6 9) : A A G T G T G A G C T G C G C C A C A A G (コード配列の第 7 9 3 塩基対から始まる)

標的配列 # 2 (配列番号 7 0) : A A G A G C C C C C T T A C C C A C T A C (コード配列の第 1 6 6 6 塩基対から始まる)

標的配列 # 3 (配列番号 7 1) : A A C A G G A A G A A T C C C C T C T G G (コード配列の第 1 9 5 7 塩基対から始まる)

標的配列 # 1 および # 3 は、G - C S F R の発現レベルを低下させ、配列 # 1 は m R N A レベルを 5 3 % 低減させた。

【0165】

50

4 . A R A 9 / X A P 2 (U 3 1 9 1 3) に対して 3 種類の s i R N A を作製した :
U 3 1 9 1 3 (8 1 4 7 3 1)

標的配列 # 1 (配列番号 7 2) : A A A C G T G T G A T A C A G G A A G
G C (コード配列の第 4 8 塩基対から始まる)

標的配列 # 2 (配列番号 7 3) : A A C A A G T A C G A C G A C A A C G
T C (コード配列の第 7 7 5 塩基対から始まる)

標的配列 # 3 (配列番号 7 4) : A A C G T C A A G G C C T A C T T C A
A G (コード配列の第 7 9 0 塩基対から始まる)

標的配列 # 2 および # 3 は、 A R A 9 発現の低減をもたらし、配列 # 3 は m R N A レベルを 5 0 % 低減させた。 10

【 0 1 6 6 】

5 . R N P S 1 (A F 0 1 5 6 0 8) に対して 3 種類の s i R N A を作製した :
A F 0 1 5 6 0 8 (8 9 7 5 9 4)

標的配列 # 1 (配列番号 7 5) : A A T A T T C A T A C G G C A T G G A
C T (コード配列の第 3 2 7 塩基対から始まる)

標的配列 # 2 (配列番号 7 6) : A A C C T A A A A T A G A A G A C C C
C T (コード配列の第 6 8 0 塩基対から始まる)

標的配列 # 3 (配列番号 7 7) : A A A A G A T G C T G A C T C A G A A
A A (コード配列の第 7 5 2 塩基対から始まる)

3 種の配列はいずれも R N P S 1 の発現を低減させるのに成功し、配列 # 1 は m R N A レベルを 3 5 % 低減させた。 20

【 0 1 6 7 】

6 . フューズドトウ (F u s e d t o e s) (B C 0 0 1 1 3 4) に対して、 3 種類の s i R N A を作製した :

B C 0 0 1 1 3 4 (3 2 1 2 4 7)

標的配列 # 1 (配列番号 7 8) : A A C C T A A A A T A G A A G A C C C
C T (コード配列の第 6 8 0 塩基対から始まる)

標的配列 # 2 (配列番号 7 9) : A A G A C C C C T A T G C A A T T A G
C T (コード配列の第 6 9 2 塩基対から始まる)

標的配列 # 3 (配列番号 8 0) : A A A A A G C C T G A A G A A C A G C
A C (コード配列の第 7 6 9 塩基対から始まる) 30

3 種の配列はいずれも フューズドトウ (F u s e d t o e s) の発現を低減させるのに成功し、配列 # 2 は m R N A レベルを 4 3 % 低減させた。

【 0 1 6 8 】

7 . グランカルシン (B C 0 0 5 2 1 4) に対して 3 種類の s i R N A を作製した :

B C 0 0 5 2 1 4 (3 4 1 4 0)

標的配列 # 1 (配列番号 8 1) : A A A T G G G A T T T A A T G C A T T
C A (コード配列の第 3 2 3 塩基対から始まる)

標的配列 # 2 (配列番号 8 2) : A A C T T C A T G A C T G T T G A T C
A A (コード配列の第 3 7 9 塩基対から始まる) 40

標的配列 # 3 (配列番号 8 3) : A A C A T C A T G A G T T G C G T C A
A G (コード配列の第 4 1 9 塩基対から始まる)

3 種の配列はいずれも グランカルシン の発現を低減させるのに成功し、配列 # 2 は m R N A レベルを 8 3 % 低減させた。

【 0 1 6 9 】

8 . S R B 1 / C L A 1 / C D 3 6 1 1 (B C 0 2 2 0 8 7) に対して 3 種類の s i R N A を作製した :

B C 0 2 2 0 8 7 (7 5 6 6 8 7)

標的配列 # 1 (配列番号 8 4) : A A G C A G C A G G T C C T T A A G A
A C (コード配列の第 1 0 9 塩基対から始まる) 50

標的配列 # 2 (配列番号 85) : A A T C T C A T C A A C A A G T A C T
 T T (コード配列の第 565 塩基対から始まる)
 標的配列 # 3 (配列番号 86) : A A T T C A G A A C G T C A G C A C C
 T G (コード配列の第 981 塩基対から始まる)

標的配列 # 1 および # 3 は、S R B 1 の発現を低減させるのに成功し、配列 # 1 は m R N A レベルを 60 % 低減させた。

【0170】

9. K I A A 0 0 8 2 (B C 0 3 1 8 9 0) に対して 3 種類の s i R N A を作製した：
 B C 0 3 1 8 9 0 (8 2 5 2 9 3) 10
 標的配列 # 1 (配列番号 87) : A A G A G G A G A A C T G A C C C A G
 A A (コード配列の第 4 塩基対から始まる)
 標的配列 # 2 (配列番号 88) : A A A T G A G C G A T T G G A T G G T
 G G (コード配列の第 509 塩基対から始まる)
 標的配列 # 3 (配列番号 89) : A A G A T C A T C A A G G G C T C C A
 G T (コード配列の第 2164 塩基対から始まる)

配列 # 1 は、m R N A レベルを 65 % 低減させた。配列 # 2 および # 3 は、m R N A レベルに対する効果を示さなかった。

【0171】

10. e I F 2 B (B C 0 1 3 5 9 0) に対して 3 種類の s i R N A を作製した：
 B C 0 1 3 5 9 0 (1 6 3 0 9 9 8) 20
 標的配列 # 1 (配列番号 90) : A A T G T G G T T C G A A T A A T T A
 C A (コード配列の第 352 塩基対から始まる)
 標的配列 # 2 (配列番号 91) : A A A C T C G A G A T G A C T T T G T
 G C (コード配列の第 800 塩基対から始まる)
 標的配列 # 3 (配列番号 92) : A A T C A A C A G C T G C A G A G G T
 T C (コード配列の第 2098 塩基対から始まる)

配列 # 1 は m R N A レベルを 57 % 低減させ、配列 # 2 は m R N A レベルを 54 % 低減させ、配列 # 3 は m R N A レベルを 43 % 低減させた。

【0172】

11. カルボニン 2 (D 8 3 7 3 5) に対して 3 種類の s i R N A を作製した：
 D 8 3 7 3 5 (7 1 3 8 8 6) 30
 標的配列 # 1 (配列番号 93) : A A G G A T G G A A C T A T C T T A T
 G C (コード配列の第 163 塩基対から始まる)
 標的配列 # 2 (配列番号 94) : A A T T T C G A C G A T G C C A C C A
 T G (コード配列の第 457 塩基対から始まる)
 標的配列 # 3 (配列番号 95) : A A C C G A C A A G T G T G A C A A C
 T C (コード配列の第 708 塩基対から始まる)

3 種の配列はいずれも遺伝子発現のレベルを低減させ、配列 # 3 は m R N A レベルを 75 % 低減させた。

【0173】

12. H Y A 2 2 (D 8 8 1 5 3) に対して 3 種類の s i R N A を作製した：
 D 8 8 1 5 3 (1 2 3 9 8 0) 40
 標的配列 # 1 (配列番号 96) : A A A G A A A T G T G T G G T C A T T
 G A (コード配列の第 507 塩基対から始まる)
 標的配列 # 2 (配列番号 97) : A A A T C G A T G G A A C T A T A C A
 T C (コード配列の第 596 塩基対から始まる)
 標的配列 # 3 (配列番号 98) : A A C T A T A C A T C A G G T G T A T
 G T (コード配列の第 606 塩基対から始まる)
 3 種の配列はいずれも遺伝子発現のレベルを低減させ、配列 # 3 は m R N A レベルを 60 % 低減させた。 50

【0174】

13 . C A 1 2 5 (B C 0 0 9 8 0 8) に対して 3 種類の siRNA を作製した :

B C 0 0 9 8 0 8 (C A 1 2 5)

標的配列 # 1 (配列番号 9 9) : A A T G G T T T C A C C C A T C A G A G C (コード配列の第 2 3 5 塩基対から始まる)

標的配列 # 2 (配列番号 1 0 0) : A A G G G C T C A G C T A C A T T C C A A C (コード配列の第 2 2 0 3 塩基対から始まる)

標的配列 # 3 (配列番号 1 0 1) : A A T A C A A C G T C C A G C A A C A G T (コード配列の第 3 3 8 0 塩基対から始まる)

配列 # 3 は、mRNA レベルを 50 % 低減させた。

10

【0175】

14 . H M T 1 (A F 2 2 2 6 8 9) に対して 2 種類の siRNA を作製し、H e y 細胞で試験した :

A F 2 2 2 6 8 9

標的配列 # 1 (配列番号 1 0 2) : A A C T C C A T G T T T C A T A A A C C G G (コード配列の第 2 0 2 塩基対から始まる)

標的配列 # 2 (配列番号 1 0 3) : A A C G T G T A T G G C T T C G A C A T G (コード配列の第 6 1 9 塩基対から始まる)

いずれの配列も H M T 1 の mRNA 発現を低減させることに成功し、配列 # 1 は約 70 % 、配列 # 2 は 60 % を少し超える程度低減させた。

20

【0176】

15 . M P P 1 0 (X 9 8 4 9 4) に対して 3 種類の siRNA を作製し、H e y 細胞で試験した :

X 9 8 4 9 4

標的配列 # 1 (配列番号 1 0 4) : A A G T T C C A G A A A T C T G A A A T A (コード配列の第 3 5 7 塩基対から始まる)

標的配列 # 2 (配列番号 1 0 5) : A A G A A A A T C C A G A A C A T G T A G (コード配列の第 1 0 4 3 塩基対から始まる)

標的配列 # 3 (配列番号 1 0 6) : A A A A C A G T A G C T T C G G A G (コード配列の第 1 4 1 4 塩基対から始まる)

