

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成23年9月29日(2011.9.29)

【公表番号】特表2010-501172(P2010-501172A)

【公表日】平成22年1月21日(2010.1.21)

【年通号数】公開・登録公報2010-003

【出願番号】特願2009-525261(P2009-525261)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 0 7 K	16/28	(2006.01)
C 0 7 K	16/40	(2006.01)
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)
C 1 2 Q	1/48	(2006.01)
A 6 1 K	45/00	(2006.01)
A 6 1 K	38/00	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
G 0 1 N	33/68	(2006.01)
G 0 1 N	33/574	(2006.01)
G 0 1 N	37/00	(2006.01)
G 0 1 N	33/53	(2006.01)
G 0 1 N	33/15	(2006.01)
G 0 1 N	33/50	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	16/40	
C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/48	Z
A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P	35/00	
G 0 1 N	33/68	
G 0 1 N	33/574	A
G 0 1 N	37/00	1 0 2
G 0 1 N	33/53	M
G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/50	Z

【手続補正書】

【提出日】平成22年10月6日(2010.10.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 5 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 5 0】

【図1】肺癌組織および正常組織におけるKIF4A、MAPJD、NPTX1、およびFGFR10Pの発現を

示す。(A) KIF4A：半定量的RT-PCRにより調べた、SCLCおよびNSCLCの臨床試料ならびに正常肺組織におけるKIF4Aの発現。本発明者らは、肺癌試料のmRNAから調製した各一本鎖cDNAの適切な希釈物を調製し、-アクチン (ACTB) の発現レベルを量的対照とした。MAPJD：半定量的RT-PCRにより調べた、非小細胞肺癌 (NSCLC) の臨床試料におけるMAPJD遺伝子の発現。肺癌細胞株におけるMAPJD遺伝子の発現。NPTX1：半定量的RT-PCR分析によって検出した、正常肺組織ならびに非小細胞肺癌 (NSCLC) 臨床試料10例およびSCLC試料5例におけるNPTX1の発現。半定量的RT-PCR分析によって検出した、小気道上皮細胞 (SAEC) および肺癌細胞株23例におけるNPTX1の発現。FGFR10P：半定量的RT-PCRにより調べた、NSCLCの臨床試料 (T) および対応する正常肺組織 (N)、肺癌細胞株におけるFGFR10Pの発現。半定量的RT-PCRによって検出した、肺癌細胞系におけるFGFR10Pの発現。(B) KIF4A：ウエスタンプロット分析により調べた、肺癌細胞株におけるKIF4Aタンパク質の発現。ACTBの発現を量的対照とした。NPTX1：肺腺癌 (ADC) およびSCLC試料の代表例3対におけるNPTX1タンパク質のウエスタンプロット分析。FGFR10P：肺癌組織試料の代表例3対および肺癌細胞株A549、NCI-H226、NCI-H522、NCI-H522、SK-LU-1、SK-MES-1、NCI-H520、NCI-H2170、LC176、SBC-5におけるFGFR10Pタンパク質のウエスタンプロット分析。(C) KIF4A：ノーザンプロット分析によって検出した、正常ヒト組織におけるKIF4Aの発現。NPTX1：23種の正常成人ヒト組織におけるNPTX1転写物のノーザンプロット分析。FGFR10P：23種の正常成人ヒト組織におけるFGFR10P転写物のノーザンプロット分析。(D) KIF4A：DMS273細胞における内因性KIF4Aタンパク質の細胞内局在。KIF4Aは細胞の細胞質および核の位置で染色された。MAPJD：抗MAPJD抗体による免疫細胞化学染色によって検出した、肺癌細胞 (LC319) における内因性MAPJDの細胞内局在。NPTX1：A549細胞およびSBC-5細胞における内因性NPTX1タンパク質の細胞内局在。NPTX1は細胞の細胞質の位置で顆粒状に染色された。NPTX1を発現するA549細胞および一過性に発現するCOS-7細胞、ならびに発現しないLC319細胞由来の馴化培地における、ELISAを用いたNPTX1の特異的検出。FGFR10P：上方パネルは、NCI-H520細胞 (左上方パネル)、SBC-5細胞 (下方パネル)、およびLC319細胞 (右上方パネル) における、内因性FGFR10Pおよび-チューブリンの免疫蛍光染色である。細胞を固定し；FGFR10P-Alexa594 (赤色)、-チューブリン-Alexa488 (緑色)、または細胞核 (DAPI) を可視化した。矢印は中心体でのFGFR10Pの局在を示す。下方パネルは、抗FGFR10P抗体を用いたLC319細胞の免疫細胞化学的分析である。アフィジコリンによりLC319細胞をG1/S境界で同調させた。細胞周期停止が解除された後の様々な時点で、細胞をFGFR10P-Alexa488 (緑色) または細胞核 (DAPI) により個々の時点で免疫染色した。(E) KIF4A：免疫組織化学的染色 (×100) によって検出した、正常ヒト組織および肺SCCにおけるKIF4Aの発現。MAPJD：抗MAPJDポリクローナル抗体を用いた、外科的に切除した腺癌 (ADC) 組織および扁平上皮癌 (SCC) 組織に由来する試料代表例の免疫組織化学的評価。NPTX1：代表的なSCLC組織および正常臓器組織 (成人肝臓、心臓、腎臓、および肺の組織) におけるNPTX1タンパク質の免疫組織化学的評価。FGFR10P：代表的な正常組織 (成人心臓、肝臓、肺、腎臓、精巣、および肺腺癌の組織) におけるFGFR10Pタンパク質の免疫組織化学的評価。倍率、×200。

