

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2007年12月27日 (27.12.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/148488 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) C12N 1/15 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)

千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内 Chiba (JP).

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

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2007/060083

(22) 国際出願日:

2007年5月10日 (10.05.2007)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2006-169681 2006年6月20日 (20.06.2006) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人千葉大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 Chiba (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鈴木敏和 (SUZUKI, Toshikazu) [JP/JP]; 〒2608670 千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内 Chiba (JP). 原田和雄 (HARADA, Kazuo) [JP/JP]; 〒1848501 東京都小金井市貫井北町4-1-1 国立大学法人東京学芸大学教育学部内 Tokyo (JP). 鈴木信夫 (SUZUKI, Nobuo) [JP/JP]; 〒2608670 千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内 Chiba (JP). 喜多和子 (KITA, Kazuko) [JP/JP]; 〒2608670 千葉県

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

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

(54) Title: PEPTIDE FOR REACTIVATION OF INACTIVATED GENE

(54) 発明の名称: 不活化遺伝子再活性化ペプチド

(57) Abstract: Disclosed is a peptide selected from the peptides (a) and (b) below, a derivative of the peptide, or a salt of the peptide or the derivative: (a) a peptide comprising the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:1; and (b) a peptide which comprises an amino acid sequence having the deletion, substitution or addition of 1 to 11 amino acid residues in the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:1 and which has an activity of reactivating the expression of an inactivated gene. It becomes possible to provide a peptide having an activity of reactivating the expression of an inactivated gene.

(57) 要約: 本発明は、以下の(a)若しくは(b)のペプチド、その誘導体又はこれらの塩を提供する。(a)配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むペプチド (b)配列番号1で表されるアミノ酸配列において1~11個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、不活化された遺伝子発現の再活性化作用を有するペプチド。これにより、不活化された遺伝子発現の再活性化作用を有するペプチドが提供される。

WO 2007/148488 A1

明 細 書

不活化遺伝子再活性化ペプチド

5 技術分野

本発明は、不活化遺伝子再活性化ペプチドとその用途に関する。

背景技術

10 遺伝子の不活化とは、哺乳細胞染色体ゲノムへ特定の遺伝子の組み替えを行った際に起こる現象である。組み込まれた染色体上の位置により、遺伝子が周囲の凝集（不活性化）クロマチンの影響を受け、遺伝子発現が抑えられる場合のあることが知られている。これは、位置効果と呼ばれている。この不活化の原因は、哺乳細胞における染色体ゲノムの遺伝子発現が、DNA のメチル化、ヒストン蛋白のメチル化、アセチル化などの修飾を含んだ複雑な生命現象により制御されている事に起因するというものである。その結果、組み込まれた周囲の凝集（不活性化）クロマチンにより、遺伝子発現が著しく抑制されてしまう。この現象は、トリコスタチン A (TSA) などのヒストン脱アセチル化酵素阻害剤により、活性化した凝集クロマチンの構造が緩むことにより、遺伝子発現の活性が再び増大する、すなわち再活性化が起きることが知られている。

20 トリコスタチン A (TSA) によるクロマチン脱凝集は、不活性化された遺伝子を再活性化する作用の他にも、

- 1) 白血球細胞の分化を誘導し、様々の癌細胞の増殖を抑える、
 - 2) 癌細胞の放射線感受性を誘導する（文献 1）、
 - 3) クローンマウス作製率向上や NT-ES 細胞の樹立成功率の向上作用もある
- 25 （文献 2）、
などの作用/効能をもたらす。

しかし、TSA には細胞毒性があるため、抗癌治療、あるいは動物クローン作製又は体細胞核移植による ES 細胞樹立の際に、制御が難しく、また安全に使用することは困難であった。

参照文献

- (1) Cancer Biol Ther. 2005 Jul;4(7):787-93. Epub 2005 Jul 16
- (2) Biochemical and Biophysical Research Communications Volume 340,
5 Issue 1 , 3 February 2006, Pages 183-189

発明の開示

本発明は、不活化された遺伝子発現の再活性化作用を持つペプチドとその利用方法を提供することを目的とする。

- 10 本発明者は、上記課題を解決するため、鋭意研究を行った結果、アルギニンモチーフを有するペプチドが不活化された遺伝子発現の再活性化作用を持つことを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

- (1) 不活化された遺伝子発現の再活性化作用を有するペプチド。
- 15 (2) 以下の(a)若しくは(b)のペプチド、その誘導体又はこれらの塩。
- (a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むペプチド
- (b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において1～11個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、不活化された遺伝子発現の再活性化作用を有するペプチド
- 20 (3) 上記(2)記載のペプチド又はその誘導体を構成するアミノ酸配列の65%以上を含むペプチド、その誘導体又はこれらの塩。
- (4) アミノ酸配列の一部に化学修飾が施された、(2)記載のペプチド、その誘導体又はこれらの塩。
- (5) 以下の(a)若しくは(b)のペプチド又はその誘導体をコードするポリヌクレ
25 オチド。
- (a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むペプチド
- (b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において1～11個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、不活化された遺伝子発現の再活性化作用を有するペプチド

