

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-29215

(P2010-29215A)

(43) 公開日 平成22年2月12日 (2010. 2. 12)

|                                |                      |             |
|--------------------------------|----------------------|-------------|
| (51) Int.Cl.                   | F I                  | テーマコード (参考) |
| <b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>  | C 1 2 Q 1/68 Z N A A | 4 B O 2 4   |
| <b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b> | C 1 2 N 15/00 A      | 4 B O 6 3   |

審査請求 有 請求項の数 11 O L (全 14 頁)

|              |                              |          |                       |
|--------------|------------------------------|----------|-----------------------|
| (21) 出願番号    | 特願2009-257000 (P2009-257000) | (71) 出願人 | 500094440             |
| (22) 出願日     | 平成21年11月10日 (2009. 11. 10)   |          | ザ・ロイヤル・インスティテュション・    |
| (62) 分割の表示   | 特願2000-508823 (P2000-508823) |          | フォア・ザ・アドバンスメント・オブ・ラ   |
|              | の分割                          |          | ーニング/マクギル・ユニヴァーシティ    |
| 原出願日         | 平成10年8月31日 (1998. 8. 31)     |          | カナダ国ケベック エイチ3エイ・2ティ   |
| (31) 優先権主張番号 | 2, 214, 461                  |          | ー5, モントリオール, シャープブルック |
| (32) 優先日     | 平成9年9月2日 (1997. 9. 2)        |          | ・ストリート・ウエスト 8 4 5     |
| (33) 優先権主張国  | カナダ (CA)                     | (71) 出願人 | 500092103             |
|              |                              |          | インペリアル・キャンサー・リサーチ・テ   |
|              |                              |          | クノロジー (アイシーアールティー)    |
|              |                              |          | イギリス国ロンドン ダブリューシー2エ   |
|              |                              |          | イ・3エヌエル, サーディニア・ストリー  |
|              |                              |          | ト, サーディニア・ハウス         |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 野生型 p 5 3 の異なる多形性形態に関連した疾患を発症する危険を有する個体を測定するスクリーニング方法

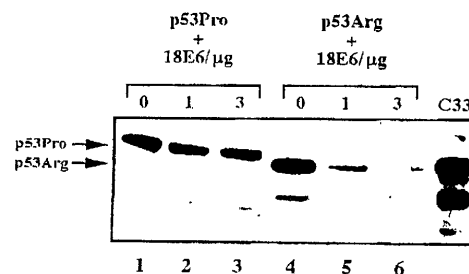
(57) 【要約】

【課題】 野生型 p 5 3 の異なる多形性形態に関連した疾患を発症する危険を有する個体を同定するためのスクリーニング方法を提供することは極めて望ましい。

【解決手段】 ヒトパピローマウイルス関連の疾患および悪性腫瘍を発症する危険性のある HPV-感染個体を同定するスクリーニング方法であって、患者の生物学上のサンプル中の p 5 3 a r g <sup>7 2</sup> 野生型対立遺伝子の存在を測定し、 p 5 3 a r g <sup>7 2</sup> / p 5 3 a r g <sup>7 2</sup> のサンプル中の対立遺伝子パターンがヒトパピローマウイルス関連の疾患および悪性腫瘍を発症する危険因子の指標であるスクリーニング方法。

【選択図】 図 1

HPV-18 E6はp53Proよりもp53Argの分解を媒介することにおいてより活性である。



F-1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒトパピローマウイルス関連の疾患および悪性腫瘍を発症する危険性のあるHPV-感染個体を同定するスクリーニング方法であって、患者の生物学上のサンプル中のp53arg<sup>7 2</sup>野生型対立遺伝子の存在を測定し、p53arg<sup>7 2</sup>/p53arg<sup>7 2</sup>のサンプル中の対立遺伝子パターンがヒトパピローマウイルス関連の疾患および悪性腫瘍を発症する危険因子の指標であるスクリーニング方法。

## 【請求項 2】

疾患が、新形成、癌、ウイルス感染および免疫抑圧からなる群から選択される、請求項 1 記載のスクリーニング方法。

10

## 【請求項 3】

疾患がウイルスにより引き起こされる、請求項 2 記載のスクリーニング方法。

## 【請求項 4】

ウイルスがヒトパピローマウイルスである、請求項 3 記載のスクリーニング方法。

## 【請求項 5】

疾患が、異常PAPスメア、頸部のいぼ、子宮頸部新形成または子宮頸部癌である、請求項 4 記載のスクリーニング方法。

## 【請求項 6】

測定工程が：

- a) ポリメラーゼ鎖反応により増幅すること；
  - b) DNAまたは蛋白質を配列決定すること；
  - c) p53arg<sup>7 2</sup>のDNAに特異的な少なくとも一つのプローブとハイブリダイズさせること；および
  - d) p53arg<sup>7 2</sup>の対立遺伝子を同定するためにp53arg<sup>7 2</sup>蛋白質に特異的な少なくとも一つの抗体を用いて免疫検出すること
- の少なくとも一つからなる、請求項 1 記載のスクリーニング方法。

20

## 【請求項 7】

患者が免疫抑圧治療下にあり、そしてウイルス感染およびウイルス病理により感受性である、請求項 1 記載のスクリーニング方法。

## 【請求項 8】

ウイルス病理がヒトパピローマウイルスに関連した皮膚癌である、請求項 7 記載のスクリーニング方法。

30

## 【請求項 9】

あらゆるHPV予防接種プログラムにおける有力な予防接種候補をスクリーニングする方法であって、患者から生物学上のサンプル中のp53arg<sup>7 2</sup>野生型対立遺伝子の存在を測定する工程を含み、その際p53arg<sup>7 2</sup>/p53arg<sup>7 2</sup>の患者が優先的に予防接種されるべきであることからなる、スクリーニング方法。