【図2】NSCLC患者におけるKIF4A、NPTX1、またはFGFR10Pの過剰発現と臨床転帰不良との関連を示す。(A) 肺癌組織におけるKIF4Aの発現および局在化の免疫組織化学的評価 (上方パネル×100；下方パネル×200)。陽性染色は主に細胞質および核において見られた。例として、SCLC、肺ADC、および肺SCCでのKIF4Aの発現、ならびに正常肺での無発現を示す。(B) KIF4A発現によるNSCLC患者での腫瘍特異的生存率のカプラン・マイヤー解析 (P = 0.0005；対数順位検定)。(C) 細胞マイクロアレイにおけるNPTX1発現の免疫組織化学的評価 (×100)。例として、NSCLCでのNPTX1の強い発現、弱い発現、および発現なしを示し、正常肺での無発現を示す。(D) NPTX1発現によるNSCLC患者での腫瘍特異的生存率のカプラン・マイヤー解析 (P = 0.0001；対数順位検定)。(E) 細胞マイクロアレイにおけるFGFR10Pタンパク質発現の免疫組織化学的評価。例として、肺SCCでのFGFR10Pの強い発現、弱い発現、または発現なしを示し、正常肺での無発現を示す。倍率、×100。(F) FGFR10Pの発現レベルによるNSCLC患者419例での腫瘍特異的生存率のカプラン・マイヤー解析 (P <

0.0001；対数順位検定)。

【図3】肺癌患者および健常対照における、ELISAにより決定したNPTX1の血清学的濃度を示す。肺ADC、肺SCC、またはSCLCを有する患者由来の血清中のNPTX1の分布。ADC患者と健常者との間 ( $P < 0.001$ 、マン・ホイットニーU検定)、SCC患者と健常者との間 ( $P < 0.001$ )、およびSCLC患者と健常者との間 ( $P < 0.001$ ) で違いは有意であった。

【図4】KIF4Aに対するsiRNAによる肺癌細胞の増殖阻害の結果を示す。(A) 半定量的RT-PCRによって分析した、SBC-5細胞でのsi-KIF4A (si-#1または-#2) または対照siRNA (LUCまたはSCR) に応じたKIF4Aの発現。(B) 特異的siRNAまたは対照プラスミドでトランスフェクションしたSBC-5細胞のコロニー形成アッセイ法。(C) MTTアッセイ法によって評価した、si-KIF4A (si-#1もしくは-#2)、si-LUC、またはsi-SCRに応じたSBC-5細胞の生存度。アッセイは全て3回、三つ組のウェルで実施した。KIF4A発現プラスミドでトランスフェクションした哺乳類細胞におけるKIF4Aの増殖促進および浸潤効果。(D) KIF4Aの増殖促進効果。MTTアッセイ法によって評価したCOS-7細胞の相対数。(E) ウエスタンプロットティングによって検出した、COS-7細胞およびNIH3T3細胞におけるKIF4Aの一過性発現。(F) および(G) ヒトKIF4Aの発現プラスミドによるトランスフェクション後のマトリゲル (Matrigel) マトリックス中のNIH3T3細胞およびCOS-7細胞の浸潤性を実証するアッセイ法。ギムザ染色 (F,  $\times 100$ )、およびマトリゲル被覆フィルタを通って移動した細胞の相対数 (G)。アッセイは3回、三つ組のウェルで実施した。

