

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-520611

(P2006-520611A)

(43) 公表日 平成18年9月14日(2006.9.14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 Z N A E	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 5
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C O 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 6
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 92 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-509126 (P2006-509126)	(71) 出願人	502458132
(86) (22) 出願日	平成16年3月5日 (2004.3.5)		セネスコ テクノロジーズ, インコーポレイティド
(85) 翻訳文提出日	平成17年10月31日 (2005.10.31)		アメリカ合衆国, ニュージャージー 08901, ニュー ブルンズウィック, スイート 420, ジョージ ストリート 303
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/006598		
(87) 国際公開番号	W02004/078940	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開日	平成16年9月16日 (2004.9.16)		弁理士 青木 篤
(31) 優先権主張番号	60/451,677	(74) 代理人	100077517
(32) 優先日	平成15年3月5日 (2003.3.5)		弁理士 石田 敬
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100087871
(31) 優先権主張番号	10/383,614		弁理士 福本 積
(32) 優先日	平成15年3月10日 (2003.3.10)	(74) 代理人	100087413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 古賀 哲次
(31) 優先権主張番号	60/476,194		
(32) 優先日	平成15年6月6日 (2003.6.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 e I F - 5 A 1 の発現を抑制するための、アンチセンス・オリゴヌクレオチド又は s i R N A の使用

(57) 【要約】

本発明は、アポトーシス因子 5 A 1、又は単純に因子 5 A 1 と呼ばれるアポトーシス特異的真核生物開始因子 5 A 1 (e I F 5 A)、アポトーシス因子 5 A 1 核酸、及びポリペプチド、並びに因子 5 A 1 の発現を抑制するためにアンチセンス・ヌクレオチド又は s i R N A を使用して細胞においてアポトーシスを阻害又は抑制する方法に関する。本発明はまた、アポトーシス因子 5 A の発現を抑制することにより、炎症促進性サイトカインの発現を阻害又は抑制することに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞におけるサイトカイン・レベルの低減方法であって、アポトーシス因子 5 A 1 の発現を低減できる薬剤の投与を含み、ここで該アポトーシス因子 5 A 1 の発現の低減が、上記サイトカインの発現を低減し、それにより上記細胞におけるサイトカイン・レベルを低減する、前記方法。

【請求項 2】

前記サイトカインが、炎症促進性サイトカインである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記サイトカインが、I L - 1、I L - 1 8、I L - 6、又は T N F - である、請求項 2 に記載の方法。 10

【請求項 4】

前記薬剤が、アポトーシス因子 5 A 1 に相補的な配列を有するアンチセンス・ヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記薬剤が、アポトーシス因子 5 A 1 に相補的な配列を有する s i R N A を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記アンチセンス・ヌクレオチドが、配列番号^{*} 6、^{*} 7、及び^{*} 8 からなる群から選ばれる配列を有する、請求項 4 に記載の方法。 20

【請求項 7】

前記アンチセンス・ヌクレオチドが、配列番号^{*} 6、^{*} 7、及び^{*} 8 からなる群から選ばれる配列に、高度に厳密な条件下でハイブリッド形成する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 s i R N A が、配列番号^{*} 1、^{*} 2、^{*} 3、^{*} 4、及び^{*} 5 からなる群から選ばれる配列を有する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 s i R N A が、配列番号^{*} 1、^{*} 2、^{*} 3、^{*} 4、及び^{*} 5 からなる群から選ばれる配列に、高度に厳密な条件下でハイブリッド形成する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 10】

配列番号^{*} 6、^{*} 7、及び^{*} 8 からなる群から選ばれる配列を有するポリヌクレオチド。 30

【請求項 11】

配列番号^{*} 1、^{*} 2、^{*} 3、^{*} 4、及び^{*} 5 からなる群から選ばれる配列を有する s i R N A。

【請求項 12】

p 5 3 の発現の低減方法であって、アポトーシス因子 5 A の発現を低減することができる薬剤を投与することを含み、ここで該アポトーシス因子 5 A 1 の発現の低減が、p 5 3 の発現を低減する、前記方法。

【請求項 13】

B c l - 2 の発現の増加方法であって、アポトーシス因子 5 A の発現を低減することができる薬剤を投与することを含み、ここで該アポトーシス因子 5 A 1 の発現の低減が、p 5 3 の発現を増加する、前記方法。 40

【請求項 14】

T N F - アルファのレベルの低減を必要とする患者において、T N F - アルファのレベルを低減する方法であって、該患者に、請求項 6 又は 7 に記載のアンチセンス・ポリヌクレオチドを投与することを含む、前記方法。

【請求項 15】

T N F - アルファのレベルの低減を必要とする患者において、T N F - アルファのレベルを低減する方法であって、該患者に、請求項 8 又は 9 に記載の s i R N A を投与することを含む、前記方法。 50

【請求項 16】

増大した IL-1、TNF-アルファ、又は IL-6 レベルにより特徴付けられる病的状態を治療する方法であって、該病的状態を有する哺乳動物に、因子 5 a 1 の発現を低減する薬剤を投与することを含む、前記方法。

【請求項 17】

前記病的状態が、リウマチ様関節炎及び骨関節炎、喘息、アレルギー、動脈炎、クローン病、i b d、潰瘍性大腸炎、冠動脈心疾患、嚢胞性線維症、糖尿病、ループス、多発性硬化症、グレーブス病、歯周病、緑内障及び黄斑変性症、円錐角膜を含む眼表面疾患、器官虚血-心臓、腎臓、再灌流損傷、敗血症、多発性骨髄腫、器官移植片拒絶、乾癬及び湿疹からなる群から選ばれる、請求項 16 に記載の方法。

10

【請求項 18】

前記細胞が、上皮細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

単球分化の抑制又は除去方法であって、アポトーシス因子 5 A 1 の発現を低減できる薬剤を投与することを含み、ここで該アポトーシス因子 5 A 1 の発現の低減が、単球分化を抑制又は除去する、前記方法。

【請求項 20】

前記薬剤が、アポトーシス因子 5 a 1 に相補的な配列を有するアンチセンス・ヌクレオチドを含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記薬剤が、アポトーシス因子 5 a 1 に相補的な配列を有する s i R N A を含む、請求項 19 に記載の方法。

20

【請求項 22】

前記アンチセンス・ヌクレオチドが、配列番号*6、*7、及び*8 からなる群から選ばれる配列を有する、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

前記アンチセンスヌクレオチドが、配列番号*6、*7、及び*8 からなる群から選ばれる配列に、高度に厳密な条件下でハイブリッド形成する、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 24】

前記 s i R N A が、配列番号*1、*2、*3、*4、及び*5 からなる群から選ばれる配列を有する、請求項 21 に記載の方法。

30

【請求項 25】

前記 s i R N A が、配列番号*1、*2、*3、*4、及び*5 からなる群から選ばれる配列に、高度に厳密な条件下でハイブリッド形成する、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 26】

緑内障の眼における網膜神経節細胞死を予防する方法であって、網膜神経節細胞においてアポトーシス特異的 e I F 5 A 1 の発現を抑制することを含む、前記方法。

【請求項 27】

前記アポトーシス特異的 e I F 5 A 1 の発現抑制が、前記網膜神経節細胞に、アンチセンス・オリゴヌクレオチドを投与することを含み、ここで該アンチセンス・オリゴヌクレオチドが、ヒト・アポトーシス特異的 e I F 5 A 1 に対して標的される、請求項 26 に記載の方法。

40

【請求項 28】

前記アンチセンス・オリゴヌクレオチドが、配列番号 26 又は 27 である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記アンチセンス・オリゴヌクレオチドが、配列番号 26 であるか、又は配列番号 26 に相補的な配列に厳密な条件下でハイブリッド形成するオリゴヌクレオチドである、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

50

前記アンチセンス・オリゴヌクレオチドが、配列番号 27 であるか、又は配列番号 27 に相補的な配列に厳密な条件下でハイブリッド形成するオリゴヌクレオチドである、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

篩骨篩板細胞においてアポトーシス特異的 eIF5A1 の発現を抑制する方法であって、篩骨篩板細胞に、ヒト・アポトーシス特異的 eIF5A1 を標的とするアンチセンス・オリゴヌクレオチドをトランスフェクションすることを含み、ここで該アンチセンス・オリゴヌクレオチドが、該細胞においてアポトーシス特異的 eIF5A1 の発現を抑制する、前記方法。

【請求項 32】

前記篩骨篩板細胞がヒト由来である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記アンチセンス・オリゴヌクレオチドが、配列番号 26 であるか、又は配列番号 26 に相補的な配列に、厳密な条件下でハイブリッド形成するオリゴヌクレオチドである、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 34】

前記アンチセンス・オリゴヌクレオチドが、配列番号 27 であるか、又は配列番号 27 に相補的な配列に、厳密な条件下でハイブリッド形成するオリゴヌクレオチドである、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 35】

星状細胞においてアポトーシス特異的 eIF5A1 の発現を抑制する方法であって、星状細胞に、ヒト・アポトーシス特異的 eIF5A1 を標的とするアンチセンス・オリゴヌクレオチドをトランスフェクションすることを含み、ここで該アンチセンス・オリゴヌクレオチドが、該細胞においてアポトーシス特異的 eIF5A1 の発現を抑制する、前記方法。

【請求項 36】

前記星状細胞がヒト由来である、請求項 35 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、アポトーシス特異的 真核生物開始因子-5A (eIF-5A)、つまりアポトーシス因子 5A 若しくは因子 5A1 又はアポトーシス特異的 eIF-5A と呼ばれるもの、及びデオキシハイプシン・シンターゼ (DHS) に関する。本発明は、アポトーシス因子 5A 及び DHS の核酸及びポリペプチド、並びにアポトーシス因子 5A 及び DHS の発現抑制方法に関する。

【0002】

関連出願

本出願は、2003 年 3 月 10 日に提出された継続中の米国出願第 10/383,614 号であり、2002 年 10 月 23 日に提出された継続中の米国出願第 10/277,969 号であり、2002 年 7 月 23 日に提出された米国出願第 10/200,148 号であり、2002 年 5 月 7 日に提出された米国出願第 10/141,647 号であり、2001 年 7 月 23 日に提出された米国出願第 9/909,796 号であり、これら全ての出願は、本明細書中にその全てを援用される。本出願はまた、2003 年 3 月 5 日に提出された米国仮出願 60/451,677 号；2003 年 6 月 6 日に提出された米国仮出願 60/476,194 号、2003 年 9 月 22 日に提出された 60/504,731 号に優先権を主張する。これら全ての出願は、本明細書中にその全てを援用される。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

アポトーシスは、明確な形態的特徴、例えば細胞収縮、クロマチン凝集、核の断片化、

10

20

30

40

50

及び膜小胞により特徴付けられる遺伝的にプログラムされた細胞の事象である(Kerr et al. (1972) Br. J. Cancer, 26,239-257 ; Wyllie et al. (1980) Brit. Rev. Cytol., 68, 251-306)。アポトーシスは、通常の組織発生及び恒常性において重要な役割を果たし、そしてアポトーシスプログラムの欠落が、神経変性及び自己免疫疾患から新生物までの範囲の広範なヒト疾患に寄与すると考えられている(Thompson (1995) Science, 267,1456-1462 ; Mullauer et al. (2001) Mutat. Res, 488, 211-231)。アポトーシス細胞の形態的特徴は、明確に特徴づけられているが、この過程を制御する分子経路は、解明され始めてきたに過ぎない。

【 0 0 0 4 】

アポトーシスにおいて重要な役割を担うと考えられているタンパク質の一群は、カスパーゼと呼ばれるシステイン・プロテアーゼ・ファミリーであり、アポトーシスの多くの経路に必要とされるようである(Creagh & Martin (2001) Biochem. Soc. Trans, 29,696-701 ; Dales et al. (2001) Leuk. Lymphoma, 41,247-253)。カスパーゼは、種々の細胞内タンパク質を切断することにより、アポトーシス刺激に応答してアポトーシスを引き起こし、これにより細胞収縮、膜小胞形成、及びDNA断片化を含むアポトーシスの古典的特徴がもたらされる(Chang & Yang (2000) Microbiol. Mol. Biol. Rev., 64,821-846)。

【 0 0 0 5 】

アポトーシス促進性タンパク質、例えばBax又はBakはまた、カスパーゼ活性化分子、例えばミトコンドリア・シトクロームcを放出することによりアポトーシス経路において重要な役割を果たし、それによりアポトーシスを介した細胞死を促進する(Martinou & Green (2001) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2,63-67; Zou et al. (1997) Cell, 90,405-413)。抗-アポトーシス・タンパク質、例えばBcl-2は、アポトーシス促進性タンパク質、Bax及びBakの活性を拮抗作用することにより細胞の生存を促進する(Tsujimoto (1998) Genes Cells, 3,697-707 ; Kroemer (1997) Nature Med., 3, 614-620)。Bax : Bcl-2の比は、細胞の運命を決定付ける一の様式であると考えられ、過剰量のBaxは、アポトーシスを促進し、そして過剰量のBcl-2は、細胞の生存を促進する(Salomons et al. (1997) Int. J. Cancer, 71,959-965 ; Wallace-Brodeur & Lowe (1999) Cell Mol. Life Sci., 55,64-75)。

【 0 0 0 6 】

アポトーシスに關与する他の主要タンパク質は、腫瘍抑制遺伝子p53によりコードされるタンパク質である。このタンパク質は、細胞成長を制御する転写因子であり、そして損傷を受けた及び遺伝的に不安定な細胞において、おそらくBaxの上方制御を介してアポトーシスを誘導する(Bold et al. (1997) Surgical Oncology, 6,133-142 ; Ronen et al., 1996; Schuler & Green (2001) Biochem. Soc. Trans., 29, 684-688 ; Ryan et al. (2001) Curr.Opin. Cell Biol., 13,332-337 ; Zornig et al. (2001) Biochem. Biophys. Acta, 1551, F1-F37)。

【 0 0 0 7 】

アポトーシスを起している細胞を特徴付ける明確な形態的特徴により、アポトーシスの開始及び進行を評価するための多くの方法が生み出されてきた。アポトーシスを起している細胞の検出に使用できる該細胞の1のそうした特徴は、フリッパーゼの活性化であり、原形質膜の内部小胞(inner leaflet)に通常局在するホスファチジルセリン、リン脂質の外局在化をもたらし(Fadok et al. (1992) J. Immunol., 149,4029-4035)。外局在化されたホスファチジルセリンを有するアポトーシスを起している細胞は、蛍光色素に結合されたホスファチジルセリン結合性タンパク質、アネキシンVにより検出されうる。アポトーシス・プロセスの間生じる特徴的なDNA断片化は、DNA断片の晒された3'-OHを、蛍光標識されたデオキシヌクレオチドで標識することにより検出されうる。核酸に結合する蛍光色素、例えばヘキスト33258は、クロマチン凝集及びアポトーシスを起している細胞における核断片化を検出するために使用されうる。細胞集合におけるアポトーシスの程度は、細胞抽出物において存在するカスパーゼのタンパク質分解活性の程度からも推察されうる。

【 0 0 0 8 】

遺伝的に定義されたプロセスとして、アポトーシスは、他の発生プログラムと同様に、突然変異によって乱されうる。アポトーシス経路の変化は、癌を含む多くの疾病プロセスにおいて主要な役割を担うことが信じられている(Wyllie et al. (1980) *Irroit. Rev. Cytol.*, 68,251-306 ; Thompson (1995) *Science*, 267,1456-1462 ; Sen & D'Incalci (1992) *FEBSLetters*, 307,122-127 ; McDonnell et al. (1995) *Seminars in Cancer and Biology*, 6, 53-60)。癌の発生と進行の研究は、伝統的に細胞増殖に焦点を当ててきた。しかしながら、腫瘍形成においてアポトーシスが担う重要な役割が最近明らかにされてきた。実際、アポトーシスについて現在知られていることの多くは、腫瘍モデルを使用して知られるようになった。なぜなら、アポトーシスの制御は、腫瘍細胞において何らかの方法により常に変化されているからである(Bold et al. (1997) *Surgical Oncology*, 6, 133-142)。

10

【 0 0 0 9 】

アポトーシスは、腫瘍発生の間、種々のシグナルにより引き起こされうる。細胞外シグナルは、成長又は生存因子の減少、低酸素状態、及び電離放射線を含む。アポトーシスを引き起こしうる内部シグナルは、DNA損傷、テロメアの短縮、及び不適切な増殖シグナルをもたらす発癌性の突然変異を含む(Lowe & Lin (2000) *Carcinogenesis*, 21, 485-495)。悪性腫瘍を治療するために使用される電離放射線及びほとんど全ての細胞傷害性の化学療法薬は、内在性のアポトーシスメカニズムを引き起こすことにより作用して、細胞死を導くと考えられている(Rowan & Fisher (1997) *Leukemia*, 11,457-465 ; Kerr et al. (1994) *Cancer*, 73,2013-2026 ; Martin & Schwartz (1997) *Oncology Research*, 9,1-5)。

20

【 0 0 1 0 】

癌の進行の初期において、腫瘍細胞は、アポトーシスを誘導する薬剤(例えば、電離放射線又は化学療法薬)に感受性であるということが、証拠により示される。しかしながら、腫瘍が進行するにつれて、細胞は、アポトーシスの刺激に対して抵抗性を発達させる(Naik et al. (1996) *Genes and Development*, 10,2105-2116)。これにより、初期の癌がより進行した癌よりも治療によりよく反応するという理由が説明されるかもしれない。後期の癌が、化学療法及び放射線治療に抵抗性を発達させる能力は、腫瘍細胞がアポトーシス刺激に応答する能力を制限するアポトーシス経路に関連しているようである(Reed et al. (1996) *Journal of Cellular Biology*, 60,23-32 ; Meyn et al. (1996) *Cancer Metastasis Reviews*, 15, 119-131 ; Hannun (1997) *Blood*, 89, 1845-1853; Reed (1995) *Toxicology Letters*, 82-83, 155-158 ; Hickman (1996) *European Journal of Cancer*, 32A, 921-926)。化学療法に対する抵抗性は、慢性リンパ性白血病及び大腸癌の各々において、抗アポトーシス性の遺伝子 bcl-2 の過発現、及びアポトーシスを促進する bax 遺伝子の欠失又は突然変異に関連してきた。

30

【 0 0 1 1 】

腫瘍細胞が播種性転移を首尾よく行う能力はまた、アポトーシス経路の変化に関連するようである(Bold et al. (1997) *Surgical Oncology*, 6,133-142)。例えば、腫瘍抑制遺伝子 p53 の突然変異は、70%の腫瘍において生じると考えられている(Evan et al. (1995) *Curr : Opin. Cell Biol.*, 7,825-834)。p53 を不活性化する突然変異は、DNA損傷に応答してアポトーシスを誘導する細胞の能力を制限し、細胞をさらなる突然変異を受けやすいものにする(Ko & Prives (1996) *Genes and Development*, 10,1054-1072)。

40

【 0 0 1 2 】

それゆえ、アポトーシスは、悪性形質転換及び転移の発生及び進行に密接に関連し、そして関連するアポトーシス経路をよりよく理解することにより、遺伝子治療アプローチを通じたアポトーシス経路の調節による癌治療のための新規の潜在的標的をもたらされうる(Bold et al. (1997) *Surgical Oncology*, 6, 133-142)。

【 0 0 1 3 】

本発明は、アポトーシスの誘導直前に上方制御される eIF-5A・cDNA のクロー

50

ニングに関する。このアポトーシス特異的 e I F - 5 A は、アポトーシスにより引き起こされる病状において、本発明の適切な標的となるようである。なぜなら、e I F - 5 A は、アポトーシス経路に関与する下流エフェクター及び転写因子を転写後制御するレベルで作用するようであるからである。特異的に、アポトーシス特異的 e I F - 5 A は、アポトーシスの下流エフェクター及び転写因子をコードする m R N A の核から細胞質への移動を選択的に促進するようであり、続いて細胞質において m R N A は翻訳される。アポトーシスを開始する最終的な決定は、内部及び外部におけるアポトーシスを促進するシグナルとアポトーシスを抑制するシグナルとの間の複合相互作用から生じるようである (Lowe & Lin (2000) *Carcinogenesis*, 21,485-495)。アポトーシスの下流エフェクター及び転写因子の翻訳を促進する能力を介して、アポトーシス関連 e I F - 5 A は、シグナル間のバランスをアポトーシスの側に傾けるようである。 10

【 0 0 1 4 】

以前に記載されたように、抗癌剤がアポトーシスを誘導し、そしてアポトーシス経路の変化が、薬剤誘導性の細胞死を弱め得るということが認められた (Schmitt & Lowe (1999) *J. Pathol.*, 187,127-137)。例えば、多くの抗癌剤は p 5 3 を上方制御し、そして p 5 3 を欠失した腫瘍細胞は、これらの薬剤に対し抵抗性を発達させる。しかしながら、ほとんど多くの化学療法薬は、投与量が十分であるならば p 5 3 に依存せずアポトーシスを誘導することができ、このことは、薬剤抵抗性の腫瘍においてさえ、アポトーシスへの経路が完全にブロックされているわけではないということを示している (Wallace-Brodeur & Lowe (1999) *Cell Mol. Life Sci.*, 55,64- 75)。このことにより、アポトーシス e I F - 5 A は突然変異した遺伝子を訂正しないが、アポトーシス e I F - 5 A の誘導は、p 5 3 依存性の経路を迂回し、そして代替の経路を促進することによりアポトーシスを誘導できるかもしれないということが示される。 20

【 0 0 1 5 】

アポトーシス関連 e I F - 5 A は、通常の近接する細胞に影響をほとんど与えないか又は全く与えない一方で、癌細胞を選択的に標的する潜在能力を有する。腫瘍細胞において発現される分裂促進的癌遺伝子が、通常細胞では存在しない特定種類の m R N A の形態でアポトーシス・シグナルを提供することのために、上記能力が生じる (Lowe et al. (1993) *Cell*, 74, 954-967; Lowe & Lin (2000) *Carcinogenesis*, 21,485-495)。例えば、p 5 3 突然変異腫瘍細胞における野生型 p 5 3 の修復は、直接的にアポトーシスを誘導し、そして腫瘍細胞系列及び異種移植において薬剤感受性を増大させる (Spitz et al., 1996; Badie et al. 1998))。 30

【 0 0 1 6 】

アポトーシス - e I F - 5 A の選択性は、アポトーシス - e I F - 5 A が、核から細胞質へのアポトーシスの下流エフェクター及び転写因子の m R N A の移動を仲介することにより、アポトーシスの下流エフェクター及び転写因子の m R N A の翻訳を選択的に促進するという事実から生じる。こうして、アポトーシス e I F - 5 A が効果を有するためには、これらのエフェクター及び転写因子についての m R N A が、転写されていなければならない。これらの m R N A は、癌細胞において転写されるが、近接する通常の細胞において転写されないかぎり、アポトーシス e I F - 5 A が癌細胞でアポトーシスを促進するが、通常細胞ではあるとしても最小効果しか有しないということが予期される。こうして、腫瘍細胞において、アポトーシス関連 e I F - 5 A でアポトーシスを起す潜在能力を修復することにより、癌患者が受ける毒性及び副作用は、腫瘍細胞の選択的に標的するため低減される。アポトーシス e I F - 5 A の誘導はまた、腫瘍細胞の抗癌剤への応答を増強し、それにより薬剤耐性腫瘍に対するこれらの薬剤の有効性を改良する可能性を有する。次に、アポトーシス e I F - 5 A の誘導は、有効性を有する抗癌剤のより少ない投与量と、患者に対する低減された毒性をもたらさう。 40

【 0 0 1 7 】

アポトーシス経路における変化はまた、緑内障による盲目を引き起こす網膜神経節細胞の変性に、重要な役割を果たすと信じられている。緑内障は、増大した眼内圧 (I O P) が 50

、視神経の損傷及び進行性の盲目を引き起こす目の病気の群を表す。緑内障は、現在、視神経への損傷を低減するために、IOPを制御する薬剤又は外科手術、或いはニューロ・プロテクター(neuro-protector)の使用によって管理されるが、緑内障眼におけるアポトーシスによる変性から網膜神経節細胞を保護する必要性が残る。