## 【請求項 10】

患者が、異常PAPスメア、頸部のいぼ、または低級の頸部病巣を有する、請求項 1 ないし 9 の何れか 1 項記載のスクリーニング方法。

40

## 【請求項 11】

患者が新生児または生殖器のHPV感染を有する母の新生児である、請求項 1 ないし 9 の何れか 1 項記載のスクリーニング方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## (a) 発明の分野

本発明は、野生型p53の異なる多形性形態に関連した疾患を発症する危険を有する個体を同定するためのスクリーニング方法に関する。

## 【背景技術】

50

## 【0002】

## (b) 従来の技術

細胞性腫瘍抑圧蛋白質 p 5 3 は細胞増殖の主要な制御因子のひとつである。刺激のコンテキストに依存して、p 5 3 は細胞成長停止またはプログラムされた細胞死（アポトーシス）を誘発する。結果として、これは DNA 変異を獲得した細胞の引き続く増殖を妨害し、そしてこれは癌に対する生物の鍵となる防御を代表する。多くのヒト腫瘍において、p 5 3 の不活性化は腫瘍の発生における主要な因子の一つである。ヒトパピローマウイルス（HPV）関連の癌においては、しかしながら、p 5 3 はほとんどいつも野生型である。これは、ユビキチン媒介性分解のために p 5 3 を標識するウイルス性 E 6 蛋白質の活性のためであり、即ち、正常な p 5 3 機能に打ち勝つ。このため、HPVs は女性における頸部癌（cervical cancer）の発生のための主要な発癌物質であり、全世界の癌のもっとも共通の形態の一つである。

10

## 【0003】

p 5 3 の 2 つの多形性形態が存在し、p 5 3 蛋白質のアミノ酸位置 7 2 においてプロリンまたはアルギニン残基の何れかをコードしうる。この多形性はポリアクリルアミドゲルにおける p 5 3 の移動の変化をもたらすが、しかし、現在のところ、両形態の p 5 3 は識別不可能なレベルの活性を有するらしい。事実、何れかの多形性がいくつかのヒト腫瘍の発症の危険性因子を表すか否かを測定するために、莫大な免疫学の調査がここ 6-7 年にわたり実施された。現在まで、アミノ酸位置 7 2 におけるプロリンまたはアルギニンの存在はあらゆる特定の癌の発症における重要な危険因子ではないとの見解に賛同した証拠が圧倒的である。

20

## 【0004】

しかしながら、我々の最近の観察に基づくと、野生型 p 5 3 の異なる多形性形態に関連した疾患を発症する危険を有する個体を同定するためのスクリーニング方法を提供することは極めて望ましい。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0005】

【非特許文献 1】Scheffner, M. et al., 1990; Cell, 63: 1129-1136

30

【非特許文献 2】Matlashewski, G. et al. 1987, Mol. Cell Biol., 7: 961-963

【非特許文献 3】Storey A. et al., 1986, Irene Leigh らによるケラチノサイトハンドブック中、ケンブリッジ大学出版、1994、p 439-457

【非特許文献 4】Zhang, W. et al., 1992, Gene, 117: 271-275

【非特許文献 5】Birgander R. et al., 1995, Carcinogenesis, 16: 2233-2236

【非特許文献 6】Weston A. et al., 1994, Carcinogenesis, 15: 583-587

40

【非特許文献 7】Weston A. et al., 1992, Env. Health Pers., 98: 61-67

【非特許文献 8】Beckman, G. et al., 1994, Hu. Hered., 44: 266-270

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

本発明の一つの目的は、野生型 p 5 3 の異なる多形性形態に関連した疾患を発症する危険を有する個体を同定するためのスクリーニング方法を提供することである。

50

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明によれば、野生型 p 5 3 関連疾患の発症の危険にある個体を同定する方法が提供され、該方法は、以下の工程：

a) 生物学上のサンプルを患者から得て；そして

b) 上記サンプル中の p 5 3 p r o または p 5 3 a r g の存在を決定するが、その際 p 5 3 p r o / p 5 3 p r o , p 5 3 a r g / p 5 3 a r g , p 5 3 p r o / p 5 3 a r g からなる群から選択される患者の対立遺伝子パターンが疾患を発症する危険因子の指標であること

からなる。

10

【0008】

上記疾患は、新形成 ( n e o p l a s i a ) 、癌、ウイルス感染およびウイルスにより引き起こされるかもしれない ( そうでないかもしれない ) ウイルス性病理からなる群から選択される。

【0009】

そのようなウイルスは、限定ではないが、ヒトパピローマウイルス、B型肝炎ウイルス、アデノウイルスまたはヒトに感染するあらゆる他のウイルスを含む。

【0010】

より特定すれば、疾患は、限定ではないが、頸部のいぼ ( c e r v i c a l w a r t s ) 、頸部の新形成または頸部癌を含む。

20

【0011】

例えば、患者の対立遺伝子パターンが p 5 3 a r g / p 5 3 a r g である場合、それは、ヒトパピローマウイルス ( H P V ) の感染に関連した頸部のいぼ、頸部の新形成または頸部癌を含む疾患の発症の大きな危険性を有する患者の指標である。

