

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7221050号

(P7221050)

(45)発行日 令和5年2月13日(2023.2.13)

(24)登録日 令和5年2月3日(2023.2.3)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 31/7088(2006.01)

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 31/7105(2006.01)

A 6 1 K 31/7105

Z N A

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/02 (2006.01)

A 6 1 P 35/02

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00

1 0 5

請求項の数 8 (全21頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-538511(P2018-538511)

(86)(22)出願日 平成28年10月7日(2016.10.7)

(65)公表番号 特表2019-500404(P2019-500404
A)

(43)公表日 平成31年1月10日(2019.1.10)

(86)国際出願番号 PCT/KR2016/011272

(87)国際公開番号 WO2017/061828

(87)国際公開日 平成29年4月13日(2017.4.13)

審査請求日 令和1年10月4日(2019.10.4)

(31)優先権主張番号 10-2015-0141667

(32)優先日 平成27年10月8日(2015.10.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関
韓国(KR)

前置審査

(73)特許権者 518123844

コリア インスティテュート オブ ラジ
オロジカル アンド メディカル サイエ
ンシズ大韓民国 0 1 8 1 2 ソウル ノウォン
ーグ ノウォンーロ 7 5

(74)代理人 110000796

弁理士法人三枝国際特許事務所

(72)発明者 イ キホ

大韓民国 0 1 3 7 4 ソウル トボンーグ
シルボンーロ 7 1 6 0 3 - 4 0 3

(72)発明者 キム ソンソブ

大韓民国 3 4 0 4 9 テジョン ユソ
ーグ エクスポーロ 4 4 8 3 0 7 - 1
4 0 4

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 P L R G 1 (P L E I O T R O P I C R E G U L A T O R 1) 抑制剤を含む癌治療用組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

P L R G 1 (pleiotropic regulator 1) 抑制剤を有効成分として含む、癌の予防又は治療用薬学組成物であって、

前記 P L R G 1 抑制剤は、P L R G 1 mRNA に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド、s h RNA 又は s i RNAである、

組成物。

【請求項 2】

前記 s i RNA は、配列番号 1 1 ~ 配列番号 2 0 のいずれかのオリゴヌクレオチド及びその相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドの二重鎖からなる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記 s h RNA は、配列番号 2 1 又は 2 2 のオリゴヌクレオチド配列を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記癌の予防又は治療は、癌細胞特異的アポトーシス (apoptosis)、細胞死 (cell death)、又は細胞増殖抑制により達成される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記癌は、脳腫瘍、頭頸部癌、肺癌、乳癌、骨癌、胸腺腫、中皮腫、食道癌、膵癌、大腸癌、肝癌、胃癌、膵臓癌、胆道癌、膀胱癌、前立腺癌、睾丸癌、卵巣癌、子宮頸癌、子

宮内膜癌、リンパ腫、急性白血病、慢性白血病、多発性骨髄腫、肉腫、悪性黒色腫及び皮膚癌である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

(a) 対照群である癌が発病した実験動物の試料の P L R G 1 (pleiotropic regulator 1) 発現レベル又は活性を測定するステップと、

(b) 前記実験動物の癌を治療できるものと予想される候補物質を投与するステップと、

(c) 実験群である前記候補物質が投与された実験動物の試料の P L R G 1 発現レベル又は活性を測定するステップと、

(d) 対照群で測定された P L R G 1 発現レベル又は活性を実験群で測定されたものと比較し、対照群で測定されたものよりも実験群で測定されたもののほうが低いレベルであれば癌の発病を防止する予防用製剤又は癌を治療する治療用製剤として前記候補物質を用いることができるものと判定するステップとを含む、

癌の予防又は治療用製剤のスクリーニング方法。

【請求項 7】

(a) P L R G 1 (pleiotropic regulator 1) を発現する分離された癌細胞を癌治療候補物質で処理するステップと、

(b) 前記候補物質で処理された分離された癌細胞の P L R G 1 発現レベル又は活性を測定するステップと、

(c) 前記 (b) ステップで測定された P L R G 1 発現レベル又は活性が候補物質で処理されていない分離された癌細胞に比べて低いレベルであれば癌の発病を防止する予防用製剤又は癌を治療する治療用製剤として前記候補物質を用いることができるものと判定するステップとを含む、

癌の予防又は治療用製剤のスクリーニング方法。

【請求項 8】

P L R G 1 (pleiotropic regulator 1) 遺伝子配列に基づいて P L R G 1 の発現を抑制する抗癌候補物質を設計するステップを含み、発現を抑制する抗癌候補物質の設計は、P L R G 1 の転写又は翻訳レベルの測定による、癌の予防又は治療用製剤候補物質の探索方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、P L R G 1 (pleiotropic regulator 1) 抑制剤を有効成分として含む癌の予防又は治療用薬学組成物、前記組成物を個体に投与するステップを含む癌の治療方法、P L R G 1 の発現レベルを測定する製剤を含む癌診断用組成物、並びに P L R G 1 の発現レベルを測定するステップを含む癌診断のための情報を提供する方法及び癌の予防又は治療用製剤のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

癌は、正常細胞に比べて細胞成長を調節することが困難であり、近接する組織に侵入することがあり、時には転移するという特性を有する。癌は基本的に組織の成長調節に関する疾病であり、正常細胞が癌細胞に形質転換されると細胞成長と分裂を調節する遺伝子の発現が変化する（非特許文献 1）。

【0003】

抗癌治療は、物理的に腫瘍組織を除去するか、放射線照射や抗癌剤投与により癌遺伝子 (oncogene) をはじめとする抗アポトーシス分子 (anti-apoptotic molecule)、テロメラーゼ (telomerase)、成長因子受容体遺伝子 (growth factor receptor gene)、シグナリング分子 (signaling molecule) などのように癌細胞の生存に必要な遺伝子の発現を阻害するか、アポトーシスを誘導する方式で行われる（非特許文献 2）。しかし、このような治療過程において癌細胞のみならず正常細胞も影響を受け、副作用が現れるという問題がある。

10

20

30

40

50

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【文献】Croce., The New England Journal of Medicine, 358(5): 502-511, 2008
Knudson AG, Nature reviews. Cancer 1(2): 157-162, 2001

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明者らは、副作用を起こすことなく癌細胞特異的にアポトーシスを誘導する製剤を開発すべく鋭意努力した結果、P L R G 1 (pleiotropic regulator 1) が正常細胞よりも癌細胞において過剰発現するので、それを抑制すると癌細胞特異的にアポトーシスを誘導できることを確認し、本発明を完成するに至った。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、P L R G 1 (pleiotropic regulator 1) 抑制剤を有効成分として含む、癌の予防又は治療用薬学組成物を提供することを目的とする。

【0007】

また、本発明は、P L R G 1 (pleiotropic regulator 1) 抑制剤を有効成分として含む薬学組成物を個体に投与するステップを含む、癌の治療方法を提供することを目的とする。

【0008】

さらに、本発明は、P L R G 1 (pleiotropic regulator 1) の発現レベルを測定する製剤を含む、癌診断用組成物を提供することを目的とする。

【0009】

さらに、本発明は、(a) 分離された生物学的試料のP L R G 1 (pleiotropic regulator 1) 発現レベルを測定するステップと、(b) 前記発現レベルを正常対照群試料のP L R G 1 発現レベルと比較するステップと、(c) 前記生物学的試料のP L R G 1 発現レベルが正常対照群のP L R G 1 発現レベルより高ければ癌であると判定するステップとを含む、癌診断のための情報を提供する方法を提供することを目的とする。

【0010】

さらに、本発明は、(a) 対照群である癌が発病した実験動物の試料のP L R G 1 (pleiotropic regulator 1) 発現レベルを測定するステップと、(b) 前記実験動物の癌を治療できるものと予想される候補物質を投与するステップと、(c) 実験群である前記候補物質が投与された実験動物の試料のP L R G 1 発現レベルを測定するステップと、(d) 対照群で測定されたP L R G 1 発現レベルを実験群で測定されたものと比較し、対照群で測定されたものよりも実験群で測定されたもののほうが低いレベルであれば癌の発病を防止する予防用製剤又は癌を治療する治療用製剤として前記候補物質を用いることができるものと判定するステップとを含む、癌の予防又は治療用製剤のスクリーニング方法を提供することを目的とする。

【0011】

さらに、本発明は、(a) P L R G 1 (pleiotropic regulator 1) を発現する分離された癌細胞を癌治療候補物質で処理するステップと、(b) 前記候補物質で処理された分離された癌細胞のP L R G 1 発現レベルを測定するステップと、(c) 前記(b) ステップで測定されたP L R G 1 発現レベルが候補物質で処理されていない分離された癌細胞に比べて低いレベルであれば癌の発病を防止する予防用製剤又は癌を治療する治療用製剤として前記候補物質を用いることができるものと判定するステップとを含む、癌の予防又は治療用製剤のスクリーニング方法を提供することを目的とする。

【0012】

さらに、本発明は、P L R G 1 遺伝子配列に基づいてP L R G 1 の転写又は翻訳を抑制するか、P L R G 1 タンパク質の活性を抑制する抗癌候補物質を設計するステップを含む