【0018】

サイトカインはまた、アポトーシス経路に関わっている。生物学的なシステムは、システムの制御のため細胞間相互作用を必要とし、そして一般的に多種多様のサイトカインが細胞間のクロストークに関与している。サイトカインは、多種の刺激に応答して多くの異なる細胞型により産生されるメディエーターである。サイトカインは、多くの異なる細胞型に多くの異なる効果を発揮できる多面的な分子であるが、特に免疫応答並びに造血細胞の増殖及び分化を調節する点で重要である。標的細胞へのサイトカインの作用は、固有のサイトカイン、相対濃度、及び他のメディエーターの存在に依存して、細胞の生存、増殖、活性化、分化、又はアポトーシスを促進できる。

10

【0019】

自己免疫疾患(乾癬、リウマチ様関節炎、クローン病)を治療するために、抗サイトカインを使用することは、一般的に受け入れられてきている。炎症促進性サイトカイン、IL-1及びTNFは、これらの慢性疾患の病状に大きな役割を果たし、そしてこれら2種のサイトカインの生理活性を低減する抗サイトカイン治療は、治療効果を提供することができる(Dinarelli and Abraham, 2002)。

【0020】

インターロイキン1(IL-1)は、局所的及び全身性の炎症反応を仲介する重要なサイトカインであり、そしてIL-1は、脈管炎、骨粗鬆症、神経変性疾患、糖尿病、ループス腎炎、及び自己免疫疾患、例えばリウマチ様関節炎を含む多くの疾患の発症においてTNFと相乗作用を与えることができる。メラノーマ細胞で注射された際のIL-1ノックアウトマウスの転移及び血管形成に対する抵抗性によって、腫瘍血管形成及び侵襲性におけるIL-1の重要性が示された(Voronov et al., 2003)。

20

【0021】

インターロイキン18(IL-18)は、IL-1ファミリーの最近発見されたメンバーであり、そしてIL-1の構造、受容体、及び機能に関係を有する。IL-18は、インターフェロン-(IFN-)、TNF-、及びIL-1を誘導するその能力の結果として炎症性及び自己免疫疾患に関与する中心サイトカイン(central cytokine)である。IL-1及びIL-18は両方とも、心筋虚血の期間における心機能不全に寄与すると知られているサイトカインであるTNF-の産生を誘導することができる(Maekawa et al., 2002)。IL-18結合タンパク質で中和することによるIL-18の阻害が、表面灌流されたヒト心房心筋の虚血/再灌流モデルにおける虚血誘導性心筋機能障害を低減することが発見された(Dinarelli 2001)。マウスIL-18結合タンパク質を使用するIL-18の中和は、IFN-、TNF-アルファ、及びIL-1転写レベルを低減でき、そしてコラーゲン誘導性関節炎マウスモデルにおいて関節の損傷を低減することができた(Banda et al., 2003)。IL-18結合タンパク質をマウス・メラノーマモデルに注射することによりうまく転移が抑制されたので、IL-18産生又は利用可能性の低下によって転移性癌を制御する利点が証明されうる(Carrascal et al., 2003)。炎症促進性サイトカインとしての重要性をさらに指し示すものとして、IL-18の血漿レベルは、慢性肝臓疾患を患う患者において上昇し、そして増大したレベルは、疾患の重篤度と相関した(Ludwiczek et al., 2002)。同様にIL-18及びTNF-は、腎障害を患う糖尿病患者の血清において増加した(Moriwaki et al., 2003)。外傷性脳損傷の後に生じる神経炎症はまた、炎症促進性のサイトカインにより仲介され、そしてIL-18結合タンパク質によるIL-18の阻害は、脳外傷後のマウスにおいて神経の回復を改善した(Yatsiv et al., 2002)。

30

40

【0022】

サイトカインのTNFファミリーのメンバーであるTNF-は、造血細胞への共分裂促進効果から、炎症応答の誘導、及び多くの細胞型における細胞死の誘導に及ぶ多面的な

50

効果を有する炎症促進性サイトカインである。TNF- は、通常、細菌のリポ多糖、寄生生物、ウイルス、悪性細胞、及びサイトカインにより誘導され、そして感染及び癌から細胞を保護するために通常有利に作用する。しかしながら、TNF- の不適切な誘導は、急性及び慢性の炎症、例えば、自己免疫疾患からもたらされる疾患に対して主に関与するものであり、そして癌、AIDS、心臓疾患、及び敗血症にも関与しうる (Aggarwal and Natarajan, 1996; Sharma and Anker, 2002に総説される)。実験動物モデルの疾患 (つまり、敗血症ショック及びリウマチ様関節炎)、並びにヒト疾病 (つまり、炎症性腸疾患、及び急性移植片対宿主疾患) は、TNF- をブロックする有利な効果を示した (Wallach et al., 1999)。TNF- の抑制は、クローン病 (van Deventer, 1999) 及びリウマチ様関節炎 (Richard-Miceli and Dougados, 2001) などの自己免疫疾患を患う患者の症状を軽減する点で有効であった。Bリンパ球の生存及び成長を促進するTNF- の能力は、B細胞慢性リンパ性白血病 (B-CLL) の発症において、役割を果たすと考えられ、そしてB-CLLにおけるT細胞により発現されるTNF- のレベルは、腫瘍の質量及び疾患ステージと正に相関した (Bojarska-Junak et al., 2002)。インターロイキン1- (IL-1) は、TNF- 産生を誘導することが知られているサイトカインである。

10

【0023】

デオキシハイブシン・シンターゼ (DHS) 及びハイブシンを含む真核生物翻訳開始因子-eIF-5A (eIF-5A) は、細胞成長及び分化を含む多くの細胞プロセスで、重要な役割を果たすことが知られている。極めて稀なアミノ酸であるハイブシンは、全ての試験された真核生物及び古細菌において見つかったが、真性細菌では見つからず、そしてeIF-5Aは、唯一知られているハイブシンを含むタンパク質である (Park (1988) J. Biol. Chem., 263,7447-7449; Schumann & Klink (1989) System. Appl. Microbiol., 11,103-107; Bartig et al. (1990) System. Appl. Microbiol., 13,112-116; Gordon et al. (1987a) J. Biol. Chem., 262,16585-16589)。活性eIF-5Aは、2つの翻訳後ステップで形成される。第一ステップは、デオキシハイブシン・シンターゼにより触媒作用されるeIF-5A前駆体の或るリジンの α -アミノ基に、スベルミジンの4-アミノブチル成分を移すことにより、デオキシハイブシン残基を形成することである。第二ステップは、デオキシハイブシン・ヒドロキシラーゼにより4-アミノブチル成分を水酸化して、ハイブシンを形成することを含む。

20

【0024】

eIF-5Aのアミノ酸配列が種の間でよく保存されており、そしてeIF-5Aにおけるハイブシン残基の周辺のアミノ酸配列が厳密に保存されており、以上の事からこの修飾が生存するために重要であることが提案される (Park et al. (1993) Biofactors, 4,95-104)。この仮定は、今日まで酵母において見つかったeIF-5Aのアイソフォームの両方の不活性化、又はDHS遺伝子活性化状態で第一ステップを触媒するDHS遺伝子の不活性化が、細胞分裂を阻害したという観察によりさらに支持される (Schnier et al. (1991) Mol. Cell. Biol., 11,3105-3114; Sasaki et al. (1996) FEBS Lett., 384,151-154; Park et al. (1998) J. Biol. Chem., 273,1677-1683)。しかしながら、酵母においてeIF-5Aタンパク質を枯渇することは、全体のタンパク質合成において少しの減少をもたらすのみであり、eIF-5Aが、タンパク質の全体の合成よりはむしろ、特異的なmRNAのサブセット翻訳に必要とされていることを示唆する (Kang et al. (1993), "Effect of initiation factor eIF-5A depletion on cell proliferation and protein synthesis," in Tuite, M. (ed), Protein Synthesis and Targeting in Yeast, NATO Series H)。eIF-5Aに結合するリガンドは、高度に保存されたモチーフを共有するという最近の発見は、eIF-5Aの重要性を支持する (Xu & Chen (2001) J. Biol. Chem., 276,2555-2561)。さらに、改変されたeIF-5Aのハイブシン残基は、RNAへの配列特異的な結合に必須であり、そしてこの結合がリボヌクレアーゼからの保護を提供しないということが発見された。

30

40

【0025】

さらに、eIF-5Aの細胞内欠損が、核における特異的mRNAの有意な増加をもた

50

らし、e I F - 5 A が、核から細胞質への m R N A の特異的クラスを輸送することに関与しているということを指し示す。(Liu & Tartakoff (1997) Supplement to Molecular Biology of the Cell, 8,426a. Abstract No. 2476,37th American Society for Cell Biology Annual Meeting)。核孔付随核内フィラメント(nuclear pore-associated intranuclear filament)での e I F - 5 A の増大、及びその一般的核輸送受容体との相互作用により、e I F - 5 A が、ポリソームの要素というよりはむしろ、核・細胞質間輸送タンパク質であるということがさらに提案される(Rosorius et al. (1999) J. Cell Science, 112,2369-2380)。

【 0 0 2 6 】

e I F - 5 A についての第一 c D N A は、1989年に、Smit-McBride et al.,によりヒトからクローニングされ、そしてそれから e I F - 5 A の c D N A 又は遺伝子は、種々の真核生物、例えば酵母、ラット、ニワトリの胚、アルファルファ、及びトマトなどからクローニングされた(Smit-McBride et al. (1989a) J. Biol. Chem., 264,1578-1583 ; Schnier et al. (1991) (酵母); Sano, A. (1995) in Imahori, M. et al. (eds), Polyamines, Basic and Clinical Aspects, VNU Science Press, The Netherlands, 81-88 (ラット); Rinaudo & Park (1992) FASEB J., 6, A453 (ニワトリ胚); Pay et al. (1991) Plant Mol. Biol., 17,927-929 (アルファルファ); Wang et al. (2001) J. Biol. Chem., 276,17541- 17549 (トマト)。

【 0 0 2 7 】

e I F - 5 A ・ m R N A の発現は、種々のヒト組織及び哺乳動物細胞系列で探索された。例えば、e I F - 5 A 発現の変化は、血清飢餓に続いて血清添加後、ヒト線維芽細胞において調べられた(Pang & Chen (1994) J. Cell Physiol., 160, 531-538)。デオキシハイプシン・シンターゼ活性が年齢依存的に減少すること、及び e I F - 5 A の前駆体を多く含むことが、感覚器の線維芽細胞において観測された。しかしながら、アイソフォームの差異の平均化を反映する可能性は、測定されなかった(Chen & Chen (1997b) J. Cell Physiol., 170, 248-254)。

【 0 0 2 8 】

研究により、e I F - 5 A が、ウイルスタンパク質、例えば、ヒト免疫不全ウイルス 1 型 R e v タンパク質、及び T 細胞白血病ウイルス 1 型 R e x タンパク質などのウイルスタンパク質の細胞標的でありうるということが示された(Ruhl et al. (1993) J. Cell Biol., 123,1309-1320 ; Katahira et al. (1995) J. Virol., 69,3125-3133)。以前の研究により、e I F - 5 A が、他の R N A -結合タンパク質、例えば R e v と相互作用することにより、R N A を標的し得るということが示され、これらのウイルスタンパク質が e I F - 5 A をウイルス R N A プロセッシングにリクルートするということが示唆された(Liu et al. (1997) Biol. Signals, 6, 166-174)。

【 0 0 2 9 】

こうして、e I F 5 A 及び D H S は周知であるが、どうやってこれらのタンパク質がアポトーシス経路に関与するかを理解する必要性、並びにアポトーシス及びサイトカイン発現を調節することができるサイトカイン刺激を理解する必要性が残っている。本発明は、この必要性を満たすものである。

【 発明の開示 】

【 0 0 3 0 】

発明の要約

本発明は、アポトーシス因子 5 A 1 又は単純に 5 A 1 と呼ばれる、アポトーシス特異的真核生物開始因子 5 A (e I F - 5 A)に関する。本発明はまた、アポトーシス因子 5 A 1 核酸及びポリペプチド、並びにアンチセンス・ヌクレオチド又は s i R N A を使用して因子 5 A 1 の発現を抑制するアポトーシスの阻害又は抑制方法にも関する。本発明はまた、アポトーシス因子 5 A 1 の発現を抑制することにより、炎症促進性サイトカインの発現を抑制または阻害することにも関する。さらに、本発明は、アポトーシス因子 5 A 1 の発現を抑制することによって、p 5 3 の発現を抑制又は阻害することに関する。本発明はまた

10

20

30

40

50

、アンチセンス・ヌクレオチド又は *siRNA* を使用して、アポトーシス因子 5 A 1 の発現を阻害又は抑制することにより、Bcl-2 の発現を増大させる方法にも関する。本発明はまた、ヒト上皮細胞において、サイトカイン、特に TNF- α の産生を抑制する方法を提供する。本発明の他の実施態様では、アポトーシス特異的 eIF5A1 で標的されたアンチセンス・オリゴヌクレオチドの使用により、アポトーシス特異的 eIF5A1 の発現を抑制することにより、緑内障の眼において網膜神経節細胞を抑制する方法が提供される。本発明はまた、アンチセンス・オリゴヌクレオチド又は *siRNA* で eIF-5A の発現を制御することにより、樹上細胞成熟及び PBM C 活性化の割合を制御する方法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

10

【0031】

発明の詳細な説明

真核生物開始因子 5 a (eIF-5A) の幾つかのアイソフォームが単離され、そして公表されたデータベースに存在する。これらのアイソフォームが、機能的に重複していると考えられた。本発明者は、アポトーシスの誘導の直前に 1 つのアイソフォームが上方制御されるということを発見し、本発明者はこのアイソフォームをアポトーシス因子 5 A、又はアポトーシス特異的 eIF-5A、又は因子 5 A 1、又は eIF5A1 と名付けた。本発明の対象は、アポトーシス因子 5 並びに eIF-5A の活性化に關与する DHS である。

【0032】

20

アポトーシス因子 5 A は、アポトーシスが引き起こす病状を介入するために適した標的であるようだ。なぜなら、アポトーシス因子 5 A は、アポトーシス経路に關与する下流のエフェクター及び転写因子の転写後調節のレベルで作用するようだからである。特異的に、アポトーシス因子 5 A は、アポトーシスの下流エフェクター及び転写因子をコードする mRNA の核から細胞質への mRNA の移動を選択的に促進するようであり、続いて細胞質で mRNA は翻訳される。アポトーシスを開始するための最終的な決定は、内部と外部のアポトーシス促進性シグナルとアポトーシス抑制性シグナルとの間の複雑な相互作用から生じるようである (Lowe & Lin (2000) Carcinogenesis, 21,485-495)。アポトーシスの下流エフェクター及び転写因子の翻訳を促進する能力を介して、アポトーシス因子 5 A は、シグナル間のバランスをアポトーシスの側に傾けるようである。

30

【0033】

従って、本発明は、アポトーシス因子 5 A 又は DHS の発現を抑制又は低減する薬剤を投与することにより細胞のアポトーシスを抑制又は低減する方法を提供する。アポトーシス因子 5 A 又は DHS の発現を抑制又は低減できる 1 の薬剤は、アンチセンス・オリゴヌクレオチドである。

【0034】

アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、in vitro 及び in vivo で、遺伝子特異的な抑制を達成するために首尾よく使用されてきた。アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、短い DNA (又は DNA アナログ) の合成鎖であって、特異的 DNA 又は RNA 標的のアンチセンスである (つまり相補的である) 鎖である。アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、標的に結合し、そして転写、翻訳、又はスプライシングのレベルで発現を止めることにより、DNA 又は RNA 標的によりコードされるタンパク質の発現を阻止するように設計される。分解に抵抗性である改変骨格 (Blake et al., 1985) を使用することにより、例えばオリゴヌクレオチド中のホスホジエステル結合を、ホスホロチオエート結合へと置換して、ヌクレアーゼ分解を妨害すること (Matzura and Eckstein, 1968) により、アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、細胞培養及び疾患の動物モデルの両方において首尾よく使用されてきている (Hogrefe, 1999)。

40

【0035】

好ましくは、本発明のアンチセンス・オリゴヌクレオチドは、アポトーシス因子 5 A ポリペプチド又はアポトーシス特異的 DHS ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を

50

有する。本発明者は、種々の細胞系列に、以下に記載されるアポトーシス因子 5 A ポリペプチドのタンパク質をコードするアンチセンス・ヌクレオチドをトランスフェクションし、そしてアポトーシスを起す細胞の数を計測した。アンチセンスオリゴヌクレオチドでトランスフェクションされた細胞は、アンチセンス・オリゴでトランスフェクションされていない細胞と比較して、アポトーシスを起している細胞の数の減少を示した。図 5 4 - 5 8 は、アンチセンス・アポトーシス因子 5 A オリゴヌクレオチドで処理された細胞において、アンチセンス・アポトーシス因子 5 A オリゴヌクレオチドでトランスフェクションされていない細胞と比較して、アポトーシスを起している細胞の割合 (%) の低下を示した。

【 0 0 3 6 】

本発明は、アポトーシス因子 5 A ポリペプチド又は D H S ポリペプチドをコードする多くの適切な核酸配列の使用を考慮する。例えば、配列番号 1、3、4、5、11、15、19、20、及び 21 (アポトーシス因子 5 A 核酸配列)、配列番号 6 及び 8 (アポトーシス特異的 D H S 核酸配列)、配列番号 12 及び 16 (アポトーシス因子 5 A 配列)、及び配列番号 7 (アポトーシス特異的 D H S ポリペプチド配列)、或いはそれらの一部は、適切な配列を提供する。他の好ましいアポトーシス因子 5 A 配列は、配列番号 6、7、及び 8 を含む。更なるアンチセンス・ヌクレオチドは、上で列挙されたものと実質的な配列同一性 (つまり 90 % の相同性) を有するヌクレオチド、又はかなり厳しい条件下で、列挙された配列番号にハイブリッド形成する配列を有するヌクレオチドを含む。さらに、他の適切な配列は、当該技術分野に周知の方法に従って、既知の配列をプローブとして使用して見つけれられた。

【 0 0 3 7 】

本発明のアンチセンス・オリゴヌクレオチドは、一本鎖、二本鎖の D N A、R N A、又はハイブリッドであってもよい。オリゴヌクレオチドは、安定性、ヌクレアーゼ抵抗性などを増大するために、当該技術分野に周知方法によって改変されてもよい。これらの改変は、当該技術分野に周知であり、非限定的にオリゴヌクレオチドの骨格を改変し、糖部分を改変し、又は塩基を改変することを含む。種々の D N A - R N A ハイブリッド又は「ギャップ」オリゴヌクレオチドと通常呼ばれる構築物も、これらの改変に含まれる。

【 0 0 3 8 】

本発明は、アポトーシス因子 5 A 又は D H S の発現を抑制又は低減することができる他の薬剤を提供する。1 のそうした薬剤は、s i R N A である。低分子抑制 R N A (s i R N A) は、アンチセンス・オリゴヌクレオチドの実行可能な代替物として現れてきた。なぜなら、アンチセンス・オリゴヌクレオチドで達成される抑制レベルと同じか又はそれより優れた抑制レベルを達成するために、より少ない濃度しか必要としないからである (Thompson, 2002)。長い二本鎖 R N A は、種々の生物、例えば植物、線虫、及びショウジョウバエにおいて、特異的な遺伝子発現をサイレンシングするために使用されてきた。ダイサーと呼ばれる R N A s e - I I I ファミリーの酵素は、これらの長い二本鎖 R N A を 21 ~ 23 ヌクレオチドの低分子干渉 R N A へとプロセッシングし、該低分子干渉 R N A は、次に R N A 誘導サイレンシング複合体 (R I S C) 中に組み入れられる。s i R N A がほどかされると、R I S C を活性化し、そして一本鎖 s i R N A が、塩基対形成により内在性の m R N A へと複合体形成することを導く。R I S C により内在性 m R N A が認識されることにより、内在性 m R N A は切断され、そして結果として、翻訳に利用できないものになってしまう。長い二本鎖 R N A を哺乳動物細胞に導入することにより、強力な抗ウイルス応答がもたらされ、この過程は s i R N A を使用することによりバイパスされ得る (Elbashir et al., 2001)。s i R N A は、細胞培養物において広く使用され、そして通常、90 % 以上の特異的な遺伝子発現の減少を達成する。

【 0 0 3 9 】

s i R N A の使用は、疾患の動物モデルにおける遺伝子発現を抑制する点で一般的になってきている。最近の研究により、ルシフェラーゼに対する s i R N A は、水力学的な注射デリバリー技術 (Lewis et al., 2002) を使用して、出生後のマウスにおいて、広範囲な組織において共トランスフェクションされたプラスミドからのルシフェラーゼ発現を阻害

10

20

30

40

50

することができるということが示された。マウスの尻尾静脈内に水力学的に注射された Fas、TNFファミリーの受容体に対する siRNA は、80% 超の幹細胞にトランスフェクションフェクションされ、そして最後の注射後 10 日まで、肝臓における Fas 発現を 90% 減少させることができた (Song et al., 2003)。Fas の siRNA はまた、肝臓の線維形成及び劇症肝炎からマウスを保護することもできた。致死量のリボ多糖で処置されたマウスにおける敗血症の発達は、TNF (Sorensen et al., 2003) に対する siRNA の使用により抑制された。siRNA は、細胞培養物において及び in vivo でその長く続く有効性、in vivo で細胞にトランスフェクションできるその能力、並びに血清中での分解抵抗性の観点から、in vivo において特異的遺伝子発現を抑制するためのとても強力な薬剤となる可能性を有する (Bertrand et al., 2002)。

10

【0040】

本発明者は、細胞をアポトーシス因子 5A の siRNA でトランスフェクションし、そしてアポトーシス因子 5A の発現に関する効果を研究した。図 64 は、アポトーシス因子 5A・siRNA でトランスフェクションされた細胞が、より少ないアポトーシス因子 5A タンパク質を産生するというを示す。図 64 ~ 67 は、アポトーシス因子 5A の siRNA でトランスフェクションされた細胞が、アポトーシス因子 5A・siRNA でトランスフェクションされていない細胞に比較して、アンブトテシン及び TNF- に晒された後にアポトーシスを起す細胞の低い割合を有するというを示す。

【0041】

好ましい siRNA は、配列番号 1、2、3、4、及び 5 を有する siRNA を含む。更なる siRNA は、列挙された配列に実質的な配列同一性 (つまり 90% の相同性) を有する siRNA を含むか、又は列挙された配列番号に、高度に厳密な条件下でハイブリッド形成する配列を有する siRNA を含む。

20

【0042】

多くの重要なヒト疾患は、アポトーシスの制御異常により引き起こされる。これらの異常は、細胞数の病的増加 (例えば、癌) か又は損害を受けるほどの細胞の減少 (例えば、変性疾患) のいずれかになりうる。非制限的な例として、本発明の方法及び組成物は、以下のアポトーシスに関連する疾病及び疾患：神経学的/神経変性疾患 (例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性外側硬化症 (ルー・ゲーリック病)、自己免疫疾患 (例えば、リウマチ様関節炎、全身性エリテマトーデス (SLE)、多発性硬化症)、デュシェンヌ筋ジストロフィー (DMD)、運動ニューロン疾患、虚血、心臓虚血、慢性心不全、卒中、乳児性脊髄筋肉萎縮症、心停止、腎不全、アトピー性皮膚炎、敗血症及び感染性ショック、エイズ、肝炎、緑内障、糖尿病 (1 型及び 2 型)、喘息、網膜色素変性症、骨粗鬆症、異種移植拒絶、並びに火傷傷害を予防又は治療するために使用される。

30

【0043】

アポトーシスの制御の異常により引き起こされるそうした疾患の 1 つは緑内障である。緑内障は、視神経の損傷から生じる目の病気群であり、進行性の盲目をもたらす。アポトーシスは、この視神経損傷の直接的な原因であると示されてきた。