【図5】細胞増殖に及ぼすMAPJDの効果を示す。(A)～(C) MAPJDに対するsiRNAによるNSCLC細胞の増殖阻害。(A) 半定量的RT-PCRによって分析した、LC319細胞におけるsiRNA-MAPJD-1 (si-1)、siRNA-MAPJD-2 (si-2)、またはルシフェラーゼ (LUC) もしくはスクランブル (SCR) に対する対照siRNAに応じたMAPJDの発現 (左上方パネル)。MAPJDに対する特異的siRNA (si-1および-2) または対照プラスミドでトランスフェクションしたLC319細胞のコロニー形成アッセイ法 (左下方パネル)。対照siRNAとの比較で、siRNA-MAPJD-2 (si-2) に応じたLC319細胞の生存度をMTTアッセイ法によって評価した (右パネル)。アッセイは3回、三つ組のウェルで実施した。(B) フローサイトメトリー分析によって検出した、対照siRNA (LUC) (左パネル) またはsi-2 (右パネル) で処理した細胞のsub-G1の比率。(C) 対照siRNAまたはsi-2で処理したLC319細胞のフローサイトメトリー分析を用いたアネキシンV結合アッセイ法。(D) NIH3T3細胞の増殖に及ぼすMAPJDの効果。ウエスタンプロットでのNIH3T3細胞の安定なトランスフェクタントにおけるMAPJDの発現 (上方パネル)。MTTアッセイ法によって評価した安定なトランスフェクタントの細胞生存度 (下方パネル)。アッセイは3回、三つ組のウェルで実施した。

【図6】NPTX1の増殖効果 (NPTX1に対するsiRNAによる肺癌細胞の増殖阻害) を示す。上方パネル、RT-PCR分析によって分析した、A549細胞およびSBC-5細胞におけるsi-NPTX1 (si-2) または対照siRNA (LUCまたはSCR) に応じたNPTX1の発現。中央パネル、NPTX1特異的なsiRNAまたは対照プラスミドでトランスフェクションしたA549細胞およびSBC-5細胞のコロニー形成アッセイ法により調べたコロニーの画像。下方パネル、MTTアッセイ法によって評価した、si-NPTX1 (si-2)、si-LUC、またはsi-SCRに応じたA549またはSBC-5細胞の生存度。アッセイは全て3回、三つ組のウェルで実施した。

【図7】細胞増殖に及ぼすFGFR10Pの効果を示す。(A) および(B) 半定量的RT-PCRによって分析した、LC319 (A) 細胞およびSBC-5 (B) 細胞におけるsi-FGFR10P (si-1および-2) または対照siRNA (EGFP、ルシフェラーゼ (LUC)、もしくはスクランブル (SCR)) に応じたFGFR10Pの発現 (上方パネル)。MTTアッセイ法によって評価した、si-1、si-2、si-EGFP、si-LUC、またはsi-SCRに応じたLC319細胞またはSBC-5細胞の生存度 (中央パネル)。特異的siRNAまたは対照プラスミドでトランスフェクションしたLC319細胞およびSBC-5細胞のコロニー形成アッセイ法 (下方パネル)。実験は全て三つ組で行った。(C) 哺乳類細胞において一過性に過剰発現されたFGFR10Pの増殖促進効果。ごく低レベルの内因性FGFR10Pを発現したCOS-7細胞を、pcDNA3.1-FGFR10P-myc-Hisベクターでトランスフェクションした。これらの細胞由来の全細胞抽出物を抗c-Myc抗体を用いるウエスタンプロット分析に用いた (左パネル)。MTTアッセイ法 (右上方パネル) および、COS-7細胞に及ぼすFGFR10Pの増殖