- (6) DNA である (5) 記載のポリヌクレオチド。
- (7) 上記 (5) 又は (6) 記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
- (8) 上記 (7) 記載の組換えベクターを含む形質転換体。
- (9) 上記 (1) ~ (4) のいずれか 1 項に記載のペプチド、その誘導体又はこれら
- 5 これらの塩を含有してなる医薬組成物。
- (10) 腫瘍細胞増殖抑制剤である (9) 記載の医薬組成物。
- (11) 抗生物質である (9) 記載の医薬組成物。
- (12) 上記 (1) ~ (4) のいずれか 1 項に記載のペプチド、その誘導体又はこれらの塩を含有してなる実験用試薬。
- 10 (13) 細胞工学用試薬である (12) 記載の実験用試薬。

本発明により、不活化遺伝子再活性化ペプチドが提供される。本発明のペプチドは、不活化された遺伝子の再活性化作用を有し、さらに他の抗癌剤、放射線治療と組み合わせ、腫瘍細胞の増殖をより低細胞毒性で抑制することができる。また、本発明のペプチドは細胞毒性がないため、腫瘍および癌に対する医薬組成物

- 15 として有用である。

TSA ではなく、本発明のペプチドを用いる利点は、天然のアミノ酸を素材にしているので細胞内で自然に分解し、活性を失う点である。本発明のペプチドの作用は 4 時間で認められ、6~9 時間で最大に達し、24 時間後に消失する。この作用は、一過的であるため TSA の持つような細胞毒性が無い、またはきわめて低い。

- 20 したがって、一過的に TSA 様効果を示すペプチドとして、特に放射線との併用による抗癌治療又は再生医療分野、例えば動物クローン作製や体細胞核移植による ES 細胞樹立の際に、TSA よりコントロールしやすくかつ安全に処理することが可能になる。

25 図面の簡単な説明

図 1 は、用いたペプチドの配列 (A) と各種ペプチド処理による R-luc 活性の変化 (B) を示す図である。

図 2 は、ペプチド 2 (配列番号 1 および 3) による R-luc mRNA 量の増加 (A) と活性の増加 (B) を示す図である。

図 3 は、ペプチド 2 と TSA による R-luc 活性の経時変化を示す図である。
HeLa/R-luc_B 細胞を使用した。

発明を実施するための最良の形態

- 5 以下、本発明を詳細に説明する。しかしながら、本発明の範囲は以下の説明に
限定されるものではなく、また、本明細書に開示した実施形態は、本発明の趣旨
を逸脱しない限りにおいて適宜変更されうる。なお、本明細書は、本願優先権主
張の基礎となる日本特許出願 2006-169681 号明細書の全体を包含する。
また、本明細書に記載した全ての文献および刊行物は、その目的にかかわらず参
10 照によりその全体を本明細書に組み込むものとする。

本発明は、アルギニンに富む 31 個のアミノ酸配列を骨格としつつ、かつ不活
化遺伝子再活性化作用を有するペプチドであり、当該ペプチドによって腫瘍細胞
増殖を抑制させようとするものである。

- 15 哺乳細胞の遺伝子の発現活性を制御する因子の一つであるヒストン蛋白には、
アルギニンリッチドメインが観察されている。しかし、ヒストン蛋白を化学合成
可能なサイズにした上で、不活化遺伝子再活性化を図ったような事例は見られて
いない。これに対し、本発明において、発明者の鋭意努力の結果、合成されたペ
プチドが不活化遺伝子再活性化作用を有する事を見出した。
- 20 以下に、本発明の実施の形態について、本発明のペプチドの合成、そして、合
成されたペプチドについて行った不活化遺伝子の再活性化試験、次に腫瘍細胞増
殖抑制試験等について詳細に説明する。

1. 不活化遺伝子再活性化ペプチド又はその塩

- 25 本発明のペプチドは、31 個のアミノ酸配列を含むものであり、その中の 3 番
目から 27 番目はアルギニン又はリジンに富むドメイン（「アルギニンリッチド
メイン」という）を形成するものである。本発明のペプチドを以下に配列番号 1
として示す。

YGRKKRRQRRRMARRIRRRLLRQRARRRAAAA（配列番号1）

本発明はまた、不活化された遺伝子発現の再活性化作用を有するペプチドであれば、配列番号1で表わされるアミノ酸配列の1個又は数個、好ましくは1～11
5 個、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失してもよく、配列番号1で表わされるアミノ酸配列に1個又は数個、好ましくは1～11個、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号1で表わされるアミノ酸配列の1個又は数個、好ましくは1～11個、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよい。