【0012】

ウイルスの病理は、ヒトパピローマウイルスにより引き起こされる皮膚癌も含み、そして長期間のウイルス感染並びに p 5 3 a r g / p 5 3 a r g の患者における初期ウイルス感染の感受性を含む。より正確には、本発明の方法の上記工程 b ) の測定は、限定ではないが以下の少なくとも一つを含む：

a) ポリメラーゼ鎖反応により増幅すること；

30

b) D N A または蛋白質を配列決定すること；

c) p 5 3 p r o または p 5 3 a r g の D N A の何れかに特異的な少なくとも一つのプローブとハイブリダイズすること；および

d) p 5 3 p r o または p 5 3 a r g の対立遺伝子を同定するために p 5 3 p r o 蛋白質または p 5 3 a r g 蛋白質の何れかに特異的な少なくとも一つの抗体を用いて免疫検出すること。

【0013】

本発明のスクリーニング方法は、免疫抑圧治療下にある患者およびウイルス感染およびウイルス病理に関して、より感受性の患者をスクリーンすることにも使用してよい。

【0014】

40

本発明によれば、あらゆる H P V 予防接種プログラムにおける有力な予防接種候補をスクリーニングする方法も提供され、該方法は以下の工程：

a) 患者から生物学上のサンプルを得て；そして

b) 上記中の p 5 3 p r o または p 5 3 a r g 野生型対立遺伝子の存在を測定するが、その際 p 5 3 a r g / p 5 3 a r g の患者が優先的に予防接種されるべきであることからなる。

【0015】

本発明の上記方法によれば、患者は、異常な P A P スメア、低級の頸部病巣を有してよく、新生児であってよく、または生殖器の H P V 感染を有する母の新生児であってよい。

【0016】

50

本発明の目的のために、以下の用語および略語を以下に定義する。

【0017】

「野生型 p 5 3 の異なる多形性形態に関連した疾患」は、p 5 3 を包含するあらゆる疾患であって、野生型 p 5 3 a r g または p 5 3 p r o が別々に挙動する疾患を意図する。そのような疾患は、限定ではないが、ウイルス例えばパピローマウイルスにより引き起こされる癌を含む。

【0018】

「p 5 3 a r g」は、p 5 3 アルギニンを意図し、但しアルギニンは p 5 3 野生型蛋白質のアミノ酸位置 7 2 において見いだされる。

【0019】

「p 5 3 p r o」は、p 5 3 プロリンを意図し、但しプロリンは p 5 3 野生型蛋白質のアミノ酸位置 7 2 において見いだされる。

【0020】

「HPV」は、ヒトパピローマウイルスを意図する。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図 1】図 1 は、インビボにおける p 5 3 P r o および p 5 3 A r g の HPV-18 E 6 誘発性分解の比較を示す。

【図 2】図 2 は、インビボ分解に関して HPV-16 および HPV-11 E 6 が p 5 3 P r o よりも p 5 3 A r g を優先的に標的とすることを示す。

【図 3 A】図 3 A は、p 5 3 遺伝子を示し、蛋白質の機能ドメインを示す。

【図 3 B】図 3 B は、プラスミド DNA からの A r g および P r o の p 5 3 対立遺伝子の検出を示す。

【図 3 C】図 3 C は、A r g および P r o の同型接合個体からのゲノミック DNA からの p 5 3 配列の増幅を示す。

【発明を実施するための形態】

【0022】

発明の詳細な説明

本発明に従い、我々は、2つの形態の p 5 3 がヒトパピローマウイルス E 6 蛋白質により別々に標的化されるか否かを測定することに興味を注いだ。我々は、p 5 3 のアルギニン形態が、p 5 3 のプロリン形態よりも、E 6 媒介性分解に対してより顕著に感受性であることを示した。これは、ウイルス感染またはウイルス形質転換においては、アルギニン p 5 3 のみを発現する個体がウイルスの作用に対してより感受性であることを示すはずである。これによる予測は、p 5 3 アルギニンのみの個体は HPV 関連腫瘍を発症する可能性がより高いはずであることである。この仮説を試験するため、我々は、頸部癌を有する一連の患者並びに皮膚癌を有する一連の腎移植レシピエント (R T R s) をスクリーンした。頸部癌の後、皮膚癌は HPV 関連腫瘍の第 2 の主要な群を代表する。このスクリーンの結果は、正常な対照集団に比して癌患者中の p 5 3 アルギニンのみの個体の圧倒的優勢を証明する。この結果は、p 5 3 アルギニンのみの個体が、同型接合患者または p 5 3 プロリンのみの個体に比して HPV 関連主要を発症する可能性がより高いことを証明する。

【0023】

野生型 p 5 3 の異なる多形性形態が HPV 不活性化に異なる感受性を持つことの証明は、絶対的に新規である。p 5 3 アルギニンのみの個体が HPV 関連癌をより発症しやすいとの証明も絶対的に新規である。

【0024】

腫瘍関連 HPV 種に由来する E 6 癌原蛋白質は、細胞性腫瘍抑圧因子蛋白質の p 5 3 に結合してその分解を誘発する (S c h e f f n e r , M . e t a l . , 1990 ; C e l l , 63 : 1129-1136) 。 p 5 3 蛋白質の変異がしばしば E 6 媒介性分解に対して蛋白質を非感受性にさせることが示されたが、野生型 p 5 3 の異なる多形性形態に対する E 6 の作用に関する同様な報告はない。この研究において、我々は、野生型 p 5 3 蛋