促進効果を実証するコロニー形成アッセイ法（右下方パネル）。(D) c-mycタグ付FGFR1OPの発現プラスミドでトランスフェクションしたCOS-7細胞の運動性の増大を実証する細胞移動アッセイ法（右パネル）。比色測定およびギムザ染色（×200）（左および右パネル）。アッセイは3回、それぞれ三つ組のウェルで実施した。これらの細胞由来の全細胞抽出物を、抗c-Myc抗体を用いるウエスタンプロット分析に用いた（左パネル）。(E) FGFR1OP用の発現プラスミドによるトランスフェクション後のマトリゲルマトリックス中でのCOS-7細胞の浸潤性を実証するアッセイ法。ギムザ染色（×200）および、マトリゲル被覆フィルタを通って移動した細胞数（左および右パネル）。アッセイは3回、それぞれ三つ組のウェルで実施した。

【図8】肺癌においてKIF4Aと相互作用するタンパク質の同定を示す。(A) 肺癌細胞系DMS273の抽出物由来の内因性KIF4Aおよび二つの相互作用タンパク質の免疫沈降。抗KIF4A抗体で免疫沈降した細胞抽出物の銀染色で、内因性のZNF549およびZNF553タンパク質に対応する可能性がある二本の特異的バンドが得られ、これらはMALDI-TOF質量分析によって後に定量した。(B) DMS273細胞における内因性KIF4Aタンパク質とZNF549との共局在。(C) SBC-5細胞における内因性KIF4Aタンパク質とZNF553との共局在。

【図9】MAPJDの下流遺伝子候補の同定、ならびにMAPJDとMYC癌遺伝子との相互作用およびその転写調節を示す。(A) LC319細胞における、四つの標的遺伝子候補それぞれのプロモーター領域を含有するレポータープラスミドのルシフェラーゼ活性に対するMAPJDの効果。(B) MAPJDとMYCの結合。MAPJD発現ベクターまたはMYC発現ベクターでトランスフェクションしたLC319細胞の抽出物を用いて、MAPJDまたはMYCに対する抗体による相互(reciprocal)免疫沈降(IP)後にイムノブロッティング(IB)を行った。(C) ChIPアッセイ法によって検出した、四つのMAPJD標的遺伝子候補およびB23遺伝子(MYCの結合を示すことによってIPの対照とした)の推定転写開始配列(TSS)の1kbの上流領域を含有するDNA断片と、内因性MAPJDまたはMYCとの結合。LC319細胞由来のDNAを表記の抗体で免疫沈降し、PCRに用いた。(D) 各MAPJD標的遺伝子のプロモーター領域を含有するレポーター遺伝子でトランスフェクションしたLC319細胞のルシフェラーゼ活性に対する外因性MAPJDおよびMYCの効果。

【図10】MAPJDとRIOK1遺伝子のEボックス配列との相互作用を示す。(A) RIOK1遺伝子の5'隣接領域中のEボックスモチーフの位置。(B) および(C) EMSAによって検出した、Eボックスモチーフに対するMAPJDの配列特異的結合。競合体有りまたは無し(B)で、および抗MAPJD抗体または抗MYC抗体有りまたは無し(C)で、免疫沈降法によって精製したMAPJDまたはMYCを、ゲノムセグメント7中のEボックス配列を含有するDNAプローブとともにインキュベーションした。

【図11】MAPJDによる標的遺伝子へのMYC関連HAT複合体の動員およびヒストンH4アセチル化の増加を示す。(A) MYCを含有するHATとMAPJDの相互作用。FLAG-MAPJD発現ベクターまたはモックベクターでトランスフェクションしたLC319細胞の抽出物を用いた、内因性MYC、TRRAPまたはTIP60に対する抗体による免疫沈降(IP)の後に、抗FLAG抗体(M2)によるイムノブロッティング(IB)を行った。(B) ChIPアッセイ法によって検出した、内因性アセチル化ヒストンH4(AcH4)またはTRRAPと、四つのMAPJD標的遺伝子のEボックスを含む5'隣接領域を含有するDNAとの結合。MAPJD発現ベクターまたはモックベクターでトランスフェクションしたLC319細胞由来のDNAを表記の抗体を用いて免疫沈降し、PCRに用いた。(C) MYC関連HAT複合体およびMAPJDによるヒストンアセチル化の機構的モデル。