【0044】

緑内障研究の分野における初期の研究により、IOP の上昇が篩骨篩板のレベルで軸索輸送の妨害を導き、その後に網膜神経節細胞が死ぬということが示唆された (Quigley 及び Anderson (1976) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 15, 606-16 ; Minckler, Bunt, 及び Klock, (1978) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 17, 33-50 ; Anderson 及び Hendrickson, (1974) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 13, 771-83 ; Quigley et al., (1980) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 19, 505-17)。緑内障の動物モデル及び死後のヒト組織の研究により、緑内障の網膜神経節細胞の死は、アポトーシスにより引き起こされるということが示唆された (Garcia-Valenzuela et al., (1995) Exp. Eye Res., 61, 33-44 ; Quigley et al., (1995) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 36, 774-786 ; Monard, (1998) In : Haefliger 10, Flammer J (eds) Nitric Oxide and Endothelin in the Pathogenesis of Glaucoma

40

50

uconia, New York, NY, Lippincott-Raven, 213-220)。増大した I O P の結果としての軸索輸送の妨害は、栄養素の欠乏により、網膜神経節細胞死に寄与するかもしれない(Quigley, (1995) Aust N Z J Ophthalmol, 23 (2), 85-91)。緑内障の眼における視神経乳頭星状細胞はまた、いくつかの神経毒性物質の増大したレベルをもたらすことが発見された。例えば、腫瘍壊死因子- (TNF-) 産生の増大(Yan et al., (2000) Arch. Ophthalmol., 118,666-673)、及び一酸化窒素合成(Neufeld et al., (1997) Arch. Ophthalmol., 115,497-503)、一酸化窒素を上昇させる酵素は、緑内障の目の視神経乳頭において見つかった。さらに、一酸化窒素合成の誘導型(iNOS)及びTNF- の発現増加は、遺伝的網膜疾患のラットのモデルにおいて観察された(Cotinet et al., (1997) Glia, 20,59-69 ; de Kozak et al., (1997) Ocul. Immunol. Inflamm., 5,85-94 ; Goureau et al., (1999) J. Neurochem, 72,2506-2515)。緑内障視神経乳頭において、過剰量の一酸化窒素は、網膜神経節細胞の軸作の変性に関連した(Arthur及びNeufeld, (1999) Surv Ophthalmol, 43 (Suppl 1), S129-S135)。最後に、模擬的な虚血又は静水圧の増加に応答する網膜グリア細胞によるTNF- の産生の増大は、共培養された網膜神経節細胞においてアポトーシスを誘導することが示された(Tezel and Wax, (2000) J Neurosci., 20 (23), 8693-8700)。

【0045】

アポトーシスによる変性から網膜神経節細胞を守ることは、緑内障が原因の盲目に対する新たな治療の可能性として研究中である。アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、網膜の神経節細胞をアポトーシスによる細胞死から保護するために、幾つかのグループによって使用されて、アポトーシス過程における鍵となるタンパク質を標的した。アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、特異的なDNA又はRNA標識にアンチセンス(又は相補的)である、短い、DNA(又はDNAアナログ)の合成鎖である。アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、標的に結合し、転写、翻訳、又はスプライシングのレベルで発現を停止することにより、DNA又はRNA標的によりコードされるタンパク質の発現を阻害するように設計される。アンチセンス・オリゴヌクレオチドを薬として使用するハードルの1つは、ヌクレアーゼにより血液及び細胞中でオリゴヌクレオチドを急速に分解されることである。この問題は、分解に抵抗性の改変された骨格を使用することにより、例えば、オリゴヌクレオチド中のホスホジエステル結合を、ホスホロチオエート結合へと置換して(Matzura and Eckstein, (1968) Eur. J. Biochem., 3, 448 - 452)、ヌクレアーゼ分解を遅延させることにより取り組まれてきた(Blake et al., (1985) Biochemistry, 24,6139-6145)。

【0046】

アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、眼疾患の動物モデルにおいて首尾よく使用されてきた。一時的な網膜全体の虚血のモデルにおいて、カスパーゼ2の発現は、虚血の間、先ず網膜内顆粒層及び網膜神経節細胞層において増大した。アンチセンス・オリゴヌクレオチドを使用してカスパーゼを抑制することにより、網膜電図により測定される有意な組織病理学的及び機能的な改善が導かれた(Singh et al., (2001) J ; Neurochem., 77 (2), 466-75)。他の試験によって、視神経が切断される際、網膜神経節細胞は、アポトーシス促進性のBaxを上方制御し、そしてアポトーシスを引き起こすことが示された。Baxアンチセンス・オリゴヌクレオチドを、ラットの側頭上網膜(temporal superior retina)に繰り返し注射することにより、Baxの局所的発現を抑制し、生存する網膜神経節細胞の数を増大し、視神経のトランスアクションを起した(Isenmann et al., (1999) Cell Death Differ., 6 (7). 673-82)。

【0047】

アンチセンス・オリゴヌクレオチドを、網膜神経節細胞へとデリバリーすることは、オリゴヌクレオチドをリポソーム中に封入し、次にリポソームが、融合によりセンダイウイルス(HVJ;センダイウイルス)のエンベロープでコートされる(HVJリポソーム)ことによって改良される。HVJリポソーム中に封入されたFITC標識アンチセンス・オリゴヌクレオチドを、マウスに硝子体注射することにより、神経節層において44%の細胞で高い蛍光をもたらした。この蛍光は3日間続いたが、その一方、剥き出しのFITC標識ア

ンチセンス・オリゴヌクレオチドの蛍光は1日後に消失した(Hangai et al., (1998) Arch Ophthalmol, 116 (7), 976)。

【0048】

本発明のアポトーシスを抑制又は調節する方法は、目の細胞、例えば非限定的に、星状細胞、網膜神経節、網膜グリア細胞、及び篩骨篩板の細胞においてアポトーシスを調節することに向けられる。緑内障の網膜神経節細胞の死は、アポトーシスにより起こる。こうして、網膜神経節細胞を、アポトーシスによる変性から保護することにより網膜神経節細胞においてアポトーシスを抑制する方法は、緑内障が原因となる盲目を保護する新規の治療を提供する。

【0049】

本発明は、アポトーシス特異的 e I F 5 A 1 の発現を抑制することにより、緑内障の目において網膜の神経節細胞死を予防する方法を提供する。アポトーシス-特異的 e I F 5 A 1 の発現を抑制することによりアポトーシスが低減される。アポトーシス特異的 e I F 5 A 1 は、アポトーシス・プロセスの全体を制御していると思える強力な遺伝子である。こうして、視神経乳頭においてアポトーシスを制御することにより、アポトーシス特異的 e I F 5 A 1 の発現阻害が緑内障の治療を提供することが示唆された。

【0050】

アポトーシス特異的 e I F 5 A 1 の発現抑制は、ヒト・アポトーシス特異的 e I F 5 A 1 を標的とするアンチセンス・オリゴヌクレオチド又は s i R N A を、目の細胞、例えば非限定的に篩骨篩板、星状細胞、網膜神経節、又は網膜グリア細胞に投与することにより達成される。アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、上で定義されたとおりであり、つまり、アポトーシス特異的 e I F 5 A 1 ポリペプチドの少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列を有する。ヒト・アポトーシス特異的 e I F 5 A 1 に対して標的されるアンチセンス・オリゴヌクレオチドは、ヒト・アポトーシス特異的 e I F 5 A 1 ポリペプチドの少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列を有する。好ましいアンチセンス・オリゴヌクレオチドは、配列番号 26 又は 27 を含み、或いはかなり厳格な状況下で配列番号 26 又は 27 に相補的な配列に結合するオリゴヌクレオチドを含む。

【0051】

本発明の別の実施態様は、篩骨篩板細胞、星状細胞、網膜神経節細胞、又は網膜グリア細胞において、アポトーシス特異的 e I F 5 A 1 の発現を抑制する方法を提供する。ヒト・アポトーシス特異的 e I F 5 A 1 に対して標的されたアンチセンス・オリゴヌクレオチド、例えば非限定的に配列番号 26 及び 27 は、篩骨篩板細胞、星状細胞、網膜神経節細胞、又は網膜グリア細胞に投与される。これらの細胞はヒトの細胞であってよい。

【0052】

アポトーシスにおける役割を有することに加えて、e I F 5 A は、免疫応答においても役割を有しうる。本発明者は、虚血心臓組織におけるアポトーシス因子 5 A レベルが、2種のサイトカイン(インターロイキン 1 - “ I L - ” 及びインターロイキン 18 “ I L - 18 ”)レベルの上昇と相関することを発見し、そうしてさらに、アポトーシス因子 5 A が虚血心臓組織に存在することから、アポトーシス因子 5 A が細胞死に関与することを証明した。さらに、このアポトーシス因子 5 A / インターロイキンの相関は、非虚血心臓組織においては見られなかった。図 50 A - F、及び 51 を参照のこと。P C R 計測を使用して、アポトーシス因子 5 A、増殖 e I F - 5 a (e I F 5 A 2 - もう一方の既知のアイソフォーム、又は幾つかの図で e I F 5 b として記載される)、I L - 1、及び I L - 18 のレベルを、(冠動脈バイパス・グラフト及び弁(僧帽弁及び心房弁)置換手術を受けた患者由来の)種々の虚血性心臓組織において計測し、そして比較した。

【0053】

アポトーシス e I F - 5 a を強力なインターロイキンへと相関することによって、虚血における炎症及びアポトーシス経路が、アポトーシス因子 5 A のレベルの制御を介して制御されうるということが示唆される。アポトーシス因子 5 A が免疫応答に関与するというさらなる証拠は、ヒト末梢血液単核細胞(P B M C)が、通常かなり低いレベルの e I F 5

10

20

30

40

50

Aを発現するという事実によって提案されるが、T-リンパ球特異的刺激で刺激する際、e I F 5 Aの発現は、劇的に増大する(Bevec et al., 1994)。これにより、T細胞増殖及び/又は活性化におけるアポトーシス因子5 Aの役割が提案される。活性化T細胞は、広範なサイトカインを産生することができるので、アポトーシス因子5 Aがサイトカインm R N Aの核細胞質間輸送体として必要とされている可能性もある。

【0054】

他の研究が、ヒト・末梢血液単核細胞及び種々の成熟刺激剤で処理された血液細胞において、e I F - 5 A・m R N A及び細胞表面マーカーの発現に着目した(Bevec et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 10829- 10833. (1994))。e I F - 5 A・m R N A発現は、T細胞活性化も誘導する種々の刺激により、P B M Cにおいて誘導された(Bevec et al., 1994)。H I V - 1患者において、健康なドナーと比較して高いレベルのP B M C・e I F - 5 A・m R N A発現が観測された。この研究の著者は、e I F - 5 A m R N Aが誘導され、その結果、e I F - 5 AがT細胞活性化及びH I V - 1複製に必要である重要なm R N Aを核細胞質間輸送して作用できることを提案することによって、彼らの結果を解釈した(Bevec et al., 1994)。e I F 5 Aは、H I V・R e vタンパク質に対する細胞内結合因子であることが示され、そしてH I V複製に必要とされることが示された(Ruhl et al., 1993)。

【0055】

本発明者は、特異的な刺激に応じてサイトカインをおそらく産生すると知られている細胞系列を使用して、in vitroで、サイトカインm R N Aを核細胞質間輸送して作用することによりサイトカインの翻訳を促進するe I F 5 A 1の能力を研究した。いくつかの最近の研究は、ヒト肝臓細胞系列が、他のサイトカインの産生を誘導することによりサイトカイン刺激に応答できるということを見つけた。I L - 1 に応答して、H e p G 2細胞は、投与量依存的な様式でT N F - のm R N Aとタンパク質を即座に産生する(Frede et al., 1996; Rowell et al., 1997; Wordemann et al., 1998)。こうして、H e p G 2細胞は、T N F - 産生の制御を研究するためのモデル・システムとして使用された。H e p G 2細胞におけるe I F 5 A 1発現の抑制は、アポトーシス因子5 Aに対するアンチセンス・ヌクレオチドでトランスフェクションされた後で、この細胞におけるT N F - の産生の減少を招くことを本発明者が示した。

【0056】

こうして、本発明の1の態様は、細胞におけるサイトカインのレベルを低減する方法を提供する。該方法は、アポトーシス因子5 A 1の発現を抑制することができる細胞へ薬剤を投与することを含む。アポトーシス因子5 A 1の発現を低減することは、サイトカインの発現の低下を招き、そうして細胞により産生されるサイトカインの量の低下を導く。サイトカインは、好ましくは炎症促進性のサイトカインであり、非限定的にI L - 1、I L - 1 8、I L - 6、及びT N F - を含む。

【0057】

アポトーシス因子5 Aの発現を低下できる薬剤は、アポトーシス因子5 Aに相補的な配列を有するアンチセンス・ヌクレオチドであってよい。好ましくは、アンチセンス・ヌクレオチドは、配列番号^{*}6、^{*}7、及び^{*}8からなる群から選ばれる配列を有するか、又は高度に厳密な条件下で、配列番号^{*}6、^{*}7、及び^{*}8からなる群から選ばれる配列にハイブリッド形成するアンチセンス・ヌクレオチドである。

【0058】

薬剤は、アポトーシス因子5 Aに相補的な配列を有するs i R N Aを含んでも良い。好ましくは、s i R N Aは、配列番号^{*}1、^{*}2、^{*}3、^{*}4、及び^{*}5からなる群から選ばれる配列を有するか、又は配列番号^{*}1、^{*}2、^{*}3、^{*}4、及び^{*}5からなる群から選ばれる配列に、かなり厳格な条件下でハイブリッド形成するs i R N Aである。図65～67は、アポトーシス因子5 Aのs i R N Aでトランスフェクションされた細胞が、アンブトテシン及びT N F - に晒された後にアポトーシスを受ける細胞の低い割合を有するということを示した。薬剤はまた、アンチセンスD H Sヌクレオチドを含んでも良い。

【 0 0 5 9 】

本発明はまた、配列番号^{*}6、^{*}7、及び^{*}8からなる群から選ばれる配列を有するポリヌクレオチドにも向けられるか、又は配列番号^{*}6、^{*}7、及び^{*}8からなる群から選ばれる配列に高度に厳密な条件下でハイブリッド形成するアンチセンス・ヌクレオチドである。

【 0 0 6 0 】

本発明はまた、配列番号^{*}1、^{*}2、^{*}3、^{*}4、及び^{*}5からなる群から選ばれる配列を有する s i R N A に向けられるか、又は配列番号^{*}1、^{*}2、^{*}3、^{*}4、及び^{*}5からなる群から選ばれる配列に高度に厳密な条件下でハイブリッド形成する s i R N A である。

【 0 0 6 1 】

本発明はまた、p 5 3 の発現を低減する方法にも向けられる。本発明はアポトーシス因子 5 A の発現を抑制できる薬剤、例えばアンチセンス・ポリヌクレオチド、又は上で記載される s i R N A を投与することを含む。アポトーシス因子 5 A 1 の発現を低減することにより、図 5 2 及び実施例 1 1 に示される p 5 3 の発現が低減される。

【 0 0 6 2 】

本発明はまた、B c 1 - 2 の発現を増加する方法にも向けられる。該方法は、アポトーシス因子 5 A の発現を低減することができる薬剤を投与することを必要とする。好ましい薬剤は、上で記載されたアンチセンス・オリゴヌクレオチド及び s i R N A である。アポトーシス因子 5 A 1 の発現低下は、図 6 3 及び実施例 1 3 に示される B c 1 - 2 の発現を増大させる。アポトーシス因子 5 a の s i R N A でトランスフェクションされた細胞が、より少ない量のアポトーシス因子 5 A 1 タンパク質を産生し、そしてさらにより多くの B c 1 - 2 タンパク質を産生するという事を、図 6 3 が示した。アポトーシス因子 5 A 1 発現の減少は、B c 1 - 2 発現の増加と相関する。

【 0 0 6 3 】

本発明はまた、T N F - のレベルを低減することを必要とする患者において T N F - のレベルを低減する方法であって、上記のアンチセンス・ポリヌクレオチド又は s i R N A を該患者に投与することを含む方法を提供する。図 6 9 及び実施例 1 4 で示されるように、本発明のアンチセンス因子 5 A オリゴヌクレオチドでトランスフェクションされた細胞は、I L - 1 で誘導した後に、そうしたアンチセンス・オリゴヌクレオチドでトランスフェクションされない細胞より少ない T N F - を産生した。

【 0 0 6 4 】

本発明は、ヒト上皮細胞における T N F - のレベルを低減する方法を提供する。図 7 4 A 及び B、並びに図 7 5、そして実施例 1 5 において記載されるように、ヒト上皮細胞における T N F - の産生を完全に抑制しない場合、e I F 5 A 1 の発現の低減又は抑制は疾患を引き起こす。e I F 5 A 1 に対する s i R N A は、e I F 5 A 1 の発現を抑制するために使用された。この発現抑制は、T N F - の産生を低減又は抑制するだけではなく、サイトカイン誘導性アポトーシスから細胞を保護する。e I F 5 A 1 の発現を低減することにより、T N F - の産生は低減される。この双方の効果は、炎症性腸疾患、例えばクローン病及び潰瘍性大腸炎を患う患者を治療する方法を提供する。これらの病気は T N F - により引き起こされる炎症の増化と関連する。

【 0 0 6 5 】

こうして、本発明は、増大された I L - 1、T N F -、I L 6 1 又は I L - 1 8 レベルにより特徴付けられる病状を治療する方法であって、該病状を有する哺乳動物に、アポトーシス因子 5 A の発現を低減する薬剤を投与することを含む方法を提供する。

【 0 0 6 6 】

I L - 1、T N F -、又は I L - 6 レベルの増加により特徴付けられた既知の病状は、非限定的に、リウマチ様関節炎及び骨関節炎、喘息、アレルギー、動脈性炎症、クローン病、炎症性腸疾患 (i b d)、潰瘍性大腸炎、冠血管心疾患、嚢胞性線維症、糖尿病、ループス、多発性硬化症、グレーブス病、歯周病、緑内障及び黄斑変性症、円錐角膜を含む眼球表面の疾患、器官虚血-心臓、腎臓、再灌流損傷、敗血症、多発性骨髄腫、器官移植片拒

10

20

30

40

50

絶、乾癬及び湿疹を含む。

【0067】

最近の研究は、細胞の分化及び活性化における e I F - 5 A の重要な役割を示唆した。未成熟の樹上細胞が、分化及び成熟を誘導されたとき、e I F - 5 A ・ m R N A レベルは、C D 8 3 タンパク質発現と一致する (Kruse et al., J. Exp. Med. 191 (9): 1581-1589 (2000))。樹上細胞は、ヘルパー及びキラー T 細胞を感作して、T 細胞性免疫を誘導する抗原提示細胞である (Steinman, 1991)。未成熟の樹上細胞は、T 細胞を刺激する能力を欠き、そして T 細胞を活性化することができる細胞へと成熟するために適切な刺激 (つまり、炎症性サイトカイン及び / 又は微生物産物) を必要とする。成熟細胞における C D 8 3 の合成及び表面発現は、ヘルパー及びキラー T 細胞を感作し、そして T 細胞性免疫を誘導する点に重大に関与する。未成熟樹上細胞は、ハイプシン化の阻害剤 (G C 7) 及びそうして e I F - 5 A 活性化の阻害剤で前以って処理されるとき、C D 8 3 の表面発現は阻害された (Kruse et al., 2000)。本研究の著者は、e I F - 5 A が実質的に C D 8 3 m R N A の核細胞質間輸送に必須であり、そしてハイプシン化及びそうして e I F 5 A を妨害することにより、C D 8 3 発現及び樹上細胞成熟が妨害される、本発明の結果を解釈した (Kruse et al., 2000)。

10

【0068】

免疫系において e I F 5 A の役割を示唆するこれらの研究の両方において (Bevec et al., 1994 ; Kruse et al., 2000)、どちらの e I F 5 A のアイソフォームを著者が試験したかを特定していないし又は同定していない、またそうする理由付けを持っていなかった。上で簡単に記載されるように、ヒトは、e I F 5 A の 2 個のアイソフォーム、e I F 5 A 1 (アポトーシス因子 5 A 1) と e I F 5 A 2 を有することが知られており、両方ともが、別々の染色体上にコードされる。本発明者の発見の前では、これらのアイソフォームの両方が、機能的に重複していると信じられていた。Bevec et al., により記載されるオリゴヌクレオチドであって、刺激された P B M C において e I F 5 A ・ m R N A を検出するために使用されたオリゴヌクレオチドは、ヒト e I F 5 A 1 と 1 0 0 % の相同性を有し、そして該研究は、e I F 5 A 2 のクローニング前に行われた。同様に Kruse et al., により記載されるプライマーであって、樹上細胞が成熟する間に逆転写ポリメラーゼ・チェーン反応により e I F 5 A を検出するために使用されたプライマーは、ヒト e I F 5 A 1 に対して 1 0 0 % の相同性を有した。

20

30

【0069】

本発明は、e I F 5 A 1 の発現を制御して、樹上細胞成熟及び P B M C 活性化の割合を制御することに関し、該制御は次に T 細胞性免疫の割合をコントロールしうる。本発明者は、U - 9 3 7 細胞系列を使用して、単球を接着マクロファージへと分化させる際の e I F - 5 A 1 の役割を試験した (Bevec et al., 1994)。なぜなら、U - 9 3 7 は、e I F 5 A ・ m R N A を発現することが知られているからである。U - 9 3 7 は、懸濁状態で成長し、P M A で刺激した際に、接着し、そしてマクロファージへと分化するヒト単球細胞系列である。培地交換により P M A を取り除いたとき、細胞は、無活動状態になり、そして次にサイトカインを産生できるようになる (Barrios- Rodiles et al., J. Immunol. 163: 963-969 (1999))。多くの細菌の外膜上に見つかる因子であり、一般的な炎症性応答を誘導することが知られているリポ多糖 (L P S) に応答して、マクロファージは、T N F - と I L - 1 を産生する (Barrios-Rodiles et al., 1999)。幹細胞の分化のチャート及び結果として生じるサイトカインの産生のチャートを示す図 7 8 を参照のこと。U - 9 3 7 細胞はまた、L P S 刺激の後に I L - 6 及び I L - 1 0 を産生する (Izeboud et al., J. Receptor & Signal Transduction Research, 19 (1-4): 191-202. (1999))。

40

【0070】

U - 9 3 7 細胞を使用して、単球の分化及び T N F - の分泌の間、e I F - 5 A 1 は上方制御されるということが示された。図 7 7 を参照のこと。従って、本発明の 1 の態様は、マクロファージの成熟を抑制又は遅延して、サイトカインの産生を抑制又は低減する方法が提供される。本方法は、D H S 又は e I F - 5 A 1 の発現を低減できる薬剤を提供す

50

ることを含む。D H S の発現を低減又は除去することにより、e I F - 5 A 1 活性化は、低減され又は除去される。e I F - 5 A 1 は、単球分化及び T N F - 分泌の間上方制御されるので、e I F - 5 A 1 は、単球分化及び T N F - 分泌が生じるために必要であると信じられている。こうして、e I F - 5 A 1 の活性を低減又は除去することにより、又は e I F - 5 A 1 発現を直接低減又は除去することにより、単球分化及び T N F - 分泌は、低減又は除去され得る。D H S 又は e I F - 5 A 1 の発現を低減できる薬剤のいずれかが使用され、そして該薬剤は非限定的に本明細書中に記載されるアンチセンス・オリゴヌクレオチド又は s i R N A を含む。

【 0 0 7 1 】

本明細書中に使用されるとき、「実質的に同一の配列」又は「実質的に相同性である」という用語は、該配列が他の配列と実質的な構造的又は機能的な同等性を示すということを目指す為に使用される。実質的に配列同一性又は実質的に相同性を有する配列間の構造的又は機能的な差のいずれかは、最小である；つまり、この差は、所望の適用形態において意図されたように機能する配列の能力に影響を与えない。差異は、例えば、異なる種間においてコドン使用が生来異なることが原因でありうる。かなりの量の配列の重複が存在し、又は 2 以上の異なる配列間の類似性が存在するなら、或いは異なる配列が類似の物理的性質を示すなら、配列の長さ又は構造の点で異なるとしても、構造的な差異は、最小であると考えられる。そうした特徴は、例えば、確定された条件下でハイブリッド形成する能力、又はタンパク質の場合、免疫学的交差反応、類似の酵素学的活性などを含む。当業者は、技術分野に周知の方法によって、これらの特徴の各々を容易に測定できる。