白質の72位におけるプロリン／アルギニン多形性の作用を調査した (Matlashewski, G. et al. 1987, Mol. Cell. Biol., 7: 961-963)。その結果は、インビボにおいてp53 Argが、p53 Proに比して、HPV E6由来の高い危険性による分解に、より顕著に感受性であることを示す。さらに、低い危険性のHPV-11からのE6はp53 Argの分解を媒介することもできたが、p53 Proの分解は媒介できなかった。よって、p53 Argは、p53 Proに比して、低危険性並びに高危険性HPV種の両者からのE6蛋白質の分解に、より感受性である。これを考慮すると、これらの結果は、野生型p53内のプロリン／アルギニン多形性がHPV誘発癌の感受性マーカーを代表することを暗示する。

#### 【0025】

頸部癌の発症が特定のヒトパピローマウイルス種、例えばHPV-16およびHPV-18の存在に密接に関連することが、うまく確立された。対照的に、他のHPV種、例えばHPV-6およびHPV-11による感染は、主に良性の病巣の発症に関連する (Storey A. et al., 1986, Irene Leighらによるケラチノサイトハンドブック中、ケンブリッジ大学出版、1994、p439-457)。HPV-16とHPV-18は、2つの主要な癌蛋白質のE6とE7をコードする。E7蛋白質は、細胞性腫瘍抑圧因子蛋白質のpRbに結合して不活性化し；E6は細胞性腫瘍抑圧因子p53に結合して、次にユビキチン経路を通して直接その分解を指示する。これら2つの腫瘍抑圧因子蛋白質のHPVによる不活性化は腫瘍発生の間、重要であると見なされるが、感染された個体が頸部癌を発症するように傾ける他の遺伝因子が存在するか否かについては明確な指標がない。p53蛋白質はしばしば多数のヒト腫瘍において変異するが、初期の頸部癌においてはいつもきまって野生型であることから、E6によるp53の不活性化が不活性化変異に類似するとの概念を導く。文献に記載の変異p53蛋白質の多くはE6媒介性分解に感受性でないことから、これら2つの蛋白質の間の相互作用が容易に破壊できることを示唆する。我々は、野生型p53蛋白質内の多形性が、ユビキチン媒介分解に関して、HPV E6のp53標識能力に影響するか否かを調査することに興味を注いだ。我々は、p53蛋白質内のアミノ酸位置72におけるプロリン／アルギニン多形性に我々の注意を集めたが、なぜならば、これが保存的アミノ酸変化ではなく、そして事実この変化がSDS-PAGE上のp53蛋白質の移動に劇的な変化をもたらすからである (Matlashewski, G. et al. 1987, Mol. Cell. Biol., 7: 961-963)。

#### 【0026】

HPV-18 E6蛋白質が優先的にp53の2つの形態の何れかを認識しうるか否かを調査するため、我々は最初に一連のインビボ分解アッセイを実施した。p53の存在しないSaos-2細胞に、p53の2つの多形性形態の一方または他方を発現するプラスミドと、増加量のHPV-18 E6発現プラスミドを感染させた。24時間後、細胞を抽出して、抗p53モノクローナル抗体のプールを用いたウエスタンブロット分析により残存のp53蛋白質を検出した。

#### 【0027】

図1は、インビボにおけるp53 Proとp53 ArgのHPV-18 E6誘発性分解の比較を示す。この実験においては、示されるとおり、Saos-2細胞に、3ugのpCDNA-p53 ProまたはpCDNA-p53 Argの何れかと、増加量のpCDNA-18E6あるいは対照プラスミドpCDNA-3をトランスフェクトした。24時間後、細胞を50mM Hepes pH7.0, 250mM NaCl, 0.1% NP40および1% APROTININ (登録商標)の溶液中に抽出した。蛋白質の濃度はバイオラッドのプロテインアッセイを用いて測定して、等量をSDS-PAGE上で泳動してニトロセルロース膜に転写した。p53蛋白質は抗p53モノクローナル抗体pAB1801、1802および1803のプールを用いて検出し、アマシャムECLシステムを用いてウエスタンブロットを現像した。トランスフェクション効率は、平行のプレート上でのlacZ発現プラスミドとの同時トランスフェクションおよびlacZ発現の染色を

10

20

30

40

50

通して監視した。C 3 3 細胞は p 5 3 発現に関する陽性対照を代表する。

#### 【0028】

図1に示すとおり、増加量のHPV-18 E6はp53 Argの量の劇的な低下を誘発することが明らかである。対照的に、同一の条件下では、p53 Proの顕著な分解は検出されなかった。これらの結果は、p53中のアミノ酸位置72におけるプレート／アルギニン多形性がインビボにおけるHPV-18 E6誘発性分解に対するその感受性を変更すること、およびp53 argがp53に比してHPV-18 E6に対してより感受性であることを示す。

#### 【0029】

我々は、次に、E6誘発性分解に対するp53の感受性のこの変化がHPV-18由来のE6に制限されるのか否か、またはそれが他のHPV種由来のE6蛋白質にも真実なのかも決定することに興味を注いだ。これを調査するため、我々は、図1において実施したインビボ分解アッセイを繰り返したが、増加量のHPV-16 E6およびHPV-11 E6を含んだ。得られた結果を図2に示す。

#### 【0030】

Saos-2細胞に、pCDNS-p53 ProまたはpCDNA-p53 Arg、並びに増加量のpCDNA-16 E6（図2、パネルA）またはpCDNA-11 E6（図2、パネルB）あるは対照プラスミドpCDNA-3を示すとおりにトランスフェクトした。残存のp53蛋白質は図1に示すとおりに検出した。pCDNA-18のE6も比較のために含んだ。