30

3 種の配列はいずれも mRNA 発現を低減させ、配列 # 1 はほぼ 90 % の低減をもたらし、配列 # 2 および # 3 は、それぞれ約 30 % および 40 % 低減させた。

【0177】

16 . I G F B P - 7 (B C 0 1 7 2 0 1) に対して 2 種類の siRNA を作製し、O V C A 4 2 9 で試験した。

B C 0 1 7 2 0 1

標的配列 # 1 : A A G G T A A A A G G G G G T C A C T A T (コード配列の第 5 8 3 塩基対から始まる) (配列番号 1 0 7)

標的配列 # 2 : A A A G G G G T C A C T A T G G A G T T C (コード配列の第 5 9 0 塩基対から始まる) (配列番号 1 0 8)

40

配列 # 1 のみが、mRNA レベルの低減をもたらし、対照と比べて約 60 % であった。

【0178】

17 . N M 2 3 - D (B C 0 0 4 8 8 0) に対して 1 種類の siRNA を作製し、O V C A 4 2 9 細胞で試験した :

B C 0 0 4 8 8 0 (2 0 3 0 0 3)

標的配列 # 3 : A A T G T C A T C C A C C G C C A G C G A C (最初の A T G から 4 4 2 塩基対の位置で始まる) (配列番号 1 3 5)

標的配列 # 3 のみが、対照と比べて約 50 % mRNA レベルを低減させた。

【0179】

18 . W D R 1 (A B 0 1 0 4 2 7) に対して 3 種類の siRNA を作製し、O V C A

50

429細胞で試験した：

A B 0 1 0 4 2 7

標的配列#1 : A A T G G A A A G T G C G T C A T C C T A (最初のA T Gから106塩基対の位置で始まる) (配列番号136)

標的配列#2 : A A G T T C A C A A T T G G C G A C C A C (最初のA T Gから544塩基対の位置で始まる) (配列番号137)

標的配列#3 : A A G T G C T T C A G C A T C G A C A A C (最初のA T Gから1309塩基対の位置で始まる) (配列番号138)

標的配列はいずれもmRNAレベルを低減させ、対照と比べて、配列#1は約85%、配列#2は約75%、配列#3は約70%低減させた。

10

【0180】

19. ピネキシン (AF037261) に対して1種類のsiRNAを作製し、OVCA429細胞で試験した：

A F 0 3 7 2 6 1

標的配列#2 : A A G A G T T A C C T A G A A G C A C C T (配列番号139)

標的配列#1および#3は対照と比べてmRNAレベルを低減させなかったのに対し、配列#2はmRNAを対照と比べて約50%低減させた。

【0181】

20. K L K 6 (BC015525) に対して3種類のsiRNAを作製し、OVCA429細胞で試験した：

B C 0 1 5 5 2 5

標的配列#1 : A A A A A A C C G A A T C T T C A G G T C (配列番号140)

標的配列#2 : A A A C T C T C T G A A C T C A T C C A G (配列番号141)

標的配列#3 : A A C T G G A T C C A A A A A C C A T T (配列番号142)

標的配列#1は対照と比べてmRNAレベルを低減させなかったのに対し、配列#2は約42%、配列#3は約55%、対照と比べてmRNAを低減させた。

30

【0182】

21. eIF5 (U49436) に対して1種類のsiRNAを作製し、OVCA429細胞で試験した：

U 4 9 4 3 6

標的配列#1 mRNA標的配列 : A A T G A C C G T T A C A T T G T C
A A T (配列番号143)

標的配列#2および#3は、対照と比べてmRNAレベルを低減させなかったのに対し、配列#1は、対照と比べて約59%、mRNAを低減させた。

【0183】

22. 亜鉛フィンガータンパク質262/MYM (AB007885) に対して1種類のsiRNAを作製し、OVCA429細胞で試験した：

A B 0 0 7 8 8 5

標的配列#3 : A A A A T A T G G G A A C C T A C A A T A (最初のA T Gから3058塩基対の位置で始まる) (配列番号144)

標的配列#1および#2は、対照と比べてmRNAレベルを低減させなかったのに対し、配列#3は、対照と比べて約45%、mRNAを低減させた。

40

【実施例9】

【0184】

検証された遺伝子のin vitro機能試験

特異的なsiRNAがOVCA429細胞およびOVCA-R-3細胞のシスプラチン感

50

受性を高める能力を、ほぼ上記の実施例3～5で開示したようにして検査した。各事例において、シスプラチニ感受性は、特異的 siRNA の存在下で増大したが、非特異的な（対照の）siRNA、または陰性対照（未処理）では増大しなかった。データは、試験した遺伝子が卵巣がん細胞株におけるシスプラチニ抵抗性の発現に機能的に関与している可能性があることを示した。これらの結果を表4に要約する。

【0185】

【表4】

表4 in vitroシスプラチニ感受性試験

登録番号	名称	siRNA 配列	OVCA429細胞 での試験	429: シスプラチニ 感受性 の増大	OVCAR-3細胞 での試験	OVCAR-3: シスプラチニ 感受性 の増大
M59818	G-CSFR	#1	yes	yes		
U31913	ARA9 XAP 2	#3	yes	yes	yes	yes
AF015608	RNPS1	#1	yes	yes		
BC001134	フューズドトウ	#2	yes	yes	yes	yes
BC005214	グランカルシン	#2	yes	yes	yes	yes
BC022087	SRB1	#1	yes	yes	yes	yes
BC031890	KIAA0082	#1	yes	yes	yes	yes
AB007885	亜鉛フィンガータンパク質	#3	yes	yes	yes	yes
BC004880	NM23D	#3	yes	yes	yes	yes
AB010427	WDR1	#1		no	yes	yes
U49436	eIF5 eIF5A	#1	yes	yes	yes	yes
D83735	カルボニン2	#3	yes	yes	Yes	yes
BC015525	KLK6	#3	yes	yes	yes	yes
AF037261	ビネキシンβ	#2		no	yes	yes
BC017201	IGFBP-7	#1	yes	yes	yes	yes
D88153	HYA22	#3	yes	境界	yes	yes
BC013590	eIF2Be	#1	yes	yes	yes	yes
L36870	SAPK/Erk1	#2	yes	yes	yes	yes

10

20

30

【実施例10】

【0186】

in vivo 実験：

OVCAR-3細胞およびヌードマウスを用いて腫瘍の増殖を検査するために、以下のプロトコールを作成した：OVCAR-3細胞（1500万個／注射）をヌードマウスの上腕部分に接種した。25日後に目に見える腫れ物が現れた。接種後約35日目に腫瘍は測定可能な大きさとなった。次に、動物を、1週3回2週間の腹腔内注射投与により4μg/kg（体重）のシスプラチニで治療し、その後1週間は治療をしないもの、あるいは、対照として生理食塩水のみで処置するもののいずれかとした。図63は、マウス2匹の体重の関数として腫瘍体積を示すグラフである。このデータは、腫瘍を有する対照の動物が、化学療法がまったくされない場合は腫瘍を増殖し続けることを実証した（マウス#1）。一方、シスプラチニ治療を受けた動物は、腫瘍サイズの安定化を示した（マウス#2）。シスプラチニ治療前後の腫瘍の写真も示す。

40

【0187】

50

このプロトコールを、本明細書で特定した遺伝子（M e t A P - 2、S P A R C、S 1 0 0 A 1 0、S 1 0 0 A 1 1、およびカルパイン2）に対するs i R N Aを発現する安定な細胞株を用いて繰り返す。カルパイン2またはS 1 0 0 A 1 1のs i R N Aを発現している安定なO V C A R - 3細胞株、ならびに緑色蛍光タンパク質（G F P、細胞増殖に関連しないマーカータンパク質）に対する安定なs i R N Aを発現している対照のO V C A R - 3細胞株を作製した；定量的リアルタイムP C Rによって測定した、カルパイン2およびS 1 0 0 A 1 1の発現ならびにs i R N A発現の効果を図64に示す。15匹のマウスを5匹ずつの3群に分ける。1つの群を対照として扱い、s i R N Aを発現していないO V C A R - 3細胞を注射する。第2群にはs i R N Aを発現しているO V C A R - 3細胞を注射し、第3群にはG F P特異的s i R N Aを発現しているO V C A R - 3細胞を注射する。測定可能な腫瘍が認められるようになった後、対照群には生理食塩水を注射し、第2群および第3群には標準のシスプラチニン治療を施す。前述したように、体重の関数として腫瘍の増殖を観察する。

【0188】

別の実験では、15匹のマウスを5匹ずつの群に分け、純粋な（すなわち、組換え体ではない）O V C A R - 3細胞を接種し、腫瘍を増殖させた。1つの群は対照として扱う。測定可能な腫瘍が認められるようになった後、対照群には生理食塩水を注射し、第2群には前述したように標準のシスプラチニン治療を施し、第3群にはT N P - 4 7 0（臨床的に認められているフマギリン誘導体）を併用する標準のシスプラチニン治療を施す。前述したように、体重の関数として腫瘍の増殖を観察する。

【0189】

実施例で開示した情報は以下のように要約することができる。

【0190】

【表5】

表5

登録番号	名称	卵巣がん患者の組織試料パネルでの試験	O V C A 4 2 9、O V C A R - 3（もしくは両方）またはHeylにおけるin vitroの機能検証に合格*
BC015973	S100A10 p11 CLP11 カルパクチン1 軽鎖 42C	yes	yes
BC001410	S100A11 S100C カルギザリン	yes	yes
AF261089	カルパイン2 CANPL2 MCANP	yes	yes
BC004974	SPARC オスティオネクチン BM-40	yes	yes

登録番号	名称	卵巣がん患者の組織試料パネルでの試験	OVCA429、OVCAR-3（もしくは両方）またはHeyににおけるin vitroの機能検証に合格*
BC013782	MetAP2 p67eIF2 MNPEP	yes	yes
BC015525	KLK6 ザイム ニューロシン プロテアーゼM	yes	yes
AF222689	HMT1 HMT2 ANM1 HCP1	yes	no
U31913	ARA9 XAP2	no	yes
D83735	カルボニン2	no	yes
U19251	NAIP	yes	no
BC005291	eEF1ε p18	yes	no
AF015608	RNPS1	yes	yes
U49436	eIF5 eIF5A	yes	yes
BC013590	eIF2Bε	yes	yes
M65217	HSF2 HSTF2	no	no
AB010427	WDR1 NORI-1	yes	yes
BC001134	フューズドトウ	no	yes
BC004880	NM23D mn23-H4	yes	yes
U10439	ADAR1	yes	no
BC005214	グランカルシン	no	yes
BC009808	NBR1	no	no
L36870	SAPK/Erk1 JNKK1 MEK4	yes	yes