10

20

30

40

50

、癌の予防又は治療用製剤候補物質の探索方法を提供することを目的とする。

【発明の効果】

【0013】

PLRG1 (pleiotropic regulator 1) は癌細胞において過剰発現するので、その発現を抑制すると癌細胞特異的にアポトーシスを誘導することができる。よって、本発明の PLRG1 抑制剤は、副作用を起こさない抗癌剤として優れた効果があり、また PLRG1 発現レベルを測定することにより癌診断や抗癌剤スクリーニングなどに活用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】肝癌組織及び肝癌細胞株における PLRG1 (pleiotropic regulator 1) 発現が増加することを確認する図である。(A) 肝癌周囲組織 N と肝癌組織 T における PLRG1 発現を RT-PCR とウェスタンブロット (western blot) 法により測定した。(B) 正常細胞株と癌細胞株における PLRG1 発現を RT-PCR とウェスタンブロット法により測定した。LO2 は不死化細胞 (immortalized cells) である。

【図2】PLRG1 の発現抑制により癌細胞単一クローン成長 (clonal growth) が抑制されることを確認する図である。Control-siRNA (si-Con) 又は PLRG1-siRNA (si-PLRG1 #1, si-PLRG1 #2) が導入された SNU475 (A)、Hep3B (B)、HepG2 (C) 及び Huh7 (D) 癌細胞株を低密度で接種し、単一クローン成長を測定した。形成されたコロニーをクリスタルバイオレット (crystal violet) で染色し (上段)、コロニー数を数値化した (下段)。PLRG1 発現減少と internal control beta-actin の発現は RT-PCR で測定した。

【図3】PLRG1 発現抑制による癌細胞特異的細胞成長抑制を確認する図である。(A) Control-siRNA (si-Con) 又は PLRG1-siRNA (si-PLRG1 #1, si-PLRG1 #2) が導入された Huh7、HDF、IMR90、WI38 及び BJ 細胞を接種し、5 日後にクリスタルバイオレットで染色し (上段)、OD595 nm で発色の程度を数値化して細胞成長を比較した (下段)。Control-siRNA で処理した細胞と PLRG1-siRNA で処理した細胞の成長差に関する統計的有意性を分析した (Not significant, N.S. $p > 0.05$; significant***, $p < 0.001$)。(B) Huh7 細胞における PLRG1 発現減少の影響を 24 時間間隔で測定して細胞成長曲線を作成した。PLRG1、beta-actin の発現は RT-PCR で測定した。

【図4】PLRG1 発現抑制により癌特異的アポトーシス (apoptosis) が誘導されることを Annexin V 染色で確認する図である。(A) Control-siRNA (si-Con) 又は PLRG1-siRNA (si-PLRG1 #2) が導入された SNU475、Huh7 及び BJ 細胞をそれぞれ接種して 96 時間培養し、Annexin V で死んだ細胞を染色した。(B) Annexin V 陽性集団を FACS で測定して定量化した。

【図5】PLRG1 発現抑制による癌特異的アポトーシス (apoptosis) を Annexin PI 染色法で確認する図である。Control-siRNA (si-Con) 又は PLRG1-siRNA (si-PLRG1 #2) が導入された BJ、HDF、WI38 正常細胞株と SNU475、Huh7 癌細胞株を接種して 96 時間培養した。Annexin V と PI で染色し、PI 陽性、Annexin V 陽性及び PI-Annexin 二重陽性集団を FACS で測定した。

【図6】PLRG1 発現抑制が間葉系幹細胞成長に影響を及ぼさないことを確認する図である。(A) Control-siRNA (si-Con) 又は PLRG1-siRNA (si-PLRG1 #1, si-PLRG1 #2) が導入された間葉系幹細胞を接種して 7 日間培養した細胞の写真である。(B) クリスタルバイオレットで染色し (上段)、OD595 nm で発色の程度を測定して細胞成長率を測定した。細胞成長率は Control-siRNA で処理した細胞の染色の程度を基準に計算した。

10

20

30

40

50

【図7】テロメラーゼ (telomerase) 発現が誘導された正常細胞の成長に P L R G 1 発現抑制が影響を及ぼさないことを確認する図である。(A) C o n t r o l - s i R N A (s i - C o n) 又は P L R G 1 - s i R N A (s i - P L R G 1 # 1, s i - P L R G # 2) が導入された B J 及び B J - T (テロメラーゼ陽性 B J) 細胞を接種して5日間培養し、クリスタルバイオレットで染色した。(B) O D 5 9 5 n m で発色の程度を測定して細胞成長率を測定した。細胞成長率は C o n t r o l - s i R N A で処理した細胞の染色の程度を基準に計算した。P L R G 1、b e t a - a c t i n の発現は R T - P C R で測定した。

【図8a】P L R G 1 に対して作製した10種の s i R N A の対応位置を示す図である。

【図8b】S N U 4 7 5 細胞を対照群 s i R N A (s i - C o n) 又は P L R G 1 - s i R N A (s i - P L R G 1 # 1 ~ s i - P L R G 1 # 1 0) で処理した場合の P L R G 1 の発現及びコロニー数を確認する図である。

【図9】様々な癌細胞株における P L R G 1 抑制によるコロニー数を確認する図である。対照群 s i R N A (s i - C o n) 又は P L R G 1 - s i R N A を様々な癌細胞に形質転換してコロニー数を確認した。

【図10】I P T G - 誘導 (inducible) s h - P L R G 1 を H u h 7 と S N U 4 7 5 細胞株に導入してシステムを確認する図である。(A) H u m a n P L R G 1 s h - R N A ターゲット塩基配列位置を示す図である。(B) P L R G 1 s h - R N A レンチウイルスによる肝癌及び正常細胞株における感染と、それによる癌細胞アポトーシスを顕微鏡で観察した。(C) P L R G 1 s h - R N A レンチウイルス感染と、I P T G 発現抑制システムによる癌細胞アポトーシスを顕微鏡で観察した。(D) 癌細胞アポトーシス中のタンパク質発現をウェスタンブロットで測定した。

【図11】動物モデルにおける P L R G 1 抑制効果を確認する図である。左側は細胞注入27日後のマウスの写真であり、右側は各日における各マウスの腫瘍のサイズを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

前記目的を達成するために、本発明の一態様は、P L R G 1 (pleiotropic regulator 1) 抑制剤を有効成分として含む、癌の予防又は治療用薬学組成物を提供する。

【0016】

本発明における「P L R G 1 (pleiotropic regulator 1)」とは、C D C 5 L (cell division cycle 5-like) 複合体の1つの構成タンパク質であり、前記 C D C 5 L 複合体はスプライソソーム (spliceosome) の一部として p r e - m R N A スプライシングに関与する。P L R G 1 は選択的スプライシング (alternative splicing) 位置を決定するのに核心的な役割を果たし、発生段階に関して一部報告されているが、P L R G 1 と癌との相関関係は報告されていない。

【0017】

本発明の具体的な一実施例においては、腫瘍組織及び癌細胞株において P L R G 1 の発現が正常組織及び正常細胞株に比べて多く発現することを見出すことにより (図1)、P L R G 1 が癌治療ターゲットに適合することを確認した。

【0018】

本発明における「P L R G 1 抑制剤」とは、P L R G 1 の発現又は活性を減少させる製剤を一括するものであり、具体的には、P L R G 1 に直接作用したり、そのリガンドに間接的に作用するなどの方式で、P L R G 1 の発現を転写レベルで減少させるか、その活性を妨害することにより、P L R G 1 の発現レベル又はその活性を減少させるあらゆる製剤が含まれる。

【0019】

前記 P L R G 1 抑制剤は、P L R G 1 を標的にして P L R G 1 の発現又は活性を抑制する化合物、核酸、ペプチド、ウイルス、前記核酸を含むベクターなど、その形態に制限されることなく用いることができる。前記 P L R G 1 抑制剤は、具体的には P L R G 1 m R

10

20

30

40

50

NAの発現を抑制するオリゴヌクレオチド、又はPLRG1タンパク質の活性を抑制する抗体もしくはその抗原結合断片であってもよく、より具体的には、前記PLRG1mRNAの発現を抑制するオリゴヌクレオチドは、PLRG1mRNAに特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマー (aptamer)、shRNA又はsiRNAであってもよく、さらに具体的には、前記siRNAは、配列番号11～配列番号20のいずれかのオリゴヌクレオチド及びその相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドの二重鎖からなるものであってもよく、前記shRNAは、配列番号21又は22のオリゴヌクレオチド配列を有するものであってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0020】

本発明における「アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、特定mRNAの配列に相補的な核酸配列を含有するDNA、RNA又はそれらの誘導体であり、mRNA内の相補的な配列に結合してmRNAのタンパク質への翻訳を阻害する作用を有する。アンチセンスオリゴヌクレオチド配列とは、前記PLRG1mRNAに相補的であり、かつ前記mRNAに結合するDNA又はRNA配列を意味する。これは、前記PLRG1mRNAの翻訳、細胞質内への転位 (translocation)、成熟 (maturation) 又はその他あらゆる全体的な生物学的機能に対する必須の活性を阻害し得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドの長さは、6～100塩基、好ましくは8～60塩基、より好ましくは10～40塩基である。前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、通常の方法によりインビトロで合成して生体内に投与することもでき、生体内でアンチセンスオリゴヌクレオチドが合成されるようにすることもできる。インビトロでアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成する例としては、RNAポリメラーゼIを用いることが挙げられる。生体内でアンチセンスRNAが合成されるようにする例としては、多重クローニング部位 (MCS) の起源が逆であるベクターを用いてアンチセンスRNAが転写されるようにすることが挙げられる。前記アンチセンスRNAは、配列内に翻訳終止コドンが存在するようにしてペプチド配列に翻訳されないようにすることが好ましい。本発明に用いることのできるアンチセンスオリゴヌクレオチドのデザインは、PLRG1の塩基配列を参照して当業界で公知の方法により容易に作製することができる。