10 ここで、「不活化された遺伝子発現の再活性化作用」とは、周囲の不活性化クロマチン構造の影響により、エピジェネティックな発現抑制を受けた遺伝子の発現を上昇させる作用を意味し、細胞中での発現量が著しく低い遺伝子の発現量を増加させることを含む。本発明のペプチドは、不活性化された遺伝子近傍領域を含んだ凝集クロマチンの構造を緩めることで遺伝子を再活性化させるものと考え
15 られる。

本発明のペプチドの不活化細胞における再活性化は、特定の遺伝子のmRNAを哺乳細胞ゲノムに組換えた際に、発現が他の細胞と比べて著しく低い株におけるmRNAの発現量を測定する事で評価できる。この場合に用いられるmRNA発現量の測定手法としては、例えばRT-PCR、ノーザンブロット解析などが挙げられる。

20 このときに、活性化比は、本発明のペプチドで処理後8時間の場合を、未処理の場合と比較して、その発現量が少なくとも3倍（発現量比＝3以上）、好ましくは5倍（発現量比＝5以上）、さらに好ましくは10倍以上（発現量比＝10以上）増大している場合に、再活性化が起こったと判断することができる。

また、本発明のペプチドは、アミノ酸配列の一部に化学修飾が施されたものも含む。「化学修飾」とは、化学試薬をタンパク質に反応させ、主にアミノ酸残基側鎖の化学構造を変えることをいう。例えば、本発明のペプチドの活性部位又は活性部位近傍に存在すると予想されるアミノ酸を特異的に修飾する試薬（例えばポリエチレングリコール）を反応させる方法などが採用される。アフィニティラ
25 ベルを行ってもよい。化学修飾法は、当分野において周知である（大野素徳・金

岡祐一・崎山文夫・前田浩 著、生物化学実験法 12、蛋白質の化学修飾（上）、学会出版センター）。

本発明は、上記ペプチドのほかにその誘導体も含まれる。「誘導体」とは、本発明のペプチドを起源とし、3 以上のアミノ酸にまでアミノ酸の数を減らしたり、
5 一部のアミノ酸を非天然物を含んだ他のアミノ酸に置換したりしたものが含まれる。

置換、欠失の根拠として、分子進化的工学や X 線や NMR などによる構造解析を行った結果を用いて行う場合などが含まれる。

さらに、本発明は、上記ペプチド（配列番号 1）、その変異体、又はその誘導
10 体を構成するアミノ酸配列の 65%以上、好ましくは 70%以上、より好ましくは 80%以上、さらに好ましくは 90%以上、最も好ましくは 95%以上を含むペプチド、その誘導体又はこれらの塩を提供する。上記 65%の領域としては、例えば配列番号 1 に示す配列のうち、アルギニンリッチドメインの領域などが挙げられる。

15 上記のとおり本発明のペプチドのアミノ酸配列が決定されると、その後は、当該アミノ酸配列をコードする DNA を構築し、これを発現させることにより、あるいは上記ペプチドを化学合成することにより、得ることができる。

本発明のペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸付加塩又は塩基性塩が好ましい。酸付加塩としては、例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など
20 の無機酸との塩、あるいは酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸などの有機酸との塩が挙げられるがこれらに限定されるものではない。塩基性塩としては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化マグネシウムなどの無機塩基との塩、あるいはカフェ
25 イン、ピペリジン、トリメチルアミン、ピリジンなどの有機塩基との塩が挙げられるがこれらに限定されるものではない。

塩は、塩酸などの適切な酸、あるいは水酸化ナトリウムなどの適切な塩基を用いて調製することができる。例えば、水中、又はメタノール、エタノール若しく

はジオキサンなどの不活性な水混和性有機溶媒を含む液体中で、標準的なプロトコルを用いて処理することにより調製し得る。

2. ペプチドの化学合成

- 5 本発明のペプチドの化学合成を行う場合は、周知のペプチドの合成方法によって合成できる。例えば、アジド法、酸クロライド法、酸無水物法、混合酸無水物法、DCC 法、活性エステル法、カルボイミダゾール法、酸化還元法等が挙げられるがこれらに限定されない。また、その合成は、固相合成法及び液相合成法のいずれをも適用することができる。市販のペプチド合成装置（島津製作所製 PSSM-
10 8 など）を使用してもよい。

反応後は、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などの通常の精製法を組み合わせる本発明のペプチドを精製することができる。

15 3. ペプチドをコードするポリヌクレオチド

- 本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド及び、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において 1 ～11 個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、不活化された遺伝子発現の再活性化作用を有するペプチド
20 （変異体ペプチド）をコードするポリヌクレオチドを含む。

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のペプチドを遺伝子工学的に設計し、得ることができる。例えば、本発明のペプチドのアミノ酸配列をもとに塩基配列を設計し、合成すればよい。ポリヌクレオチドとしては DNA、RNA などが挙げられるが、DNA であることが好ましい。