【図12】FGFR1OPと相互作用する新規分子の同定を示す。(A) 肺癌細胞における内因性FGFR1OPおよびWRNIP1の相互作用。抗FGFR1OP抗体およびLC319細胞由来の抽出物を用いて免疫沈降を実施した。免疫沈降物（左パネル）および細胞抽出物（左パネル）をウエスタンプロット分析に供して、内因性WRNIP1を検出した。IP、免疫沈降；IB、イムノブロット。細胞抽出物（右下方パネル）をウエスタンプロット分析に供して内因性ABL1を検出した。(B) FGFR1OPおよびWRNIP1の局在が、LC319細胞（左パネル）およびSBC-5細胞（右パネル）の核内で顆粒状構造で観察された。LC319細胞およびSBC-5細胞を固定した。FGFR1OP-A1exa594（赤色）および細胞核（DAPI）をそれぞれ、赤色および青色で可視化した。(C) A5

A549細胞を100 J/m<sup>2</sup>のUV照射で処置したか、または処置しなかった。照射後の表記の時点で、全細胞溶解物を回収し、抗FGFR1OP抗体、抗WRNIP1抗体、抗ABL1抗体を用いたウエスタンプロット分析による評価に供した。プロットを - アクチンに関してプローブして、負荷が等量であることを確認した。(D)、(E) DNA損傷に応じたFGFR1OP、WRNIP1、およびABL1の細胞内分布。UVで誘発されたFGFR1OPおよびWRNIP1の中心の形成。A549細胞を100 J/m<sup>2</sup>のUV照射で処置したか、または処置しなかった。照射後1時間の時点で、細胞を固定し、内因性FGFR1OP (D) およびWRNIP1 (E) を免疫染色した。FGFR1OP-Alexa488またはWRNIP1-Alexa488および細胞核 (DAPI) をそれぞれ、緑色 (左パネル) および青色 (中央パネル) で可視化した。A549細胞において画像を重ね合わせて可視化した (右パネル)。(F) UV照射に応じたABL1の核移行。A549細胞を100 J/m<sup>2</sup>のUV照射で処置したか、または処置しなかった。照射後1時間の時点で、細胞を固定し、内因性ABL1を免疫染色した。ABL1-Alexa488および細胞核 (DAPI) をそれぞれ、緑色 (左パネル) および青色 (中央パネル) で可視化した。A549細胞において画像を重ね合わせて可視化した (右パネル)。

【図13】インビトロおよびインビオにおけるABL1によるWRNIP1 (FGFR1OPと相互作用する新規の分子) のリン酸化を示す。(A) c-mycタグ付FGFR1OP (c-mycタグ付FGFR1OP用の発現プラスミドでトランスフェクションしたCOS-7細胞由来の抗c-myc免疫沈降物) またはc-mycタグ付WRNIP1 (c-mycタグ付WRNIP1用の発現プラスミドでトランスフェクションしたCOS-7細胞由来の抗c-myc免疫沈降物) を組換えABL1 (キナーゼとして) とともにインキュベーションすることによって、キナーゼアッセイ法を行った。キナーゼ反応の後、試料を抗pan-ホスホ-チロシン抗体を用いるウエスタンプロット分析に供した (左上方および右上方パネル)。プロットをc-mycでプローブして、負荷が等量であることを確認した (左下方および右下方パネル)。組換えABL1の存在下においてc-mycタグ付FGFR1OPのリン酸化は検出されなかった (左上方パネル) のに対し、c-mycタグ付WRNIP1のリン酸化は検出された (右上方パネル)。組換えABL1によるWRNIP1リン酸化型 (#) および組換えABL1の自己リン酸化型 (# #) を示した。(B) c-mycタグ付WRNIP1を組換えABL1および[<sup>-32</sup>P]ATPとともにインキュベーションした。反応試料をSDS-PAGEおよびオートラジオグラフィーにより分析した。組換えABL1によるWRNIP1リン酸化型 (#) および組換えABL1の自己リン酸化型 (# #) を示した。(C) COS-7細胞を、c-mycタグ付WRNIP1用の発現プラスミドおよびFlagタグ付ABL1用の発現プラスミドまたは空のプラスミドで同時トランスフェクションした。抗c-myc免疫沈降物 (c-mycタグ付WRNIP1) を抗pan-ホスホ-チロシン抗体によるウエスタンプロット分析に供した (上方パネル)。プロットをc-mycでプローブして負荷が等量であることを確認した (下方パネル)。