【0021】

本発明における「アプタマー (aptamer)」とは、一本鎖オリゴヌクレオチドであり、20～60ヌクレオチド程度のサイズであり、所定の標的分子に対する結合活性を有する核酸分子を意味する。配列によって様々な3次元構造を有し、抗原抗体反応のように特定物質との親和力が高い。アプタマーは、所定の標的分子に結合することにより、所定の標的分子の活性を阻害し得る。本発明のアプタマーは、RNA、DNA、修飾された (modified) 核酸又はそれらの混合物であってもよく、また直鎖状又は環状の形態であってもよい。前記アプタマーは、PLRG1に結合することによりPLRG1の活性を阻害する役割を果たすことが好ましい。このようなアプタマーは、PLRG1の配列から当業者が公知の方法により作製することができる。

【0022】

本発明における「siRNA」及び「shRNA」とは、RNA妨害又は遺伝子サイレンシング (silencing) を媒介する核酸分子であり、標的遺伝子の発現を抑制することができるので、効率的な遺伝子ノックダウン (knockdown) 法又は遺伝子治療法として用いられる。shRNAは一本鎖のオリゴヌクレオチド内で相補的な配列間の結合によりヘアピン (hairpin) 構造を形成したものであり、生体内における前記shRNAはダイサー (dicer) により切断されることにより21～25ヌクレオチドのサイズの小さなRNA断片であって二重鎖のオリゴヌクレオチドであるsiRNAとなり、相補的な配列を有するmRNAに特異的に結合することにより発現を抑制することができる。よって、shRNAとsiRNAのいずれの手段を用いるかは当業者の選択により決定されるものであり、これらが標的とするmRNA配列が同じ場合は同等の発現減少効果を期待することができる。本発明の目的上、PLRG1に特異的に作用してPLRG1mRNA分子を切断し、RNA干渉 (RNAi, RNA interference) 現象を誘導することにより、前記PLRG

10

20

30

40

50

1を抑制することができる。s i R N Aは化学的又は酵素学的に合成し得る。s i R N Aの作製方法は、特に限定されるものではなく、当業界で公知の方法を用いることができる。例えば、s i R N Aを直接化学的に合成する方法、インビトロ (in vitro) 転写を用いたs i R N Aの合成法、インビトロ (in vitro) 転写により合成された長い二重鎖R N Aを酵素で切断する方法、s h R N A発現プラスミドやウイルス性ベクターの細胞内伝達による発現法、P C R (polymerase chain reaction) 誘導s i R N A発現カセット (cassette) の細胞内伝達による発現法などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0023】

特に、本発明のP L R G 1に対するs i R N Aは、配列番号11～配列番号20のいずれかのオリゴヌクレオチド及びその相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドの二重鎖からなるものであってもよいが、これらに限定されるものではない。また、前記s h R N Aは、配列番号21又は配列番号22のオリゴヌクレオチド配列を有するものであってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0024】

本発明における「抗体」とは、生体の免疫系において血液やリンパを循環しながら外部物質である抗原が侵入するとそれに反応する物質を意味し、リンパ組織で形成されるグロブリン系タンパク質であり、免疫グロブリンともいう。抗体は、B細胞が生産して体液に流し込むタンパク質であり、抗原と特異的に結合し、1つの抗体分子には2つの重鎖 (heavy chain) と2つの軽鎖 (light chain) があり、重鎖及び軽鎖のそれぞれはそのN末端に可変領域を有する。各可変領域は3つの相補性決定領域 (Complementarity determining region: CDR) と4つのフレームワーク領域 (framework regions: FRs) とから構成されるが、相補性決定領域は抗体の抗原結合特異性を決定し、可変領域のフレームワーク領域で維持される比較的短いペプチド配列として存在する。本発明の目的上、前記抗体は、P L R G 1と結合することによりP L R G 1の活性を抑制する抗体であってもよい。

【0025】

本発明における「癌」とは、アポトーシス調節に関する疾病であり、正常なアポトーシスバランスが崩れて細胞が過剰増殖することにより生じる疾病を意味する。これら異常な過剰増殖細胞は、場合によっては周囲組織や臓器に侵入して塊を形成し、体内の正常な構造の破壊や変形をもたらすが、このような状態を癌という。一般に、腫瘍 (tumor) とは、身体組織の自律的かつ過剰な成長により異常に成長した塊を意味し、良性腫瘍 (benign tumor) と悪性腫瘍 (malignant tumor) に分けられる。悪性腫瘍は、良性腫瘍に比べて成長速度が非常に速く、周囲組織に浸潤して転移 (metastasis) を起こすと生命を脅かす。このような悪性腫瘍を通常「癌 (cancer)」といい、癌の種類としては、脳脊髄腫瘍、脳腫瘍、頭頸部癌、肺癌、乳癌、胸腺腫、中皮腫、食道癌、膵癌、大腸癌、肝癌、胃癌、膵臓癌、胆道癌、腎臓癌、膀胱癌、前立腺癌、睾丸癌、生殖細胞腫、卵巣癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、リンパ腫、急性白血病、慢性白血病、多発性骨髄腫、肉腫、悪性黒色腫及び皮膚癌が挙げられるが、前記例に本発明の癌の種類が限定されるものではない。また、本発明における癌は、P L R G 1が正常組織より過剰発現した癌であるが、これに限定されるものではない。

【0026】

前記癌の予防又は治療は、癌細胞特異的アポトーシス (apoptosis) により達成されるものであってもよい。前記アポトーシスとは、細胞の死に方の一種であり、物理的に細胞が破壊されるネクロシス (necrosis) とは区別され、プログラム細胞死 (programmed cell death) ともいい、D N Aが損傷した細胞や不要となった細胞が自ら死滅する過程を意味する。

【0027】

本発明の具体的な一実施例においては、P L R G 1に対するs i R N Aで細胞を処理してP L R G 1の発現を減少させた場合、癌細胞株においては単一クローン成長が減少して細胞増殖が抑制されるが、正常細胞株においては細胞増殖に影響を及ぼさないことを確認

10

20

30

40

50

した（図3）。また、PLRG1に対するsiRNAで処理した細胞に対してAnnexin V単独又はAnnexin V及びPIで染色し、その結果から、PLRG1の減少により癌細胞特異的にアポトーシスが起こることが原因であることを確認した（図4及び図5）。さらに、このようなPLRG1減少による癌細胞特異的な効果は正常細胞である間葉系幹細胞やテロメラーゼ活性が誘導された細胞においても現れないことを確認することにより（図6及び図7）、PLRG1抑制は非常に厳格に癌細胞特異的にアポトーシスを誘導できることを確認した。さらに、IPTG-inducible-sh-PLRG1システムを用いて、前記結果が生体内でも同様に現れることをマウス動物モデルにおいて確認した（図11）。これは、PLRG1抑制剤が抗癌剤として用いられると、正常細胞には影響を及ぼさず、副作用を起こすことなく癌細胞特異的にアポトーシスを誘導できることを示唆するものである。

10

【0028】

本発明における「治療」とは、治療する個体又は細胞の自然過程を変更するために臨床的に介入することを意味し、臨床病理状態の進行中に行われてもよく、それを予防するために行われてもよい。目的とする治療効果には、疾病の発生や再発を予防すること、症状を緩和すること、疾病に伴うあらゆる直接又は間接的な病理学的結果を低減すること、転移を予防すること、疾病の進行速度を減少させること、疾病状態を軽減又は一時的に緩和すること、快方に向かわせること、予後を改善することが含まれる。本発明においては、PLRG1を抑制する物質を含む組成物の投与により癌の経過を好転させるあらゆる行為が含まれることが好ましい。また、「予防」とは、本発明によるPLRG1を抑制する物質を含む組成物の投与により前記癌の発病を抑制又は遅延させるあらゆる行為を意味する。

20

【0029】

本発明の薬学組成物は、薬学組成物の製造に通常用いられる適切な担体、賦形剤又は希釈剤をさらに含んでもよい。薬学的に許容される担体を含む組成物は、経口又は非経口の様々な剤形であってもよい。製剤化する場合は、通常用いる充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、界面活性剤などの希釈剤又は賦形剤を用いて調製される。経口投与のための固形製剤には、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤などが含まれ、これらの固形製剤は、少なくとも1つの化合物に少なくとも1つの賦形剤、例えばデンプン、炭酸カルシウム、スクロース（sucrose）又はラクトース（lactose）、ゼラチンなどを混合して調製される。また、通常の賦形剤以外に、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤も用いられる。経口用液体製剤としては、懸濁剤、内用液剤、乳剤、シロップ剤などが挙げられ、通常用いられる通常の希釈剤である水、液体パラフィン以外にも種々の賦形剤、例えば湿潤剤、甘味剤、芳香剤、保存剤などが用いられる。非経口投与用製剤としては、滅菌水溶液剤、非水性溶剤、懸濁剤、乳剤、凍結乾燥剤、坐剤が挙げられる。非水性溶剤、懸濁剤としては、プロピレングリコール（propylene glycol）、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物性油、オレイン酸エチルなどの注射可能なエステルなどが用いられる。坐剤の基剤としては、ウィテップゾール（witepsol）、マクロゴール、ツイーン（tween）61、カカオ脂、ラウリン脂、グリセロゼラチンなどが用いられる。

30

【0030】

また、本発明の薬学組成物は、これらに限定されるものではないが、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、懸濁剤、内用液剤、乳剤、シロップ剤、滅菌水溶液剤、非水性溶剤、凍結乾燥剤及び坐剤からなる群から選択されるいずれかの剤形を有してもよい。