10

20

【 0 0 7 2 】

さらに、2 個のヌクレオチド配列が、その間で少なくとも 7 0 % 以上、より好ましくは 8 0 % 以上、さらに好ましくは約 9 0 % 以上、及び最も好ましくは約 9 5 % 以上の配列類似性を有するならば、2 個のヌクレオチド配列は「実質的に相補的」である。2 個のアミノ酸配列が、活性、又は機能的な関係、ポリペプチドの部分との間で、少なくとも 5 0 % 、好ましくは少なくとも 7 0 % 、さらにより好ましくは少なくとも 8 0 % 、さらに好ましくは少なくとも 9 0 % 、最も好ましくは少なくとも 9 5 % の類似性を有するならば、2 個のアミノ酸配列は実質的に相同である。

【 0 0 7 3 】

2 個の配列を同一割合を測定するために、配列は、最適比較目的(例えば、最適配列比較では、ギャップは第一及び第二アミノ酸配列又は核酸配列のうちの 1 つ又は両方に導入されうるし、そして比較目的では、非相同配列は無視され得る)で、整列される。好ましい実施態様では、少なくとも 3 0 % 、4 0 % 、5 0 % 、6 0 % 、7 0 % 、8 0 % 、9 0 % 以上の長さの参照配列は、比較目的のため整列される。次に対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置でのアミノ酸残基又はヌクレオチドが比較される。第一配列における位置が、第二配列の対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドにより占められるとき、分子は、その位置で同一である(ここで使用されるとき、アミノ酸又は核酸の「同一」は、アミノ酸又は核酸「ホモロジー」と同一である)。2 個の配列間の同一性の割合(%) は、これらの配列により共有される同一位置の数の関数であり、2 個の配列の最適配列比較のために導入される必要があるギャップの数及び各ギャップの長さを考慮に入れる。

30

40

【 0 0 7 4 】

配列の比較及び、二つの配列間の同一性及び類似性の割合の決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成されうる(Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., 著., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M S t o c k t o n Press, New York, 1991)。

【 0 0 7 5 】

50

本発明の核酸及びタンパク質配列は、さらに「クエリー配列(query sequence)」として使用されて、配列データベースに対する検索を行って、例えば他のファミリーメンバー又は関連配列を同定する。そうした検索は、Altschul, et al. (1990) J Mol Biol. 215: 403-10のN B L A S T及びX B L A S Tプログラム(バージョン2.0)を使用して行われる。B L A S Tヌクレオチド検索は、N B L A S Tプログラムで行われる。B L A S Tタンパク質検索は、X B L A S Tプログラムで行われて、本発明のタンパク質と相同なアミノ酸配列を得る。比較目的のため、ギャップのある配列比較を得るために、Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389-3402に記載されるギャップB L A S Tが使用される。B L A S T及びギャップB L A S Tプログラムを使用するとき、それぞれのプログラム(例えばX B L A S T及びN B L A S T)のデフォルトのプログラムが使用されう。 10

【0076】

核酸の「機能的な誘導体」という用語は、本明細書中で使用されて、遺伝子又はヌクレオチド配列のホモログ又はアナログを意味する。機能的な誘導体は、与えられた遺伝子の機能の少なくとも1部を保持し、それにより本発明に従ってその用途を許容する。本明細書中に記載されるアポトーシス因子5 Aポリペプチドの「機能的な誘導体」は、アポトーシス因子5 Aの断片、バリエーション、アナログ、又は化学的誘導体であって、少なくともアポトーシス因子5 Aの活性又はアポトーシス因子5 Aに特異的な抗体と免疫学的交差反応を保持するものである。アポトーシス因子5 Aポリペプチドは、分子のサブセットのいずれかを指す。 20

【0077】

機能的なバリエーションは、機能において何の変化をもたらさないか又は有意でない変化しきもたらさない類似アミノ酸の置換も含みうる。機能に必須なアミノ酸は、当該技術分野において周知な方法、例えば部位特異的突然変異誘発法又はアラニン-スキャン突然変異誘導法(Cunningham et al. (1989) Science 244: 1081-1085)により同定されうる。後者の方法は、分子の全ての残基で、単一のアラニン突然変異を誘導する。得られた突然変異分子は、次に生理活性、例えばキナーゼ活性などについて試験され、又はin vitro増殖活性などのアッセイで試験される。パートナー/基質結合の結合に決定的な部位は、結晶化、核磁気共鳴法、又は光親和性標識(Smith et al., (1992), J. Mol. Biol. 224: 899-904; de Vos et al. (1992) Science 255: 306-312)によっても決定されうる。 30

【0078】

「バリエーション」は、遺伝子全体又はその断片のいずれかに実質的に類似する分子を指し、例えば1以上の置換されたヌクレオチドを有するが、特定の遺伝子とハイブリッド形成するか、又は未変性のDNAとハイブリッド形成するmRNA転写物をコードする能力を維持するヌクレオチド置換バリエーションを指す。「ホモログ」は、異なる動物属又は種由来の断片又はバリエーション配列を指す。「アナログ」は、分子全体、バリエーション、又はそれらの断片に実質的に類似するか、又はそれらに関して機能する非天然分子を指す。

【0079】

バリエーション・ペプチドは、天然バリエーション並びに当該技術分野に周知の方法により製造されるものを含む。そうしたバリエーションは、分子技術及び本明細書中に開示される配列情報を使用することにより容易に同定/作成されうる。さらに、そうしたバリエーションは、本発明のe I F 5 A又はD H Sタンパク質に対する配列及び/又は構造ホモロジーに基いて、他のタンパク質から容易に区別されうる。存在するホモロジー/同一性の程度は、そのタンパク質が機能的バリエーションであるか又は非機能的バリエーションであるか、パラログ/ファミリーにおいて存在する相異量、及びオルソログ間の進化距離に基く。 40

【0080】

本発明のe I F - 5 A又はD H Sの非天然バリエーションが、組換え技術を使用して容易に作成され得る。そうしたバリエーションは、非限定的にタンパク質のアミノ酸配列中での欠失、添加及び置換を含む。例えば、置換の1のクラスは、保存されたアミノ酸置換である。そうした置換は、タンパク質中の或アミノ酸を、同様の特徴の他のアミノ酸により置換す 50

ることである。典型的に、保存的置換として見られるのは、脂肪族アミノ酸、A l a、V a l、L e u、及びI l eの間で1のアミノ酸を別のアミノ酸に置き換えること；ヒドロキシル残基S e rとT h rとの交換；酸性残基A s pとG l uの交換；アミド残基A s nとG l nとの間の置換；塩基性残基L y sとA r gの交換；及び芳香族残基P h eとT y rの間の置き換えである。どのアミノ酸変化が、表現型の上でサイレントであるかに関する手引きは、Bowie et al., Science 247: 1306-1310 (1990)に見られる。

【0081】

本明細書中で使用される「ハイブリダイゼーション」という用語は、プローブ配列及び標的配列の性質に基いて当業者に容易に明らかである適切な厳密条件で核酸がハイブリダイゼーションすることを意味するために一般的に使用される。ハイブリダイゼーション及び洗浄の条件は、当該技術分野に周知であり、そしてインキュベーション時間、温度、及び/又は溶液のイオン強度により所望される厳密度に依存して条件を調節することは、容易に達成される。例えば、Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989を参照のこと。

10

【0082】

条件の選択は、ハイブリッド形成される配列の長さ、特に、プローブ配列の長さ、核酸の相対G C含量、及び許容される不適正塩基対の量により決定される。低い相補性を有する鎖の間での部分的なハイブリダイゼーションが所望されるとき、厳密度の低い条件が好ましい。完全又は完全に近い相補性が所望されるとき、厳密度の高い条件が好まれる。典型的に厳密度の高い条件では、ハイブリダイゼーション溶液は、6 × S.S.C、0.01 M・E D T A、1 × デンハート溶液及び0.5 % S D Sを含む。ハイブリダイゼーションは、クローン化されたD N Aの断片について、約68 で3 ~ 4時間、真核生物の全D N Aについて約68 で12 ~ 16時間行った。低い厳密度では、ハイブリダイゼーションの温度は、二本鎖の融点(T m)以下である約42 まで減らされる。T mは、G C含量及び二本鎖の長さ、並びに溶液のイオン強度の関数であると知られている。

20

【0083】

本明細書中で使用されるとき、D N A又はR N A分子の「対応する部分にハイブリッド形成する」というフレーズは、該分子、例えば、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、又はいずれかのヌクレオチド配列(センス又はアンチセンスの向き)が、別の核酸分子配列であって、おおよそ同じ大きさでありかつ適切な条件下で該分子に対してハイブリダイゼーションする十分な配列類似性を有する配列を認識し、そしてハイブリッド形成することを意味する。例えば、100ヌクレオチド長のセンス分子は、2つの配列間に70%以上の配列類似性が存在する限り、核酸配列のおおよそ100ヌクレオチド部分を認識しそしてハイブリッド形成する。「対応する部分」の大きさは、ハイブリダイゼーションにおけるいくらかのミスマッチを許容するので、「対応する部分」は、それにハイブリッド形成する分子よりも小さくてもよいし又は大きくてもよく、例えば、20 ~ 30%大きい又は小さく、好ましくは12 ~ 15%以下の範囲で大きい又は小さいということが理解される。

30

【0084】

さらに、ポリペプチドの機能的なバリエーションは、機能において変化がないか又は取るに足らない変化をもたらす類似アミノ酸の置換も含みうる。機能に必須であるアミノ酸は、当該技術分野に周知である方法、例えば部位特異的突然変異誘導法又はアラニン-スキャン突然変異誘導法(Cunningham et al., Science 244: 1081-1085 (1989))により同定され得る。後者の方法は、分子における全ての残基で単一アラニン突然変異を誘導する。得られた変異分子は、次に生理活性について又はアッセイにおいて試験される。

40

【0085】

例えば、アポトーシス因子5 Aのアナログは、非天然タンパク質又はそのタンパク質全体又は断片のいずれかに実質的に類似するペプチドミメティクスを指す。アポトーシス5 A因子の化学誘導体は、通常ペプチド又はペプチド断片の一部ではないさらなる化学成分

50

を含む。ペプチドの標的アミノ酸残基を有機誘導体化剤であって、選択された側鎖又は末端残基と反応できるものと反応することにより、改変はペプチド又はその断片中に導入される。

【0086】

本発明の核酸及びポリペプチドは、予防又は治療の目的で動物に使用される場合、医薬として許容される担体をさらに含む組成物の形態で投与される。適切な医薬として許容される担体は、例えば1以上の水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、並びにそれらの組合せを含む。医薬として許容される担体は、さらに少量の補助物質、例えば湿潤剤又は乳濁剤、保存剤、又は緩衝剤をさらに含むことができ、これらは結合タンパク質の有効期間又は有効性を高める。注射組成物は、当該技術分野に周知であり、哺乳動物に投与された後に、素早く、持続性の、又は遅延した活性成分の放出を提供するために剤形されうる。

10

【0087】

本発明の組成物は、様々な形態でありうる。これらは、例えば、固体、半固体、及び液体投与形態、例えば錠剤、ピル、粉末、液体溶液、分散液又は懸濁液、リポソーム、坐薬、注射及び輸液溶液を含む。好ましい形態は、投与及び治療適用の意図されたモードに依存する。

【0088】

そうした組成物は、医薬分野において周知の様式で製造される。組成物を製造する際、活性成分は、通常担体と混合されるか、又は担体で希釈されるか、及び/又はカプセル、サチェット、紙、又は他の容器の形で剤形されうる。担体が、希釈剤として用いられるとき、担体は、固体、半固体、又は溶媒として働く液体物質、賦形剤、活性成分のための培地でありうる。こうして、組成物は、錠剤、ロゼンジ、サチェット、カプセル、エリクシル、懸濁液、(固体として又は液体培地内の)エアロゾル、例えば活性化化合物を重量で10%まで含む軟膏、軟及び硬ゼラチンカプセル、坐薬、注射液、懸濁液、滅菌パック粉末、及び経皮パッチの形であり得る。

20

【0089】

ここで本発明を一般的に記載すると、例示の方法により提供される以下の実施例を参考にして同じことがより容易に理解されるだろう。実施例は、本発明を理解する際に、手助けとなるように記載されるが、その範囲をいずれの方法において制限することを意図されないし、そのように解釈されるべきではない。そうした方法は、当業者に周知であり、そして多くの文献に記載されている。慣用方法、例えばベクター及びプラスミドの構築に使用される方法、ベクター及びプラスミドなどにポリペプチドをコードする核酸を挿入する方法、プラスミドの宿主細胞への導入、及び遺伝子及び遺伝子産物の発現及びその決定などの慣用方法の詳細な記載は、多くの刊行物、例えばSambrook, J. et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press から得られる。本明細書中で挙げられる参考文献は、その全てを本明細書中に援用される。

30

【実施例】

【0090】

40

実施例1

DNAラダー化によるラット黄体のアポトーシスの可視化

アポトーシスの程度をDNAラダー化により測定した。ゲノムDNAを分散黄体細胞から、又は切除した黄体組織から、QIAamp DNA Blood Kit(Qiagen)を使用して、製品説明書に従って単離した。PGF-2で処理することによりアポトーシスを誘導する前、アポトーシスの誘導後1時間、及び24時間で、黄体組織を切除した。500 ngのDNAを、0.2 μ Ci [$-^{32}$ P]dCTP、1 mM トリス、0.5 mM \cdot EDTA、3 ユニットのクレノー酵素、及び0.2 pM づつのdATP、dGTP、及びdTTPと室温で30分インキュベーションすることにより、単離されたDNAを末端標識した。取り込まれていないヌクレオチドを、Sambrook et al.,に従ってサンプルを1 mlのSepadex G50カラム

50

に通すことにより取り除いた。サンプルを次にトリス-酢酸-EDTA (1.8%)ゲル電気泳動により分離した。ゲルを30分間、室温にて吸引下で乾燥して、そして-80℃で24時間X線フィルムに露光した。

【0091】

1の実験では、過排卵処理されたラット黄体におけるアポトーシスの程度を、PGF-2を注射した0、1、又は24時間後で試験した。0時間のコントロールにおいて、卵巣は、PGF-2注射することなく取り出された。アポトーシスに関連するヌクレアーゼ活性を反映する低分子量のDNA断片のラダーは、PGF-2で処理する前に切除されたコントロールの黄体組織において明確ではなかったが、アポトーシスの誘導後1時間内に認められるようになり、そしてアポトーシスの誘導後24時間でより強調される。これらは図16に示される。この図では、上のパネルが、³²P-dCTP-標識されたラット黄体アポトーシス特異的DH5のcDNAの3'非翻訳領域でプローブされたノーザン・ブロットのオートラジオグラフィーである。下のパネルは、全てのRNAを臭化エチジウム染色したゲルである。各レーンは、10μgのRNAを含む。このデータにより、EIF-5A転写産物が、血清の使用を止めた後に下方制御されるということを示す。

10

【0092】

別の実施態様では、対応するコントロール動物は、PGF-2の代わりに生理食塩水で処理された。生理食塩水又はPGF-2で処理後15分で、黄体を動物から取り出した。ゲノムDNAを、動物から組織を取り出した後3時間及び5時間で、黄体から単離した。DNAラダー及び増大された末端標識されたゲノムDNAは、PGF-2処理された動物から組織を取り出した後6時間で明確であったが、組織から取り出した3時間後では、明らかではなかった。図17を参照のこと。アポトーシスを反映するDNAラダーはまた、黄体をPGF-2で処理後15分で切除し、そしてEBSS (Gibco)中のin vitro条件下で6時間維持した時にも明らかである。アポトーシスと関連するヌクレアーゼ活性はまた、ゲノムDNAの末端標識が過度に多いことから明らかである。

20

【0093】

別の実験では、500μgのPGF-2で皮下注射することにより、過排卵を誘導した。コントロールのラットを、等量の生理食塩水溶液で処理した。15~30分後、卵巣を取り出し、そしてコラゲナーゼで細分化した。PGF-2で処理されたラット由来の分散された細胞を、10mmグルタミン+10mmスベルミジンで1時間インキュベーションし、そしてスベルミジンを含まない10mmグルタミンでさらに5時間インキュベーションするか(レーン2)、又は10mmグルタミン+10mmスベルミジンで1時間インキュベーションし、そしてさらに10mmグルタミン+1mmスベルミジンで5時間インキュベーションした(レーン3)。生理食塩水で処置されたラット由来のコントロール細胞を、コラゲナーゼで分散させ、そして1時間インキュベーションし、さらに5時間グルタミンのみの中でインキュベーションした(レーン1)。各サンプル由来の500ナノグラムのDNAを、クレノー酵素を使用して[³²P]-dCTPで標識し、1.8%のアガロースゲルで分離させて、フィルムに24時間露光した。結果を図18に示した。

30

【0094】

さらに別の実施態様では、過排卵処理されたラットを、500μgのPGF-2を皮下注射する24、12、及び2時間前に、0.333mg/100g体重の等しい投与量で3回デリバリーして、100mg/100g体重のスベルミジンを皮下に注射した。コントロール・ラットを、3のセット：注射なし；スベルミジンを3回注射するが、PGF-2の注射なし；及びPGF-2処理前に同じ量の生理食塩水の3回注射する群に分けた。プロスタグランジン処理後1時間35分で、又は3時間45分で卵巣をラットから取り出し、そしてDNAの単離に使用した。各サンプル由来のDNA 500ngを、クレノー酵素を使用して[³²P]-dCTPで標識し、1.8%アガロースゲル上で分離し、そしてフィルムに24時間露光した。レーン1、注射なし(レーン3~5と同じ時に動物を屠殺した)；レーン2、スベルミジンで3回注射(レーン3~5と同じ時に動物を屠殺した)；レーン3、生理食塩水の3回注射の後にPGF-2を注射(動物をPGF-2で処理

40

50

後 1 時間 3 5 分で屠殺した) ; レーン 4、スベルミジンの 3 回注射の後に P G F 2 を注射 (P G F - 2 で処理後 1 時間 3 5 分で動物を屠殺した) ; レーン 5、スベルミジンの 3 回注射の後に P G F 2 で注射 (動物を P G F - 2 で処理後 1 時間 3 5 分で屠殺した) ; レーン 6、スベルミジンの 3 回注射の後に P G F - 2 を注射 (動物を P G F - 2 で処理後 3 時間 4 5 分で屠殺した) ; レーン 7、スベルミジンの 3 回注射の後に P G F - 2 を注射 (動物を P G F - 2 で処理後 3 時間 4 5 分で屠殺した)。結果を図 1 9 に示す。

【 0 0 9 5 】

R N A 単離

P G F - 2 でアポトーシスを誘導した後、様々な時間でラットから取り出した黄体から全量 R N A を単離した。簡潔に記すと、組織 (5 g) を液体窒素中で粉末にした。粉末は、 3 0 m l のグアニジウム緩衝液 (4 M グアニジウム・イソチオシアネート、 2 . 5 m M ・ N a O A c 、 p H 8 . 5 、 0 . 8 % -メルカプトエタノール) と混合した。混合体をミラクロス (Miracloth) の 4 層を通してろ過し、そして 4 1 0 0 0 0 g で 3 0 分間遠心した。上清を次に、 1 1 2 0 0 g で 2 0 時間、塩化セシウム密度勾配遠心にかけた。ペレット化された R N A を 7 5 % エタノールで洗浄し、 6 0 0 m l の D E P C 処理水中に再懸濁し、そして R N A を - 7 0 にて 1 . 5 m l の 9 5 % エタノール及び 6 0 m l の 3 M ・ N a O A c で沈殿させた。

10

【 0 0 9 6 】

ゲノム D N A 単離及びラダー化

製品説明書に従って QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen) を使用して、抽出された黄体組織又は分散された黄体細胞からゲノム D N A を単離した。 5 0 0 n g の D N A を 0 . 2 μ C i [$-^{32}$ P] d C T P 、 1 m M トリス、 0 . 5 m M ・ E D T A 、 3 ユニットのクレノー酵素、及び 0 . 2 p M づつの d A T P 、 d G T P 、及び d T T P と、室温で 3 0 分間インキュベーションすることにより、D N A を末端標識した。Maniatis et al., により記載された方法に従って、サンプルを 1 m l セファデックス G - 5 0 カラムを通すことにより、取り込みされていないヌクレオチドを取り除いた。サンプルを次にトリス-酢酸 E D T A (2 %) ゲル電気泳動により分離した。ゲルを吸引下で 3 0 分間乾燥し、そして X 線フィルムに - 8 0 で 2 4 時間露光した。

20

【 0 0 9 7 】

プラスミド D N A 単離、D N A シーケンス

上記 Sambrook et al., により記載されるアルカリ溶解法を使用して、プラスミド D N A を単離した。全長の陽性 c D N A クローンを、ジデオキシ・シーケンス法 (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463-5467) を使用してシーケンスした。オープンリーディング・フレームを B L S T 検索 (GenBank, Bethesda, MD) を使用してコンパイルし、そして分析し、そして配列比較を B C M サーチ・ランチャー : 多配列比較・パターン誘導性の多配列比較法 (F. Corpet, Nuc. Acids Res., 16: 10881-10890, (1987) を参照のこと) を使用してシーケンスした。シーケンス及びシーケンス比較を図 5 - 1 1 に示す。

30

【 0 0 9 8 】

ラット黄体 R N A のノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーション

アポトーシスの種々のステージでのラット黄体から単離された 2 0 m g の全 R N A を、 1 % 変性ホルムアルデヒド・アガロース・ゲル上で分離し、そしてナイロン膜上に固定した。ランダム・プライマー・キット (Boehringer) を使用して 32 P - d C T P で標識された全長ラット・アポトーシス特異的 e I F - 5 A ・ c D N A (配列番号 1) を使用して、膜をプローブした (7×10^7 c p m) 。代わりに、ランダム・プライマー・キット (Boehringer) を使用して 32 P - d C T P で標識された全長ラットアポトーシス特異的 D H S ・ c D N A (配列番号 6) を使用して膜をプローブした (7×10^7 c p m) 。膜を 1 \times S S C 、 0 . 1 % S D S で室温で 1 回、そして 0 . 2 \times S S C 、 0 . 1 % S D S で 6 5 にて 3 回洗浄した。膜を乾燥し、そして - 7 0 で一晩 X 線フィルムに露光した。

40

【 0 0 9 9 】

上記のように、e I F - 5 A 及び D H S は、両方ともラット組織をアポトーシスさせる

50

際に上方制御される。アポトーシス特異的 e I F - 5 A の発現は、P G F - 2 で処理することによりアポトーシスを誘導した後に有意に増大される。つまり、時間 0 で低く、処理後 1 時間以内はかなり増加し、処理後 8 時間以内でさらに増加し、そして処理後 2 4 時間以内で少し増加した(図 1 4)。D H S の発現は、時間 0 で低く、処理後 1 時間でかなり増加し、処理後 8 時間以内でさらに増加し、そして処理後 2 4 時間以内でさらに少し増加した(図 1 5)。