【図14】FGFR1OPによる、ABL1依存的なWRNIP1リン酸化の有意な低減を示す。(A) A549細胞における内因性FGFR1OPおよび内因性WRNIP1の免疫蛍光染色。FGFR1OP-Alexa488 (緑色)、WRNIP1-Alexa594 (赤色)、または細胞核 (DAPI) を可視化した。FGFR1OPおよびWRNIP1の共局在性は、主に核周囲において観察された (上方パネル)。A549細胞における内因性FGFR1OPおよび内因性ABL1の免疫蛍光染色。FGFR1OP-Alexa488 (緑色)、ABL1-Alexa594 (赤色)、または細胞核 (DAPI) を可視化した。FGFR1OPおよびABL1の共局在性は、主に核周囲において観察された (下方パネル)。(B) FGFR1OPによる、WRNIP1に対するABL1キナーゼ活性の阻害。組換えGSTタグ付FGFR1OPまたは組換えGST (0、0.4、0.8、2、4 pmol) の存在下において、組換えABL1 (キナーゼとして) とともにc-mycタグ付WRNIP1 (基質として) をインキュベーションすることによって、キナーゼアッセイ法を行った。キナーゼ反応の後、試料を抗pan-ホスホ-チロシン抗体を用いたウエスタンプロット分析に供した。(C) ABL1誘発性の細胞周期停止に対するFGFR1OPの効果を、BrdU取り込みアッセイ法によって分析した。A549細胞を、Flagタグ付ABL1用のおよびc-mycタグ付FGFR1OP用の発現プラスミドで同時トランスフェクションした。細胞に後半8時間でBrdUを取り込ませ、その吸光度を測定した。

【図15】WRNIP1の増殖促進効果を示す。WRNIP1に対するsiRNAによる肺癌細胞系LC319の増殖阻害。上方パネル、RT-PCRによって分析した、二つのsi-WRNIP1 (si-WRNIP1-1およびsi-WRNIP1-2) ならびに二つの対照siRNA (si-LUCおよびsi-CTR) による、LC319細胞でのW

RNIP1発現に対する遺伝子ノックダウン効果。中央パネルおよび下方パネル、si-WRNIP1または対照siRNAでトランスフェクションしたLC319細胞のMTTおよびコロニー形成アッセイ法。MTTアッセイ法（中央パネル）の縦列は、三重アッセイの相対吸光度；バーは、標準偏差。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0482

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0482】

FGFR10Pについては、先に、ADC 263例、SCC 115例、LCC 28例、腺扁平上皮癌（ASC）13例を含む原発性NSCLCおよび隣接する正常肺組織の合計419例のホルマリン固定試料を、手術を受けた患者から臨床病理学的データとともに入手した。先に剖検材料（NSCLC患者2例）からのNSCLC検体および5種の組織（心臓、肝臓、肺、腎臓、および精巣）を、インフォームドコンセントを得て入手した。腫瘍検体の組織学的分類はWHO基準に基づいて実施した（Travis WD, et al. Berlin: Springer, 1999）。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0488

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0488】

ノーザンプロット分析

ヒトマルチティッシュプロット（心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、結腸、末梢血白血球、胃、甲状腺、脊髄、リンパ節、気管、副腎、および骨髄を含む23種の正常組織；BD Biosciences Clontech）をKIF4A、MAPJD、NPTX1、およびFGFR10Pの<sup>32</sup>P標識PCR産物とハイブリダイズさせた。上記のプライマーを用いるRT-PCRによりKIF4AまたはNPTX1のcDNAプローブを調製し、以下のプライマーを用いるRT-PCRによりMAPJDまたはFGFR10Pの部分長cDNAを調製した：