40

【0031】

本発明の他の態様は、PLRG1（pleiotropic regulator 1）抑制剤を有効成分として含む薬学組成物を個体に投与するステップを含む、癌の治療方法を提供する。

【0032】

本発明における「個体」とは、本発明における癌疾患を保有しているか、発症したヒトを含むあらゆる動物を意味する。本発明の薬学組成物を個体に投与することにより、肝癌をはじめとする癌を緩和又は治療することができる。前記緩和とは、本発明による組成物の投与により癌疾患を好転又は有利に変化させるあらゆる行為を意味する。

50

【0033】

前記本発明の薬学組成物は、薬学的に有効な量で投与する。

【0034】

本発明における「投与」とは、任意の適切な方法で対象に本発明の薬学組成物を導入することを意味し、投与経路は、標的組織に送達できるものであれば経口又は非経口の様々な経路で投与することができる。

【0035】

前記薬学組成物は、標的又は必要に応じて当業界で用いられる通常の方法、投与経路、投与量により適切に個体に投与することができる。投与経路の例としては、経口、非経口、皮下、腹腔内、肺内及び鼻腔内投与が挙げられ、非経口注入としては、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内又は皮下投与が挙げられる。また、当業界で公知の方法により適切な投与量及び投与回数が選択されてもよく、実際に投与される本発明の薬学組成物の量及び投与回数は、治療する症状の種類、投与経路、性別、健康状態、食餌、個体の年齢及び体重、疾患の重症度などの様々な因子により適宜決定されてもよい。

【0036】

本発明における「薬学的に有効な量」とは、医学的用途に適用できる合理的な利益／リスク比で血管透過性の増加を抑制又は緩和するのに十分な量を意味し、有効用量レベルは、個体の種類及び重症度、年齢、性別、薬物の活性、薬物に対する感受性、投与期間、投与経路及び排出率、治療期間、同時に用いられる薬物が含まれる要素、並びにその他医学分野で公知の要素により決定されてもよい。本発明の組成物は、単独で又は他の治療剤と併用して投与してもよく、従来の治療剤と順次又は同時に投与してもよい。また、単一又は多重投与してもよい。前記要素を全て考慮して副作用なく最小限の量で最大限の効果が得られる量を投与することが重要であり、これは当業者により容易に決定されてもよい。

【0037】

本発明のさらに他の態様は、PLRG1 (pleiotropic regulator 1) の発現レベルを測定する製剤を含む、癌診断用組成物を提供する。

【0038】

本発明のさらに他の態様は、(a) 分離された生物学的試料のPLRG1 (pleiotropic regulator 1) 発現レベルを測定するステップと、(b) 前記発現レベルを正常対照群試料のPLRG1発現レベルと比較するステップと、(c) 前記生物学的試料のPLRG1発現レベルが正常対照群のPLRG1発現レベルより高ければ癌であると判定するステップとを含む、癌診断のための情報を提供する方法を提供する。本発明によれば、癌マーカーPLRG1を検出することにより、癌診断に必要な情報を提供し、癌を診断することができる。

【0039】

本発明における「診断」とは、生物学的試料又は組織サンプルにおいて本発明のPLRG1の存在又は不在を測定することにより、癌疾患の存在又は特徴を確認することを意味する。また、「マーカー又は診断マーカー (diagnosis marker)」とは、癌細胞又は癌疾患を有する個体を正常細胞又は正常個体と区分して診断できる物質であり、正常細胞に比べて癌を有する細胞又は個体において増加又は減少を示す、ポリペプチド、タンパク質又は核酸 (例えば、mRNA など)、脂質、糖脂質、糖タンパク質又は糖 (単糖類、二糖類、オリゴ糖類など) などの有機生体分子が含まれる。本発明の目的上、本発明の癌診断マーカーは、正常細胞又は組織の細胞に比べて、癌細胞において特異的に高いレベルの発現を示すPLRG1である。

【0040】

本発明において、PLRG1発現レベルを測定するとは、PLRG1のmRNA発現レベル測定を行うか、PLRG1のタンパク質発現レベル測定を行うことであってもよい。

【0041】

前記「mRNA発現レベル測定」とは、癌を診断するために生物学的試料において癌マーカー遺伝子のmRNAの存否と発現の程度を確認する過程であり、mRNAの量を測定

することにより行うことができる。そのための分析方法としては、R T - P C R、競合的 R T - P C R (competitive RT-PCR)、リアルタイム R T - P C R (real-time RT-PCR)、R N a s e プロテクションアッセイ (RPA; RNase protection assay)、ノーザンブロッティング (Northern blotting)、D N A チップなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0042】

前記「タンパク質発現レベル測定」とは、癌を診断するために生物学的試料において癌マーカー遺伝子から発現したタンパク質の存否と発現の程度を確認する過程であり、前記遺伝子のタンパク質に対して特異的に結合する抗体を用いてタンパク質の量を確認することにより行う。そのための分析方法としては、ウェスタンブロット、E L I S A (enzyme linked immunosorbent assay)、放射免疫測定 (RIA: Radioimmunoassay)、放射免疫拡散法 (radioimmunodiffusion)、オクタロニー (Ouchterlony) 免疫拡散法、ロケット (rocket) 免疫電気泳動、組織免疫染色、免疫沈降法 (Immunoprecipitation assay)、補体固定分析法 (complement fixation assay)、F A C S、プロテインチップ (protein chip) などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0043】

一例として、前記 m R N A レベルを測定する製剤は、本発明の P L R G 1 の m R N A に対するプライマー (primer) 対、プローブ (probe) 又はアンチセンスヌクレオチド (anti-sense nucleotide) であってもよく、本発明の P L R G 1 のポリヌクレオチド配列により当業者がプライマー、プローブ又はアンチセンスヌクレオチド配列を容易にデザイン

【0044】

本発明においては、P L R G 1 の癌診断マーカーとしての可能性を確認し、P L R G 1 のレベルを測定することにより肝癌をはじめとする癌を診断できるという効果を確認した。

【0045】

本発明のさらに他の態様は、(a) 対照群である癌が発病した実験動物の試料の P L R G 1 (pleiotropic regulator 1) 発現レベルを測定するステップと、(b) 前記実験動物の癌を治療できるものと予想される候補物質を投与するステップと、(c) 実験群である前記候補物質が投与された実験動物の試料の P L R G 1 発現レベルを測定するステップと、(d) 対照群で測定された P L R G 1 発現レベルを実験群で測定されたものと比較し、対照群で測定されたものよりも実験群で測定されたもののほうが低いレベルであれば癌の発病を防止する予防用製剤又は癌を治療する治療用製剤として前記候補物質を用いることができるものと判定するステップとを含む、癌の予防又は治療用製剤のスクリーニング方法を提供する。

【0046】

本発明のさらに他の態様は、(a) P L R G 1 (pleiotropic regulator 1) を発現する分離された癌細胞を癌治療候補物質で処理するステップと、(b) 前記候補物質で処理された分離された癌細胞の P L R G 1 発現レベルを測定するステップと、(c) 前記 (b) ステップで測定された P L R G 1 発現レベルが候補物質で処理されていない分離された癌細胞に比べて低いレベルであれば癌の発病を防止する予防用製剤又は癌を治療する治療用製剤として前記候補物質を用いることができるものと判定するステップとを含む、癌の予防又は治療用製剤であるスクリーニング方法を提供する。

【0047】

癌を予防又は治療できる候補物質の不在下で細胞における本発明の前記遺伝子の発現レベル又は前記遺伝子がコードするタンパク質のレベルを測定し、また、前記候補物質の存在下で本発明の前記遺伝子の発現レベル又は前記遺伝子がコードするタンパク質のレベルを測定して両者を比較し、前記候補物質の存在下での本発明の前記遺伝子の発現レベル又は前記遺伝子がコードするタンパク質のレベルを前記候補物質の不在下でのレベルより減少させる物質が癌の予防又は治療用製剤であろうと予測することができる。

【0048】

前記スクリーニング方法は、インビボ (in vivo) 又はインビトロ (in vitro) で行われるが、特にこれらに限定されるものではない。候補物質は、公知の物質又は新規物質であり、例えば植物抽出物又はケミカルライブラリー (chemical library) により大規模にスクリーニングを行うことができる。よって、PLRG1の発現又は活性を抑制することにより癌細胞特異的のアポトーシスを誘導することのできる癌の予防又は治療用製剤を見出すことができる。

【0049】

本発明のさらに他の態様は、PLRG1 (pleiotropic regulator 1) 遺伝子配列に基づいてPLRG1の転写又は翻訳を抑制するか、PLRG1タンパク質の活性を抑制する抗癌候補物質を設計するステップを含む、癌の予防又は治療用製剤候補物質の探索方法を提供する。

10

【0050】

前述したように、本発明においては、PLRG1の発現を抑制すると癌細胞特異的に増殖が抑制されてアポトーシスが起こることをインビトロ及びインビボで多方面から確認した。すなわち、本発明においては、PLRG1の抑制が癌細胞特異的な抗癌効果を有することを最初に解明した。従って、当業者であれば、本発明によりPLRG1の転写又は翻訳を抑制するか、PLRG1タンパク質の活性を抑制する物質が抗癌活性を有することを認知することができる。よって、本発明の実施例においてその効果を確認したPLRG1に対するsiRNA及びshRNAは単に前記技術的思想を立証した例示とみなすべきであり、当業者であれば、当該技術分野で公知の様々な方法によりPLRG1遺伝子配列情報に基づいてPLRG1の発現や活性などを抑制する癌の予防又は治療用製剤候補物質を設計することができる。それに関する具体的な例として、PLRG1遺伝子配列に基づいてそれを抑制するsiRNA又はshRNAを作製することができ、PLRG1遺伝子から翻訳されるタンパク質の構造に基づいてそれを抑制する化合物をコンピュータプログラムなどにより予測することができる。前記探索方法により選択された候補物質は、インビトロ又はインビボスクリーニングにより有効物質の選択に活用することができる。