【 0 1 0 0 】

酵母、真菌、及びヒト e I F - 5 A 配列を使用した、ラット黄体 R T - P C R 産物の作成
アポトーシス特異的 e I F - 5 A の遺伝子の 3' 末端に対応する部分長のアポトーシス
特異的 e I F - 5 A 配列(配列番号 1 1)を、酵母、真菌、及びヒト e I F - 5 A 配列から設
計されたオリゴヌクレオチド・プライマー対を使用する R T - P C R により、アポトーシ
スを起しているラット黄体 R N A テンプレートから作成した。ラット e I F - 5 A 遺伝子
の 3' 末端を単離するために使用される上流のプライマーは、20ヌクレオチドの縮重プ
ライマー：5' T C S A A R A C H G G N A A G C A Y G G 3' (配列番号 9)である。こ
こで、S は、C 及び G から選ばれ；R は A 及び G から選ばれ；H は A、T、及び C から選
ばれ；Y は C 及び T から選ばれ、そして N は任意の核酸である。ラット e I F - 5 A 遺伝
子の 3' 末端を単離するために使用される下流のプライマーは、42ヌクレオチド：5'
G C G A A G C T T C C A T G G C T C G A G T
T T 3' (配列番号 10)を含む。リバーシ・トランスクリプターゼ・ポリメラーゼ・チェ
ーン反応(R T - P C R)を行った。簡潔に記載すると、下流プライマー 5 m g を使用し、
c D N A の主鎖を合成した。上流及び下流のプライマーの両方を使用して、R T - P C R
において、主鎖をテンプレートとして使用した。

【 0 1 0 1 】

アガロースゲル上で R T - P C R 産物を分離することにより、900 b p 断片が存在
することがわかった。該 900 b p の断片を、平滑末端ライゲーションを使用して、p B l
u e s c r i p t (商標)(Stratagene Cloning Systems, LaJolla, CA)中にサブクローニ
ングし、配列を決定した(配列番号 1 1)。3' 末端の c D N A 配列は、配列番号 1 1 で
あり、そして 3' 末端のアミノ酸配列は配列番号 1 2 である。図 1 - 2 を参照のこと。

【 0 1 0 2 】

アポトーシス特異的 e I F - 5 A 遺伝子の 5' 末端に対応し、かつ 3' 末端の配列と重
なる部分長のアポトーシス特異的 e I F - 5 A 配列(配列番号 1 5)を、R T - P C R により
、アポトーシスを起しているラット黄体 R N A テンプレートから作成した。5' プライ
マーは、以下の配列：5' C A G G T C T A G A G T T G G A A T C G A A G C 3' (配
列番号 1 3)を有する 24 m e r であり、該配列は、ヒト e I F - 5 A 配列から設計された。
3' プライマーは、以下の配列：5' A T A T C T C G A G C C T T G A T T G C A A C
A G C T G C C 3' (配列番号 1 4)を有する 30 m e r であり、該配列は、3' 末端 R T
- P C R 断片に従って設計された。リバーシ・トランスクリプターゼ・ポリメラーゼ・チ
ェーン・リアクション(R T - P C R)を行った。簡潔に記載すると、5 m g の下流プライ
マーを使用して、c D N A の主鎖を合成した。上流及び下流プライマーの両者を使用する
R T - P C R においてテンプレートとして使用した。

【 0 1 0 3 】

アガロース・ゲル上での R T - P C R 産物の分離は、500 b p の断片を明らかにし、
上流及び下流に存在する X b a I 及び X h o I クローニング・サイトを使用して、該断片
を p B l u e s c r i p t (商標)(Stratagene Cloning Systems, LaJolla, CA)中にサブ
クローニングし、そしてシーケンスした(配列番号 1 5)。5' 末端の c D N A 配列は、配
列番号 1 5 であり、そして 5' 末端のアミノ酸配列は配列番号 1 6 である。図 2 を参照の
こと。

【 0 1 0 4 】

ラット・アポトーシス特異的 e I F - 5 A の 3' 末端及び 5' 末端の配列(配列番号 1 1
と配列番号 1 5 のそれぞれ)は、重なり合い、そして全長 c D N A 配列を与えた(配列番号

1)。全長配列を整列し、そしてGenBankデータ・ベースの配列と比較した。図1-2を参照のこと。cDNAクローンは、16.8KDaの計算された分子量を有する154個のアミノ酸のポリペプチド(配列番号2)をコードする。RT-PCRにより得られたラットアポトーシス特異的黄体eIF-5A遺伝子の全長cDNAについてのヌクレオチド配列、配列番号1は、図3に示され、そして対応する派生アミノ酸配列は、配列番号9である。得られたeIF-5Aのアミノ酸配列の全長は、ヒト及びマウスeIF-5a配列と配列比較される。図7-9を参照のこと。

【0105】

ヒトDHS配列に基いたプライマーを使用した、アポトーシスを起しているラット黄体のRT-PCRの作成

10

アポトーシス特異的DHS遺伝子の3'末端に対応する部分長のアポトーシス特異的DHS配列(配列番号6)をヒトDHS配列から設計されたオリゴヌクレオチド・プライマーのペアを使用するRT-PCRにより、アポトーシスを起しているラット黄体RNAテンプレートから作成した。5'プライマーは、以下の配列5'GTCCTGTGTATTATTGGGCCCC3'(配列番号17)を有する20merであり;3'プライマーは、以下の配列5'GCGAAGCTTTC CATGGCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT3'(配列番号18)を有する42merである。リバーシ・トランスクリプターゼ・ポリメラーゼ・チェーン反応(RT-PCR)を行った。簡潔に記載すると、5mgの下流プライマーを使用して、cDNAの主鎖を合成した。上流及び下流プライマーの両者を使用するRT-PCRで、主鎖をテンプレートとして使用した。

20

【0106】

RT-PCRの産物をアガロース・ゲル上で分離することにより、606bpの断片の存在を明らかにした。該断片を、平滑末端ライゲーションを使用してpBlue-script(商標)(Stratagene Cloning Systems, LaJolla, CA)中にサブクローニングし、そしてシーケンスした(配列番号6)。RT-PCRにより得られるラット・アポトーシス特異的黄体DHS遺伝子の部分長cDNAに対するヌクレオチド配列を、図4に記載し、そして対応する派生アミノ酸配列は、配列番号7である。

【0107】

ゲノムDNAの単離及びサザン分析

サザンブロッティング用のゲノムDNAを、切除したラット卵巣から単離した。約100mgの卵巣組織を、小片に分割し、そして15mlチューブ内に入れた。1mlのPBSを加え、組織懸濁液をゆっくり振盪し、次にピペットを用いてPBSを取り除くことにより、組織を2回PBSで洗浄した。組織を2.06mlDNA緩衝液(0.2Mトリス-HCl・pH8.0及び0.1mM・EDTA)中に再懸濁し、そして240µlの10%SDS及び100µlのプロテイナーゼK(Boehringer Mannheim; 10mg/ml)を加えた。組織を45の振盪水浴中に一晚配置した。次の日、別の100µlのプロテイナーゼK(10mg/ml)を加え、そして組織懸濁液をさらに4時間45にて水浴中でインキュベーションした。インキュベーションした後に、組織懸濁液を等量のフェノール：クロロホルム：イソ-アミル・アルコール(25:24:1)で一回抽出し、そして等量のクロロホルム：イソアミルアルコール(24:1)で抽出した。抽出に続いて、1/10量の3M酢酸ナトリウム(pH5.2)と2倍量のエタノールを加えた。ブンゼンバーナーを使用して密閉されそしてフック型にされたガラス・ピペットを使用して、DNAスレッドを溶液からとり、そしてDNAをきれいなマイクロ遠心チューブ中にいれた。DNAを70%エタノールで一回洗浄し、そして10分間風乾した。DNAペレットを500µlの10mMトリス-HCl(pH8.0)中に溶解し、10µl・RNaseA(10mg/ml)を加え、そしてDNAを37で1時間インキュベーションした。DNAをフェノール：クロロホルム：イソ-アミルアルコール(25:24:1)で抽出し、そしてDNAを1/10量の3M酢酸ナトリウム(pH5.2)及び2倍量のエタノールを加えることにより沈殿させた。DNAを413000×gで10分間遠心することにDNAをペレット化した。DNAペレットを70%エタノールで1回洗浄し、そしてDNAを4で一晚回転させること

30

40

50

により、200 μ l の 10 mM・トリス-HCl (pH 8.0) 中に溶解した。

【0108】

サザンブロット分析では、ラット卵巢から単離されたゲノムDNAを、内部の遺伝子を切断しないか、又は1回だけ切断する種々の制限酵素で切断した。これを達成するために、10 μ g のゲノムDNA、20 μ l の 10 \times 反応緩衝液、及び100 Uの制限酵素を総反応量200 μ l で5～6時間反応させた。切断されたDNAを0.7%アガロース・ゲル上にロードし、そして40ボルトで6時間又は15ボルトで一晩電気泳動にかけた。電気泳動後、ゲルを10分間0.2 N・HCl 中で脱プリン化し、その後変性溶液(0.5 M・NaOH、1.5 M・NaCl)中で15分間2回洗浄し、そして中和緩衝液(1.5 M・NaCl、0.5 M トリス・HCl、pH 7.4)中で15分間2回洗浄した。DNAをナイロン膜に転写し、そして膜をハイブリダイゼーション溶液(40%ホルムアミド、6 \times SSC、5 \times デンハート溶液(1 \times デンハート溶液は、0.2%フィコール、0.02% PVP、及び0.02% BSA)、0.5% SDS、及び1.5 mg 変性サケ精子DNA)中でプレハイブリダイゼーションした。ラット eIF-5A・cDNAの3' UTRにおける700 bpのPCR断片(650 bpの3' UTR及び50 bpのコード領域)を[$^{-32}$ P]-dCTPでランダム・プライミングをすることにより標識し、そして1 \times 10⁶ cpm/ml で膜に加えた。

【0109】

同様に、ラット DHS・cDNAの606 bpのPCR断片(450 bpのコード領域及び156 bpの3' UTR)を、[$^{-32}$ P]-dCTPでランダム・プライム標識し、そして1 \times 10⁶ cpm/ml で加えて、第二の同一膜へと加えた。プロットを一晩42℃でハイブリッド形成させ、そして2 \times SSC及び0.1% SDSで42℃にて2回洗浄し、そして1 \times SSC及び0.1% SDSで42℃にて2回洗浄した。プロットを次にフィルムに3～10日間露光した。

【0110】

図20に示されるようにラット黄体ゲノムDNAを、制限酵素で切断し、そして 32 P-dCTP-標識された全長 eIF-5A・cDNAでプローブした。高い厳密性条件下でのハイブリダイゼーションにより、全長cDNAプローブが、各制限酵素で切断されたDNAサンプルについて、幾つかの制限断片にハイブリダイゼーションすることを明らかにされ、このことは、eIF-5Aの幾つかのアイソフォームが存在することを示唆する。特に注目すべきなのは、ラット・ゲノムDNAを、アポトーシス特異的 eIF-5Aのオープン・リーディング・フレーム内に制限酵素部位を有する EcoRV で切断したとき、eIF-5Aのアポトーシス特異的アイソフォームの2個の制限酵素断片が、サザンブロットにおいて検出できるということである。この2個の断片を、図20において二個の矢印で示す。アポトーシス特異的 eIF-5Aのアイソフォームに対応する制限酵素断片を EcoR1 及び BamH1 と記されたレーンにおいて1の矢印により示す。ここで、EcoR1 及び BamH1 は、オープン・リーディング・フレーム内に切断部位が存在しない制限酵素である。これらの結果により、アポトーシス特異的 eIF-5A が、ラットにおいてシングルコピーの遺伝子であるということが示唆された。図5～13において示されるように、eIF-5A 遺伝子は、種を通じて高度に保存されており、そしていずれかの種におけるアイソフォーム間においてかなりの程度、保存することが予期される。

【0111】

図21は、 32 P-dCTP 標識された部分長ラット黄体アポトーシス特異的 DHS・cDNAでプローブされたラット・ゲノムDNAのサザン・プロットを示す。ゲノムDNAを、EcoRVで切断した。ここで該制限酵素は、プローブとして使用される部分長cDNAを切断しない。2個の切断断片が明らかであり、該遺伝子の2つのコピーが存在するか、又はこの遺伝子がEcoRVサイトを伴うイントロンを含むということが示唆される。

【0112】

実施例 2

C O S - 7 細胞の培養及び R N A の単離

10

20

30

40

50

。該プラスミドはまた、安定な形質転換体の選別を可能にするネオマイシン-抵抗性(G 4 1 8)遺伝子、SV 4 0 巨大T 抗原を発現する細胞、例えばCOS-7 内でエピソーム複製を許容するSV 4 0 初期プロモーター及び開始点を特徴とする。

【0 1 1 6】

トランスフェクション実験において使用されるCOS-7 細胞を、タンパク質抽出に使用される細胞については2 4 ウェル細胞培養プレート(Corning)内で、或いは染色に使用される細胞については4 チャンバー培養スライド(Falcon)内で培養した。細胞を1 0 % FBSを加えたが、ペニシリン/ストレプトマイシンを欠いたDMEM 中で、5 0 ~ 7 0 % コンフルエントになるまで成長させた。2 4 ウェル・プレートの1 ウェル又は培養スライドに十分なトランスフェクション培地を、0 . 3 2 μ g のプラスミドDNA を4 2 . 5 μ l の無血清DMEM 中に希釈し、そして室温で5 分間インキュベーションした。5 分後、リポフェクタミン(LipofectAMINE)混合液をDNA 混合液に加え、そして室温で3 0 ~ 6 0 分間インキュベーションした。トランスフェクションされる細胞を、トランスフェクション培地を重層する前に、無血清DMEM で1 回洗浄し、そして細胞を成長チャンバー中に4 時間戻した。

10

【0 1 1 7】

インキュベーション後、0 . 1 7 ml のDMEM + 2 0 % FBSを細胞に加えた。ウエスタン・ブロット分析用の染色又は回収に先立ってアポトーシスを起すように誘導される前に、細胞をさらに4 0 時間培養した。コントロールとして、プラスミドDNA をトランスフェクション培地から取り除いた偽トランスフェクションを行った。

20

【0 1 1 8】

タンパク質抽出及びウエスタン・ブロッティング

細胞をPBS (8 g / L \cdot NaCl、0 . 2 g / L \cdot KCl、1 . 4 4 g / L \cdot Na₂HPO₄、及び0 . 2 4 g / L \cdot KH₂PO₄) 中で2 回洗浄し、次に1 5 0 μ l の熱SDS ゲル添加液(5 0 mM トリスHCl \cdot pH 6 . 8、1 0 0 mM ジチオスレイトール、2 % SDS、0 . 1 % ブロモフェノール・ブルー、及び1 0 % グリセロール)を加えることにより、トランスフェクションされた細胞からタンパク質をウエスタン・ブロッティング用に単離した。細胞ライセートをマイクロ遠心チューブ内に回収し、9 5 $^{\circ}$ C で1 0 分間熱し、そして次に1 3 0 0 0 \times g で1 0 分間遠心した。上清を新たなマイクロ遠心チューブに移し、そして- 2 0 $^{\circ}$ C で使用するまで貯蔵した。

30

【0 1 1 9】

ウエスタン・ブロッティング用に、2 . 5 又は5 μ g の全タンパク質を、1 2 % SDS - ポリアクリルアミド・ゲル上で分離した。分離したタンパク質を、ポリビニリデン・ジフロリド膜に転写した。該膜を次に1 時間、ブロッキング溶液(5 % スキムミルク粉末、0 . 0 2 % アジ化ナトリウムを含むPBS) 中でインキュベーションし、そしてPBS - T (PBS + 0 . 0 5 % Tween - 2 0) で1 5 分間3 回洗浄した。膜を一晚PBS - T 中で、4 $^{\circ}$ C で保存した。次の日に室温まで温め、膜を3 0 秒間1 μ g / ml のポリビニル・アルコール中でブロッキングした。膜を脱イオン水で5 回洗浄し、そしてPBS 中の5 % ミルクの溶液中で3 0 分間ブロッキングした。一次抗体をPBS 中5 % ミルクの溶液中で、膜とインキュベーションする前に、3 0 分間プレインキュベーションした。

40

【0 1 2 0】

幾つかの一次抗体を使用した。抗-[HA]-ペルオキシダーゼ抗体(Roche Molecular Biochemicals)を、1 : 5 0 0 0 の希釈度で使用して、組換えタンパク質の発現を検出した。この抗体が、ペルオキシダーゼに結合されているので、二次抗体は必要がなく、そしてブロットを洗浄し、そして化学発光により現像された。使用された他の一次抗体は、Oncogeneから購入したモノクローナル抗体であって、p 5 3 を認識するもの(Ab - 6)、Bcl - 2 を認識するもの(Ab - 1)、及びc - Myc を認識するもの(Ab - 2)である。p 5 3 に対するモノクローナル抗体を0 . 1 μ g / ml の希釈度で使用し、そしてBcl - 2 及びc - Myc に対するモノクローナル抗体は、0 . 8 3 μ g / ml の希釈度で使用した。一次抗体で6 0 ~ 9 0 分間インキュベーションした後に、膜をPBS - T 中で1 5 分間3 回洗浄し

50

た。二次抗体を1%ミルクを含むPBS中に希釈し、そして膜と60~90分間インキュベーションした。p53(Ab-6)を一次抗体として使用したとき、使用される二次抗体は、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗マウスIgG(Rockland)であり、1:1000の希釈度であった。Bcl-2(Ab-1)及びc-Myc(Ab-2)を一次抗体として使用するとき、ペルオキシダーゼ結合ラビット抗マウスIgGを、1:5000の希釈度で使用した。二次抗体とインキュベーションした後に、膜をPBS-T中で3回洗浄した。

【0121】

プロットを現像するために2種の検出方法、比色法と化学発光法を使用した。比色法は、p53(Ab-6)を一次抗体として、アルカリホスファターゼ結合二次抗体と組み合わせて使用するときのみ、使用した。結合された抗体を、暗所で、0.33mg/mlニトロ・ブルー・テトラゾリウム、0.165mg/ml5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル・ホスフェート、100mM・NaCl、5mM・MgCl₂、及び100mM・トリス-HCl(pH9.5)の溶液中でインキュベーションすることにより可視化された。呈色反応は、プロットを2mM・EDTAを含むPBS中でインキュベーションすることにより停止された。化学発光検出法は、抗-[HA]-ペルオキシダーゼ、Bcl-2(Ab-1)、及びc-Myc(Ab-2)を含む他の一次抗体全てについて使用された。ECLプラス・ウエスタン・プロットング検出キット(ECL Plus Western blotting detection kit)(Amersham Pharmacia Biotech)を使用して、ペルオキシダーゼ結合抗体を検出した。簡潔に記載すると、膜を軽く乾燥状態でプロットし、次に暗所で試薬Aと試薬Bの40:1混合液と5分間インキュベーションした。膜を乾燥状態でプロットし、アセテート/シートの間に置き、そして10秒~10分で時間を変えて、X線フィルムに露光した。

【0122】

COS7細胞におけるアポトーシスの誘導

トランスフェクションされたCOS-7細胞においてアポトーシスを誘導するために、2種の方法、血清飢餓及びアクチノマイシンD、ストレプトマイシスsp(streptomyces sp)(Calbiochem)処理を使用した。両方の処理において、培地をトランスフェクション後40時間で取り除いた。血清飢餓実験においては、培地を、血清-及び抗生物質を伴わないDMEMと置換した。10%FBSを加えた抗生物質を伴わないDMEMをコントロールとして使用した。アクチノマイシンDによるアポトーシス誘導では、培地を10%FBS及びメタノール中に溶解した1µg/mlアクチノマイシンDを加えた抗生物質を含まないDMEMと置換された。コントロール細胞を、10%FBS及び等量のメタノールを加えた抗生物質を含まないDMEM中で成長させた。両方の方法では、アポトーシスを起している細胞の割合(%)を、ヘキスト又はアネキシンV-Cy-3で染色することにより48時間後に測定した。アポトーシスの誘導を、図22において示されるようにノーザンブロット分析により確認した。

【0123】

ヘキスト染色

核断片化及び凝集などの形態的特徴に基いたアポトーシスを起している細胞を同定するために、核染色であるヘキストを使用して、トランスフェクションされたCOS-7の細胞の核を標識した。3:1の無水メタノール及び氷酢酸からなる固定液を、使用直前に調製した。等量の固定液を、培養スライド上で成長しているCOS-7細胞の培地に加え、そして2分間インキュベーションした。培地/固定液の混合液を細胞から取り除いて、捨て、そして1mlの固定液を細胞に加えた。5分後、固定液をすて、そして1mlの新たな固定液を細胞に加えて5分間インキュベーションした。固定液を捨て、細胞を4分間風乾し、その後1mlのヘキスト染色液(0.5µg/mlヘキスト33258を含むPBS)を加えた。暗所で10分のインキュベーションの後、染色溶液を捨て、そしてスライドを脱イオン水で1分間3回洗浄した。洗浄後、1mlのマックルバイン(McIlvaine's)緩衝液(0.021Mクエン酸、0.058M・Na₂HPO₄・7H₂O; pH5.6)を細胞に加え、そして細胞を暗所で20分間インキュベーションした。緩衝液を捨て、そして細胞を暗所で5分間風乾し、そして培養スライドのウェルを区切るチャンバーを取り除いた。蛍光用

ベクタシールド (Vectashield) 標本用培地 (Vector Laboratories) の数滴をスライドに加え、そしてカバーガラスを被せた。染色された細胞を UV フィルターを使用する蛍光顕微鏡の下で観察した。明るく染色されるか又は断片化された核を有する細胞を、アポトーシスを起している細胞として計測した。

【0124】

アネキシン V - C y 3 染色

アネキシン V - C y 3 アポトーシス検出キット (Sigma) は、アポトーシス細胞上の外表面に現われたホスファチジルセリンを蛍光標識するために使用された。該キットを、以下の改変を伴った製品プロトコルに従って使用した。簡潔に記載すると、4 個のチャンバー培養スライド上で成長するトランスフェクションされた COS - 7 細胞を、PBS で二回洗 10
浄し、そして 1 × 結合緩衝液で 3 回洗浄した。150 µl の染色溶液 (1 × 結合緩衝液中の 1 µg / ml Annexin V) を加え、そして細胞を暗所で 10 分間インキュベーションした。染色溶液を次に取り除き、そして細胞を 1 × 結合緩衝液で 5 回洗浄した。チャンパー壁を培養スライドから取り除き、そして数滴の 1 × 結合緩衝液を細胞上に配置し、そしてカバーガラスを被せた。染色された細胞を、緑色のフィルターを使用する蛍光顕微鏡により分析して、陽性染色された (アポトーシスを起している) 細胞の赤色蛍光を可視化した。全細胞数を、可視光の下で細胞数を計数することにより測定した。

【0125】

実施例 3

本実施例は、アポトーシス因子 5 A 及び DHS での、アポトーシスの調節を示す。 20

一般的方法及び前の実施例において記載される方法を使用して、図 23 は、COS - 7 細胞の一過性トランスフェクションの方法を記載するフローチャートであり、ここで無血清培地中の細胞を、プラスミド DNA を含むリポフェクタミン中で 4 時間インキュベーションし、血清を加え、そして細胞をさらに 40 時間インキュベーションした。細胞を次に、分析前にさらに 48 時間血清を含む通常培地中でインキュベーションするか (つまり更なる処理なし)、分析前に血清を 48 時間欠乏させてアポトーシスを誘導するか、又はアクチノマイシン D で 48 時間処理して分析前にアポトーシスを誘導した。

【0126】

図 22 は、pH 6 でトランスフェクションした後、COS - 7 細胞中における外来タンパク質の一過的な発現を示すウエスタンブロットである。偽トランスフェクション、或 30
いは pH 6 - LacZ、pH 6 - アンチセンス 3' rF5A (pH 6 - アンチセンス 3' UTR アポトーシス eIF - 5A)、又は pH 6 - センス rF5A (pH 6 - 全長ラットアポトーシス eIF - 5A) でトランスフェクションされた 48 時間あとで、タンパク質を COS - 7 細胞から単離した。各サンプルからの 5 µg のタンパク質を SDS - PAGE により分画し、PVD 膜に転写し、そして抗 - [HA] - ペルオキシダーゼでウエスタンブロットした。結合抗体を、化学発光により検出し、そして X 線フィルムに 30 秒間露光した。LacZ (レーン 2) 及び センス・ラット・アポトーシス eIF - 5A (レーン 4) の発現は、明らかにみることができる。