#### 【0031】

HPV-16 E6蛋白質（図2A）は異なる形態のp53を分解する能力を示し、HPV-18 E6を用いて観察されたのと同様であった。観察されうるとおり、高いE6投入においてのみp53 Proの顕著な分解が得られ、一方、はるかに低い濃度のHPV-16 E6蛋白質はp53 Argの完全な分解を生じる。特に興味深いのは、しかしながら、HPV-11 E6蛋白質を用いた結果である（図2B）。多数のインビトロ研究が以前に示したことは、HPV-11 E6がユビキチン媒介性分解に関してp53を標的にできないことであった。インビボにおいてp53 Proを用いた結果はこの見解を確かに支持するが、何故ならば、HPV-11 E6はp53 Proの分解を媒介できなかったからである（図2B）。しかしながら、HPV-11 E6はインビボアッセイにおいてはp53 Argの分解を明らかに誘発したが、とはいえ、癌原性HPV-16およびHPV-18のE6蛋白質により誘発されたほどの効率ではなかった。これらの結果は、p53蛋白質内の72位におけるプロリン／アルギニン多形性が、HPVの種類に拘わらず、E6媒介性分解に対する野生型p53の感受性を決定することを証明した点において極めて顕著である。本発明に従い、我々は、E6媒介性分解に対する野生型p53の2つの多形性形態の感受性における明確な差異を示した。HPV-16のE6およびHPV-18のE6の両者はp53のプロリン形態の分解を誘発できるが、この分解はp53のアルギニン形態の分解よりもはるかに効率が低い。さらに、HPV-11のE6蛋白質はp53 Proに関しては完全に不活性であるが、それでもなおp53 Argに対する分解の低いしかし顕著なレベルを示す。p53は腫瘍形成に対しての宿主防御において鍵となる制御点を表すから、これらの研究は、この多形性がHPV感染の有望な結果に対して顕著な関係を有することを予測するはずである。いくつかの研究は、非HPV関連腫瘍内のp53多形性に接近して、p53の特定の多形性形態の存在または不在との顕著な相関を示すことに失敗した（Zhang, W. et al., 1992, Gene, 117: 271-275; Birgander R. et al., 1995, Carcinogenesis, 16: 2233-2236; Weston A. et al., 1994, Carcinogenesis, 15: 583-587; Weston A. et al., 1992, Env. Health Pers., 98: 61-67）。対照的に、我々の研究は、HPV関連腫瘍において、p53の72位における多形性が重要な危険因子を代表するとの仮説を強く支持する。この仮説を試験するため、我々は、一連のHPV関連

10

20

30

40

50

頸部癌および皮膚癌において p 5 3 遺伝子型 ( p 5 3 p r o または p 5 3 a r g ) を試験した。これらの H P V 関連腫瘍における p 5 3 多形性に関するこのスクリーンの結果は、この仮説を確証する ( 表 1 および 2 の結果を参照 ) 。その中で詳細なとおり、これらのデータは、H P V 関連頸部癌 ( 表 1 ) および皮膚癌 ( 表 2 ) を有する個体の 8 5 % 以上が p 5 3 a r g 対立遺伝子に関して同型接合であったことを証明する。我々は、アミノ酸位置 7 2 における p 5 3 多形性の性質が H P V 関連腫瘍原性における重大な因子であること、および p 5 3 a r g に関して同型接合である個体はこれらの腫瘍を発症する危険性が大きいことを結論する。

野生型 p 5 3 の遺伝子型 ( p 5 3 p r o または p 5 3 a r g ) の測定方法

腫瘍生検は侵入性および皮膚扁平細胞の両方を含んだ。全ての病巣は組織学上確認されて生検切除または外科的切除の時に回収して、スナップ凍結して - 7 0 ° C に保存した。7 つの頸部 S C C s を、ホルマリン固定してパラフィンを埋め込んだ公的材料から得た。対照群に関するサンプルは、健常ボランティアから採血した全血から抽出された D N A からなった。

D N A 抽出

凍結した組織からの D N A をプロテイナーゼ K 消化およびフェノールクロロホルム抽出により抽出し、パラフィン埋め込み組織からの D N A を脱パラフィン後に同じようにして抽出した。N u c l e o n D N A 抽出キット ( S c o t l a b ) を用いて対照の個体からの全血から D N A を抽出した。

p 5 3 多形性配列の P C R 増幅

p 5 3 P r o 配列は、P C R によりプライマー対 p 5 3 P r o + / p 5 3 - ( p 5 3 P r o + : 5 ' G C C A G A G G C T G C T C C C C C ( 配列番号 : 1 ) 、 p 5 3 - : 5 ' C G T G C A A G T C A C A G A C T T ( 配列番号 : 2 ) ) により検出し、そして p 5 3 A r g はプライマー対 p 5 3 + / A r g - ( p 5 3 + : 5 ' T C C C C C T T G C C G T C C C A A ( 配列番号 : 3 ) 、 A r g - : 5 ' C T G G T G C A G G G G C C A C G C ( 配列番号 : 4 ) ) を用いて検出した。プライマー対 ( 各 2 u g ) を混合して 5 0 u C i [ α 3 2 P ] A T P ( アマシャム ) を含む 5 0 u l の全量にてポリヌクレオチドキナーゼ ( プロメガ ) により [ 3 2 p ] で末端標識した。1 u l の標識されたプライマー混合物を P C R 反応あたり用いた。P C R 反応 ( 2 5 サイクル ) は、0 . 2 ユニットのレッドホットポリメラーゼ ( アドバンスドバイオテクノロジーズ ) を用いて、全量 5 0 u l にて、反応バッファー I V ( 製造者により供給された ) 中にて 1 . 5 m M M g + + にて実施した。1 0 u l の反応産物を 8 % ポリアクリルアミドゲル上において 1 X の T B E バッファー中で分画し、乾燥して、そして X 線フィルム上に露出するかあるいはストーム 8 4 0 ホスホリメジャー ( モリキュラーダイナミックス ) およびイメージクワントソフトウェアを用いて定量した。