20

【実施例】

【0051】

以下、本発明の理解を容易にするために実施例を挙げて詳細に説明する。しかし、本発明による実施例は様々な他の形態に変形することができ、本発明の範囲がこれらの実施例に限定されるものと解釈されてはならない。本発明の実施例は、当該技術分野における通常の知識を有する者に本発明をより完全に説明するために提供されるものである。

30

【実施例1】

【0052】

プライマー及びsiRNA配列

遺伝子の発現を測定するために用いたRT-PCR及びreal-time PCRプライマーは次の通りである。

[RT-PCR]

PLRG1 forward primer: ACCGTCCAC AGCCTACAGCGA (配列番号1)

40

PLRG1 reverse primer: ACTATCACGCCCCGACAGT (配列番号2)

GAPDH forward primer: GTCAGTGGTGGACCTGACCT (配列番号3)

GAPDH reverse primer: TGCTGTAGCCAAATTCTGTG (配列番号4)

β -actin forward primer: GGACTTCGAGCAAGAGATGG (配列番号5)

β -actin reverse primer: AGCACTGTGTTGGCGTAC

50

AG (配列番号6)

[Real-time PCR]

PLRG1 forward primer: CTTAAAGAGAAGGGTCCTCA
G (配列番号7)

PLRG1 reverse primer: GGTCCTGGTGGGTATGGATG
T (配列番号8)

β -actin forward primer: GCACCACACCTTCTACAA
TGA (配列番号9)

β -actin reverse primer: TAGCACAGCCTGGATAGC
AAC (配列番号10)

【0053】

PLRG1発現を抑制するために用いたsiRNA及びshRNAは次の通りである。

siPLRG1#1: uccggucuaa augcuauuauu (配列番号11)

siPLRG1#2: agccaugauacua caauucga (配列番号12)

siPLRG1#3: cgaggaggguacagaaacauucugua (配列番号
13)

siPLRG1#4: aaagagaaggguccucagaaugcaa (配列番号
14)

siPLRG1#5: cagaacuaa aagaucugggacuu (配列番号
15)

siPLRG1#6: uccagucagcuggaaaccagaaauu (配列番号
16)

siPLRG1#7: cccaugacauguuuguagcugauaa (配列番号
17)

siPLRG1#8: ccaagaacucugcacugauggcuaa (配列番号
18)

siPLRG1#9: accguggaaacucuaacaggguuauc (配列番号
19)

siPLRG1#10: aagcugauaaaaccauuaaaguaua (配列番
号20)

shPLRG1#1: CCATGATACTACAATTTCGATT (配列番号21)

shPLRG1#2: GACTTGGCTAGTGGCAAATTA (配列番号22)

【実施例2】

【0054】

癌細胞、正常細胞及び間葉系幹細胞の培養

ATCCから購入したヒト肝癌細胞株であるHuh7とSNU475細胞は10% FBS (fetal bovine serum) を含有するRPMI培地で培養した。他のヒト肝癌細胞株であるHep3BとHepG2細胞は10% FBSを含有するMEM培地で培養した。正常細胞であるHDF、IMR90、WI38、BJ及びBJ-T細胞は10% FBSを含有するDMEM培地で培養した。Lonzaから購入したヒト間葉系幹細胞 (human mesenchymal stem cell) はMSCGM (human Mesenchymal Stem Cell Growth Bulle
tKit™ Medium) で培養した。

【実施例3】

【0055】

RNA分離及びRT-PCR

Qiagen RNeasy Mini Kitを用いてRNAを抽出し、RNA濃度はND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, DE, USA) を用いて測定した。また、iScript™ cDNA Synthesis Kitを用いて (Biorad) cDNA (complementary DNA) を合成し、Maxime PCR PreMix kit (Intron Biotechnology) を用いてRT-P

10

20

30

40

50

C R (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) を行った。

【実施例 4】

【0056】

タンパク質分離及びウェスタンブロット (western blot)

肝癌患者組織及びその周囲組織から溶解緩衝液 (lysis buffer) を用いてタンパク質を抽出し、P L R G 1 (pleiotropic regulator 1) 抗体 (SIGMA) と G A P D H 抗体 (Santaacruz) を用いてウェスタンブロットによりタンパク質発現量を測定した。各細胞株に対しても前記と同様にウェスタンブロットを行った。対照群として β -actin 抗体 (Santaacruz) を用いた。

【実施例 5】

【0057】

P L R G 1 抑制剤を用いた単一クローン成長 (clonal growth) 抑制の測定

本発明者らは、P L R G 1 発現を抑制するための抑制剤として、代表的には P L R G 1 に対する siRNA を用いた。よって、siP L R G 1 # 1 ~ siP L R G # 10 は Qiagen から購入し、Control-siRNA は Mbiotech から購入して用いた。各細胞を 60mm 培養皿に接種し、その後 Control-siRNA と 2 種類の P L R G 1-siRNA をそれぞれ導入した。24 時間後に 1,000 個の細胞を計算して再び接種し、10 日経過後にクリスタルバイオレット (crystal violet) で細胞を染色した。染色されたコロニーを計算して単一クローン成長を定量化した。

【実施例 6】

【0058】

P L R G 1 抑制剤を用いた細胞成長抑制

各細胞を 24 ウェル培養皿に接種し、その後 Control-siRNA と 2 種類の P L R G 1-siRNA をそれぞれ導入した。5 日経過後にクリスタルバイオレットで細胞を染色し、氷酢酸で溶解して O.D595nm で吸光度を測定した。各実験は 3 回繰り返し実験を行った。Huh7 細胞株は 24、48、72、96、120 時間後に細胞成長を測定した。

【実施例 7】

【0059】

P L R G 1 抑制剤を用いたアポトーシス (apoptosis) 誘導

各細胞を 60mm 培養皿に接種し、その後 Control-siRNA と P L R G 1-siRNA でそれぞれ処理した。72 時間後に細胞を全て回収し、Annexin V-FITC を添加して 15 分間染色し、フローサイトメトリーを用いてアポトーシスの程度を測定した。

【0060】

二重染色の場合は、Annexin V-FITC と PI (propidium iodide) を同時に添加して 15 分間染色し、フローサイトメトリーを用いてアポトーシスの程度を測定した。

【0061】

実験例 1. 肝癌組織及び肝癌細胞株の P L R G 1 (pleiotropic regulator 1) 発現レベルの確認

非腫瘍性の周囲肝組織と肝癌組織に存在する P L R G 1 の mRNA 量をそれぞれ RT-PCR 法により測定した結果、非腫瘍性の周囲肝組織と比較して、肝癌組織において P L R G 1 の mRNA が過剰発現していることを確認した (図 1)。ウェスタンブロット法によりタンパク質量を測定した場合も、肝癌組織において P L R G 1 の発現が大きく増加していた (図 1 の A)。

【0062】

細胞株を用いた実験においても、癌細胞株の P L R G 1 発現量が正常細胞株の発現量より多いことを確認した (図 1 の B)。

【0063】

10

20

30

40

50

実験例 2 . 癌細胞株における P L R G 1 発現抑制による単一クローン成長 (clonal growth) 抑制の確認

実験例 1 の結果から、P L R G 1 が癌成長などの癌の進行 (progression) に関与するものと推定され、それを確認するために P L R G 1 発現を抑制した場合に癌細胞の単一クローン成長に及ぼす影響を測定した。

【 0 0 6 4 】

その結果、P L R G 1 - s i R N A で癌細胞株 S N U 4 7 5 を処理して P L R G 1 発現を減少させると、C o n t r o l - s i R N A で処理した対照群と比較してコロニー形成が著しく抑制されることを確認した (図 2 の A) 。このような P L R G 1 発現抑制による癌細胞のコロニー形成抑制は、H e p 3 B 、 H e p G 2 、 H u h 7 癌細胞株においても同様に観察された (図 2 の B 、 C 及び D) 。また、P L R G 1 発現減少による単一クローン成長抑制は、2 種類の異なる P L R G 1 - s i R N A (# 1 , # 2) を用いた実験において同様に観察された。前記結果から、P L R G 1 発現減少は様々な癌細胞において単一クローン成長を抑制することが分かる。

【 0 0 6 5 】

実験例 3 . 正常細胞株における P L R G 1 の発現抑制効果の確認

P L R G 1 発現抑制が正常細胞株の成長にも影響を及ぼすか否かを確認するために、P L R G 1 - s i R N A で処理し、その後癌細胞株と正常細胞株の成長を測定、比較した。クリスタルバイオレット (crystal violet) 染色法で細胞成長を測定した結果、癌細胞株である H u h 7 の場合、コロニー形成実験で示したように、P L R G 1 発現抑制により細胞成長が起こらず (図 3 の A) 、むしろ減少した (図 3 の B) 。しかし、実験に用いた H D F 、 I M R 9 0 、 W I 3 8 及び B J 正常細胞株の場合、C o n t r o l - s i R N A で処理した対照群と比較して、P L R G 1 発現抑制による細胞成長減少現象が観察されなかった (図 3 の A , $p > 0 . 0 5$) 。前記結果から、P L R G 1 発現減少による細胞成長抑制は癌細胞特異的なものであることが分かる。