【0127】

上で記載されるように、COS - 7 細胞は、偽トランスフェクションされるか、或いは 40
pH 6 - センス rF5A (pH 6 - 全長ラット eIF - 5A) でトランスフェクションされる。トランスフェクション後 40 時間で、48 時間血清を取り除くことによりアポトーシスを引き起こすように、細胞を誘導した。トランスフェクションされた細胞抽出液におけるカスパーゼのタンパク質分解活性を、蛍光定量的に均一なカスパーゼ・アッセイ・キット (fluorometric homogenous caspase assay kit) (Roche Diagnostics) を使用して計測した。DNA 断片を、FragEL・DNA 断片アポトーシス検出キット (FragEL DNA Fragmentation Apoptosis Detection Kit) (Oncogene) を使用して計測した。該キットは、DNA 断片の晒された 3' OH 末端を蛍光標識されたデオキシヌクレオチドで標識する。

【0128】

更なる COS - 7 細胞を、偽トランスフェクションし、或いは pH 6 - センス rF5 50

A (p H M 6 -全長ラット e I F - 5 A)でトランスフェクションした。トランスフェクション後 4 0 時間で、細胞を血清を含む通常培地中でさらに 4 8 時間成長させるか、4 8 時間血清を取り除くことによりアポトーシスを誘導させるか、又は 4 8 時間 0 . 5 μ g / m l のアクチノマイシン D で処理することによりアポトーシスを誘導させた。アポトーシスに付随する核の断片化を表すヘキスト 3 3 2 5 8 で細胞を染色するか、又はアポトーシスに付随するホスファチジルセリンの露出を表すアネキシン V - C y 3 で染色した。染色された細胞を、緑色フィルターを使用する蛍光顕微鏡により観測し、そしてアポトーシスを起している細胞の割合 (%) 測定するために計数した。全細胞数を、可視光のもとで計数した。

【 0 1 2 9 】

図 2 5 は、C O S - 7 細胞が全長ラット・アポトーシス誘導性 e I F - 5 A をセンスの向きで含む p H M 6 で一過的にトランスフェクションされたとき、増加されたカスパーゼ活性により反映されるアポトーシスの増加を表す。アポトーシス誘導性 e I F - 5 A の発現は、カスパーゼ活性の 6 0 % 増加をもたらす。

10

【 0 1 3 0 】

図 2 6 は、C O S - 7 細胞が、全長ラット・アポトーシス誘導性 e I F - 5 A をセンスの向きに含む p H M 6 で一過的にトランスフェクションされたとき、増大された D N A の断片により反映されるアポトーシスの増加を表す。ラット・アポトーシス誘導性 e I F - 5 A の発現は、D N A 断片の 2 7 3 % の増加をもたらした。図 2 7 は、C O S - 7 細胞が全長ラット・アポトーシス誘導性 e I F - 5 A をセンスの向きに含む p H M 6 で一過的にトランスフェクションされたとき、増大された核断片により反映されるアポトーシスの検出を表す。ラット・アポトーシス誘導性 e I F - 5 A を発現する細胞において、断片化された核がより多く発生する。図 2 8 は、C O S - 7 細胞が、全長ラット・アポトーシス誘導性 e I F - 5 A をセンスの向きで含む p H M 6 で一過的にトランスフェクションされたとき、増加した核断片化により反映されるアポトーシスの増加を表す。ラット・アポトーシス誘導性 e I F - 5 A の発現は、非血清飢餓及び血清飢餓サンプルのコントロールに対して、それぞれ 2 7 % 及び 6 3 % 増加した。

20

【 0 1 3 1 】

図 2 9 は、C O S - 7 細胞が全長ラットアポトーシス誘導性 e I F - 5 A をセンスの向きに含む p H M 6 で一過的にトランスフェクションされた場合の、ホスファチジルセリンの露出により反映されるアポトーシスの検出を表す。図 3 0 は、C O S - 7 細胞が全長ラット・アポトーシス誘導性 e I F - 5 A をセンスの向きに含む p H M 6 で一過的にトランスフェクションされるととき、ホスファチジルセリンの露出の増加により反映されるアポトーシスの増加を表す。アポトーシス誘導性 e I F - 5 A の発現は、非血清飢餓及び血清飢餓サンプルのコントロールに対して、ホスファチジルセリンの露出の 1 4 0 % 及び 1 9 8 % の増加をもたらした。

30

【 0 1 3 2 】

図 3 1 は、C O S - 7 細胞が全長ラットアポトーシス誘導性 e I F - 5 A をセンスの向きに含む p H M 6 で一過的にトランスフェクションされたとき、増大した核断片により反映されるアポトーシスの増加を表す。ラット・アポトーシス誘導性 e I F - 5 A の発現は、未処理及び処理サンプルにおけるコントロールに対して、それぞれ 1 1 5 % 及び 6 2 % の核断片の増加をもたらした。図 3 2 は、全長ラットアポトーシス誘導性 e I F - 5 A をセンスの向きに含む p H M 6 で一過的にトランスフェクションされる C O S - 7 細胞が、アポトーシスを起すための更なる処理を受ける条件下、又は受けない条件下でのアポトーシスの増加の比較を表す。

40

【 0 1 3 3 】

実施例 4

本実施例は、アポトーシス因子 5 A 及び D H S の投与後の、アポトーシス活性の調節を表す。

C O S - 7 細胞は、偽トランスフェクションされるか、p H M 6 - L a c Z でトランスフェクションされるか、又は p H M 6 - センス r F 5 A (p H M 6 - 全長ラット e I F - 5 A)

50

でトランスフェクションされ、そして40時間インキュベーションされた。各サンプルから抽出されるタンパク質5 μ gのサンプルを、SDS-PAGEにより分画し、PVDF膜へと転写し、そしてBcl-2を認識するモノクローナル抗体でウエスタン・ブロットした。ペルオキシダーゼ結合ウサギ抗マウスIgGを二次抗体として使用し、そして結合した抗体を化学発光及びX線フィルムへの露光により検出した。結果を図32において示す。pHM6-LacZでトランスフェクションされた細胞において検出できるBcl-2より少ないBcl-2を、pHM6-センス-rF5Aでトランスフェクションされた細胞で検出した。これより、Bcl-2は、下方制御されている。

【0134】

さらなるCOS-7細胞は、偽トランスフェクションされるか、pHM6-アンチセンス3' rF5Aでトランスフェクションされるか、又はpHM6-センスrF5A(pHM6全長ラットアポトーシス特異的eIF-5A)でトランスフェクションされた。トランスフェクション後40時間で、血清を48時間取り除くことによりアポトーシスを誘導した。各サンプル由来のタンパク質抽出液サンプル5 μ gを、SDS-PAGEにより分画して、PVDF膜に転写し、そしてBcl-2を認識するモノクローナル抗体でウエスタンブロットした。ペルオキシダーゼ結合ウサギ抗マウスIgGを二次抗体として使用し、そして結合された抗体を、化学発光及びX線フィルムへの露光により検出した。

10

【0135】

さらに、COS-7細胞を、偽トランスフェクションするか、pHM6-LacZでトランスフェクションするか、又はpHM6-センスrF5A(pHM6-全長ラットeIF-5A)でトランスフェクションし、そして40時間インキュベーションした。各サンプルから抽出されたタンパク質のサンプル5 μ gをSDS-PAGEにより分画し、PVDF膜へ転写し、そしてp53を認識するモノクローナル抗体でウエスタン・ブロットした。アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗マウスIgGを二次抗体として使用し、そして結合された抗体を、比色分析により検出した。

20

【0136】

最後に、COS-7細胞を偽トランスフェクションするか、pHM6-LacZでトランスフェクションするか、またはpHM6-センスrF5A(pHM6-全長ラットeIF-5A)でトランスフェクションし、そして40時間インキュベーションした。各サンプル由来のタンパク質抽出物のサンプル5 μ gを、SDS-PAGEにより分画し、PVDF膜に転写し、そしてp53を認識するモノクローナル抗体でプローブした。対応するタンパク質のプロットを、抗[H A]-ペルオキシダーゼでプローブして、ラット・アポトーシス特異的eIF-5A発現のレベルを測定した。アルカリホスファターゼ結合ヤギ-抗-マウスIgGを二次抗体として使用し、そして結合された抗体を化学発光により検出した。

30

【0137】

図33は、COS-7細胞が、全長ラット・アポトーシス誘導性eIF-5Aをセンスの向きに含むpHM6で一過的にトランスフェクションされるとき、Bcl-2の下方制御を表す。上のパネルは、クマシー・ブルーで染色されたタンパク質ブロットを表し；下のパネルは、対応するウエスタン・ブロットを表す。pHM6-LacZでトランスフェクションされた細胞において検出できるBcl-2と比較して、より少ないBcl-2がpHM6-センスrF5Aでトランスフェクションされた細胞で検出できる。

40

【0138】

図34は、COS-7細胞が全長ラット・アポトーシス誘導性eIF-5Aをアンチセンスの向きに含むpHM6で一過的にトランスフェクションされる場合におけるBcl-2の上方制御を表す。上のパネルは、クマシー・ブルーで染色されたタンパク質ブロットを表し；下のパネルは、対応するウエスタン・ブロットを表す。偽トランスフェクションされた又はpHM6-センスrF5Aでトランスフェクションされた細胞において検出できるBcl-2と比較して、より多くのBcl-2が、pHM6-アンチセンス3' rF5Aでトランスフェクションされた細胞で検出できる。

【0139】

50

図 3 5 は、C O S - 7 細胞が全長ラット・アポトーシス誘導性 e I F - 5 A をセンスの向
きに含む p H M 6 で一過的にトランスフェクションされるとき、c - M y c の上方制御を
表す。上のパネルは、クマシー・ブルーで染色されたタンパク質プロットを表し；下のパ
ネルは、対応するウエスタン・プロットを表す。p H M 6 - L a c Z 又は偽コントロール
でトランスフェクションされた細胞において検出できる c - M y c と比較して、より多く
の c - M y c が、p H M 6 - センス r F 5 A でトランスフェクションされた細胞において検
出できる。

【 0 1 4 0 】

図 3 6 は、C O S - 7 細胞が全長ラット・アポトーシス誘導性 e I F - 5 A をセンスの向
きに含む p H M 6 で一過的にトランスフェクションされるとき、p 5 3 の上方制御を表す
。上のパネルは、クマシー・ブルーで染色されたタンパク質プロットを表し；下のパネル
は、対応するウエスタン・プロットを表す。p H M 6 - L a c Z 又は偽コントロールでト
ランスフェクションされた細胞において検出できる p 5 3 と比較して、より多くの p 5 3
が、p H M 6 - センス r F 5 A でトランスフェクションされた細胞において検出できる。

【 0 1 4 1 】

図 3 7 は、C O S - 7 細胞において、p H M 6 - 全長ラット・アポトーシス-誘導性 e I
F - 5 A の発現の際、P 5 3 上方制御の依存性を表す。抗-[H A]-ペルオキシダーゼでブ
ロークされたウエスタン・プロットにおいて、上のパネルは、クマシー・ブルーで染色さ
れたタンパク質プロットを表し、そして下のパネルは、対応するウエスタン・プロットを
表す。第二のトランスフェクションにおいてより、多くのラットアポトーシス誘導性 e I
F - 5 A が第一トランスフェクションにおいて検出できる。抗-p 5 3 でブローブされたウ
エスタンプロットにおいて、A における上のパネルは、対応するクマシーブルー染色され
たタンパク質プロットを表し、そして下のパネルは、p 5 3 でのウエスタンプロットを表
す。第一トランスフェクションでは、p H M 6 - L a c Z 又は偽コントロールでトランス
フェクションされた細胞において検出できる c - M y c と比較して、より多くの p 5 3 が
が、p H M 6 - センス r F 5 A でトランスフェクションされた細胞において検出できる。
ラット・アポトーシス-誘導性 e I F - 5 A の発現が少ない第二のトランスフェクションで
は、p H M 6 - センス r F 5 A、p H M 6 - L a c Z、又は偽コントロールでトランスフェ
クションされた細胞間における p 5 3 レベルの検出可能な差異はない。

【 0 1 4 2 】

実施例 5

図 4 7 は、ヒト心臓の鼓動及び続いて誘導された心臓発作を模倣するために、心臓組織
において行われる実験を表す。図 4 9 は、研究室のベンチの配置を示す。弁置換手術の間
にヒト心臓組織の切片を電極に取り付けた。小さい重りを心臓組織につけて、心臓鼓動の
強さを計測することを容易にした。電極は、電気刺激を提供して、組織を鼓動させ始めた
。アポトーシス特異的 e I F - 5 A (e I F - 5 a) 及び増殖 e I F - 5 A (e I F 5 b) の両
方の遺伝子発現レベルを、虚血が誘導される前に、心臓組織において計測した。図 4 6 を
参照のこと。虚血前心臓組織において、e I F - 5 a 及び 5 e I F 5 b の両方のレベルが
低く、そしてそのレベルは、相対バランスにあった。この時間のあいだ、酸素及び二酸化
炭素を、干渉液中の心臓に、9 2 . 5 % 及び 7 . 5 % でそれぞれデリバリーした。心臓組織
をこうして、通常酸素レベルに晒し、そしてアポトーシス特異的 e I F - 5 A (e I F -
5 a) 及び増殖 e I F - 5 A (e I F 5 b) の発現レベルを計測した。後に、酸素レベルを減
らし、そして窒素レベルを増加させて、低酸素状態及び虚血を誘導し、そして最終的に「
心臓発作」を誘導した。心臓組織は鼓動を止めた。酸素レベルを次に通常に戻し、心臓組
織を再び電気刺激でパルスをかけて、心臓鼓動を再び開始させた。「心臓発作」の後、ア
ポトーシス特異的 e I F - 5 a 及び増殖 e I F - 5 A (e I F 5 b) の発現レベルを再び計測
した。今回は、アポトーシス特異的 e I F - 5 A レベルの発現レベルは有意に増加したが
、一方増殖 e I F - 5 A (e I F 5 b) の発現レベルの増加は、著しく少なかった。図 4 6
を参照のこと。

【 0 1 4 3 】

「心臓発作」の後、より少ない圧縮/取り付けられた重りの移動により示されるように、強く鼓動せず、該心臓組織細胞が、アポトーシス-特異的 e I F - 5 A の存在のために急速に殺されたということが示された。

【0144】

E K G の結果は、図 4 8 に表した。パネルの左側に、通常の心臓の鼓動を表した(虚血前心臓組織)。「心臓発作」(直線)及び心臓鼓動の再開の後、E K G は、筋肉細胞死のため活動性の低下を示す。E K G は、心臓鼓動の強さの相対的な減少を示す。

【0145】

実施例 6 : ヒト細胞系列培養条件

ヒト篩骨篩板及び樹状細胞

ヒトの両目を、Canada, Ontario Division のアイバンクから死後 4 8 時間以内に得た。(付着された極を伴う)視神経乳頭を取り出し、そして抗生物質/抗真菌剤、グルタミン、及び 1 0 % F B S を含むダルベッコ改変イーグル培地(D M E M)中に 3 時間置いた。視神経乳頭(O N H)ボタンを、各組織サンプルから回収し、そして解剖ハサミで細かく切って、4 の小片にした。移植片を 1 2 . 5 c m² プラスチック製培養フラスコ内の D M E M 培地中で培養した。生育できた移植片について 1 月間成長を観測した。細胞が 9 0 % コンフルエントに達すると、トリプシン処理され、そして分化継代培養に供して、篩骨篩板(L C)及び星状細胞集合を産生した。特異的に、L C 細胞を、ゲンタマイシン、グルタミン、及び 1 0 % F B S を加えた D M E M を入れた 2 5 c m² フラスコ内で継代した。ここで、星状細胞を、F B S を含まない E B M 完全培地(Clontics)を含んだ 2 5 c m² フラスコ内で成長させた。F B S を、1 0 日の継代の後に、星状細胞に加えた。細胞を、維持し、そしてこのプロトコルにより、継代した。

【0146】

異なる継代により得た細胞集合を、8 ウェル培養スライド上で、異なる蛍光抗体を使用することにより、同一性及び集合の均一性について特徴づけした。細胞を 1 0 % ホルマリン溶液中で固定し、そしてダルベッコ・リン酸緩衝生理食塩水(D P B S)で 3 回洗浄した。2 % 脱脂乳を含む D P B S でブロッキングしたのちに、抗体を 1 % B S A を含む D P B S 中で希釈し、そして 6 個のウェルに細胞を加えた。残った 2 個のウェルを、1 % ウシ血清アルブミン(B S A)溶液のみで、及びコントロールとして一次抗体なしで処理した。細胞を、一次抗体で、1 時間室温でインキュベーションし、そして 3 回 D P B S で洗浄した。適切な二次抗体を 1 % B S A を含む D P B S 中に希釈し、各ウェルに加え、そして 1 時間インキュベーションした。D P B S で洗浄した後に、培養スライドのウェルを区切るチャンパーを、スライドから取り除き、そしてスライドを 2 回蒸留水に浸し、次に風乾した。蛍光標本培地(Fluoromount)(Vector Laboratories)を各スライドに加え、そして 2 2 × 6 0 m m のカバーガラスを被せた。

【0147】

免疫蛍光染色を、適切なフィルターを備える蛍光顕微鏡の下で観察し、そして一次抗体で処理されていないコントロール・ウェルと比較した。全ての一次抗体を、他に記載がない限り Sigma から得た。全ての二次抗体を Molecular Probe 社から購入した。L C 細胞を同定するために使用される一次抗体は、抗-コラーゲン I、抗-コラーゲン I V、抗ラミニン、及び抗-細胞フィブロネクチンであった。星状細胞を同定するために使用した一次抗体は、以下：抗-ガラクトセレブロシド(Chemicon International)、抗-A 2 B 5 (Chemicon International)、抗-N C A M、抗-ヒト・フォン・ウィルブランド因子であった。両方の細胞集合に使用される更なる抗体は、抗グリア線維(G F A P)及び抗-平滑筋アクチンを含む。細胞集合が、コラーゲン I、コラーゲン I V、ラミニン、細胞フィブロネクチン、平滑筋アクチンについて陽性に染色され、かつグリア線維(G F A P)について陰性に染色される場合、細胞集合は L C 細胞から構成されるということが確定される。細胞集合は、N C A M、グリア線維(G F A P)について陽性に染色され、かつガラクトセレブロシ、A 2 B 5、ヒトフォン・ウィルブランド因子、及びアルファ平滑筋アクチンについて陰性に染色される場合、該細胞集合は、星状細胞から構成されるということが確定される。

10

20

30

40

50

【0148】

この予備試験において、3セットのヒトの目を使用して、培養を開始する。LC細胞系列#506、#517、及び#524を、83歳男性、17歳男性、及び26歳女性の視神経乳頭から確立した。全てのLC細胞系列は、完全に十分に特徴付けられており、そして90%を超えるLC細胞を含むことが分かっている。

【0149】

RKO細胞培養

RKO (American Type Culture Collection CRL-2577)、野生型p53を発現するヒト大腸癌細胞系列を使用して、アンチセンス・オリゴヌクレオチドが、eIF5Aタンパク質発現を抑制する能力について試験した。RKOを、非必須アミノ酸、アールの塩、及びLグルタミンを伴う最小必須イーグル培地(MEM)中で培養した。培養培地に10%ウシ胎児血清(FBS)、そして100ユニットのペニシリン/ストレプトマイシンを加えた。細胞を、5%CO₂、及び95%空気の加湿環境内で37℃にて成長させた。接着細胞を、0.25%トリプシン及び1mM・EDTAの溶液で引き剥がすことにより、細胞を3~4日ごとに継代した。引き剥がした細胞を、1:10~1:12の分割比で、新たな培地を含む新たな培養ディッシュに加えた。

10

【0150】

HepG2細胞培養

ヒトeIF5A1に対するアンチセンス・オリゴがIL-1での処理に応答するTNF- α の産生を抑制する能力を試験するために、HepG2、ヒト肝細胞癌細胞系列を使用した。HepG2細胞を、ゲンタマイシン、グルタミン、及び10%FBSを加えたDMEM中で培養し、そして5%CO₂及び95%空気の加湿環境中で、37℃にて成長させた。

20

【0151】

実施例7アポトーシスの誘導

アクチノマイシンD、RNAポリメラーゼ阻害剤、カンプトテシン、及びトポイソメラーゼ阻害剤をそれぞれ使用して、RKO及び篩骨篩板細胞においてアポトーシスを誘導した。アクチノマイシンDを0.25µg/mlで使用し、そしてカンプトテシンを20、40、又は50µMの濃度で使用した。アポトーシスはまた、篩骨篩板細胞において、カンプトテシン(50µM)とTNF- α (10ng/ml)の組合せを使用して誘導された。カンプトテシンとTNF- α の組合せは、単独のカンプトテシン又はTNF- α のいずれかよりは、アポトーシスを誘導する点でより有効であることが分かった。

30

【0152】

アンチセンス・オリゴヌクレオチド

ヒトeIF5A1に対して標的された3個のアンチセンス・オリゴヌクレオチドのセットを、Molecular Research Labsにより設計し、そしてそこから購入した。ヒトeIF5A1に対して標的された第一アンチセンス・オリゴヌクレオチド(#1)は、5' CCT GTC TCG AAG TCC AAG TC 3'であった。ヒトeIF5A1に対して標的された第二アンチセンスの配列(#2)は、5' GGA CCT TGG CGT GGC CGT GCG 3'であった。ヒトeIF5A1に対して標的される第三アンチセンス・オリゴヌクレオチドの配列は、5' CTC GTA CCT CCC CGC TCT CCC 3'であった。コントロールのオリゴヌクレオチドは、以下の配列: 5' CGT ACC GGT ACG GTT CCA GG 3'であった。蛍光イソチオシアネート(FITC)-標識アンチセンス・オリゴヌクレオチド(Molecular Research Labs)は、トランスフェクション効率をモニターするために使用されて、そして以下の配列: 5' GGA CCT TGG CGT GGC CGT GCG 3'を有し、ここでXはFITC標識された。全てのアンチセンス/オリゴヌクレオチドを完全にホスホロチオエート化した。

40

【0153】

50

アンチセンス・オリゴヌクレオチドのトランスフェクション

e I F 5 A 1 タンパク質発現を阻害する e I F 5 A 1 アンチセンス・オリゴヌクレオチドの能力は、R K O 細胞において試験された。R K O 細胞に、トランスフェクション試薬、オリゴフェクタミン (Invitrogen) を使用して、アンチセンス・オリゴヌクレオチドをトランスフェクションした。トランスフェクションの 24 時間前に、細胞に 10 % F B S を加えたが、ペニシリン/ストレプトマイシンを欠く M E M 培地中で、1 ウェルあたり 157000 で 24 ウェルプレートに分配した。24 時間後、細胞は通常、およそ 50 % コンフルエントに達した。R K O 細胞は、偽トランスフェクションされるか、又は 100 nM 又は 200 nM のアンチセンス・オリゴヌクレオチドでトランスフェクションされた。24 ウェル・プレートの 1 ウェルあたりに十分なトランスフェクション培地は、0、1、25、又は 2.5 μ l のアンチセンス・オリゴヌクレオチドの 20 μ M ストックを、無血清 M E M で 42.5 μ l の最終体積に希釈し、そして室温で 15 分間混合液をインキュベーションすることにより調製した。1.5 μ l のオリゴフェクタミンを、6 μ l の無血清 M E M 中に希釈し、そして室温で 7.5 分間インキュベーションした。5 分後、希釈されたオリゴフェクタミン混合液を、D N A 混合液に加え、そしてともに 20 分間室温でインキュベーションした。細胞を無血清 M E M で 1 回洗浄し、その後 200 μ l の M E M を細胞に加え、そして 50 μ l のトランスフェクション培地を加えた。細胞を 4 時間成長チャンバー内に戻した。インキュベーション後、125 μ l の M E M + 30 % F B S を細胞に加えた。細胞を次にさらに 48 時間培養し、0.25 μ g / ml アクチノマイシン D で 24 時間処理し、次に細胞抽出液をウェスタンブロット分析用に回収した。