p 5 3 遺伝子型決定の結果

我々は、最初に一連の頸部癌生検中の p 5 3 P r o および A r g 対立遺伝子の頻度を調査し、そしてこれを対照群において観察された頻度と比較した ( 表 1 ) 。各々の相対頻度を括弧で示す。

【 0 0 3 2 】

10

20

30



## 【表 1】

表 1

正常ボランティアと頸部腫瘍生検中の Arg および Pro 対立遺伝子の検出の頻度

|          | Pro      | Arg       | Pro/Arg   |
|----------|----------|-----------|-----------|
| 正常 N=42  | 2 (0.05) | 15 (0.36) | 24 (0.57) |
| 頸部癌 N=24 | 2 (0.08) | 21 (0.88) | 1 (0.04)  |

10

頸部癌において検出されたHPV種：HPV16 N=12, HPV18 N=4, HPV45 N=2, IIPV陽性であるが分類されず=6

## 【0033】

両群は広く類似の人種バックグラウンドの個体からなり、そして我々の対照DNAサンプル中にて我々が観察した対立遺伝子の頻度は以前に報告された研究において観察されたのと類似であり、p53対立遺伝子頻度は異なる人種群間で変化する (Beckman, G. et al., 1994, Hu. Hered., 44:266-270)。我々の研究においては、Arg対立遺伝子の検出頻度はArg/Pro遺伝子型のそれに比して顕著な相違があり、頸部癌生検と正常対照の間には顕著な相違が存在し、( $\chi^2 = 218.89$ ,  $p = 0.000013$ )、Arg対立遺伝子のみがはるかに多数のサンプル中において観察され (癌中88%に対して対照中36%)、観察されたPro/Arg遺伝子型の数の付随的低下を伴った (癌中4%に対して対照中57%)。この研究においてはPro対立遺伝子のみの検出頻度間に顕著な差異はなかったが、各群の数は小さかった。

20

## 【0034】

対照群に比べた頸部癌のサンプルの対立遺伝子頻度の明確な識別は、Pro対立遺伝子の不在下においてp53argの存在が、危険性の高いHPV種を有する頸部癌腫瘍における疾患の発症に対する感受性を付与することを示す。これは、他の腫瘍とは顕著に対照的であり (Zhang, W. et al., 1992, Gene, 117:271-275; Birgander R. et al., 1995, Carcinogenesis, 16:2233-2236; Weston A. et al., 1994, Carcinogenesis, 15:583-587; Weston A. et al., 1992, Env. Health Pers., 98:61-67)、腫瘍生検と対照生検の間でp53多形性頻度の顕著な相違は観察されなかった。p53Arg蛋白質がE6媒介性の蛋白質分解性の分解に、より感受性であることにより、より容易に不活性化されるとの事実は、腫瘍p53の遺伝子型の発見に強く相関する。

30

## 【0035】

頸部癌中におけるそれらの十分に実証された役割に加えて、HPVsは皮膚癌の発症に関与することが仮定された。免疫上抑圧された個体、例えば腎移植レシピエントにおいて、広い範囲のウイルス種が病巣および同じでない頸部腫瘍において見いだされ、これらの病巣はしばしば一つより多いHPV種を有する。以前に定義されたHPV種に加えて、いくつかの新たに同定されたEV-関連HPV配列もRT-PCRからの生検において同定された。我々は、次に、腎移植レシピエント由来の腫瘍を含むように、我々のp53多形性研究を広げ、その結果を表2に示す。

40

## 【0036】

【表 2】

Table 2

| 患者コード | SCC | HPV 種               | 腫瘍のArg/Pro状態 (R/P) |
|-------|-----|---------------------|--------------------|
| CW    | 2H  | 27                  | R                  |
|       | 7S  | 10                  | R                  |
|       | 7U  | 28                  | RP                 |
| CR    | 2L  | HPVRTRx5*           | R                  |
| AO    | 3D  | 3, 20, 23           | RP                 |
| DE    | 3U  | 10, HPVRTRx5*       | R                  |
|       | 3V  | HPVRTRx5*           | R                  |
|       | 3X  | HPVRTRx1*           | R                  |
|       | 7L  | 10, 23              | R                  |
|       | 7M  | 5                   | R                  |
| DL    | 7Q  | 10, 23              | R                  |
|       | 3Y  | 1, 10               | R                  |
|       | 3Z  | 1, 27               | R                  |
| BM    | 4A  | 27                  | R                  |
|       | 4B  | 27, 36              | R                  |
|       | 4E  | 19, 27              | R                  |
|       | 7F  | 37                  | R                  |
|       | 7G  | 1, 14D, 19          | R                  |
| BW    | 7T  | 10, 66              | R                  |
|       | 4N  | 5, 27, 77           | R                  |
|       | 4P  | 77                  | R                  |
| DP    | 4T  | 27                  | R                  |
|       | 5C  | 24, HPVVS42L1*      | R                  |
|       | 5D  | 24, 38, 77          | R                  |
| RA    | F   | 5, 10, 27           | R                  |
| RW    | 7B  | 14D, 77, HPVVS92L1* | R                  |
|       | 7C  | 14D                 | R                  |
| LS    | 7D  | 10, 14D, 24         | R                  |
|       | 7J  | 38-rel              | RP                 |
|       | 7K  | 38-rel, HPVVS92L1*  | RP                 |
| AB    | 7R  | 38-rel              | R                  |
|       | 5J  | 23, 77              | R                  |