【 0 0 6 6 】

実験例 4 . P L R G 1 発現抑制によるアポトーシス (apoptosis) の確認

実験例 2 で確認した P L R G 1 発現抑制による細胞成長抑制が細胞死 (cell death) に関連するか否かを確認するために、アポトーシスマーカー (apoptosis marker) である A n n e x i n - V で染色した細胞を測定した。H u h 7 と S N U 4 7 5 癌細胞株の場合、C o n t r o l - s i R N A で処理した細胞株と比較して、P L R G 1 - s i R N A で処理すると A n n e x i n V 染色強度が大きく増加したが、正常細胞株である B J 細胞の場合、対照群との差はなかった (図 4 の A 及び B) 。

【 0 0 6 7 】

より正確な分析のために、A n n e x i n V と P I で二重染色し、染色した細胞の変化を F A C S で分析した。癌細胞株である S N U 4 7 5 、 H u h 7 は P L R G 1 - s i R N A 処理により P I と A n n e x i n V で同時に染色 (late apoptosis marker) された細胞の数が大きく増加したが、正常細胞株である B J 、 H D F 及び W I 3 8 においては変化がほとんど観察されなかった (図 5) 。よって、P L R G 1 発現抑制は癌細胞特異的に後期アポトーシス (late apoptosis) を誘導することが分かる。

【 0 0 6 8 】

実験例 5 . 間葉系幹細胞における P L R G 1 抑制効果の確認

P L R G 1 は癌細胞又は組織において過剰発現し、発現を抑制すると正常細胞には影響がなく、癌細胞特異的にアポトーシスを誘導することから、P L R G 1 が癌細胞に特異的に必要な成長因子であることが分かる。このような結果を補強するために、細胞分裂が速い間葉系幹細胞を用いて P L R G 1 の影響を測定した。

【 0 0 6 9 】

その結果、他の正常細胞と同様に、間葉系幹細胞においても P L R G 1 の発現減少による細胞成長抑制は観察されなかった (図 6) 。具体的には、顕微鏡観察による細胞形態 (cell morphology) (図 6 の A) だけでなく、クリスタルバイオレット染色による細胞成

10

20

30

40

50

長（図6のB）実験においてもPLRG1発現減少による変化が観察されなかった。

【0070】

一方、間葉系幹細胞をはじめとする幹細胞は、癌細胞と同様にテロメラーゼ（telomerase）が活性化している。間葉系幹細胞においてPLRG1発現減少の影響が観察されなかったため、それをより明確にするために、テロメラーゼの過剰発現が誘導された正常細胞を用いてPLRG1発現減少の影響を測定した。

【0071】

その結果、テロメラーゼ発現がないBJ細胞とテロメラーゼ発現が誘導されたBJ-T細胞の両方において、PLRG1発現抑制により細胞成長に影響を受けないことを確認した（図7のA及びB）。これは、テロメラーゼ発現に関係なく、癌細胞ではない正常細胞においてはPLRG1発現抑制による影響がないことを意味するものである。

10

【0072】

実験例6．様々なPLRG1-siRNAの癌細胞成長抑制効果の確認

PLRG1抑制による抗癌効果をより明確に確認するために、さらにPLRG1遺伝子を標的とする10種のsiRNAを異なる配列で作製した（図8a）。また、各siRNAをHu h7とSNU475に形質転換して細胞成長及びPLRG1発現に及ぼす影響を測定した。

【0073】

その結果、前述した2つの細胞株において10種のsiRNA（siPLRG1#1～siRLRG1#10）は全てPLRG1発現を抑制し、それに伴って生存するコロニー数も大きく減少させることを確認した（図8b）。よって、PLRG1-siRNA効能は特定塩基配列をターゲティングするsiRNAに限定されないことが分かる。前記結果は、PLRG1遺伝子の発現が抑制されるものであれば、その方法に関係なく癌細胞特異的に細胞成長を抑制することを示唆するものである。

20

【0074】

実験例7．様々な癌細胞株におけるPLRG1抑制効果の確認

前記PLRG1抑制による癌細胞アポトーシス現象が肝癌などの特定癌に限定されるものであるか、そうでなければ由来組織に関係なくあらゆる癌細胞に汎用的に適用される現象であるかを確認するために様々な癌細胞株を用いてさらに実験を行った。

【0075】

その結果、実験に用いた肺癌細胞（A549, H460）、乳癌細胞（MDA231）、子宮頸癌細胞（HeLa, SiHa）、骨肉腫（SaOS2, U2OS）、脳の癌細胞（LN229）、大腸癌細胞（HCT116, SW480）の全てにおいて、PLRG1の発現を抑制すると生存するコロニー数が大きく減少することを確認した（図9）。よって、PLRG1発現抑制による癌細胞アポトーシスは、特定癌に限定されるものではなく、広範囲にあらゆる癌に適用される現象であることが分かる。

30

【0076】

実験例8．IPTG-誘導（inducible）sh-PLRG1システムの作製及びそれによる癌細胞成長抑制効果の確認

PLRG1欠乏による癌細胞成長抑制現象をさらに明確に解明するために、本発明者らは、IPTG-誘導（inducible）sh-PLRG1によるPLRG1発現調節システムを作製した。ヒトPLRG1（NM_002669）に対するshRNAを導入したConstitutiveレンチベクターをシグマから購入した（図10のA）。Constitutiveレンチベクターシステムで検証されたshPLRG1#1とshPLRG1#2の塩基配列をinducibleレンチベクターシステムに導入するためにオリゴを合成した。shPLRG1#1とshPLRG1#2を対象にプライマーをアニーリングし、その後合成されたPCR産物をKpnI-EcoRIで切断してLKO-3X Inducibleベクターにクローニングした。オリゴのシーケンス情報は次の通りである。shPLRG1#1-F（KpnI）：CgaGgttaCCGGCCATGATACTACAATTTCGATTCTCGAGAATCGAATTGTAGTATCATGGTTT

40

50

T T a g a a t t c C G (配列番号 23)

s h P L R G 1 # 1 - R (E c o R I) : C G g a a t t c t A A A A A C C A T G A T
A C T A C A A T T C G A T T C T C G A G A A T C G A A T T G T A G T A T C A T G
G C C G G t a c C t c g (配列番号 24)

s h P L R G 1 # 2 - F (K p n I) : C g a G g t a C C G G G A C T T G G C T A G
T G G C A A A T T A C T C G A G T A A T T T G C C A C T A G C C A A G T C T T T
T T T G a a t t c C G (配列番号 25)

s h P L R G 1 # 2 - R (E c o R I) : C G g a a t t C A A A A A A G A C T T G G
C T A G T G G C A A A T T A C T C G A G T A A T T T G C C A C T A G C C A A G T
C C C G G t a c C t c g (配列番号 26)

【0077】

クローニングが完了したレンチベクターを対象にウイルスを合成し、その後肝癌細胞株 H u h 7、S N U 4 7 5 と正常細胞株 B J に感染させた。その後、7日間細胞を維持した結果、正常細胞はアポトーシスに影響を受けないのに対して、肝癌細胞株は s h - R N A ターゲットシーケンス s h - P L R G 1 # 1、s h - P L R G 1 # 2 によりアポトーシスが誘導された(図10のB)。2種の I n d u c i b l e レンチベクター、すなわち s h - P L R G 1 # 1、s h - P L R G 1 # 2 を対象にウイルスを合成し、その後肝癌細胞株 H u h 7、S N U 4 7 5 と正常細胞株 B J に2日間感染させ、5日間 p u r o m y c i n で感染細胞を選択した。その後、10日間 1 m M I P T G 処理下で細胞を維持した結果、正常細胞はアポトーシスに影響を受けないのに対して、肝癌細胞株は s h - R N A ターゲットシーケンス # 1、# 2 によりアポトーシスが誘導されることを確認した(図10のC)。s h - R N A ターゲットシーケンス # 1、# 2 による肝癌細胞株のアポトーシスを他のセットの実験で確認したが、そこでは P L R G 1 タンパク質発現が s h - 対照群シーケンスと比較して大きく減少した(図10のD)。

【0078】

実験例9. I P T G - 誘導(inducible) s h - P L R G 1 システムを用いた動物モデルにおける P L R G 1 抑制効果の確認

I P T G - i n d u c i b l e s h - P L R G 1 # 1 又は # 2 を導入した H u h 7 細胞(各 3×10^6 個)をそれぞれヌードマウスの右大腿部に注入し、s h - 対照群ベクターを導入した H u h 7 細胞をヌードマウスの左大腿部に注入した。次に、前記マウスに I P T G を含有する水又は I P T G を含有しない水を供給して27日間飼育し、その後各マウスにおける腫瘍形成の有無を確認した。

【0079】

その結果、I P T G を含有する水を飲ませて飼育したマウスの場合、注入した H u h 7 細胞(すなわち、s h - P L R G 1 # 1 又は # 2 が導入された細胞)の腫瘍が形成されたが、所定期間が経過すると成長減少と共に結局は腫瘍が消滅することを確認した。しかし、I P T G を含有しない水を飲ませて飼育したマウスの場合、腫瘍組織のサイズが大きくなり続けることを確認した。また、s h - 対照群を有する H u h 7 細胞を注入した場合、I P T G の有無に関係なく成長が持続した(図11)。

【0080】

前記結果をまとめると、P L R G 1 発現抑制は間葉系幹細胞などの正常細胞には影響がなく、癌細胞特異的にアポトーシスを誘導できることが分かる。よって、P L R G 1 発現を抑制する製剤を用いて抗癌剤として用いることができ、また P L R G 1 発現レベルを測定することにより癌診断や抗癌剤スクリーニングなどに活用できるものと期待される。