10

20

30

40

登録番号	名称	卵巣がん患者の組織試料パネルでの試験	OVCA429、OVCAR-3(もしくは両方)またはHeyにおけるin vitroの機能検証に合格*
	MKK4 MAPKK4		
AB007885	亜鉛フィンガータンパク質-262 MYM	yes	yes
D88153	HYA22	yes	yes
AB049635	MRPL4 CGI-28	yes	no
AF037261	ビネキシンβ	yes	yes
M59818	G-CSFR	yes	yes
BC015710	RAB22A	yes	no
BC017201	IGFBP-7 MAC25 FSTL2	no	yes
BC011770	FASTキナーゼ	no	no
AB057597	TESK2	no	no
BC022087	SRB1 CLA1 CD36L1	yes	yes
BC031890	KIAA0082	no	yes
NM_0063 12	NCOR2	no	no
BC032338	MT1	yes	no
X98494	MPP10	no	no

10

20

30

*: 薬剤抵抗性の腫瘍細胞において発現が上昇するすべての遺伝子(KLK6、ARA9、カルボニン2、RNPS1、eIF5、eIF2Bε、WDR1、フェヌードトウ、NM23D、グランカルシン、SAPK/Erk1、亜鉛フィンガータンパク質-262MYM、HYA22、ビネキシンβ、G-CSFR、IGFBP-7、SRB1、またはKIAA0082)をOVCAR-3細胞またはOVCA429細胞で試験し、ほとんどの抵抗性の腫瘍細胞において発現が低下するすべての遺伝子(MPP10、HMT1、NAIP、Eef1ε、RAB22A、NCOR2、またはMT1)をHey細胞で試験した。

以上の開示内容は本発明の一部の特定の実施形態を強調するものであり、該実施形態に等価な全ての修正形態または代替形態は添付の特許請求の範囲に記載の本発明の趣旨および範囲に含まれると理解されるべきである。

40

【図面の簡単な説明】

【0191】

【図1】化学療法薬に対する抵抗性が高い卵巣がん細胞株においてS100A10が高いレベルで発現していることを実証する、ノーザンプロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図2】化学療法薬に対する抵抗性が高い卵巣がん細胞株においてS100A11が高いレベルで発現していることを実証する、ノーザンプロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンプロットの結果のグラフ図。

50

【図3】化学療法に対する反応性がより高い患者から得た試料と比べて、抵抗性がより高い患者の腫瘍試料においてS100A10およびS100A11のmRNAレベルが上昇していることを実証する、ノーザンプロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図4】化学療法抵抗性の細胞株でSPARCが高いレベルで発現していたことを実証する、定量的リアルタイムPCRの結果を示すグラフ。

【図5】がんが再発していた患者から採取した試料においてSPARCのmRNAが増大していたことを実証する、ノーザンプロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真。

【図6】化学療法抵抗性の卵巣がん細胞株でカルパイン2のmRNAレベルが上昇していたことを実証する、ノーザンプロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンプロットの結果のグラフ図。10

【図7】シスプラチニンを用いた治療に対して感受性の細胞株と比べて、化学療法抵抗性の細胞株においてグランカルシンのmRNAレベルが上昇していたことを実証するノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図8】MetAP2タンパク質の発現が化学療法抵抗性の極めて高い細胞株OVCA429において上昇しており、シスプラチニン治療に対して感受性であるHeY細胞株において下方制御されていたことを実証する、ウェスタンプロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびウェスタンプロットの結果のグラフ図。

【図9】シスプラチニン系の化学療法に対する抵抗性のレベルが異なる3名の患者から得た組織試料におけるMetAP2のmRNA発現を示す、ノーザンプロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンプロットの結果のグラフ図。MetAP2は、化学療法に対する抵抗性が中間レベルの患者(CAP2)および低レベルの患者(CAP1)と比較して、最も抵抗性の高い腫瘍を有する患者(CAP3)から得た試料において最も増大している。20

【図10】シスプラチニンに対する抵抗性のレベルが最も高い卵巣がん細胞株においてeIF5の2種の転写物が検出され、いずれの発現レベルも上昇していたことを実証する、ノーザンプロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図11】腫瘍の再発前(CAP2)および再発後(CAP2+)の化学療法抵抗性の患者の腫瘍試料におけるeIF5の発現を示す、ノーザンプロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンプロットの結果のグラフ図。30

【図12】化学療法抵抗性の細胞株でeIF2BのmRNAが増大していたことを実証する、ノーザンプロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図13】シスプラチニンに対する抵抗性が最も高い卵巣がん細胞株においてeEF1のmRNAが下方制御されていたことを実証する、ノーザンプロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図14】シスプラチニンに感受性の細胞株と比べて、抵抗性の細胞株においてSAPK/Erk1のmRNAレベルが上昇していたこと実証する、ノーザンプロットの結果のグラフ図。40

【図15】TEST2のmRNAがシスプラチニン抵抗性の細胞株において増大していたことを実証する、ノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図16】FASTキナーゼmRNAがシスプラチニン抵抗性の細胞株において増大していたことを実証する、ノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図17】試験されたシスプラチニン抵抗性の細胞株においてKLK6の発現レベルが増大されていたことを実証する、ノーザンプロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図18】シスプラチニン抵抗性の細胞においてHMT1の発現が下方制御されていたことを実証する、ノーザンプロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンプロットの結果のグラフ図。50

【図19】シスプラチン抵抗性の細胞においてARA9由来のmRNAが増大していたことを実証する、ノーザンプロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図20】化学療法感受性の卵巣がん細胞株と比較して化学療法抵抗性の細胞株でカルボニン2の発現が増大していたことを実証する、ノーザンプロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図21】シスプラチンに最も抵抗性の高い細胞株において、神経細胞アポトーシス阻害タンパク質の遺伝子発現が低下していたことを実証する、ノーザンプロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図22】シスプラチン抵抗性の細胞株においてRNP S 1のレベルが増大していたことを実証する、ノーザンプロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンプロットの結果のグラフ図。10

【図23】化学療法抵抗性の細胞株でHSF2のmRNAのレベルが上昇していたことを実証する、ノーザンプロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図24】化学療法感受性の細胞株と比較して化学療法抵抗性の細胞株でWDR1のmRNAが増大していたことを実証する、ノーザンプロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図25】シスプラチン抵抗性の細胞株においてFt1のmRNAレベルが上昇していたことを実証する、ノーザンプロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンプロットの結果のグラフ図。20

【図26】化学療法抵抗性の細胞株でNME4のmRNAが増大していたことを実証する、ノーザンプロット解析の結果を示すオートラジオグラム写真およびノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図27】シスプラチン抵抗性の細胞株においてADAR1のmRNAが増大していたことを実証する、ノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図28】NBR1のmRNAが、試験された他の細胞株と比較して最も化学療法抵抗性が高い細胞株であるOVCA429において増大していたことを実証する、ノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図29】亜鉛フィンガータンパク質262に対するmRNAが、試験された他の細胞株と比較して最もシスプラチン抵抗性が高い細胞株において増大していたことを実証する、ノーザンプロットの結果のグラフ図。30

【図30】MRPL4のmRNAが、化学療法抵抗性の細胞株において増大していたことを実証する、ノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図31】HYA22のmRNAが、化学療法感受性の細胞株と比較して化学療法抵抗性の細胞株において増大していたことを実証する、ノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図32】ビネキシンのmRNAが、化学療法抵抗性の細胞株において増大していたことを実証する、ノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図33】G-CSFRのmRNAが、化学療法抵抗性の細胞株において増大していたことを実証する、ノーザンプロットの結果のグラフ図。40

【図34】SRB1のmRNAが、化学療法抵抗性の細胞株において増大していたことを実証する、ノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図35】IGFBP-7のmRNAが、化学療法抵抗性の細胞株において増大していたことを実証する、ノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図36】RAB22AのmRNAが、化学療法抵抗性の細胞株において低下していたこと、および反応性のより高い細胞株において増大していることを実証する、ノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図37】KIAA0082のmRNAの発現が、化学療法抵抗性の細胞株において増大していたことを実証する、ノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図38】NCOR2のmRNAが、シスプラチン感受性の細胞株と比較して抵抗性の細50

胞株において低減していたことを実証する、ノーザンプロット解析および結果のグラフ図。

【図39】MTTアッセイの結果に基づく、シスプラチンに対する感受性のレベルによる5種の卵巣がん細胞株の順位付けを示す図。

【図40】(上側パネル)：フマギリンの濃度上昇がフマギリンへの曝露4時間後のOVCA429細胞生存率に与える効果を示すグラフ。(下側パネル)：0.1μg/mlのフマギリンの存在下ではシスプラチンの効果が増大されたが、10μg/mlのフマギリンの存在下で4時間、シスプラチンで細胞を処理したときは効果が増大されなかったことを示すグラフ。

【図41】(上側パネル)：フマギリンの濃度上昇がフマギリンへの曝露8時間後のOVCA429細胞生存率に与える効果を示すグラフ。(下側パネル)：0.1μg/mlのフマギリンの存在下ではシスプラチンの効果が増大されたが、10μg/mlのフマギリンの存在下で8時間、シスプラチンで細胞を処理したときは効果が増大されなかったことを示すグラフ。

【図42】(上側パネル)：フマギリンの濃度上昇がフマギリンへの曝露24時間後のOVCA429細胞生存率に与える効果を示すグラフ。(下側パネル)：0.1μg/mlのフマギリンの存在下ではシスプラチンの細胞毒性効果が増大されたが、10μg/mlのフマギリンの存在下で24時間、シスプラチンで細胞を処理したときは効果が増大されなかったことを示すグラフ。

【図43】MetAP-2メッセンジャーRNAの異なる領域を標的とするように設計された、3種のsiRNA(#1：配列番号4、#2：配列番号5、#3：配列番号6)の概略図。