腎移植レシビエントのSCCs中のArgおよびProの状態のp53対立遺伝子。

同じでない頸部腫瘍、同じ患者由来の異なる皮膚病巣はしばしば一つより多いHPV種を含むことに注目されたい。

\*は全ゲノム配列がまだ公表されていないジェンバンクデータベース中で利用可能なHPV配列の座の名称を示す（アクセション番号は括弧内）：

HPVRTRx1 (L38918), HPV group 24 B1  
 HPVRTRx5 (L38922), HPV group B1  
 HPVVS42L1 (X79943), HPV group B1  
 HPVVS92L1 (X79943), HPV group B1

#### 【0037】

これらの結果は、再び、これらの皮膚HPV含有腫瘍において、Arg/Pro（12.5%）およびPro（0%）の対立遺伝子に対して激しく過剰なArg（87.5%）を伴うp53arg対立遺伝子に関連した腫瘍に対して断固たる感受性を明らかにする。

#### 【0038】

腫瘍の生検はきまって間質組織または炎症細胞の何れかにより汚染されているから、我々は、単一反応においてp53Argまたはp53ProのDNA鋳型の何れかを混合する作用を決定することに興味を注いだ。汚染した非腫瘍細胞のレベルに関するガイドとして機能するはずである。p53Argまたはp53Pro配列の何れかを95:5または5:95で含むプラスミドDNAを用いて大きい方のインプットとして何れかのDNA 100ngを用いてPCR反応を実施した場合、低コピー数の対立遺伝子に由来する産物はこれらの条件下において高いインプットDNA由来の産物と同じほどに効果的に増幅されたことから（図3B）、一方の対立遺伝子の増幅が他方の存在により影響されなかったことを示す。

#### 【0039】

A r gまたはP r o対立遺伝子の何れかをコードすることが知られているプラスミドD N Aをp c D N Aベクターにクローン化し、何れか一方をP C R増幅するか、または他方の対立遺伝子を含むプラスミドの存在下で、一方の対立遺伝子の特異的に検出するプライマーを用いた。A r g (1 4 1 b p)またはP r o (2 7 7 b p)対立遺伝子の特異的産物は、その対立遺伝子を含むプラスミドのみから、過剰な競合鋳型の存在下でさえも検出された。

#### 【0 0 4 0】

コドン7 2における多形性の位置およびP C R研究において使用されたプライマーの位置を図3 Aに示す。

#### 【0 0 4 1】

汚染する非腫瘍組織を含むそれらの腫瘍生検から、真の同型接合D N Aサンプルを識別することは相対的に簡単であることを証明したが、なぜならば、同型接合の個体からのゲノミックD N Aの増幅は、日常的にほぼ等しい強度であり、そして放射性標識産物の定量により測定されたとおり2 倍の誤差を決して越えなかった産物を生じるからである。可能性のある間質の汚染を評価するため、P r oまたはA r g対立遺伝子の何れかに関して同型接合であることが知られているゲノミックD N Aサンプルを、同じ比率で、高いインプットとして1 0 0 n gの全ゲノミックD N Aを用いて混合した。この場合、我々は、もっとも低いコピー数のD N Aがもっとも高いコピー数のD N Aよりもはるかに低い程度で増幅されたことを見いだした(図3 C)。

#### 【0 0 4 2】

鋳型の混合は、図3 B中において、1 0 0 n gの全ゲノミックD N Aを大きい方のインプットとして用いた。

#### 【0 0 4 3】

わずか2つのサンプルにおいて、P C R産物の比率により非腫瘍性組織による汚染が測定されたが、一方、A r g / P r o産物の強度の比は1 : 2 0から1 : 4 0に及び、図3 C中の故意に混合したサンプルにより生じたバンドパターンに極めて類似した。

#### 【0 0 4 4】

この研究に基づき、H P V関連疾患のコンテクストにおいて、p 5 3 a r g対立遺伝子のみを有する個体は、従って、p 5 3 p r o対立遺伝子少なくとも1コピーを有する個体に比して悪性腫瘍を発症することについて、極めて高い危険性を有すると考えることができる。他の対立遺伝子を用いて我々のサンプルの5 %汚染を我々が容易に検出できたこと、および腫瘍生検が間質組織1 0 - 5 0 %で日常的に汚染されていることを考えると、P r o対立遺伝子が大多数の腫瘍生検において検出されなかったとの事実は、患者らがA r g対立遺伝子に関して同型接合であることを示唆する。注目すべきは、コドン7 2の多形性が、p 5 3による効果的な成長抑圧に必要な最近同定されたS H 3ドメイン中に位置することである。

#### 【0 0 4 5】

参酌すれば、これらの結果は、H P V関連悪性腫瘍に対しての、p 5 3 A r g対立遺伝子に関連した顕著な感受性を証明し、さらに、該p 5 3多形性変異体が以前から信じられてきたとおり機能的に均等ではないことを暗示する。これらの発見は、スクリーニングプログラムに対して直接の衝撃を有することになり、それら発見は、p 5 3遺伝子型が異常なP A Pスメアおよび／または頸部新形成を有する個体および免疫上抑圧された個体の悪性腫瘍においても今考慮されなければならない。そのようなプログラムは、H P V感染およびH P V関連新形成を有する個体の増加した観察およびおそらくは初期の治療のための長期間の含蓄を有する。