10

20

【0154】

100 及び 200 nM アンチセンス・オリゴヌクレオチド及びオリゴフェクタミンを使用し、R K O 細胞について記載された方法と同じ方法を使用して、篩骨篩板細胞のトランスフェクションを試験した。しかしながら、篩骨篩板細胞の有効なトランスフェクションは、1 μ M ~ 10 μ M で無血清培地中に希釈されたアンチセンス・オリゴヌクレオチドを細胞に 24 時間加え、その後、全体として 2 ~ 5 日間、24 時間ごとに培地を、血清を含む培地中に希釈された新たなアンチセンス・オリゴヌクレオチドに置き換えることによって単純に達成された。

【0155】

アンチセンス・オリゴヌクレオチド・トランスフェクションの効率は、e I F 5 A 1 アンチセンス・オリゴヌクレオチド # 2 と同じ配列を有するが、3' 末端で F I T C に結合された F I T C 標識アンチセンス・オリゴヌクレオチドでトランスフェクションを行うことにより、最適化しそしてモニターした。R K O 及び篩骨篩板細胞を、8 ウェル培養スライド上で、F I T C 標識アンチセンス・オリゴヌクレオチドでトランスフェクションした。48 時間後、細胞を P B S で洗浄し、そして 3.7 % ホルムアルデヒドを含む P B S 中で 10 分間固定した。ウェルを取り除き、そして標本培地 (Vectashield) を加え、続いてカバーガラスを載せた。細胞を次に蛍光顕微鏡上の U V 光の下で、蛍光フィルター (グリーン H546、フィルターセット 48915) を使用して可視化し、そして鮮緑色の蛍光を発する細胞を、当該オリゴヌクレオチドを取り込んだと決定した。

30

【0156】

40

アポトーシスの検出

篩骨篩板細胞をアンチセンス・オリゴヌクレオチドでトランスフェクションし、そしてカンプトテシンでアポトーシスを誘導した後に、コントロール・アンチセンス・オリゴヌクレオチド又はアンチセンス・オリゴヌクレオチド・e I F 5 A 配列番号 26 で処理された細胞においてアポトーシスを起す細胞の割合 (%) を測定した。二つの方法 - ヘキスト染色及び DeadEnd (商標) 蛍光定量 T U N E L を、アポトーシスを起している篩骨篩板細胞を検出するために使用した。核断片化及び凝集などの形態学的特徴に基いてアポトーシスを起している細胞を同定するために、核染色であるヘキストを使用して篩骨篩板細胞の核を染色した。3 : 1 の無水メタノール及び氷酢酸の混合液からなる固定液を、使用直前に調製した。等量の固定液を培養スライド上で成長する細胞の培地に加え、そして 2 分間インキュ

50

ベーションした。培地 / 固定液混合液を細胞から取り除いて廃棄し、そして 1 m l の固定液を細胞に加えた。5 分後、固定液を捨て、そして 1 m l の新たな固定液を加え、細胞を 5 分間インキュベーションした。固定液を捨て、そして細胞を 4 分間風乾し、その後 1 m l のヘキスト染色液 (0.5 μ g / m l ヘキスト 33258 を含む P B S) を加えた。暗所で 10 分間インキュベーション後、染色溶液を捨て、培養スライドのウェルを区切るチャンバーを取り除き、そしてスライドを 1 分間脱イオン水で 3 回洗浄した。洗浄後、数滴のマックルバイン緩衝液 (0.021 M クエン酸、0.058 M \cdot Na₂HPO₄ \cdot 7 H₂O ; p H 5.6) を細胞に加え、そしてカバーガラスを被せた。染色された細胞を、U V フィルターを使用して蛍光顕微鏡の下で可視化した。明るく染色された細胞又は断片化された核を有する細胞を、アポトーシスを起している細胞として数えた。1 ウェルあたり最低 200 10
個の細胞を計数した。

【0157】

アポトーシスを起している細胞の特徴である D N A の断片化を検出するために、DeadEnd (商標) 蛍光定量 T U N E L (Promega) を使用した。ヘキスト染色の後に、細胞スライドを蒸留水で簡単に洗浄し、そしてさらにスライドを P B S (137 m M \cdot NaCl、2.68 m M \cdot KCl、1.47 m M \cdot KH₂PO₄、8.1 m M \cdot Na₂HPO₄) 中に 5 分間二回スライドを浸し、洗浄と洗浄との間でスライドをペーパータオル上で拭いた。細胞を 0.2 % トライトン X - 100 を含む P B S 中に 5 分間浸すことにより透過処理した。次に、スライドを P B S 中に 5 分間 2 回浸すことにより再び洗浄し、そして洗浄と洗浄の間でペーパータオル上でスライドを拭き取った。1 ウェルあたり 25 μ l の平衡緩衝液 [200 m M カコジル酸カリウム (p H 6.6)、25 m M トリス-HCl (p H 6.6)、0.2 m M ジチオスレイトール、0.25 m g / m l ウシ血清アルブミン、及び 2.5 m M 塩化コバルト] を加えて、そして 5 ~ 10 分間インキュベーションした。平衡化の間、30 μ l の反応混合液を各ウェルについて、45 : 5 : 1 の比率の平衡緩衝液、ヌクレオチドミックス [50 μ M フルオレセイン-12-d U T P、100 μ M \cdot d A T P、10 m M \cdot トリス-HCl (p H 7.6)、および 1 m M \cdot E D T A]、及び末端デオキシヌクレオチド・トランスフェラーゼ酵素 (T d t、25 U / μ l) を混合することにより調製した。平衡緩衝液中でインキュベーションした後に、30 μ l の反応混合液を 1 ウェルあたりに加え、そしてカバーガラスを被せた。反応を暗所にて 37 で 1 時間進ませた。スライドを、2 \times S S C [0.3 M \cdot NaCl、及び 30 m M クエン酸ナトリウム (p H 7.0)] 中に浸し、そして 1 30
5 分間インキュベーションすることにより反応を終わらせた。スライドを次に P B S 中に浸すことにより 5 分間 3 回洗浄した。P B S をキムワイプで、ウェルの周りを吸い取ることにより取り除き、そして標本培地 (Oncogene Research Project、Ja1750-4ML) を各ウェルに加え、そしてスライドにカバーガラスを被せた。ヘキスト染色された核を計数するために、U V フィルター (U V - G 365、フィルターセット 487902) を使用して、細胞を蛍光顕微鏡の下で観察した。明るく染色された核又は断片化された核を有する細胞の全てをアポトーシスを起している細胞として数えた。同じ視野を使用して、次に蛍光フィルター (グリーン H546、フィルターセット 48915) を使用して観察し、そして鮮緑色の蛍光を発する核の全てをアポトーシスを起している細胞として計数した。フルオレセイン・フィルターを使用して計数された鮮緑色の核の数を U V フィルターの下計数された核の総数で 40
割ることにより、視野においてアポトーシスを起している細胞の割合 (%) を計算した。1 ウェルあたり、最低でも 200 細胞を計数した。

【0158】

図 54 ~ 57 は、これらの研究の結果を示す。アポトーシス特異的 e I F 5 A 1 でトランスフェクションされたサンプルにおけるアポトーシスを起している細胞の割合 (%) は、コントロール・オリゴヌクレオチドでトランスフェクションされた細胞の場合より明らかにずっと少ない。

【0159】

タンパク質抽出及びウエスタン・ブロッティング

トランスフェクションされた R K O 細胞を、細胞を P B S で洗浄し、1 ウェルあたり 4 50

0 μ l の熱溶解緩衝液[0.5% SDS、1 mMジチオスレイトール、50 mMトリス-HCL (pH 8.0)]を加えることによりウエスタン・ブロット分析用に回収した。細胞を掻き剥がし、そして得られた抽出物を遠心チューブへと移し、5分間煮沸し、そして-20で貯蔵した。パイオラッド・タンパク質アッセイ(Bio-Rad protein Assay)(Bio-Rad)を、製品説明書に従って使用して、タンパク質を定量した。

【0160】

ウエスタン・ブロッティング用に、5 μ gの全タンパク質を、12% SDS-ポリアクリルアミド・ゲル上で分離した。分離されたタンパク質をポリビニリデン・ジフロリド膜へと転写した。次に膜をブロッキング溶液(5%スキムミルク粉末を含むPBS)中で1時間インキュベーションし、そして0.05% Tween-20 / PBS中で15分間、3回洗淨した。膜を一晚PBS-T中で4 にて貯蔵した。次の日、室温に温めた後に、膜を1 μ g / ml ポリビニル・アルコール中で30秒間ブロックした。膜を脱イオン水で5回洗淨し、次に5%ミルクを含む0.025% Tween-20 / PBSの溶液中で30分間ブロッキングした。膜とインキュベーションする前に、一次抗体を5%ミルクを含む0.025% Tween-20 / PBS中でプレインキュベーションした。

10

【0161】

幾つかの一次抗体を使用した。p53を認識するOncogeneから購入したモノクローナル抗体(Ab-6)並びにヒトeIF5A1のc末端に相同性を有する合成ペプチド(アミノ-CRLPEGLGKEIEQKYD-カルボキシ)(配列番号33)に対するポリクローナル抗体であって、トリにおいて産生された抗体(Gallus Immunotech)を使用した。抗- - アクチン抗体(Oncogene)を使用して、等量のタンパク質をロードしたことを示した。p53に対するモノクローナル抗体を、0.05 μ g / mlの希釈度で使用し、eIF5A1に対する抗体を、1:1000の希釈度で使用し、そしてアクチンに対する抗体を1:20000の希釈度で使用した。一次抗体で60~90分間インキュベーションした後、膜を0.05% Tween-20 / PBS中で15分間、3回洗淨した。次に、二次抗体を1%ミルクを含む0.025% Tween-20 / PBS中に希釈し、そして膜と60~90分インキュベーションした。p53(Ab-6)を一次抗体として使用したとき、使用される二次抗体は、ペルオキシダーゼ結合ウサギ抗マウスIgG(Sigma)であり、1:5000の希釈度であった。抗eIF-5A1を一次抗体として使用したとき、ペルオキシダーゼ結合ウサギ抗トリIgY(Gallus Immunotech)を1:5000の希釈度で使用した。アクチンについて使用される二次抗体は、1:5000の希釈度で使用されるペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgMであった。二次抗体でインキュベーション後、膜をPBS-Tで3回洗淨した。

20

30

【0162】

ECLプラス・ウエスタン・ブロッティング検出キット(Amersham Pharmacia Biotech)を使用して、結合されたペルオキシダーゼ結合抗体を検出した。簡潔に記載すると、膜を軽く拭き取って乾かし、次に暗所で、試薬Aと試薬Bの40:1混合体と5分間インキュベーションした。膜を拭き取って乾かし、アセテートのシートの間に配置し、そして10秒~30分で変化する期間、X線フィルムに露光した。膜を剥離緩衝液[100 mM・2-メルカプトエタノール、2% SDS、及び62.5 mMトリス-HCL (pH 6.7)]に沈め、そして50 で30分間インキュベーションすることにより、膜を剥離させた。次に膜を脱イオン水で洗淨し、そして多量の0.05% Tween-20 / PBSで10分間2回洗淨した。膜を剥離させ、そして3回再ブロットした。

40

【0163】

実施例 8

siRNAの構築

ヒトeIF5A1に対する低分子抑制RNA(siRNA)を使用して、RKO及び篩骨篩板細胞において、eIF5A1の発現を特異的に抑制した。6種のsiRNAを、サイレンサー(Silencer)(商標)siRNA構築キット(Ambion Inc)を使用してin vitro転写により作成した。4種のsiRNAを、ヒトeIF5A1に対して作成した(si

50

RNA (#1 ~ #4)。2種の siRNA、キット内に提供される GAPDH に対する siRNA、及び eIF5A1 特異的 siRNA #1 の逆配列を有するが、それ自身は eIF5A1 を標的としない siRNA (siRNA #5) を、コントロールとして使用した。これらの siRNA を製品プロトコルに従って作成した。簡潔に記載すると、T7 プロモーター・プライマーとアニールさせ、そしてクレノー断片でのフィルイン反応 (fill-in reaction) 後に、所望の siRNA 鎖をコードする DNA オリゴヌクレオチドを、T7 RNA・ポリメラーゼのテンプレートとして使用して、siRNA の個々の鎖を作成した。センス及びアンチセンス鎖の両方について転写反応後に、反応物を混合し、そして2本の siRNA 鎖をアニールし、DNase 及び RNase で処理し、そして次にカラム精製した。siRNA を作成するために使用される DNA オリゴヌクレオチドの配列 (T7 プライマーがアニールする部位に下線を引いた) は：

10

【化1】

siRNA #1 アンチセンス 5' AAAGGAATGACTTCCAGCTGACCTGTCTC 3' と
 siRNA #1 センス 5' AATCAGCTGGAAGTCATTCCTCCTGTCTC 3';
 siRNA #2 アンチセンス 5' AAGATCGTCGAGATGTCTACTCCTGTCTC 3' と
 siRNA #2 センス 5' AAAGTAGACATCTCGACGATCCCTGTCTC 3';
 siRNA #3 アンチセンス 5' AAGGTCCATCTGGTTGGTATTCTGTCTC 3' と
 siRNA #3 センス 5' AAAATACCAACCAGATGGACCCCTGTCTC 3';
 siRNA #4 アンチセンス 5' AAGCTGGACTCCTCCTACACACCTGTCTC 3' と
 siRNA #4 センス 5' AATGTGTAGGAGGAGTCCAGCCCTGTCTC 3';
 siRNA #5 アンチセンス 5' AAAGTCGACCTTCAGTAAGGACCTGTCTC 3' と
 siRNA #5 センス 5' AATCCTTACTGAAGGTCGACTCCTGTCTC 3'.

20

30

であった。

【0164】

siRNA を RKO 及び篩骨篩板細胞中への取り込みをモニターするために、サイレンサー (商標) siRNA 標識キット - FAM (Ambion) を使用して、GAPDH の siRNA を FAM で標識した。8 ウェル培養スライド上でトランスフェクションした後に、細胞を PSS で洗浄し、3.7 %ホルムアルデヒドを含む PBS 中で10分間固定した。ウェルを取り除き、そして標本培地 (Vectashield) を加えた後、カバーガラスを被せた。FAM 標識 siRNA の取り込みは、フルオレセイン・フィルターを使用して UV 光の下蛍光顕微鏡下で可視化された。GAPDH・siRNA を製品プロトコルに従って標識した。

40

【0165】

siRNA のトランスフェクション

RKO 細胞及び篩骨篩板細胞を、同じトランスフェクション・プロトコルを使用して、siRNA でトランスフェクションした。トランスフェクションする前の日に、RKO 細胞を、8 ウェル培養スライド又は24ウェル・プレート上に、それぞれ1ウェルあたり46000及び105800細胞密度で蒔いた。細胞集密度が40 ~ 70 % であるとき、篩骨篩板細胞はトランスフェクションされ、そして一般的に篩骨篩板細胞は、1ウェルあたり7500 ~ 1000細胞で、トランスフェクションの3日前に8ウェル培養スライド上に蒔かれた。8ウェル培養スライドの1ウェルに十分な量のトランスフェクション培地は、25.5 pmol の siRNA ストックを、Opti-Mem (Sigma) 中に最終体積

50

21.2 μ l まで希釈することにより調製した。0.425 μ l のリポフェクタミン 2000 を終量 21.2 μ l の Opti-Mem に 7 ~ 10 分間室温にてインキュベーションした。希釈されたリポフェクタミン 2000 混合体を、次に希釈 siRNA 混合液に加え、そして室温で 20 ~ 30 分間インキュベーションした。細胞を無血清培地で一回洗浄し、その後 135 μ l の無血清培地を細胞に加え、そして 42.4 μ l のトランスフェクション培地を加えた。細胞を成長チャンバーに 4 時間戻した。インキュベーションの後、65 μ l の無血清培地 + 30 % FBS を細胞に加えた。ウエスタン・ブロット分析について使用される細胞中への siRNA のトランスフェクションは、8 ウェルスライドでトランスフェクションした条件と同じ条件であるが、体積を 2.3 倍に増加させた条件を使用し、24 ウェルプレートで行われた。

10

【0166】

トランスフェクションに続いて、ウエスタン・ブロット分析用の細胞抽出液を集める前に、RKO 及び篩骨篩板細胞を 72 時間インキュベーションした。アポトーシスをブロックする eIF5A1 に対する siRNA の有効性を測定するために、篩骨篩板細胞を 50 μ M のカンプトテシン (Sigma) 及び 10 ng/ml の TNF- α (Leinco Technologies) で処理して、トランスフェクション後 48 又は 72 時間でアポトーシスを誘導した。アポトーシスを起している細胞の割合 (%) を測定するために、24 又は 48 時間後で、細胞をヘキストで染色した。

【0167】

実施例 9

20

アポトーシスの検出

篩骨篩板細胞をアンチセンス・オリゴヌクレオチドでトランスフェクションし、そしてカンプトテシンでアポトーシスを誘導した後に、コントロール・アンチセンス・オリゴヌクレオチド又はアンチセンス・オリゴヌクレオチド eIF5A #2 で処理された細胞においてアポトーシスを起す細胞の割合 (%) を測定した。二つの方法 - ヘキスト染色及び DeadEnd (商標) 蛍光定量 TUNEL を、アポトーシスを起している篩骨篩板細胞を検出するために使用した。核断片化及び凝集などの形態学的特徴に基いてアポトーシスを起している細胞を同定するために、核染色であるヘキストを使用して篩骨篩板細胞の核を染色した。3 : 1 の無水メタノール及び氷酢酸の混合液からなる固定液を、使用直前に調製した。等量の固定液を培養スライド上で成長する細胞の培地に加え、そして 2 分間インキュベーションした。培地 / 固定液混合液を細胞から取り除いて廃棄し、そして 1 ml の固定液を細胞に加えた。5 分後、固定液を捨て、そして 1 ml の新たな固定液を加え、細胞を 5 分間インキュベーションした。固定液を捨て、そして細胞を 4 分間風乾し、その後 1 ml のヘキスト染色液 (0.5 μ g/ml ヘキスト 33258 を含む PBS) を加えた。暗所で 10 分間インキュベーション後、染色溶液を捨て、培養スライドのウェルを区切るチャンバーを取り除き、そしてスライドを 1 分間脱イオン水で 3 回洗浄した。洗浄後、数滴のマックルバイン緩衝液 (0.021 M クエン酸、0.058 M \cdot Na₂HPO₄ \cdot 7 H₂O ; pH 5.6) を細胞に加え、そしてカバーガラスを被せた。染色された細胞を、UV フィルターを使用して蛍光顕微鏡の下で可視化した。明るく染色された細胞又は断片化された核を有する細胞を、アポトーシスを起している細胞として数えた。1 ウェルあたり最低 200 個の細胞を計数した。

30

40

【0168】

アポトーシスを起している細胞の特徴である DNA の断片化を検出するために、DeadEnd 蛍光定量 TUNEL (Promega) を使用した。ヘキスト染色の後に、細胞スライドを蒸留水で簡単に洗浄し、そしてさらにスライドを PBS (137 mM \cdot NaCl、2.68 mM \cdot KCl、1.47 mM \cdot KH₂PO₄、8.1 mM \cdot Na₂HPO₄) 中に 5 分間二回スライドを浸し、洗浄と洗浄との間でスライドをペーパータオル上で拭いた。細胞を 0.2 % トライトン X-100 を含む PBS 中に 5 分間浸すことにより透過処理した。次に、スライドを PBS 中に 5 分間 2 回浸すことにより再び洗浄し、そして洗浄と洗浄の間でペーパータオル上でスライドを拭き取った。1 ウェルあたり 25 μ l の平衡緩衝液 [200 mM カコ

50

ジル酸カリウム (pH 6.6)、25 mM トリス-HCl (pH 6.6)、0.2 mM ジチオスレイトール、0.25 mg/ml ウシ血清アルブミン、及び 2.5 mM 塩化コバルト]を加えて、そして 5 ~ 10 分間インキュベーションした。平衡化の間、30 µl の反応混合液を各ウェルについて、45 : 5 : 1 の比率の平衡緩衝液、ヌクレオチドミックス [50 µM フルオレセイン-12-dUTP、100 µM・dATP、10 mM・トリス-HCl (pH 7.6)、および 1 mM・EDTA]、及び末端デオキシヌクレオチド・トランスフェラーゼ酵素 (Tdt、25 U/µl) を混合することにより調製した。平衡緩衝液中でインキュベーションした後に、30 µl の反応混合液を 1 ウェルあたりに加え、そしてカバーガラスを被せた。反応を暗所にて 37 °C で 1 時間進ませた。スライドを、2 × SSC [0.3 M・NaCl、及び 30 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0)] 中に浸し、そして 15 分間インキュベーションすることにより反応を終わらせた。スライドを次に PBS 中に浸すことにより 5 分間 3 回洗浄した。PBS をキムワイプで、ウェルの周りを吸い取ることにより取り除き、そして標本培地 (Oncogene Research Project、Ja1750-4ML) を各ウェルに加え、そしてスライドにカバーガラスを被せた。ヘキスト染色された核を計数するために、UV フィルター (UV-G365、フィルターセット 487902) を使用して、細胞を蛍光顕微鏡の下で観察した。明るく染色された核又は断片化された核を有する細胞の全てをアポトーシスを起している細胞として数えた。同じ視野を使用して、次に蛍光フィルター (グリーン H546、フィルターセット 48915) を使用して観察し、そして鮮緑色の蛍光を発する核の全てをアポトーシスを起している細胞として計数した。フルオレセイン・フィルターを使用して計数された鮮緑色の核の数を UV フィルターの下計数された核の総数で割ることにより、視野においてアポトーシスを起している細胞の割合 (%) を計算した。1 ウェルあたり、最低でも 200 細胞を計数した。

10

20

【0169】

タンパク質抽出及びウエスタン・ブロッティング

トランスフェクションされた RKO 細胞を、細胞を PBS で洗浄し、1 ウェルあたり 40 µl の熱溶解緩衝液 [0.5 % SDS、1 mM ジチオスレイトール、50 mM トリス-HCl (pH 8.0)] を加えることによりウエスタン・ブロット分析用に回収した。細胞を掻き剥がし、そして得られた抽出物をエッペンドルフ・チューブへと移し、5 分間煮沸し、そして -20 °C で貯蔵した。バイオラッド・タンパク質アッセイ (Bio-Rad protein Assay) (Bio-Rad) を、製品説明書に従って使用して、タンパク質を定量した。

30

【0170】

ウエスタン・ブロッティング用に、5 µg の全タンパク質を、12 % SDS-ポリアクリルアミド・ゲル上で分離した。分離されたタンパク質をポリビニリデン・ジフロリド膜へと転写した。次に膜をブロッキング溶液 (5 % スキムミルク粉末を含む PBS) 中で 1 時間インキュベーションし、そして 0.05 % Tween-20 / PBS 中で 15 分間、3 回洗浄した。膜を一晚 PBS-T 中で 4 °C にて貯蔵した。次の日、室温に温めた後に、膜を 1 µg/ml ポリビニル・アルコール中で 30 秒間ブロックした。膜を脱イオン水で 5 回洗浄し、次に 5 % ミルクを含む 0.025 % Tween-20 / PBS の溶液中で 30 分間ブロッキングした。膜とインキュベーションする前に、一次抗体を 5 % ミルクを含む 0.025 % Tween-20 / PBS 中でプレインキュベーションした。

40

【0171】

幾つかの一次抗体を使用した。p53 を認識する Oncogene から購入したモノクローナル抗体 (Ab-6; Oncogene)、ヒト bcl-2 を認識するモノクローナル抗体 (Oncogene)、並びにヒト eIF5A1 の c 末端に相同性を有する合成ペプチド (アミノ-CRLPEGLGKEIEQKYD-カルボキシ) に対するポリクローナル抗体であって、トリにおいて産生された抗体 (Gallus Immunotech) を使用した。抗- α -アクチン抗体 (Oncogene) を使用して、等量のタンパク質をロードしたことを示した。p53 に対するモノクローナル抗体を 0.05 µg/ml の希釈度で使用し、bcl-2 に対する抗体を 1 : 3500 の希釈度で使用し、eIF5A1 に対する抗体を 1 : 1000 の希釈度で使用し、そしてアクチンに対する抗体を 1 : 20000 の希釈度で使用した。一次抗体で 60 ~ 90 分間インキュベ