- 25 本発明の変異体ペプチドを遺伝子工学的に得るには、配列番号 1 アミノ酸配列をコードするポリペプチドを、当分野において周知の部位特異的突然変異誘発法によって変異体を作製することができる。市販の部位特異的突然変異誘発用キットを用いてもよい（例えば TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System (Mutan-K、Mutan-Super Express Km 等：タカラバイオ社製)）。

4. 組換えベクター、形質転換体及びペプチド

タンパク質発現用組換えベクターは、上記ポリヌクレオチドを適当なベクターに連結することにより得ることができ、形質転換体は、本発明の組換えベクターを、目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる (Sambrook J and Russel D. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition, CSHL Press, 2001)。

ベクターには、宿主微生物で自律的に増殖し得るファージ又はプラスミドが使用される。プラスミド DNA としては、大腸菌、枯草菌又は酵母由来のプラスミドなどが挙げられ、ファージ DNA としては λ ファージが挙げられる。さらに、動物ウイルス、昆虫ウイルスベクターを用いることもできる。

組換えベクターの作製は、精製された DNA を適当な制限酵素で切断し、適当なベクター DNA の制限酵素部位等に挿入してベクターに連結すればよい。

形質転換に使用する宿主としては、目的の遺伝子を発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、細菌（大腸菌、枯草菌等）、酵母、動物細胞（COS 細胞、CHO 細胞等）、昆虫細胞が挙げられる。

宿主への組換えベクターの導入方法は公知であり、任意の方法（例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等）が挙げられる。

本発明において、本発明のペプチドは、前記形質転換体を培養し、その培養物から採取することにより得ることもできる。「培養物」とは、(a)培養上清、(b)培養細胞若しくは培養菌体又はその破砕物のいずれをも意味するものである。

培養法は、当分野において周知である（前記 Sambrook ら、Molecular Cloning を参照）。

培養後、目的ペプチドが菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破砕することによりタンパク質を抽出する。また、目的タンパク質が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲル濾過、イオン交換クロマ

トグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせ用いることにより、目的のペプチドを単離精製することができる。

本発明においては、*in vitro* 翻訳によるペプチド合成を採用することができる。この場合は、RNA を鋳型にする方法と DNA を鋳型にする方法（転写／翻訳）

- 5 の2通りの方法を用いることができる。鋳型 RNA としては、前記3に記載のポリヌクレオチドが挙げられ、鋳型 DNA としては、翻訳開始点の上流にプロモーターとリボゾーム結合部位を有している上記ポリヌクレオチド、あるいは翻訳開始点の上流に転写に必要なプロモーター等が組み込まれたポリヌクレオチドが挙げられる。*in vitro* 翻訳システムは、市販のシステム、例えば Expressway™ システム
- 10 ム（Invitrogen 社）、PURESYSTEM（登録商標；ポストゲノム研究所）、TNT システム（登録商標；Promega 社）などを用いることができる。*in vitro* 翻訳システムによるペプチド合成後は、上記の一般的な生化学的方法を単独又は組み合わせることにより、目的のペプチドを単離精製することができる。

15 5. ペプチド、その誘導体又はこれらの塩を含む医薬組成物

本発明のペプチド、その誘導体又はこれらの塩（以下、本発明のペプチドと称する。）を腫瘍細胞の増殖抑制剤として使用する場合は、がん治療を特異目的として用いることができる。本発明において対象となる腫瘍は、特に限定されるものではないが、例えば以下の群から選ばれる少なくとも1種が挙げられる：

- 20 脳腫瘍（神経膠腫、髄膜種、髄芽腫等）、舌癌、歯肉癌、鼻癌、咽頭癌、食道癌、十二指腸癌、胃癌、膵臓癌、胆管癌、胆嚢癌、小腸癌、大腸癌（結腸癌、直腸癌）、肛門癌、肝臓癌、前立腺癌、腎臓癌、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、子宮体癌、卵巣癌、外陰癌、陰癌、横紋筋肉腫、線維肉腫、骨肉腫、各種白血病（急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病等）、悪性リンパ腫（リンパ肉腫、細網肉腫、ホジキン病）、多発性骨髄腫、
- 25 皮膚癌、悪性黒色腫。

また、本発明のペプチドを抗生物質として使用する場合は、感染症などの疾患を対象とすることができる。

これらの疾患は、単独であっても、併発したものであっても、上記以外の他の疾病を併発したものであってもよく、いずれも本発明のペプチドを使用する対象とすることができる。

さらに、健常者に対して、感染予防の目的で使用することも可能である。

- 5 本発明の医薬組成物は、経口又は非経口的に全身又は局所投与することができる。本発明の医薬組成物を経口投与する場合は、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、丸剤、トローチ剤、内用水剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤等のいずれのものであってもよく、使用する際に再溶解させる乾燥生成物にしてもよい。また、本発明の医薬組成物を非経口投与する場合は、静脈内注射（点滴を含む）、筋肉内
10 注射、腹腔内注射、皮下注射、坐剤などの製剤形態を選択することができ、注射用製剤の場合は単位投与量アンプル又は多投与量容器の状態で提供される。