#### 【0 0 4 6】

本発明は、以下の実施例を参照することにより、より容易に理解されることになるが、実施例は発明を例示するために提供され、発明を限定するために提供されるのではない。

#### 【実施例】

#### 【0 0 4 7】

## 実施例 I

p 5 3 遺伝子型は、異常な P A P スメアを伴って提示される個体において測定できた。p 5 3 A r g 対立遺伝子に関して同型接合である (p 5 3 A r g / p 5 3 A r g) と決定された個体は、従って、H P V に関連した頸部新形成および頸部癌を発症する危険性がより高いとして分類されるはずである。同型接合 p 5 3 A r g の個体は、次に、少なくとも p 5 3 P r o 対立遺伝子上に有する個体よりも攻撃的な様式で臨床医により治療される。

## 実施例 I I

かなりの努力が、頸部新形成および頸部癌の範囲を減じるための H P V に対するワクチンの開発に注がれている最中である。p 5 3 A r g 対立遺伝子に関して同型接合 (p 5 3 A r g / p 5 3 A r g) であると決定された個体は、従って、H P V 関連頸部新形成および頸部癌の発症の危険性が高いとして分類されるはずである。同型接合 p 5 3 A r g の個体は次に優先的に予防接種されるが、なぜならば、それらは H P V 関連の病理例えば癌を発症する危険性が高いからである。

## 実施例 I I I

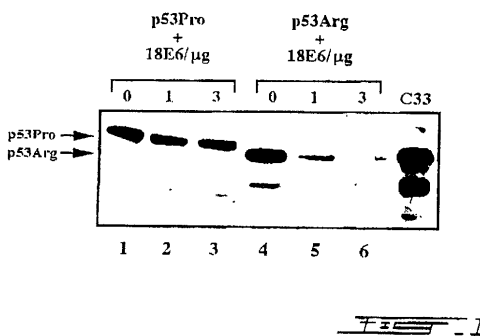
個体は様々な理由例えば免疫抑圧性薬剤または感染因子例えば H I V のために免疫抑圧性になりうる。p 5 3 A r g 対立遺伝子に関して同型接合 (p 5 3 A r g / p 5 3 A r g) であると決定された免疫抑圧個体は、従って、H P V 関連病理例えば癌を発症する危険性が高いとして分類されるはずである。

## 【 0 0 4 8 】

本発明は特定の態様に関して記載されてきたが、さらに修飾することが可能であり、そして本出願はあらゆる変更物、使用、または適合を包含することを意図し、一般的には本発明の原理に従いそして本開示からのそのような逸脱を包含するが、それらは発明が属する分野において公知または日常の実施の範囲内であり、そして前記の本質的特徴に適合させてよく、請求の範囲に従う。

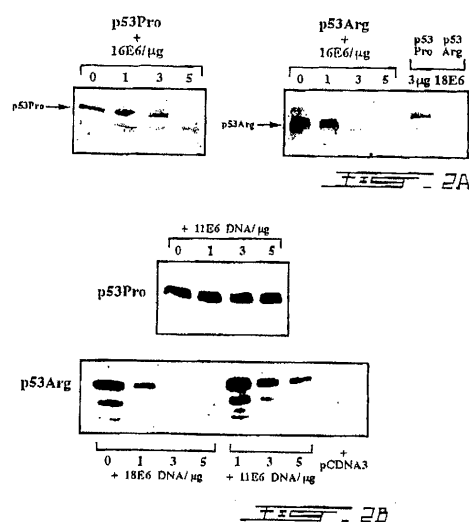
## 【 図 1 】

HPV-18 E6はp53Proよりもp53Argの分解を媒介することにおいてより活性である。



## 【 図 2 】

HPV-16 E6 (パネルA) および HPV-11 E6 (パネルB) は p53Pro よりも p53Arg の分解を媒介することにおいてより活性である。





---

フロントページの続き

- (71)出願人 500092114  
インターナショナル センター フォー ジェネティック エンジニアリング アンド バイオテ  
クノロジー  
イタリア国イー 3 4 0 1 2 トリエステ, パドリチアーノ 9 9, エリア・サイエンス・パーク
- (74)代理人 100140109  
弁理士 小野 新次郎
- (74)代理人 100089705  
弁理士 社本 一夫
- (74)代理人 100075270  
弁理士 小林 泰
- (74)代理人 100080137  
弁理士 千葉 昭男
- (74)代理人 100096013  
弁理士 富田 博行
- (72)発明者 マトラシュースキ, グレグ・ジェイ  
カナダ国ケベック ジェイ 7 ティー・2 エイ 1, セントーラザレ, チェスナット・サークル 2 5  
7 1
- (72)発明者 バンクス, ローレンス  
イタリア国イー 3 4 1 0 0 トリエステ, ガロ, スルピチオ 1 4
- (72)発明者 ストーリー, アラン  
イギリス国ケンブリッジシャー ピービー 1 9・2 アールキュー, セント・ネオッツ, アインズバ  
リー, カンバーランド・ウェイ 5
- F ターム(参考) 4B024 AA14 CA04 CA20 DA03 EA04  
4B063 QA01 QQ42 QR08 QR62 QS25