【0081】

以上の説明から、本発明の属する技術分野の当業者であれば、本発明がその技術的思想や必須の特徴を変更することなく、他の具体的な形態で実施できることを理解するであろう。なお、前記実施例はあくまで例示的なものであり、限定的なものでないことを理解すべきである。本発明の範囲は、明細書ではなく請求の範囲の意味及び範囲とその等価概念から導かれるあらゆる変更や変形された形態を含むものであると解釈すべきである。

10

20

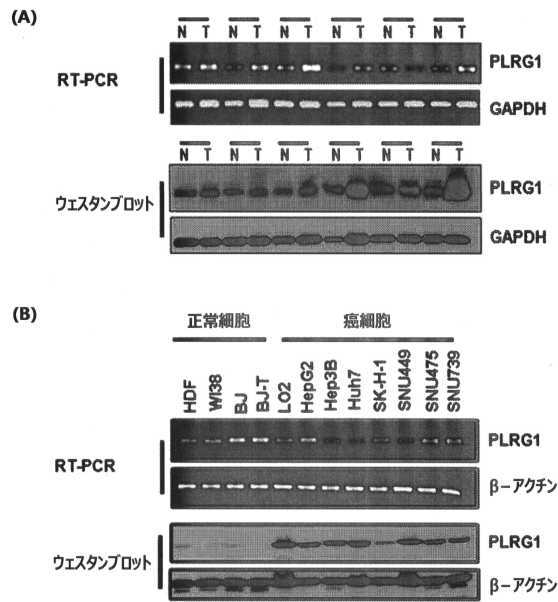
30

40

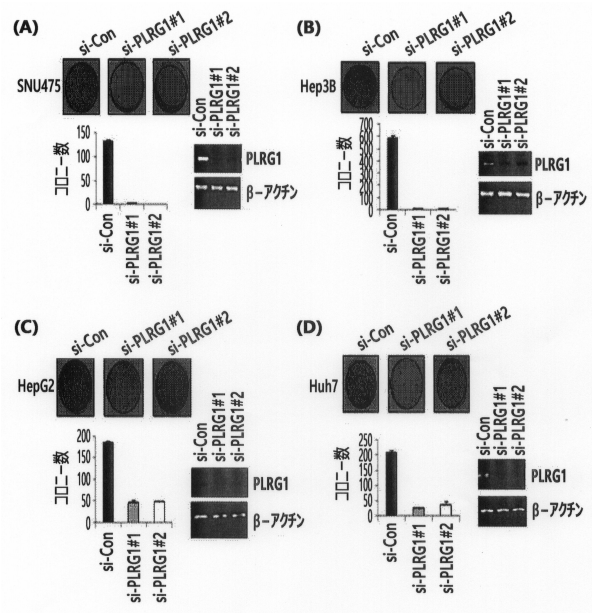
50

【図面】

【図 1】



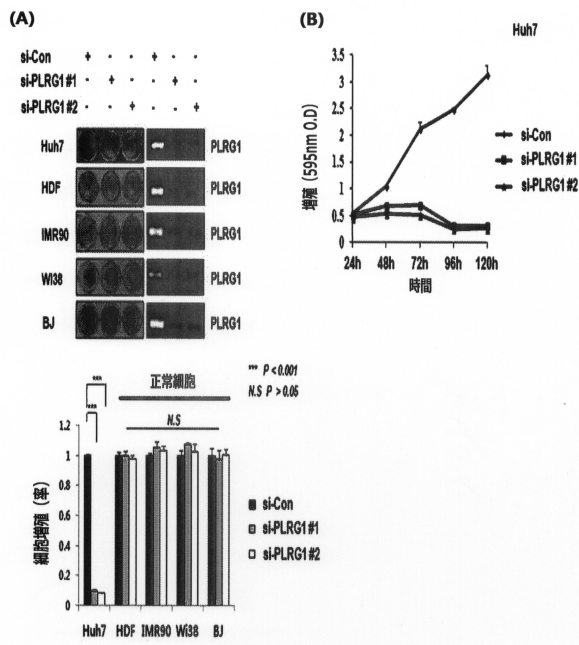
【図 2】



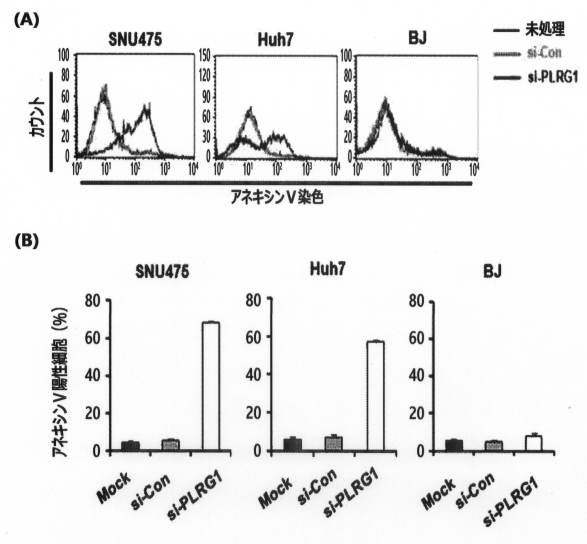
10

20

【図 3】



【図 4】

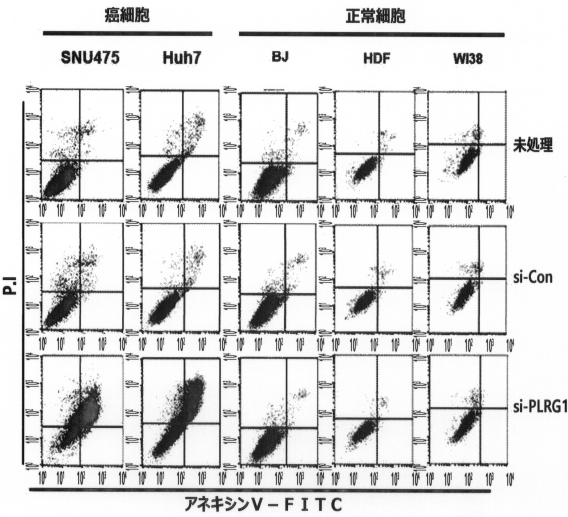


30

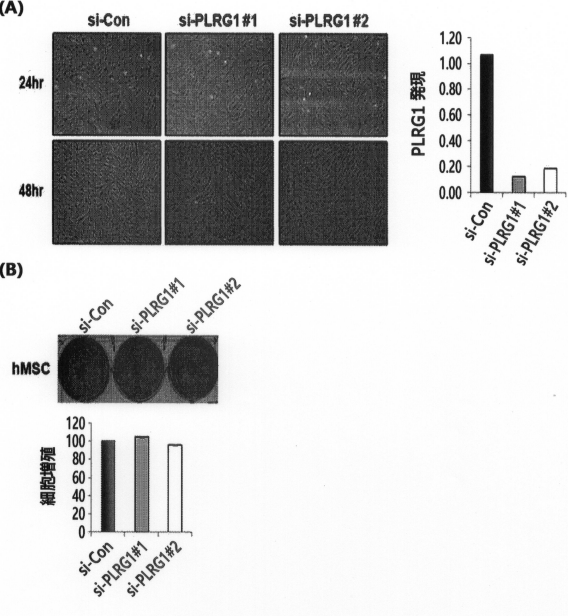
40

50

【図 5】

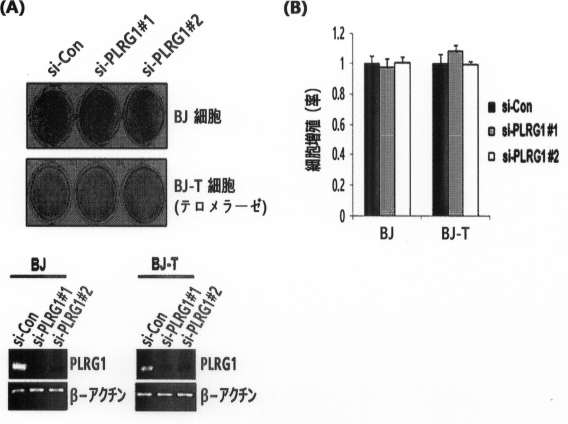


【図 6】

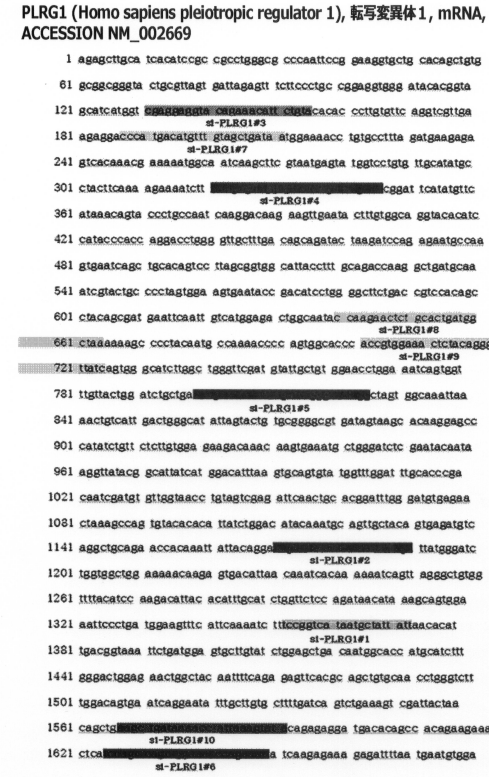


10

【図 7】



【図 8 a】



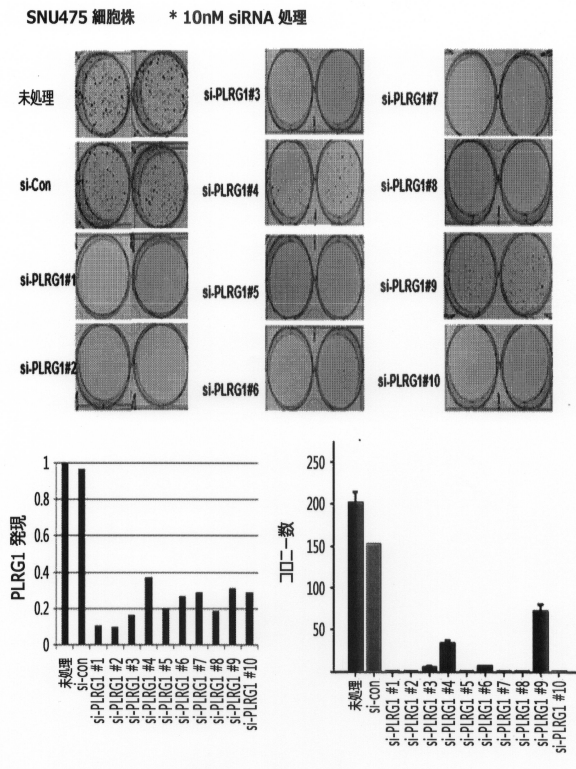
20

30

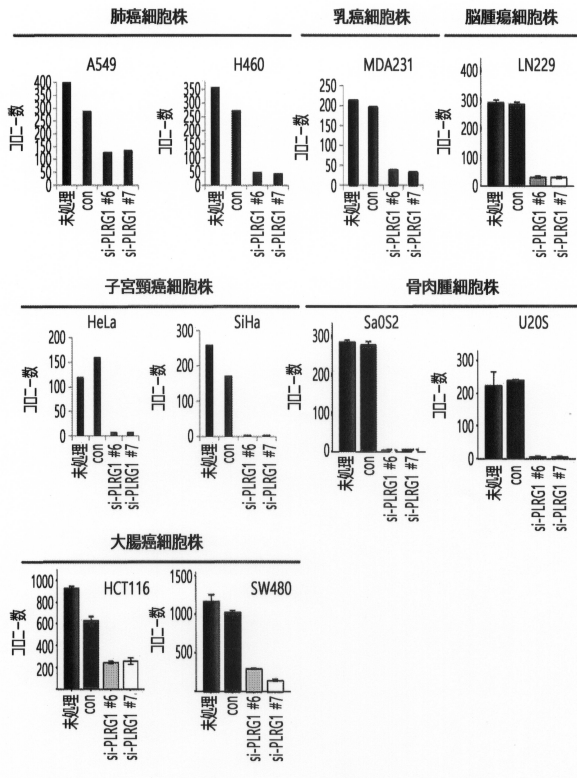
40

50

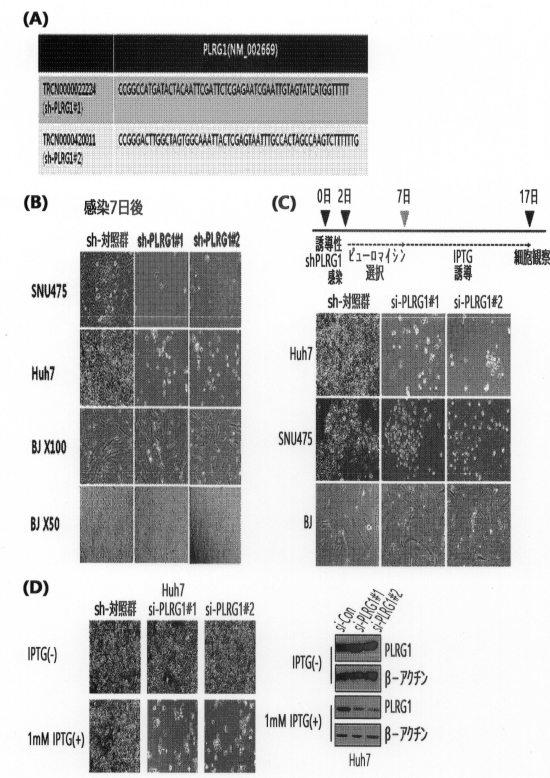
【図 8 b】



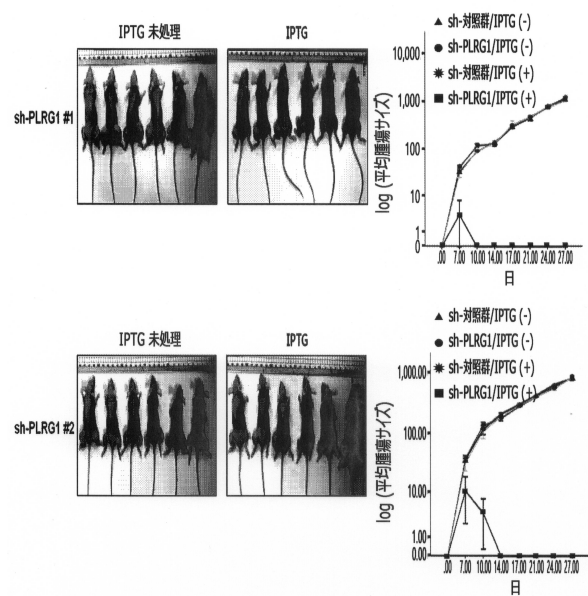
【図 9】



【図 10】



【図 1 1】



【配列表】

0007221050000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/68 (2018.01)	C 1 2 Q	1/68	
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	G 0 1 N	33/574	A
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	

(72)発明者 キム ヨンス

大韓民国 3 4 1 7 8 テジョン ユソンーグ ケリョンー口 5 2 ボンーギル 1 1 1 1 1 1 ホ

(72)発明者 パク ウンラン

大韓民国 0 1 8 1 3 ソウル ノウォンーグ コンルンー口 4 6 ーギル 1 9 1 0 3 ー4 0 8

(72)発明者 シン ヒョンジン

大韓民国 0 5 3 4 8 ソウル カンドンーグ チョンホーデ口 1 9 9 ーギル 1 0 1 0 8 ー1 0 1

(72)発明者 イ ウンジュ

大韓民国 0 5 5 7 7 ソウル ソンパーグ ペクチェゴブンー口 1 8 ーギル 7 1 0 3 ー7 0 1