【図44】定量的リアルタイムPCRにより決定した、OVCA429におけるMetAP-2発現レベルに対するsiRNA #1の効果を示すグラフ。

【図45】siRNA #1の存在下でOVCA429をシスプラチンに曝露させた後にMTTアッセイにより決定した、細胞生存率の定量結果を示すグラフ。

【図46】MetAP-2のsiRNA #1でトランスフェクションしたOVCA429細胞に対するシスプラチンの効果を示すMTTアッセイ(図45に示す定量アッセイ)を実施した後の、OVCA429細胞の入った96ウェルプレートの写真。

【図47】SPARCのメッセージの異なる領域を標的とするように設計された、3種のsiRNA(#1：配列番号1、#2：配列番号2、#3：配列番号3)の概略図。

【図48】図47に示すsiRNAでトランスフェクションしたOVCA429細胞におけるSPARC発現の定量的リアルタイムPCR解析の結果を示すグラフ。

【図49】SPARCのsiRNA #2の存在下でのOVCA429細胞に対するシスプラチンの効果を測定するためにMTTアッセイを実施した後の、OVCA429細胞の入った96ウェルプレートの写真。

【図50】siRNAを介したSPARC遺伝子発現の低減がOVCA429細胞のシスプラチン感受性に与える効果を示すグラフ。

【図51】MT1のmRNAが、シスプラチンに対する感受性が最も高い細胞株(Hey)において著しく増大していたことを実証する、ノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図52】シスプラチンに対する感受性が高くなるほど、MPP10のmRNAが増大していたことを実証する、ノーザンプロットの結果のグラフ図。

【図53】OVCA429細胞におけるカルバイン2遺伝子発現のsiRNAを介した低減の効果を示すグラフ。

【図54】OVCA429細胞のシスプラチン感受性に対するカルバイン2のsiRNA #3の効果を示すグラフ。

【図55】OVCA429細胞のシスプラチン感受性に対するカルバイン2阻害因子ALNの効果を示すグラフ。

【図56】OVCA429細胞のシスプラチン感受性に対するS100A10遺伝子発現のsiRNAを介した低減の効果を示すグラフ。

10

20

30

40

50

【図57】O V C A 4 2 9 細胞におけるS 1 0 0 A 1 1 遺伝子のm R N A 発現レベルに対するs i R N A の効果を示すグラフ。

【図58】正常細胞および結腸がん細胞のc D N A におけるM e t A p - 2 のm R N A 発現レベルを示すグラフ。

【図59】正常細胞および結腸がん細胞のc D N A におけるS P A R C のm R N A 発現レベルを示すグラフ。

【図60】正常細胞および結腸がん細胞のc D N A におけるS 1 0 0 A 1 1 のm R N A 発現レベルを示すグラフ。

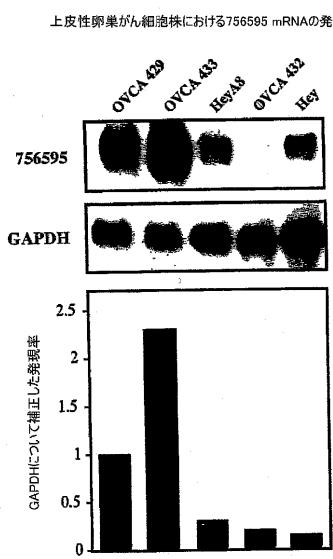
【図61】正常細胞および結腸がん細胞のc D N A におけるS 1 0 0 A 1 0 のm R N A 発現レベルを示すグラフ。

【図62】正常細胞および結腸がん細胞のc D N A におけるカルパイン - 2 のm R N A 発現レベルを示すグラフ。

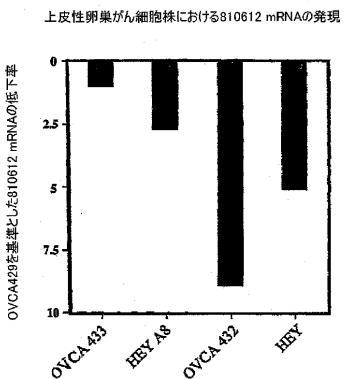
【図63】O V C A R - 3 細胞 (1 5 0 0 万個 / 注射、アメリカンタイプカルチャーコレクション (American Type Culture Collection [米国バージニア州マナッサス (Manassas) 所在]) から入手、登録番号H T B - 1 6 1) を注射し、3 5 日後に、4 μ g / k g (体重) のシスプラチンを週に3回ずつ2週間、腹腔内投与して治療し、その後は1週間治療を行わなかったヌードマウス、または対照として生理食塩水溶液のみで処理したヌードマウス2匹の体重の関数として腫瘍の体積を示すグラフ。

【図64】O V C A R - 3 細胞におけるカルパイン 2 またはS 1 0 0 A 1 1 に対するs i R N A の安定な発現を示すグラフ。対照では、双方のm R N A の発現を、未処理の細胞または無関係なG F P s i R N A を含む細胞において測定した。カルパイン 2 およびS 1 0 0 A 1 1 のm R N A 発現は、関連性のあるs i R N A の場合に大きく低減された。

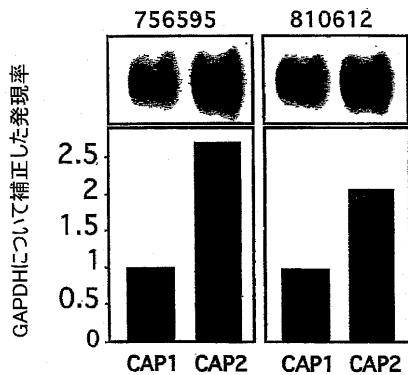
【図1】



【図2】

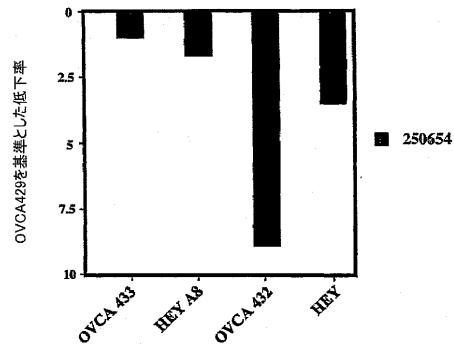


【図3】



【図4】

定量的リアルタイムPCRを用いた、上皮性卵巣がん細胞株における250654の発現の検証

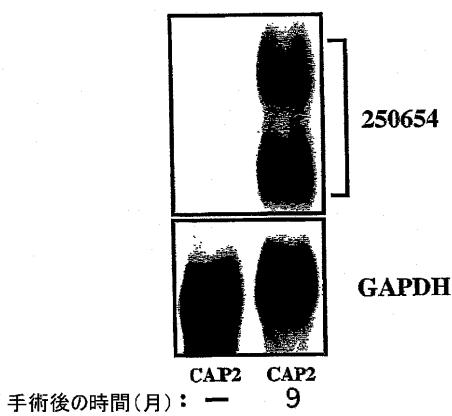


プローブ配列

FAM-CGCGTATGAACCTGGGTTATGTGACGCG-DABCYL

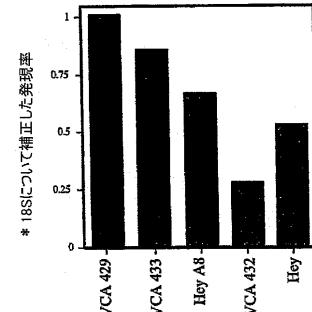
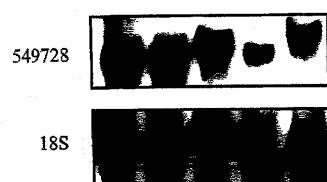
【図5】