MAPJDについては、

5'-CTGGAAACAAGGCAGTAGTGATT-3' (SEQ ID NO: 27) および

5'-GTACACTGAAGCCTGAAGGTGAT-3' (SEQ ID NO: 28)；

FGFR10Pについては、

5'-TAATAGTACCAAGCCATCGCTCAG-3' (SEQ ID NO: 94) および

5'-ATCCTACGGCTTATTGACACCT-3' (SEQ ID NO: 95)。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0500

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0500】

免疫組織化学および組織マイクロアレイ分析

臨床的肺癌におけるKIF4A、MAPJD、NPTX1、またはFGFR10Pの過剰発現の有意性を調べるため、本発明者らは、ENVISION+ Kit/HRP (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) を用いて組織切片を染色した。内因性のペルオキシダーゼおよびタンパク質のプロッキング後に抗KIF4A抗体（abcam）、ヒトMAPJDに対するウサギ抗体、マウス抗ヒトNPTX1モノクローナル抗体（mAb-75-1）、またはウサギ抗ヒトFGFR10Pポリクローナル抗体を加え、各切片を、二次抗体としてのHRP標識抗ヤギIgG、HRP標識抗ウサギIgG、またはHRP標識抗マウスIgGとともにインキュベーションした。基質-色素原を加え、検体をヘマトキシリンで対比染色した。ホルマリン固定したNSCLCを用いて、以前に公開されたように腫瘍組織マイクロア

レイを構築した (Chin SF, et al. Mol Pathol 2003; 56(5): 275-9, Callagy G, et al. Diagn. Mol. Pathol 2003; 12(1): 27-34, J Pathol 2005; 205:388-96)。サンプリングのための組織領域は、スライドガラス上の対応するHE染色切片との視覚的な整合に基づいて選択した。ドナーの腫瘍塊から採取した3つ、4つ、または5つの組織コア (直径0.6 mm; 高さ3~4 mm) を、組織マイクロアレイヤ (Beecher Instruments) を用いてレシピエンタパラフィンブロック中に配置した。正常組織のコアを各症例から打ち抜いた。得られたマイクロアレイブロックの5 μm切片を免疫組織化学的分析に用いた。

#### 【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0505

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0505】

#### 統計学的解析

統計学的解析は、StatView統計プログラムを用いて実施した (SaS, Cary, NC, USA)。本発明者らは分割表を用いて、NSCLC患者におけるKIF4A、NPTX1、またはFGFR10Pの発現と臨床病理学的変数の関係を解析した。腫瘍特異的生存曲線は、手術の実施日からNSCLCに関連した死亡時まで、または最後の追跡観察まで算出した。カプラン・マイヤー曲線を、それぞれの関連変数およびKIF4A、NPTX1、またはFGFR10Pの発現について算出した。患者サブグループ内での生存期間の差を、対数順位検定を用いて解析した。Coxの比例ハザード回帰モデルを用いて単変量解析および多変量解析を実施し、臨床病理学的変数と癌関連死亡率との関連性を判定した。本発明者らはまず、死亡と、年齢、性別、組織型、pT分類、およびpN分類などの考えられる予後因子との関連性を、一度に一因子を考慮して解析した。次に、後退(段階)法に多変量Cox解析を適用し、P値0.05未満のエントリレベル (entry level) を満たした任意かつ全ての変数と一緒に、KIF4A、NPTX1、またはFGFR10Pの発現を常にモデルに強制投入した。モデルに因子を追加し続けたため、独立因子はP < 0.05のイグジットレベル (exit level) を超えなかった。

#### 【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0508

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0508】

#### RNA干渉アッセイ法

本発明者らは以前に、哺乳類細胞中でsiRNAを合成するよう設計された、ベクターに基づくRNA干渉 (RNAi) 系であるpsiH1BX3.0を確立した (Suzuki C et al. Cancer Res 2003; 63:7038-41, Cancer Res. 2005; 65, 11314-25; Kato T, et al. Cancer Res. 2005; 65(13):5638-46, Furukawa C, et al. Cancer Res. 2005; 65(16):7102-10)。Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 30 μlを用いて、siRNA発現ベクター10 μgで、肺癌細胞株、つまり (MAPJDおよびNPTX1については) A549、(MAPJD、およびFGFR10Pについては) LC319 (NSCLC細胞株)；(KIF4A、NPTX1、およびFGFR10Pについては) SBC-5 (SCLC細胞株) をトランスフェクションした。