- これらの各種製剤は、製剤上通常用いられる賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、潤滑剤、界面活性剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤、等張化剤等などを適宜選択し、常法により製
15 造することができる。

- 上記各種製剤は、医薬的に許容される担体又は添加物を共に含むものであってもよい。このような担体及び添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、
20 ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアシルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトースなどが挙げられる。使用される添加物は、本発明の剤型に応じて上記の中から適宜又は組み合わせて選択される。

- 本発明の医薬組成物の投与量は、投与対象の年齢、投与経路、投与回数により
25 異なり、広範囲に変えることができる。本発明のペプチドの有効量と適切な希釈剤及び薬理学的に使用し得る担体との組合せとして投与される有効量は、一回につき体重 1kg あたり 10～1000mg/body、好ましくは 50～500mg/body の範囲の投与量を選ぶことができ、1 日 1 回から数回に分けて 1 日以上投与される。

6. 細胞工学用試薬

本発明のペプチド、その誘導体又はこれらの塩（以下、本発明のペプチドと称する。）は、前記トリコスタチンA (TSA)様の作用を持つため、実験用試薬、特に、細胞工学用試薬として利用することができる。特に、本発明のペプチドは、

5 再生医療などの現場における分化誘導試薬として使用することができる。

例えば、幹細胞と本発明のペプチドとを反応させ、白血球細胞への誘導を行う事ができる。また、同様に胚細胞と反応させて、当該細胞の全能性を回復させる試薬としても利用する事ができる。これにより、クローンマウス作製率を向上させることができ、NT-ES 細胞の樹立成功率を向上させることができる。

10

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[実施例]

15 [実験方法]

1) 細胞

HeLa 細胞へ、CMV プロモーターの下流にウミシイタケ由来ルシフェラーゼ遺伝子(R-luc)を含むベクター、pRL-CMV をピューロマイシン耐性遺伝子をコードするプラスミドベクター、pPGKpuro と共導入し、ピューロマイシンを用いた選択
20 により、安定形質導入細胞クローンとして HeLa/R-luc_A 及び HeLa/R-luc_B を得た。HeLa/R-luc_A は中程度～高いレベルの R-luc を発現する細胞であり、HeLa/R-luc_B は非常に低いレベルの R-luc を発現する細胞であった（図 1B、コントロール参照）。

25 2) 細胞のペプチド処理

細胞をディッシュに播種して 24 時間経過後、血清を含まない OPTI-MEM 培地に培地交換し、ペプチドを添加して細胞を 30 分間インキュベートした。用いたペプチドは、Peptide1（配列番号 2）、Peptide2（配列番号 3）、Peptide1-TAT（配列番号 4）および Peptide2-TAT（配列番号 5）の 4 種類である（図 1A）。

このうち、Peptide1 は、陰性対照ペプチドであり、Peptide2 は、本発明のペプチドである。また、Peptide 1 および 2 は、細胞内へ浸透する TAT 配列を付加してある。Peptide1-TAT および Peptide2-TAT は、上記ペプチドより TAT 配列を除いたペプチドである。30 分後にペプチドを含む培地を除去し、血清を含む通常
5 の培地（MEM 培地、10% 仔牛血清）に交換した。一定時間培養後に細胞を回収し、ルシフェラーゼアッセイ、RNA 分離を行った。

3) ルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼ活性の測定には、試薬として東洋インキ社のピッカジーンデュ
10 アル・シーパンジーキットを用い、ルシフェラーゼの作用による反応基質の発光量をアトー社のルミノメーター、AB-2200 で定量した。活性は、単位細胞数あたりの任意の値（RLU, relative luminescent unit）で示した。

4) RT-PCR

15 細胞を PBS で洗浄後、キアゲン社の RNA 分離キット、RNAeasy MiniKit を用いて全 RNA を抽出した。全 RNA を鋳型として、オリゴ dT プライマーを用いて逆転写反応により一本鎖 cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として R-luc 遺伝子の発現量の半定量を PCR により行った。図 2 では、R-luc 遺伝子は 30 回の増幅、コントロールとして用いた GAPDH 遺伝子は 18 回の増幅反応を行った。
20 増幅遺伝子産物をアガロース電気泳動、エチジウムブロミド染色により可視化し、染色した DNA バンドの濃さをコンピューターで半定量した。

〔結果・考察〕

Peptide 1 および 2 は、細胞内へ浸透する TAT 配列を付加してある。これら 2
25 種類のペプチドの細胞内移行は、蛍光標識ペプチドを用いて確認済みである。TAT 配列を持つペプチドおよび上記ペプチドより TAT 配列を除いたペプチドの 4 種類それぞれで細胞を処理した 6 時間後に R-luc の活性を調べた。Peptide 2 で処理したときに、R-luc の活性増大が認められた。特に、発現量の低い HeLa/R-luc_B で 10 倍以上の活性増大が見られた（図 1 B）。