非反応性の上皮性卵巣がん患者における長期の250654発現



【図6】

549728のノーザンプロット解析

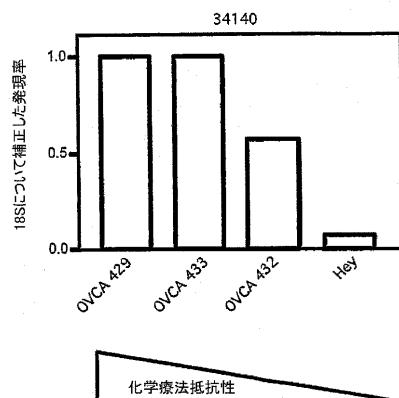


* 2連の平均を示す

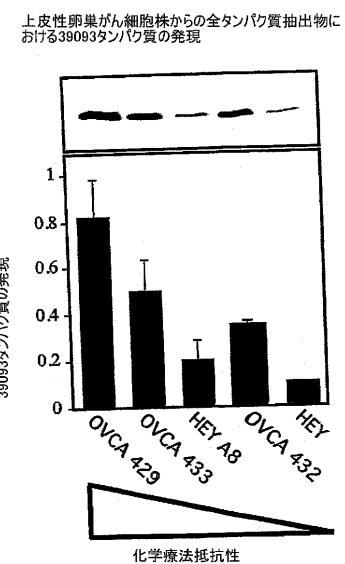


シスプラチン抵抗性

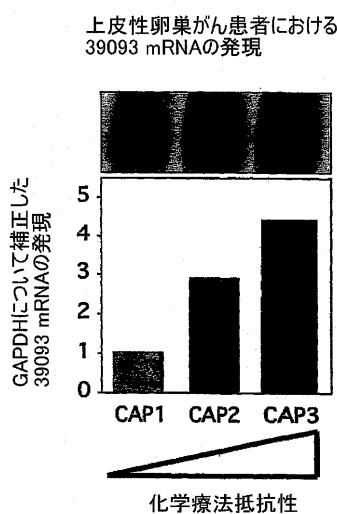
【図7】



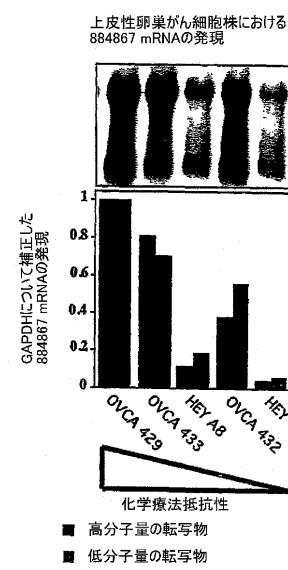
【図8】



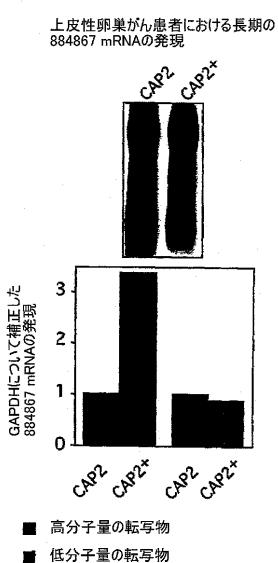
【図9】



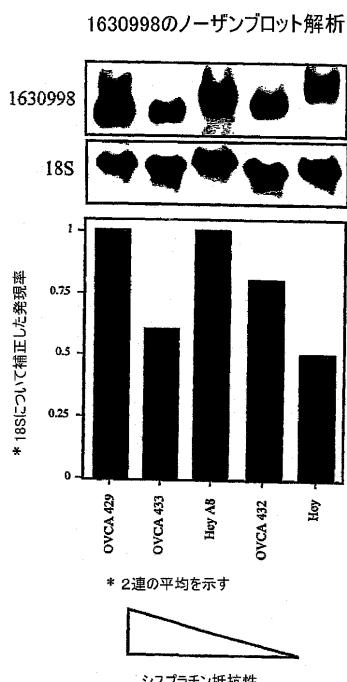
【図10】



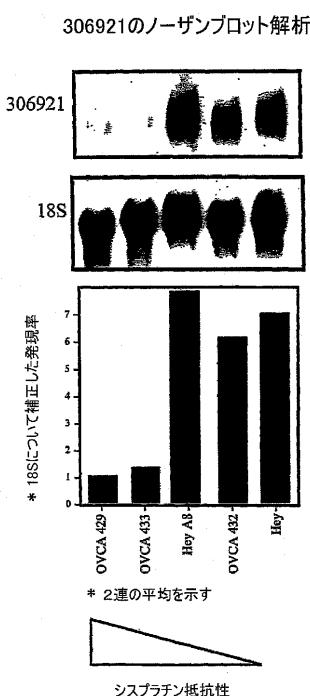
【図 1 1】



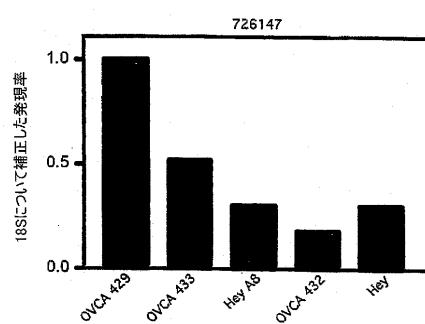
【図 1 2】



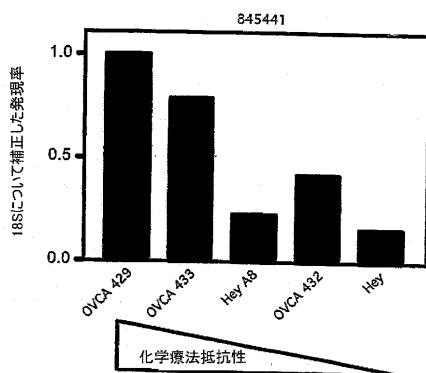
【図 1 3】



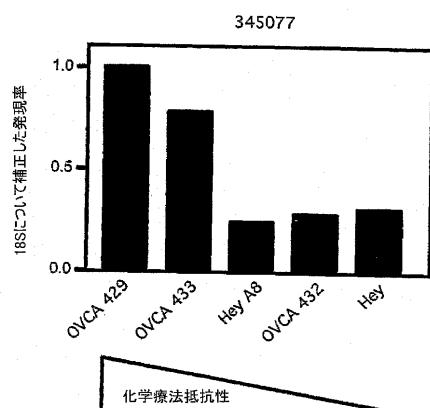
【図 1 4】



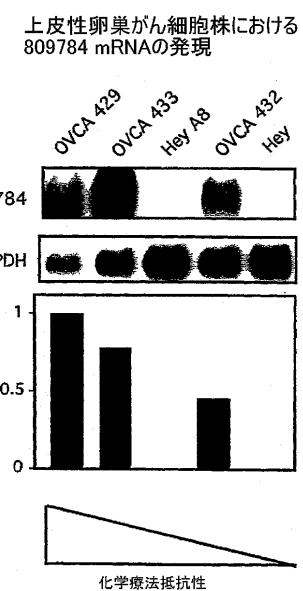
【図 1 5】



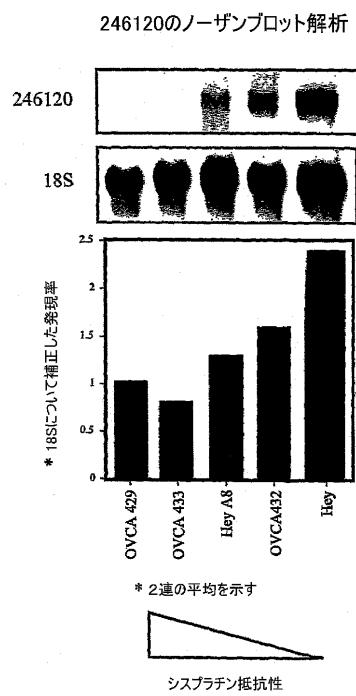
【図16】



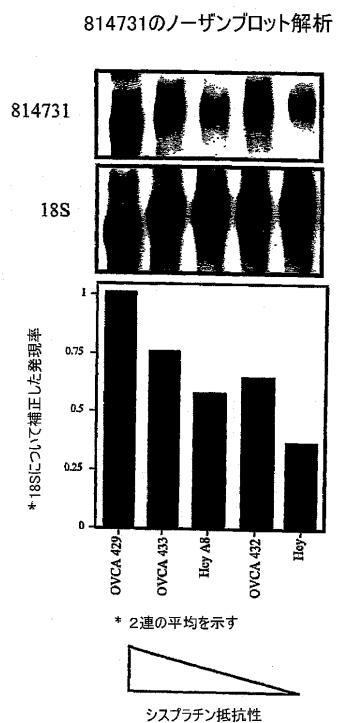
【図17】



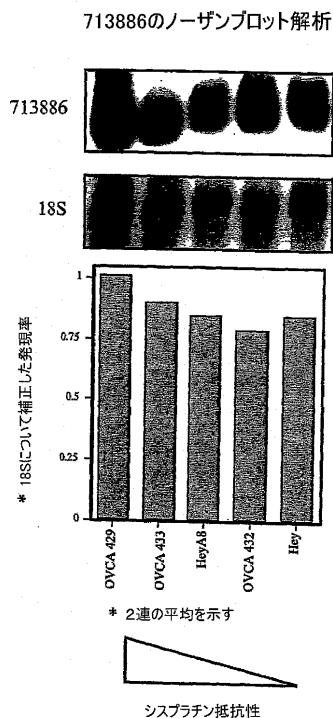
【図18】



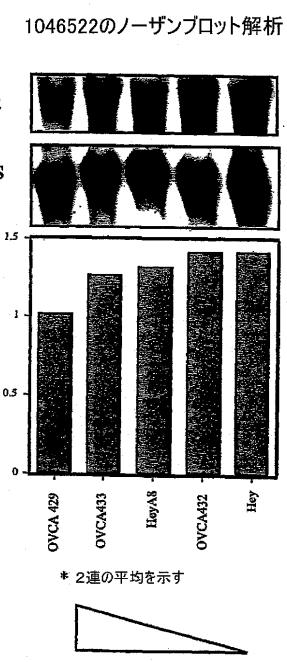
【図19】



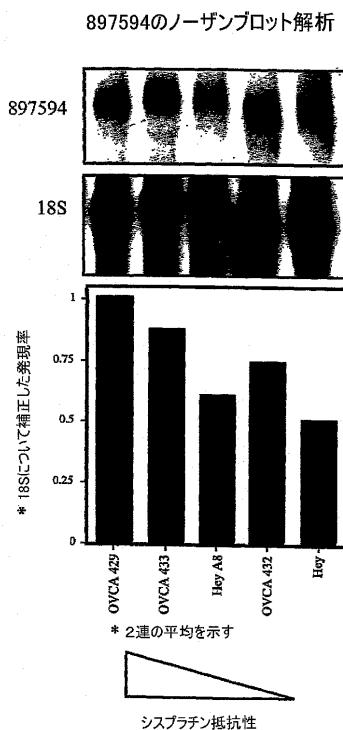
【図20】



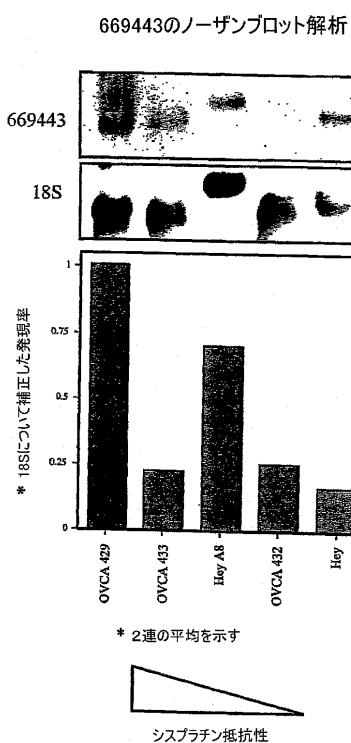
【図21】



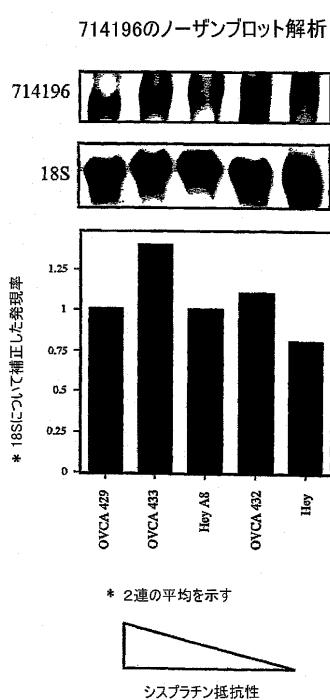