#### 【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0509

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0509】

トランスフェクションした細胞を適切な濃度のジェネティシン (G418) の存在下で7日間培養し、コロニーの数をギムザ染色によって計数し、処理後7日目の時点でMTTアッセイ

法によって細胞生存率を評価した。簡単に言えば、セルカウンティングキット-8溶液(DO JINDO)を1/10容量の濃度で各ディッシュに加え、プレートを37℃でさらに2時間インキュベーションした。その後、マイクロプレートリーダー550(BIO-RAD)を用いて、490 nmで、および参照として630 nmで吸光度を測定した。KIF4A、MAPJD、NPTX1、またはFGFR10PのmRNA発現の抑制を確認するため、合成した以下のKIF4A特異的プライマー、MAPJD特異的プライマー、NPTX1特異的プライマー、またはFGFR10P特異的プライマーを用い、標準的なプロトコールにしたがって半定量的RT-PCR実験を行った。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0513

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0513】

KIF4A、MAPJD、またはFGFR10Pを発現するNIH3T3トランスフェクタント

KIF4Aを発現する安定的トランスフェクタントおよびMAPJDを発現する安定的トランスフェクタントを、標準的なプロトコールにしたがって樹立した。KIF4A、MAPJD、またはFGFR10Pのコード領域全体をRT-PCRによって増幅した。産物をpcDNA3.1-myc/His A(+)ベクター(Invitrogen)の適切な部位にクローニングし、KIF4Aタンパク質、MAPJDタンパク質、またはFGFR10Pタンパク質のC末端の位置にc-myc-Hisエピトープ配列(LDEES1LKQE-HHHHHH)を含めた。製造元の使用説明書にしたがってFuGENE 6トランスフェクション試薬(Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)を用い、本発明者らは、内因性のKIF4A、MAPJD、もしくはFGFR10Pを発現しないCOS-7細胞および/またはNIH3T3細胞を、MAPJD発現プラスミド(pcDNA3.1-MAPJD-myc/His)、KIF4A発現プラスミド(pcDNA3.1-KIF4A-myc/His)、FGFR10P発現プラスミド(pCDNA3.1/myc-His-FGFR10P)、またはモックプラスミド(pcDNA3.1)のいずれかでトランスフェクションした。トランスフェクト細胞を10%FCSおよびジエネティシン(0.4 mg/ml)を含むDMEMまたはRPMIの中で14日間培養し、その後、個別のコロニー50個をトリプシン処理し、限界希釈法によって安定的トランスフェクタントをスクリーニングした。MAPJD、KIF4A、またはFGFR10Pの発現をRT-PCR、ウエスタンプロットティングおよび免疫染色により各クローンにおいて決定した。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0555

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0555】

FGFR10P

哺乳類細胞の増殖に対するFGFR10Pの効果をさらに確認するために、本発明者らはFGFR10Pを一過性発現するCOS-7細胞(FGFR10P/COS-7)を用いてインビトロアッセイ法を行った。MTTアッセイ法によって測定されたように、FGFR10P/COS-7細胞の増殖は空のベクター対照と比べて促進され(図7C)、このことはしたがって、FGFR10Pが哺乳類細胞の増殖に不可欠であることを個別に示唆するものである。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0591

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0591】

FGFR10P

分子標的療法は、悪性細胞に対する特異性が高いことおよびその明確な作用機序によって有害反応が少ないことが期待される。同じく、臨床の場に容易に適応しうる、低侵襲性

、高感度、高特異性をもつ新たな診断方法が有力候補となる。その目標へのアプローチとして、本発明者らは、ゲノム規模の発現分析による候補分子のスクリーニングと、RNAi技術による機能喪失効果のハイスループットスクリーニングとを組み合わせる戦略をとった（Suzuki C, et al. *Cancer Res* 2003;63:7038-41., *Cancer Res* 2005;65:11314-25; Ishikawa N, et al. *Clin Cancer Res* 2004;10:8363-70., 2005 *Cancer Res* 2005;65:9176-9184; Kato T, et al. *Cancer Res* 2005;65:5638-46; Furukawa C, et al. *Cancer Res* 2005;65:7102-10）。