(72)発明者 ハム ヨンホ

大韓民国 0 5 5 7 7 ソウル ノウォンーグ スラクサンー口 6 ーギル 1 2

(72)発明者 キム サンボム

大韓民国 0 4 4 2 4 ソウル ヨンサンーグ イチョンー口 8 7 ーギル 1 4 1 0 7 ー1 2 0 2

(72)発明者 パク ソンホ

大韓民国 0 4 9 8 3 ソウル クァンジンーグ アチャサンー口 5 3 7 ー1 7 1 4 0 1 ー1 2 0 2

(72)発明者 ハン チョルジュ

大韓民国 0 4 5 5 8 ソウル ジュンーグ テゲー口 2 3 5 ビー ー2 5 0 3

(72)発明者 ホン ソンヒ

大韓民国 0 1 3 1 8 ソウル トボンーグ トボンー口 1 8 0 ガーギル 3 2 1 0 1 ー1 4 0 2

(72)発明者 キム ヤンヒョン

大韓民国 0 1 8 4 3 ソウル ノウォンーグ トンイルー口 1 8 6 ーギル 5 3 ー4 6 3 0 3 ホ

(72)発明者 キム ジョンミン

大韓民国 0 3 4 1 0 ソウル ウンピョンーグ カルヒョンー口 1 7 0 ー2 5 0 2 ホ

(72)発明者 キム ミヨン

大韓民国 2 1 3 7 7 インチョン プピョンーグ プヨンー口 1 6 5 1 1 3 ー7 0 5

(72)発明者 カン ムンギョン

大韓民国 3 4 1 2 0 テジョン ユソンーグ カジヨンー口 6 5 1 0 6 ー6 0 4

(72)発明者 ソン ウンヨン

大韓民国 2 8 7 4 8 チュンチョンブクード チョンジューシ サンタンーグ ヨンジョンー口 3 5 2 0 5 ー5 0 2

(72)発明者 ソン ジョン

大韓民国 0 7 3 2 4 ソウル ヨンドンポーグ ヨイドンー口 3 ーギル 1 0

審査官 池上 文緒

(56)参考文献

国際公開第 0 2 / 0 9 5 4 1 7 (WO, A 2)
 国際公開第 2 0 1 1 / 0 3 5 4 3 3 (WO, A 1)
 国際公開第 2 0 1 0 / 0 1 7 5 1 5 (WO, A 2)
 国際公開第 2 0 1 1 / 0 2 0 0 8 9 (WO, A 2)
 Mol. Cell. Biol. (2009) vol.29, no.11, p.3173-3185

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 4 5 / 0 0
 A 6 1 K 3 1 / 7 0 8 8
 A 6 1 K 3 1 / 7 1 0 5
 A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 2

C 1 2 Q 1 / 6 8

C 1 2 Q 1 / 0 6

G 0 1 N 3 3 / 5 7 4

G 0 1 N 3 3 / 5 0

G 0 1 N 3 3 / 1 5

C 1 2 N 1 5 / 1 1 3

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)