【図22】



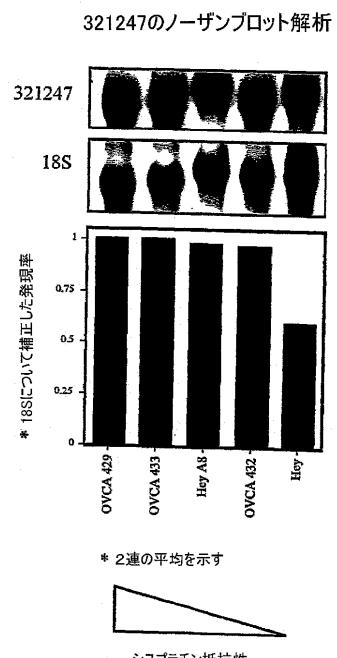
【図23】



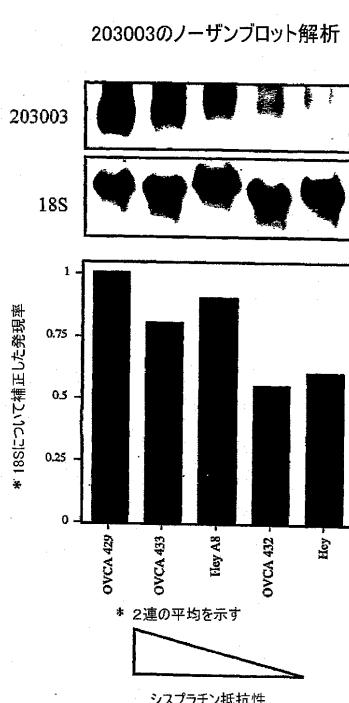
【図24】



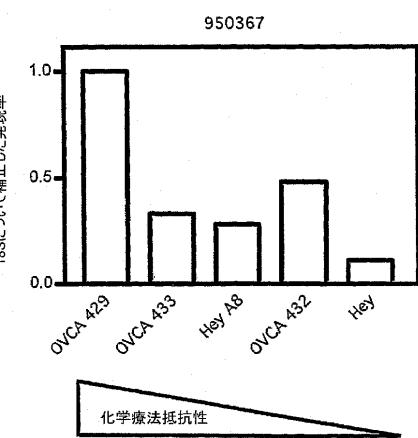
【図25】



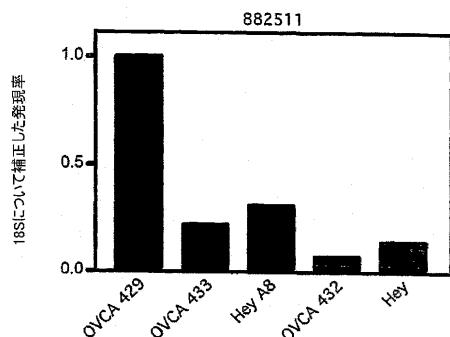
【図26】



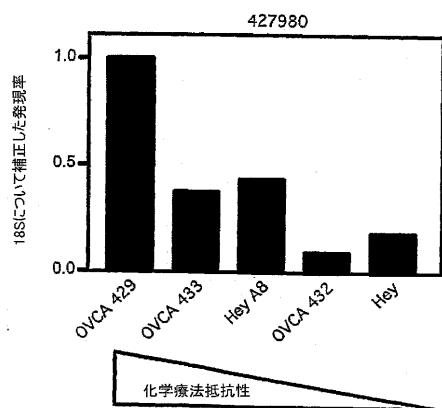
【図27】



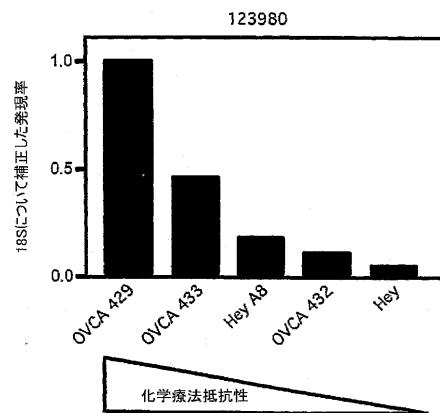
【図28】



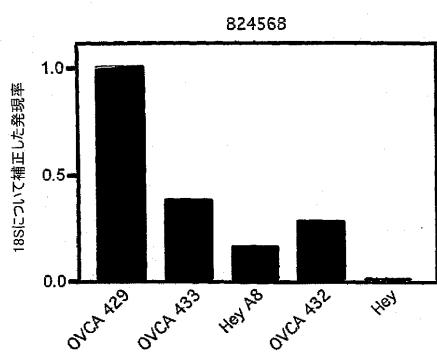
【図29】



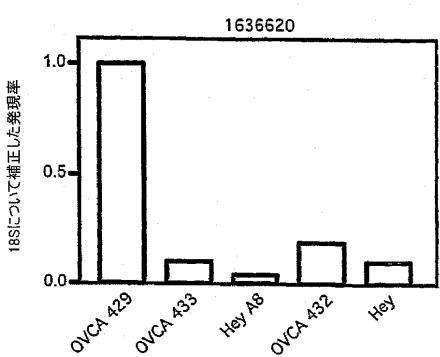
【図31】



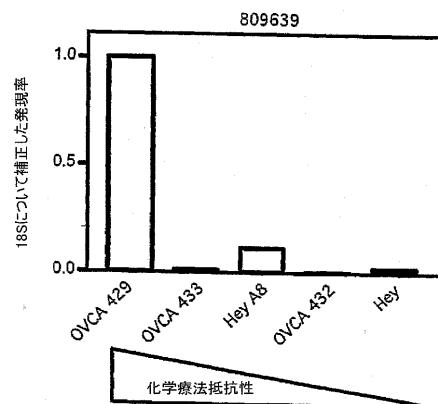
【図30】



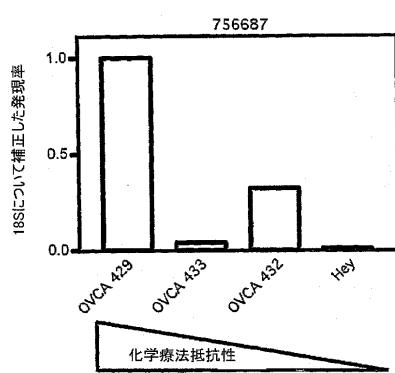
【図32】



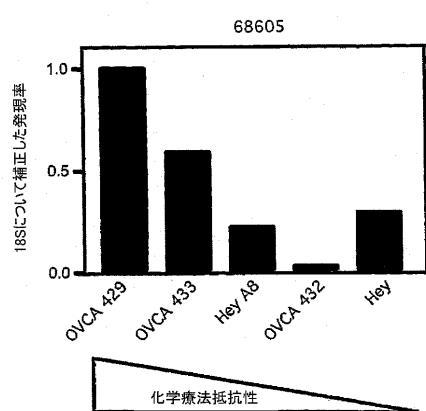
【図33】



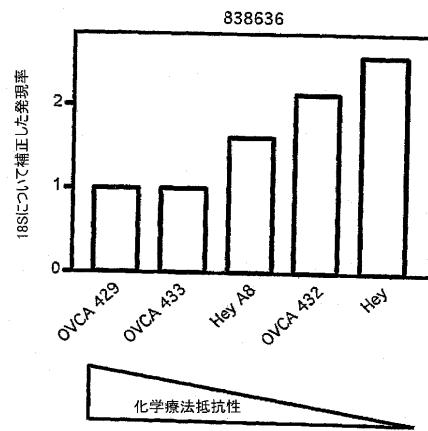
【図34】



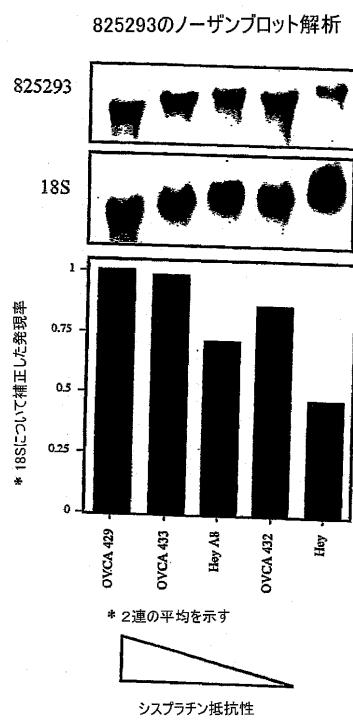
【図35】



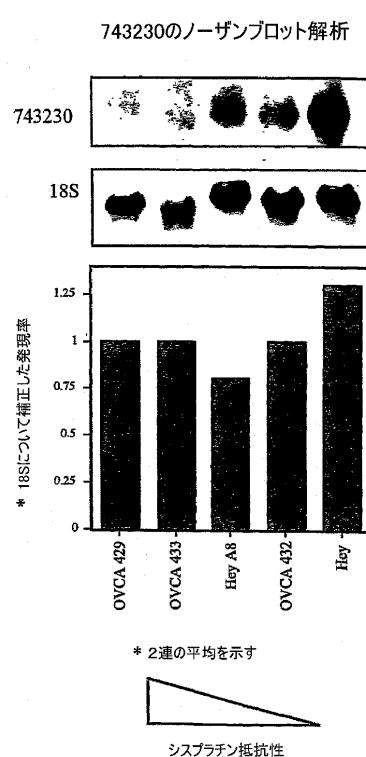
【図36】



【図37】

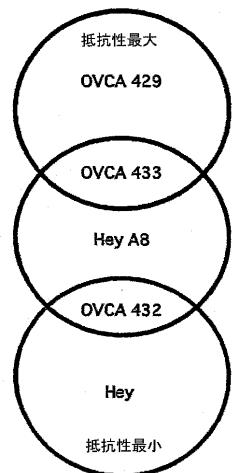


【図38】



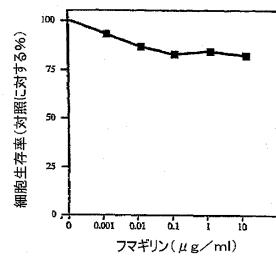
【図39】

シスプラチン抵抗性のレベルに従って順位付けした
上皮性卵巣がん細胞株

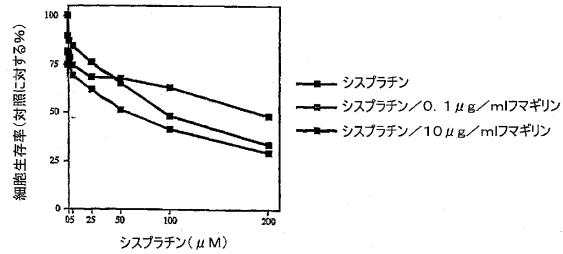


【図40】

フマギリン曝露後4時間のOVCA429細胞の生存率
(いずれのデータも2回の独立の実験の平均を示す)