この活性増大は、発現量の増加とペプチドによる酵素活性化の2通りが考えられる。しかし、酵素活性化の場合、発現している蛋白質に作用するので、クローンが異なっても活性増大の割合は同じにならなければならない、今回のケースは該当しない。したがって、Peptide2（本発明のペプチド）による活性増大は、発現
5 量変化が関与しているといえる。そこで、R-luc mRNA 量が Peptide2 処理により変化するか調べた。期待通り、Peptide2 処理 6 時間後には、R-lucmRNA 量が増大した（図 2A）。

しかもその増大は、R-luc 活性の増大と相関していた（図 2B）。なお、図 2B 中においては、2 つの独立した実験結果（Experiment 1 および 2）をしめした。
10 以上の結果より、Peptide2 は、導入された R-luc の発現量を、特に活性の低い HeLa/R-luc_B 細胞で激しく活性化することが示された。

さらに、HeLa/R-luc_B で peptide2 の遺伝子再活性化能の経時変化を調べたところ、4 時間で活性化が見られ、8 時間でピークを迎えた。さらに、peptide2 の遺伝子再活性化能は、24 時間後にほぼ消失した。一方、ヒストン脱アセチル化
15 酵素阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) を $1\mu\text{M}$ の濃度で処理すると、12 時間以降に活性が増大した（図 3）。このことから、HeLa/R-luc_B 細胞では染色体に組み込まれた R-luc 遺伝子が周囲の凝集クロマチンにより不活性化を受けている（位置効果）可能性が示唆された。この Peptide2 は TSA と同様に不活性化された遺伝子を再活性化する作用を有することを示す。また、この Peptide2 は TSA
20 と同様に、不活性化した凝集クロマチンの構造を緩め、様々な TSA 様効果を示すと考えられる。さらに、Peptide2 の遺伝子再活性化能は、24 時間後にほぼ消失し、一過的であるため、細胞毒性のある TSA と異なり、Peptide2 の細胞毒性はきわめて低いと考えられる。

25 [配列表フリーテキスト]

配列番号 1：合成ペプチド

配列番号 2：合成ペプチド

配列番号 3：合成ペプチド

配列番号 4：合成ペプチド

配列番号 5 : 合成ペプチド

請 求 の 範 囲

1. 不活化された遺伝子発現の再活性化作用を有するペプチド。
2. 以下の(a)若しくは(b)のペプチド、その誘導体又はこれらの塩。
- 5 (a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むペプチド
(b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において1～11個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、不活化された遺伝子発現の再活性化作用を有するペプチド
3. 請求項2記載のペプチド又はその誘導体を構成するアミノ酸配列の65%以上を含むペプチド、その誘導体又はこれらの塩。
- 10 4. アミノ酸配列の一部に化学修飾が施された、請求項2記載のペプチド、その誘導体又はこれらの塩。
5. 以下の(a)若しくは(b)のペプチド又はその誘導体をコードするポリヌクレオチド。
- 15 (a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むペプチド
(b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において1～11個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、不活化された遺伝子発現の再活性化作用を有するペプチド
6. DNAである請求項5記載のポリヌクレオチド。
- 20 7. 請求項5又は6記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
8. 請求項7記載の組換えベクターを含む形質転換体。
9. 請求項1～4のいずれか1項に記載のペプチド、その誘導体又はこれらの塩を含有してなる医薬組成物。
10. 腫瘍細胞増殖抑制剤である請求項9記載の医薬組成物。
- 25 11. 抗生物質である請求項9記載の医薬組成物。
12. 請求項1～4のいずれか1項に記載のペプチド、その誘導体又はこれらの塩を含有してなる実験用試薬。
13. 細胞工学用試薬である請求項12記載の実験用試薬。

図 1

A.

Peptide 1 : YGRKKRRQRRRMDAQTRRRERRAEKQAQWAAAA
 Peptide 2 : YGRKKRRQRRRMARRIRRLRQRARRRAAAA
 Peptide 1-TAT : MDAQTRRRERRAEKQAQWAAAA
 Peptide 2-TAT : RRDRRRLRQRARRRAAAA

B.