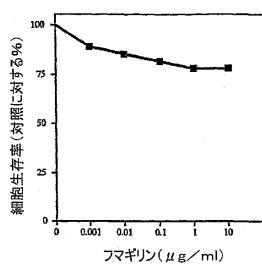


シスプラチン単独またはシスプラチンおよびフマギリンの組合せに曝露した
4時間後のOVCA429細胞の生存率
(いずれのデータも2回の独立の実験の平均を示す)

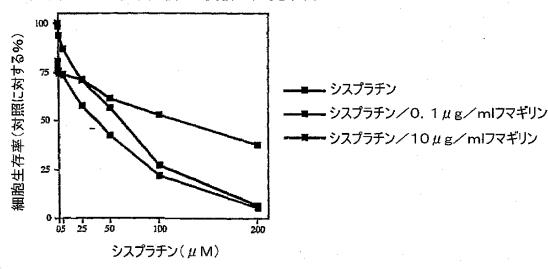


【図41】

フマギリン曝露後8時間のOVCA429細胞の生存率
(いずれのデータも2回の独立の実験の平均を示す)

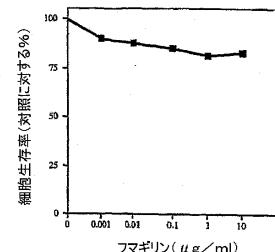


シスプラチン単独またはシスプラチンおよびフマギリンの組合せに
曝露した8時間後のOVCA429細胞の生存率
(いずれのデータも2回の独立の実験の平均を示す)

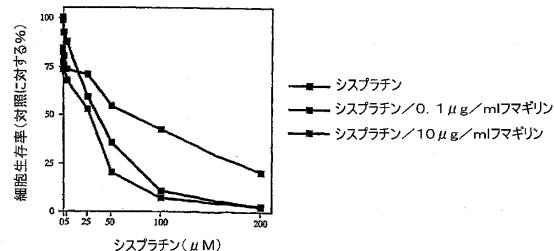


【図42】

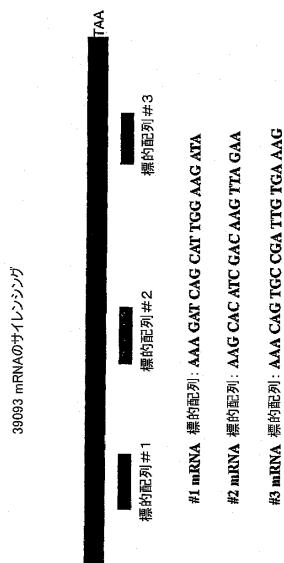
フマギリン曝露後24時間のOVCA429細胞の生存率
(いずれのデータも2回の独立の実験の平均を示す)



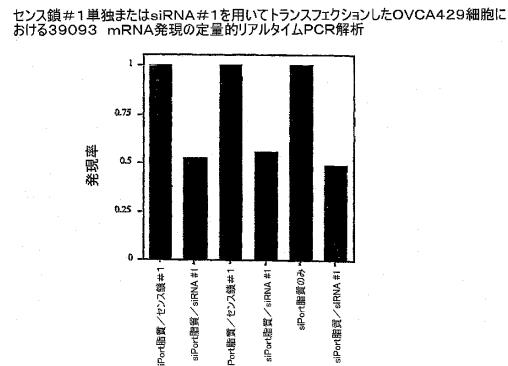
シスプラチン単独またはシスプラチンおよびフマギリンの組合せに
曝露した24時間後のOVCA429細胞の生存率
(いずれのデータも2回の独立の実験の平均を示す)



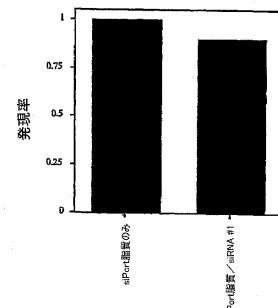
【図43】



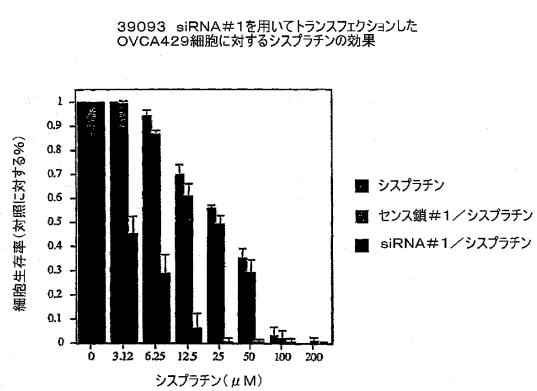
【図44】



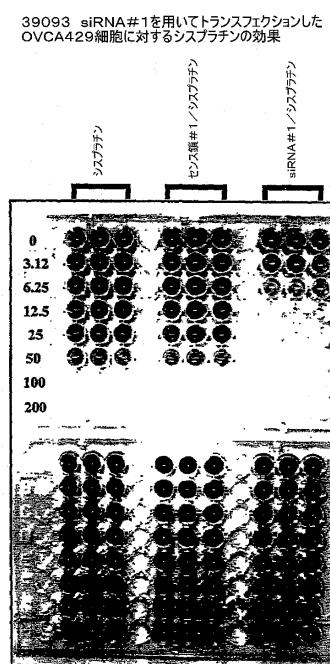
siPort指貫質单独で処理または39093 siRNA #1を用いてトランسفエクションしたOVCA429細胞におけるGAPDH mRNA発現の定量的リアルタイムPCR解析



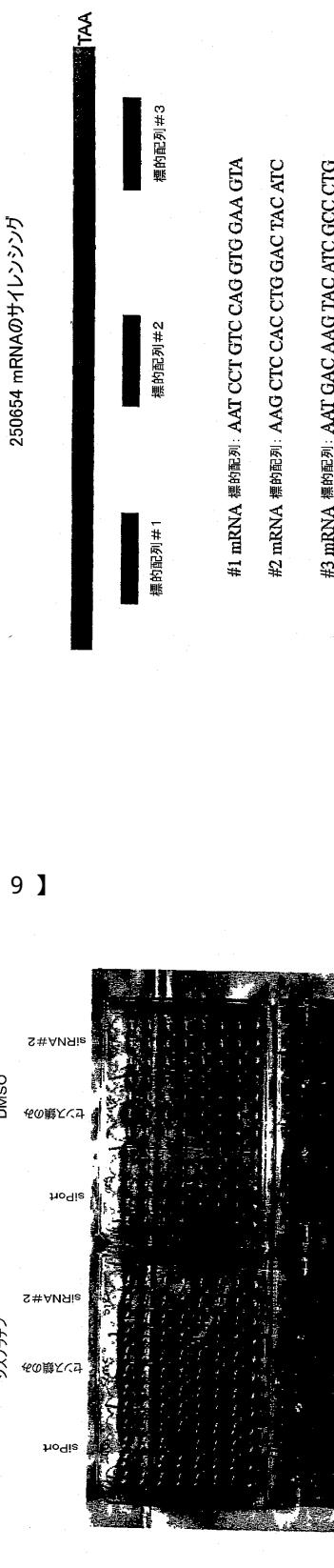
【図45】



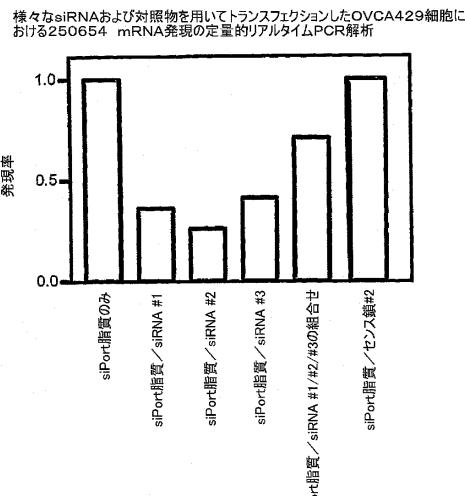
【図46】



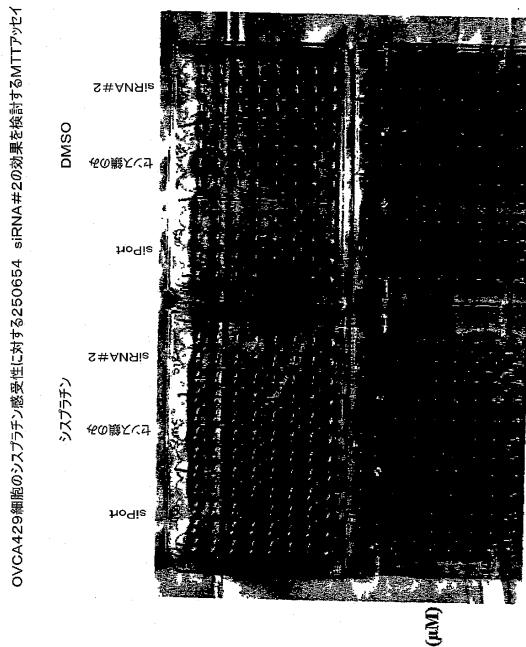
【図47】



【図48】

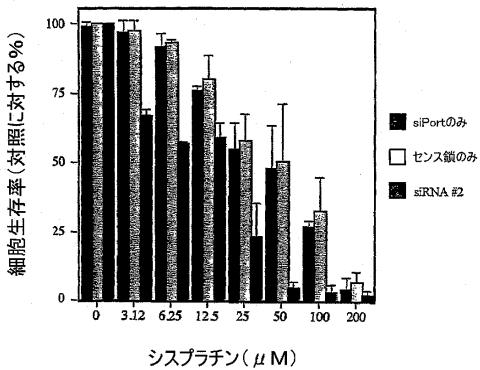


【図49】

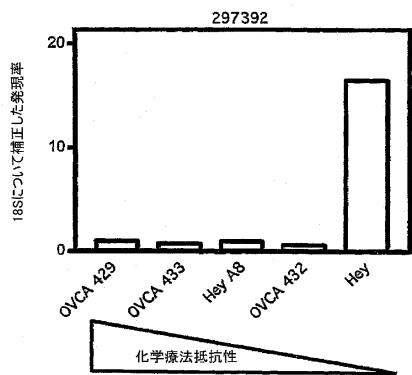


【図50】

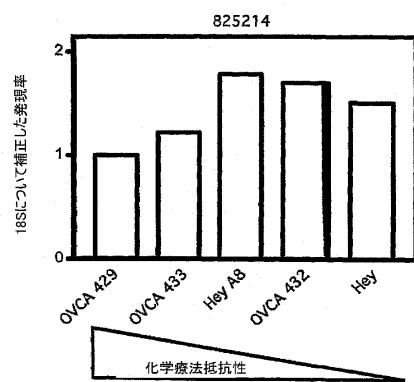
OVCA429のシスプラチニン感受性に対するsiRNAによる250654ノックアウトの効果