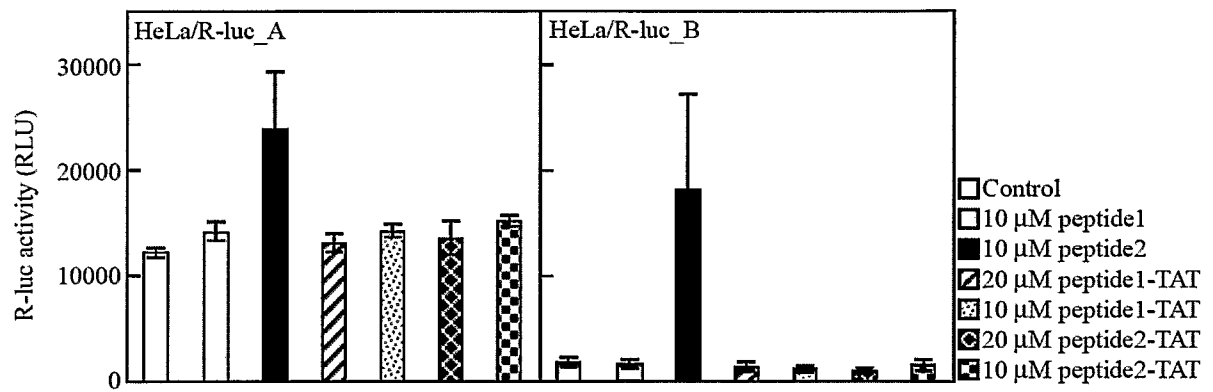
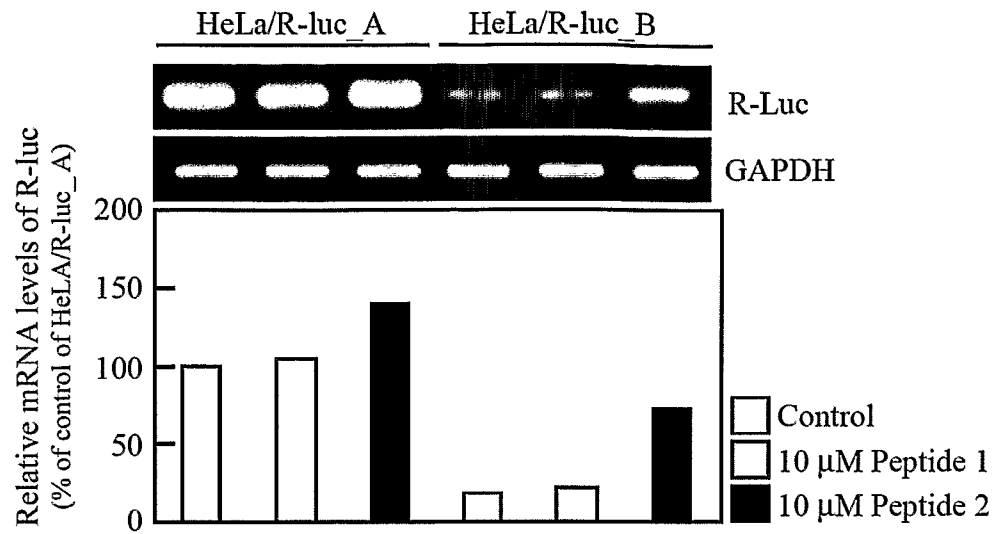