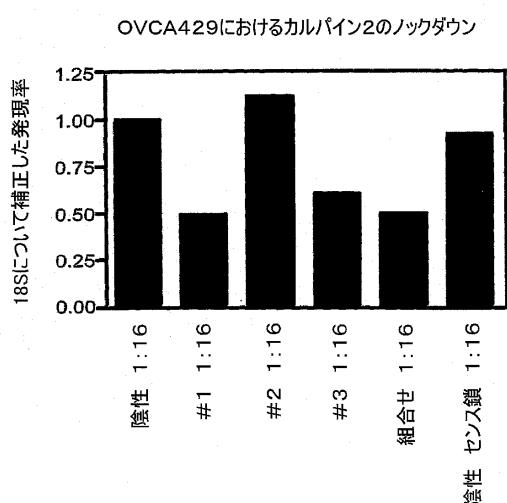
【図51】



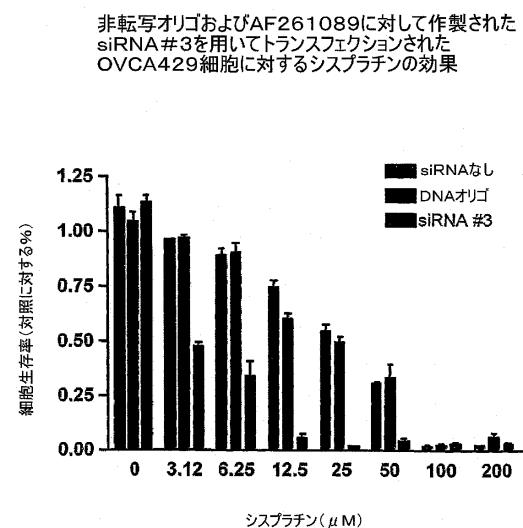
【図52】



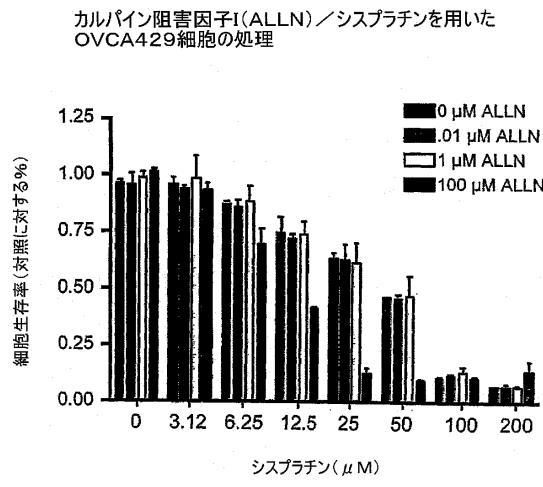
【図53】



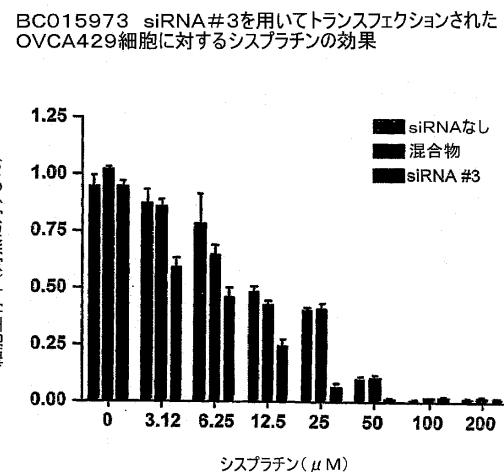
【図54】



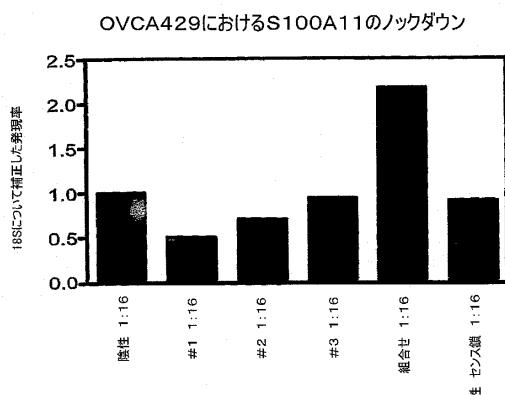
【図 5 5】



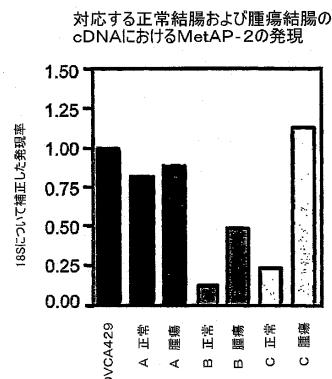
【図 5 6】



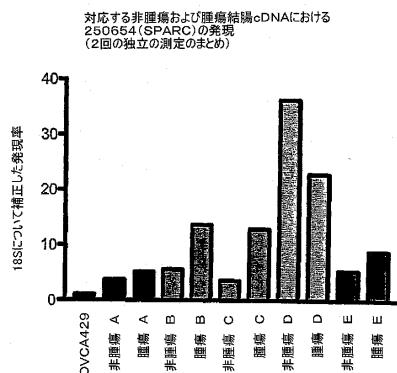
【図 5 7】



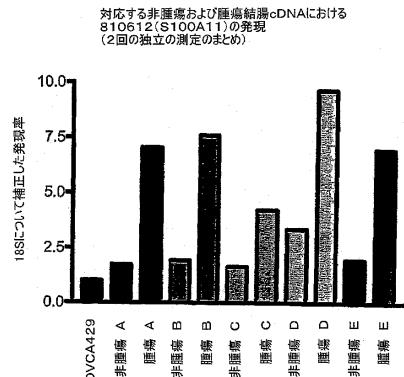
【図 5 8】



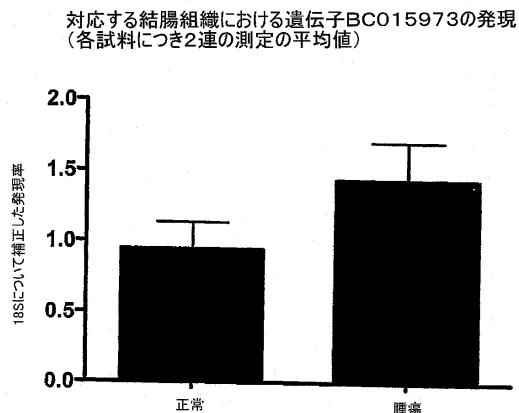
【図59】



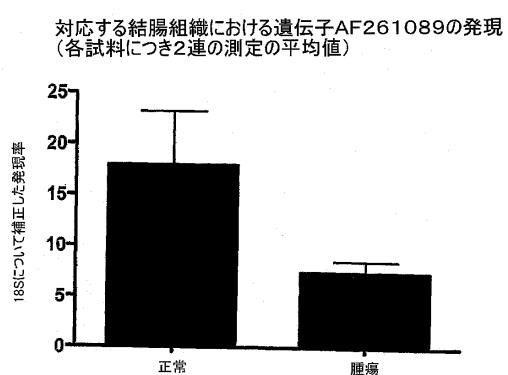
【図60】



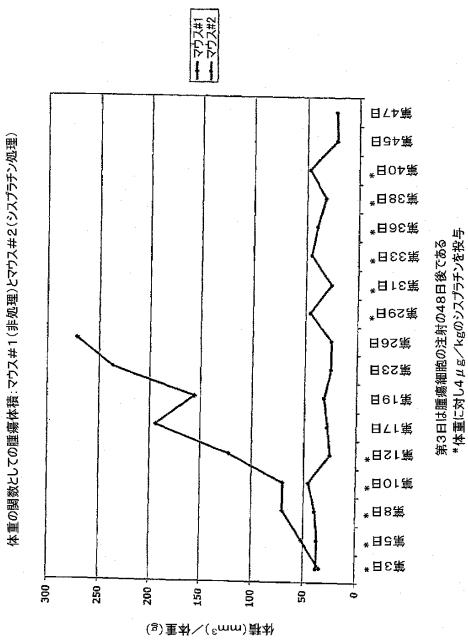
【図61】



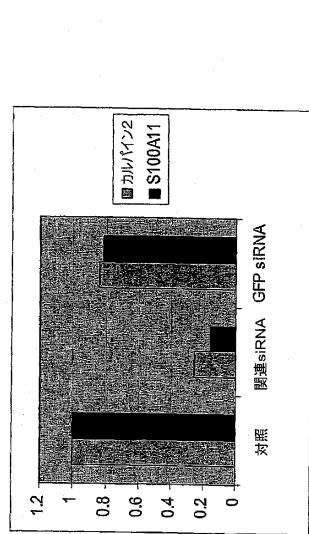
【図62】



【図 6 3】



【図 6 4】



【配列表】

0004682152000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 アル - マーラニ、セイマー

アメリカ合衆国 66614 カンザス州 トピーカ エスタブリュ ラギート コート 251
3

審査官 松波 由美子

(56)参考文献 日本産科婦人科学会雑誌 , 1999年 , Vol.51, No.8 , p.575-585

American Journal of Pathology , 2001年 , Vol.159, No.2 , p.609-622

Experimental Cell Research , 1999年 , Vol.246 , p.376-383

Biochemical and Biophysical Research Communications , 1995年 , Vol.214, No.3 , p.1130
-1137

Cancer Research , 2003年 8月 1日 , Vol.63 , p.4632-4640

Current Opinion in Molecular Therapeutics , 2003年 6月 , Vol.5, No.3 , p.225-234

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12Q 1/02

C12Q 1/68

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)