图 2

A



B

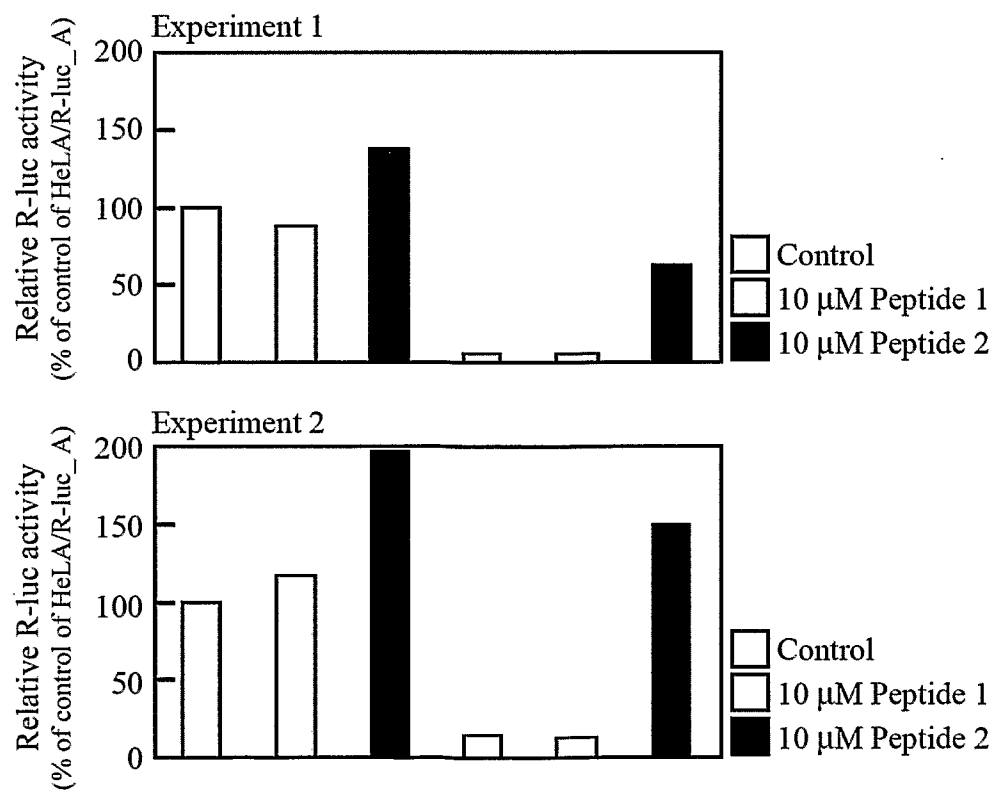
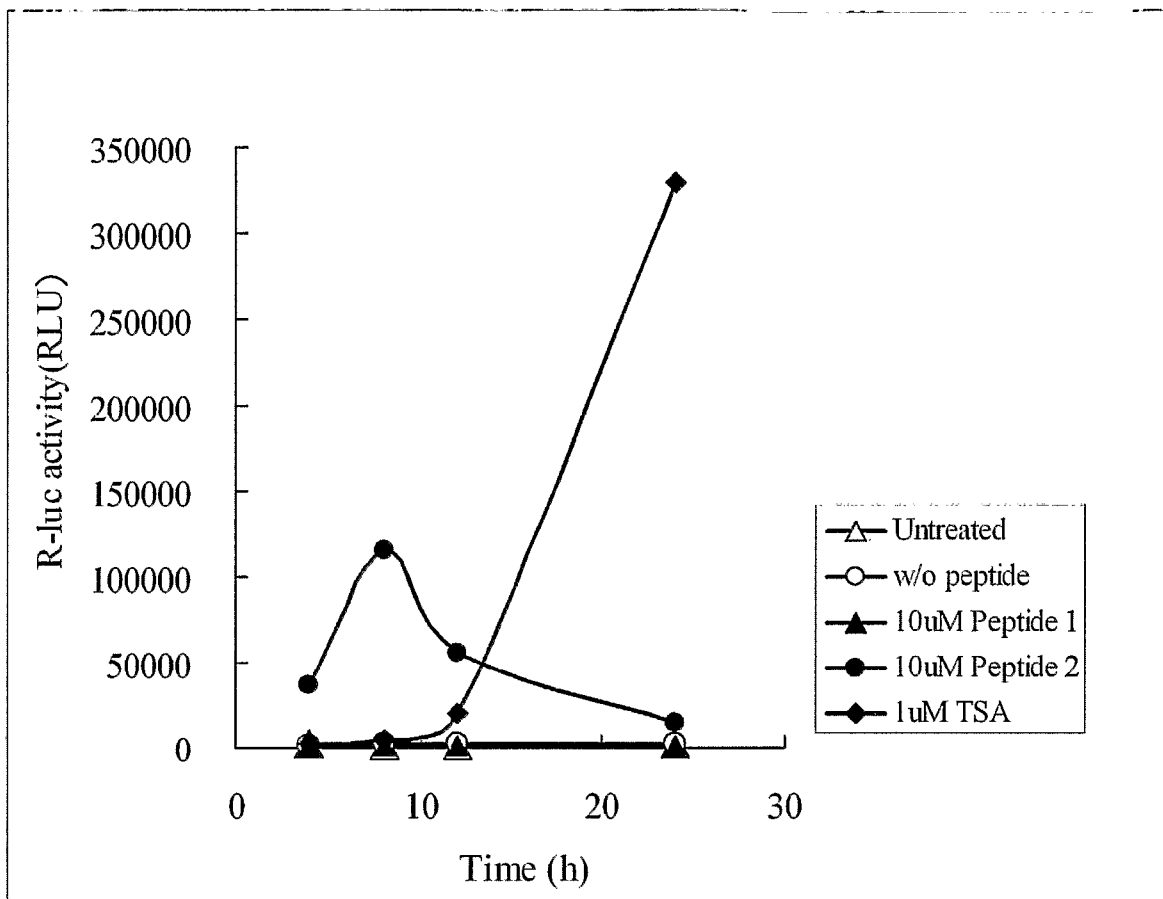


图 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/060083

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K14/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A61K38/00, A61P31/04, A61P35/00, C07K14/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10

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

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

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAPLUS (STN), UniProt /Geneseq, PubMed, JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Tsuyoshi IKEHARA et al., "Chromatin Sai Kosei to Histone no Acetylation", Cell technology, 2001, Vol.20, No.3	1,9-13/2-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 June, 2007 (06.06.07)

Date of mailing of the international search report
19 June, 2007 (19.06.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i,
C07K14/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, A61K38/00, A61P31/04, A61P35/00, C07K14/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CaPlus (STN),
UniProt /Geneseq,
PubMed, JSTPlus (JDream2)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/ A	池原 強, 他, クロマチン再構成とヒストンのアセチル化, 細胞工 学, 2001, Vol. 20, No. 3	1, 9-13/ 2-8

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 6 . 0 6 . 2 0 0 7

国際調査報告の発送日

1 9 . 0 6 . 2 0 0 7

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

三原 健治

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

4 N

3 4 3 4

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. b の続き）

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

- a. タイプ ☒ 配列表
☐ 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット ☐ 紙形式
☒ 電子形式
- c. 提出時期 ☒ 出願時の国際出願に含まれていたもの
☐ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの
☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

2. ☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：