50

ーションした後、膜を0.05% Tween-20 / PBS中で15分間、3回洗浄した。次に、二次抗体を1%ミルクを含む0.025% Tween-20 / PBS中に希釈し、そして膜と60～90分インキュベーションした。p53 (Ab-6)を一次抗体として使用したとき、使用される二次抗体は、ペルオキシダーゼ結合ウサギ抗マウスIgG (Sigma)であり、1:5000の希釈度であった。抗eIF-5A1を一次抗体として使用したとき、ペルオキシダーゼ結合ウサギ抗トリIgY (Gallus Immunotech)を1:5000の希釈度で使用した。アクチンと共に使用される二次抗体は、1:5000の希釈度で使用されるペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgMであった。二次抗体でインキュベーション後、膜をPBS-Tで3回洗浄した。

【0172】

10

ECLプラス・ウエスタン・ブロッティング検出キット (Amersham Pharmacia Biotech) を使用して、結合されたペルオキシダーゼ結合抗体を検出した。簡潔に記載すると、膜を軽く拭き取って乾かし、次に暗所で、試薬Aと試薬Bの40:1混合体とインキュベーションした。膜を拭き取って乾かし、アセテートのシートの間に配置し、そして10秒～30分で変化する期間、X線フィルムに露光した。膜を剥離緩衝液[100mM・2-メルカプトエタノール、2% SDS、及び62.5mM トリス-HCl (pH 6.7)]に沈め、そして50℃で30分間インキュベーションすることにより、膜を剥離させた。次に膜を脱イオン水で洗浄し、そして多量の0.05% Tween-20 / PBSで10分間2回洗浄した。膜を剥離させ、そして3回再プロットした。

【0173】

20

実施例 10

He p G 2 の T N F - 産生の定量

He p G 2 細胞を、1ウェルあたり20000細胞で、48ウェルプレートに蒔いた。72時間後、培地を取り除き、そして、2.5 μM のコントロール・アンチセンス・オリゴヌクレオチド又は2.5 μM アンチセンス・オリゴヌクレオチド e I F 5 A 1 # 2 を含む新たな培地を細胞に加えた。アンチセンス・オリゴヌクレオチドを含む新たな培地を、24時間後に加えた。オリゴヌクレオチドと合計48時間のインキュベーションの後、培地をインターロイキン1 (I L - 1、1000 pg / ml ; Leinco Technologies)を含む培地と置き換え、そして6時間インキュベーションした。T N F - 定量用に培地を回収し、そして凍結した(-20℃)。未処理の細胞(アンチセンス・オリゴヌクレオチド及び I L - 1 を含まない)及び I L - 1 のみで処理された細胞との、平行して行った更なるインキュベーションを、コントロールに使用した。全ての処理を二回行った。培地中に放出された T N F - を、製品プロトコルに従って E L I S A アッセイ (Assey Designs Inc) により計測した。

30

【0174】

実施例 11

以下の実験により、アンチセンス・アポトーシス因子5Aヌクレオチドが、アポトーシス因子5A並びにp53の発現を抑制することができるということが示された。

【0175】

R K O 細胞を未トランスフェクションのままにするか、偽トランスフェクションするか、又は200 nM のアンチセンスオリゴヌクレオチド、e I F 5 A 1 # 1、# 2、又は# 3でトランスフェクションした。R K O 細胞を100 nM のアンチセンスオリゴヌクレオチド e I F 5 A 1 # 2 でトランスフェクションした。トランスフェクション後48時間で、細胞を0.25 μg / ml のアクチノマイシンDで処理した。24時間後、細胞抽出液を回収し、そして各サンプル由来の5 μg のタンパク質を、S D S - P A G E ゲル上で分離し、P V D F 膜へ転写し、そしてe I F 5 A 1 に対する抗体でウエスタン・ブロットした。化学発光検出後、膜を剥離し、そしてp53に対する抗体で再プローブした。化学発光検出の後、膜を再び剥離し、そしてアクチンに対する抗体で再プローブした。(アポトーシス因子5Aに対する)アンチセンスオリゴ1、2、及び3で処理された後、R K O 細胞により産生されるタンパク質のレベルを示す図52を参照のこと。R K O 細胞は、アン

40

50

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

別の実験では、篩骨篩板細胞系列 # 5 1 7 を $1 \mu\text{M}$ 又は $2.5 \mu\text{M}$ のいずれかのコントロール・アンチセンスオリゴヌクレオチド又はアンチセンス・オリゴヌクレオチド e I F

5 A 1 # 2 で合計 5 日間トランスフェクションした。アンチセンス・オリゴヌクレオチド処理を開始後 4 8 時間で、細胞を 4 0 μ M カンプトテシンで 3 日間処理した。アンチセンスオリゴヌクレオチド及びカンプトテシンを含む培地を毎日交換した。アポトーシスを起している細胞の割合 (%) を細胞をヘキストで標識することにより検出した。図 5 8 を参照のこと。

【 0 1 8 2 】

別の実験では、篩骨篩板細胞 # 5 1 7 を未処理のままにするか、或いは 1 0 n g / m l \cdot T N F - \cdot 5 0 μ M カンプトテシン、又は 1 0 n g / m l \cdot T N F - 及び 5 0 μ M カンプトテシンで処理した。アポトーシスを起している細胞の割合を、細胞をヘキストで標識することにより測定した。図 5 9 を参照のこと。

10

【 0 1 8 3 】

別の実験では、篩骨篩板細胞系列 # 5 0 6 及び # 5 1 7 を 2 . 5 μ M 又は 5 μ M のいずれかのコントロールアンチセンス・オリゴヌクレオチド又はアンチセンス・オリゴヌクレオチド e I F 5 A 1 # 2 のいずれかで合計 2 日間トランスフェクションした。アンチセンス・オリゴヌクレオチドを含む新たな培地を 2 4 時間後に加えた。アンチセンス・オリゴヌクレオチドの開始後 4 8 時間で、細胞を 5 0 μ M のカンプトテシン及び 1 0 n g / m l \cdot T N F - で 2 日間処理した。アポトーシスを起している細胞の割合 (%) を、細胞をヘキストで標識することにより測定した。図 6 0 を参照のこと。

【 0 1 8 4 】

別の実験では、篩骨篩板細胞系列 # 5 0 6 、 # 5 1 7 、及び # 5 2 4 を、2 . 5 μ M のコントロール・アンチセンス・オリゴヌクレオチド又はアンチセンス・オリゴヌクレオチド e I F 5 A 1 # 2 のいずれかで、合計 2 日間トランスフェクションした。アンチセンス・オリゴヌクレオチドを含む新たな培地を、2 4 時間後に加えた。アンチセンス・オリゴヌクレオチド処理を開始後 4 8 時間で、細胞を 5 0 μ M カンプトテシン及び 1 0 n g / m l T N F - で 2 日間処理した。アポトーシスを起している細胞の割合 (%) を、細胞をヘキストで標識することにより測定した。図 6 1 を参照のこと。

20

【 0 1 8 5 】

実施例 1 3

以下の実験により、アポトーシス因子 5 A を標的とした s i R N A でトランスフェクションされた細胞が、より少ない量のアポトーシス因子 5 A を発現することが示された。該実験はまた、アポトーシス因子 5 A を標的とした s i R N A が、アポトーシスを低減することができるということを示す。

30

【 0 1 8 6 】

一の実験では、篩骨篩板細胞系列 # 5 1 7 を、トランスフェクションの間、血清有り (A) 又は血清なし (B) のリポフェクタミン 2 0 0 0 \cdot トランスフェクション試薬を使用して、1 0 0 n M \cdot F A M 標識 s i R N A でトランスフェクションした。(A) 及び (B) の細胞を、合計 2 4 時間後に固定し、そしてフルオレセイン・フィルターを使用する U V 光の下で蛍光顕微鏡上で可視化した。図 6 2 を参照のこと。

【 0 1 8 7 】

別の実験では、R K O 細胞を、トランスフェクションの間血清の存在又は非存在下のいずれかで、1 0 0 n M \cdot s i R N A とトランスフェクションした。6 種の s i R N A 、つまり 2 個のコントロール s i R N A (s i R N A # 5 及び G A P D H に対して標的された s i R N A) と 4 種の e I F 5 A を標的とした s i R N A (s i R N A # 1 ~ # 4) をトランスフェクションした。トランスフェクション後 7 2 時間で、細胞抽出液を回収し、そして各サンプルからの 5 μ g のタンパク質を、S D S - P A G E ゲル上で分離し、P V D F 膜に転写し、そして e I F 5 A 1 に対する抗体でウエスタン・プロットした。化学発光検出の後、膜を剥離し、そして b c 1 - 2 に対する抗体で再プローブした。化学発光検出の後に、膜を再び剥離し、そしてアクチンに対する抗体で再プローブした。図 6 3 を参照のこと。

40

【 0 1 8 8 】

50

別の実験では、篩骨篩板細胞系列#506及び#517を、100nM siRNAでトランスフェクションした。6種のsiRNA、つまり2種のコントロール(s i R N A # 5及びG A P D Hを標的とするs i R N A)及び4種のe I F 5 A 1を標的とするs i R N A(s i R N A # 1 ~ # 4)をトランスフェクションした。トランスフェクション後72時間で、細胞抽出液を回収し、そして各サンプル由来の5µgのタンパク質を、S A S - P A G Eゲル上で分離し、P V D F膜へと転写し、そしてe I F 5 A 1に対する抗体でウエスタン・プロットした。化学発光検出の後に、膜を剥離し、そしてアクチンに対する抗体で再プローブした。図64を参照のこと。

【0189】

別の実験では、篩骨篩板細胞系列#506を100nmのsiRNAでトランスフェク 10
ションした。6種のsiRNA、つまり2種のコントロールs i R N A(s i R N A # 5
及びG A P D Hを標的とするs i R N A)及び4種のe I F 5 A 1を標的とするs i R N
A(s i R N A # 1 ~ # 4)をトランスフェクションした。トランスフェクション後48時
間で、培地を50µMカンプトテシン及び10ng/ml・TNF-を含む培地と置換
した。24時間後、アポトーシスを起している細胞の割合(%)を、細胞をヘキストで標識
することにより測定した。図65を参照のこと。

【0190】

別の実験では、篩骨篩板細胞系列#506を、100nmのsiRNAとトランスフェ 20
クションした。6種のsiRNA、つまり2種のコントロールs i R N A(s i R N A #
5及びG A P D Hを標的とするs i R N A)及び4種のe I F 5 A 1を標的とするs i R
N A(s i R N A # 1 ~ # 4)でトランスフェクションした。トランスフェクション後72
時間で、培地を50µMのカンプトテシン及び10ng/ml・TNF-を含む培地と
置き換えられた。24時間後、アポトーシス細胞の割合(%)を、細胞をヘキストで標識す
ることにより測定した。図66を参照のこと。

【0191】

別の実験では、篩骨篩板細胞系列#506をトランスフェクションされないままにする 30
か、又は100nmのsiRNAでトランスフェクションした。6種のsiRNA、つま
り2種のコントロールs i R N A(s i R N A # 5及びG A P D Hを標的とするs i R N
A)及びe I F 5 A 1を標的とする4種類のs i R N A(s i R N A # 1 ~ # 4)をトラン
スフェクションした。トランスフェクション後72時間後、培地を50µMカンプトテシ 30
ン及び10ng/ml・TNF-を含む培地と置き換えた。新たな培地をトランスフェ
クションされていない、未処理コントロール細胞に加えた。48時間後、アポトーシス細
胞の割合(%)を細胞を、ヘキストで標識することにより測定した。図67を参照のこと。

【0192】

図67及び実施例13に記載された実験由来のsiRNAでトランスフェクションされ
、そしてカンプトテシン及びTNF-で処理された篩骨篩板細胞系列#506であってヘ
キスト染色されたものの写真については、図68を参照のこと。

【0193】

実施例14

ヒト細胞系列をアポトーシス因子5Aに対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドで処 40
理することにより、細胞のTNF-の産生が少なくなることが本実施例により示される
。

He p G 2細胞を、合計2日間、2.5µMのコントロール・アンチセンス・オリゴヌ
クレオチド又はアンチセンス・オリゴヌクレオチドe I F 5 A 1 # 2で処理した。アンチ
センス・オリゴヌクレオチドを含む新たな培地を、24時間後に加えた。さらなる細胞を
2日間未処理のまま置いておいた。処理の開始後48時間で、細胞をIL-1 (1000
pg/ml)で6時間処理した。実験の終わりに、TNF- 定量用に、培地を回収し、そ
して冷凍した(-20)。培地中に放出されるTNF- を、Assay Designs Inc.から購入
したE L I S Aアッセイを使用して計測した。

【0194】

実施例 1 5

H T - 2 9 細胞 (ヒト・大腸腺癌) を、e I F 5 A 1 に対する s i R N A 又は逆配列を有するコントロール・s i R N A でトランスフェクションした。使用された s i R N A は、以下の通りである。

6 9 0 位 (3 ' U T R) % G / C = 4 8

5 ' A A G C U G G A C U C C U C C U A C A C A 3 '

使用されたコントロール s i R N A は以下のとおりである。

% G / C = 3 9

5 ' A A A C A C A U C C U C C U C A G G U C G 3 '

【 0 1 9 5 】

4 8 時間後、細胞をインターフェロン-ガンマ (I F N - ガンマ) で 1 6 時間処理した。1 6 時間後、細胞を新たな培地で洗浄し、そしてリポ多糖 (L P S) で 8 又は 2 4 時間処理した。各時間点において (8 又は 2 4 時間)、細胞培養培地を細胞から取り除き、冷凍し、そして培地中に存在する T N F - を、E L I S A により定量した。細胞ライセートを回収し、タンパク質について定量し、そして T N F - 値を、p g / m g タンパク質へと調節した (異なるウェルにおける細胞数の差を調節した)。ウエスタン・プロット及び E L I S A の結果を図 7 4 A 及び B に提供する。図 7 5 は、細胞が高密度であることを除いて同じである実験の結果である。

【 0 1 9 6 】

実施例 1 6

U - 9 3 7 細胞系列の組織培養条件

U - 9 3 7 は、懸濁状態で成長し、そして P M A で刺激された際に、接着を開始し、そしてマクロファージへと分化するヒト単球細胞系列 (A T C C 番号 C R L - 1 5 9 3 . 2) である (これらの細胞は A T C C から直接得たものではない)。細胞を、2 m M ・ L - グルタミン、1 . 5 g / L 炭酸水素ナトリウム、4 . 5 g / L グルコース、1 0 m M ・ H E P E S 、1 . 0 m M ビルビン酸ナトリウム、及び 1 0 % ウシ胎児血清を含む R P M I 1 6 4 0 内で、3 7 ° C O₂ (5 %) のインキュベーター内にて維持した。週に二回細胞を新たな培地に分け (分割比 1 : 4 又は 1 : 5)、そして細胞密度をつねに 1 0⁵ 及び 2 × 1 0⁶ 細胞 / m l の間に維持した。細胞を、組織培養処理 T 2 5 フラスコ中で、懸濁状態で培養し、そして実験を 2 4 ウェル・プレート内で行った。

【 0 1 9 7 】

タイムコース実験

実験の開始 2 日前に、細胞密度を、3 × 1 0⁵ 細胞 / m l 培地に調節した。実験の日、細胞を対数期で回収した。細胞懸濁液を、1 5 m l チューブに移し、そして 4 0 0 × g で 1 0 分間、室温で遠心した。上清を吸引し、そして細胞ペレットを新たな培地で洗浄 / 再懸濁した。細胞を再び 4 0 0 × g で 1 - 分間遠心し、上清を吸引し、そして細胞ペレットを最終的に新たな培地で最終的に再懸濁した。等量の細胞懸濁液及びトリパン / ブルー溶液 (0 . 4 % トリパン・ブルー色素を含む P B S) を混合し、そして血球計数版及び顕微鏡を使用して生細胞を計数した。細胞を 4 × 1 0⁵ 細胞 / m l に希釈した。

【 0 1 9 8 】

P M A 又は D M S O (溶媒コントロール) のいずれかを各ウェルに加えることにより、2 4 ウェル・プレートを準備した。1 m l の細胞懸濁液を各ウェルに加え、その結果各ウェルは、4 0 0 0 0 0 細胞、0 . 1 % D M S O + / - 1 6 2 n M ・ P M A を含んだ。細胞を、3 7 ° C O₂ (5 %) インキュベーター内で維持した。区分けされたウェルの細胞を、0、2 4、4 8、7 2、9 6、9 9 及び 1 0 2 時間で回収した。実験時間点及び添加の要約について、図 7 6 を参照のこと。

【 0 1 9 9 】

培地を 7 2 時間で交換した。幾つかの細胞が接着し、そして残りは懸濁状態であったので、接着細胞がバラバラになることを避けるために注意を払った。各ウェルからの培地を注意深く対応するマイクロ遠心チューブに移し、そしてチューブを 1 4 0 0 0 × g で 3 分

10

20

30

40

50

間遠心した。チューブを吸引処理し、細胞ペレットを、新たな培地(1 ml、(-)DMSO、(-)PMA)中で懸濁し、そしてそれらの元のウェルに戻した。細胞は、PMAを伴わない新たな培地中で静止し始めた。96時間で、LPS(100 ng/ml)を加え、そして細胞を3 hか99 h)及び6 h(102 h)後に回収した。

【0200】

時間点において、懸濁細胞及び培地を各ウェルから遠心チューブ中に移した。細胞を14000 × gで3分間ペレット化した。培地(上清)をきれいなチューブに移し、そしてELISA/サイトカイン分析用に貯蔵した(-20)。ウェル内に残っている細胞をPBSで洗浄し(1 ml、37)、そしてこのPBSを使用して、対応するマイクロ遠心チューブ内の細胞ペレットを洗浄した。細胞を、14000 × gで3分間再びペレット化した。細胞を煮沸溶解緩衝液(50 mM・トリスpH 7.4及び2%SDS)で溶解した。各ウェルからの接着細胞及び懸濁細胞を取っておいた。サンプルを煮沸し、そして次に-20で貯蔵した。

10

【0201】

ウエスタン・プロット

各細胞サンプルにおけるタンパク質濃度を、BSA(ウシ血清アルブミン)を標準タンパク質として使用して、BCA(ビシンコニン酸)法により測定した。タンパク質サンプル(5 µg 全量タンパク質)を12%SDS-PAGE電気泳動により分離し、そしてPVDf膜へと転写した。膜をポリビニル・アルコール(1 µg/ml、30秒)でブロッキングし、そして5%スキム・ミルクを含むPBS-t(1時間)ブロッキングした。膜を、ヒトeIF-5Aに対するマウス・モノクローナル抗体(BD Biosciences cat# 611976; 5%スキムミルクを含むPBS-t中1:20000で1時間)でプローブした。膜をPBS-tで3 × 10分洗浄した。二次抗体は、西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ結合抗マウス抗体(Sigma、1:5000、1%スキムミルク、1h)であった。タンパク質のバンドを、化学発光により可視化した(EC L検出システム、Amersham Pharmacia Biotech)。

20

【0202】

同等の量のタンパク質を各ゲル・レーンにロードしたことを示すために、膜を剥離し、そしてアクチンについて再プローブ化した。膜を剥離し(100 mM・2メルカプトエタノール、2%SDS、62.5 mMトリス-HCl・pH 6.7; 50で30分間)、洗浄し、次に上記のようにブロッキングした。膜をアクチン・一次抗体(マウス中で作成したアクチン・モノクローナル抗体; Oncogene, Ab-1; 5%スキムミルク中に1:20000)でプローブした。二次抗体、洗浄、及び検出は上記と同様であった。

30

【0203】

図77は、eIF5Aが、単球(U-397)が分化する間上方制御され、そしてその後TNF-αが分泌されることを示す。

【0204】

実施例17: eIF5A・siRNAによる、インターフェロン・ガンマに応答したIL-8産生の抑制

HT-29(ヒト結腸腺癌)細胞を、アポトーシスeIF5Aに対するsiRNAでトランスフェクションした。トランスフェクション後約48時間で培地を交換し、その結果、幾つかの試験サンプルは、インターフェロン・ガンマを伴う培地を有し、そして幾つかのサンプルはインターフェロン・ガンマを伴わない培地を有した。インターフェロン・ガンマの添加後16時間で、細胞を洗浄し、そしてTNF-αを伴う又は伴わない培地を、細胞に加えた。IL-8のELISA検出に使用する(培地)及び細胞ライセートを、8又は24時間後に回収した。

40

【0205】

図79及び80は、IL-8がTNF-αに反応して、並びにインターフェロンに反応して産生されることを示す。TNF処理の前に、インターフェロン・ガンマで細胞を刺激することにより、細胞は、単独の処理よりも多いIL8を産生ようになる。これは、インターフェロンに反応するTNF受容体の知られている上方制御のためのようであ

50

り、該細胞をインターフェロンで「刺激」することによって、該細胞がより多くの受容体を有するようになるので、細胞がTNFによりよく応答することが可能になる。eIF5Aに対するsiRNAは、TNFのみに応答したIL-8の産生に影響を与えない(前述の実験)が、該siRNAは、インターフェロンに応答するほとんど全てのIL-8並びにインターフェロン及びTNFの併用処理の結果として産生されたIL-8のかなりの量をブロックした。これらの結果は、アポトーシスeIF-5Aに対するsiRNAの使用によって、該siRNAは、IL-8を導くインターフェロン・シグナル経路を有するが、TNF経路を有さないということを示した。図81は、HT-29細胞においてインターフェロンガンマに応答するアポトーシスeIF5Aの上方制御(8時間で4倍)を示すウエスタンである。

10

【0206】

実施例18

ヒト篩骨篩板細胞培養

ヒトの両目を、Canada, Ontario Divisionのアイバンクから死後48時間以内に得た。(付着された極を伴う)視神経乳頭を取り出し、そして抗生物質/抗真菌剤、グルタミン、及び10%FBSを含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中に3時間置いた。視神経乳頭(ONH)ボタンを、各組織サンプルから回収し、そして解剖ハサミで細かく切って、4の薄片にした。移植片を12.5cm²プラスチック製培養フラスコ内のDMEM培地中で培養した。生育できた移植片について1月間成長を観測した。細胞が90%コンフルエントに達すると、トリプシン処理され、そして分化継代培養に供して、篩骨篩板(LC)及び星状細胞集合を産生した。LC細胞を、ゲンタマイシン、グルタミン、及び10%FBSを加えたDMEMを入れた25cm²フラスコ内で継代することにより濃縮した。このプロトコルのように、細胞を維持し、そして継代培養した。

20

【0207】

異なる継代により得た細胞集合を、8ウェル培養スライド上で、異なる蛍光抗体を使用することにより、同一性及び集合の均一性について特徴づけした。細胞を10%ホルマリン溶液中で固定し、そしてダルベッコ・リン酸緩衝生理食塩水(DPBS)で3回洗浄した。2%脱脂乳を含むDPBSでブロッキングしたのちに、抗体を1%BSAを含むDPBS中で希釈し、そして6個のウェルに加えた。残った2個のウェルを、1%ウシ血清アルブミン(BSA)溶液のみで、及びコントロールとして二次抗体のみで処理した。細胞を、一次抗体で、1時間室温でインキュベーションし、そして3回DPBSで洗浄した。適切な二次抗体を1%BSAを含むDPBS中に希釈し、各ウェルに加え、そして1時間インキュベーションした。スライドを水で洗浄し、風乾し、そして蛍光標本培地(Vector Laboratories)を各スライドに加えた。免疫蛍光染色を、適切なフィルターを備える蛍光顕微鏡の下で観察し、そして一次抗体で処理されていないコントロール・ウェルと比較した。全ての一次抗体を、他に記載がない限りSigmaから得た。全ての二次抗体をMolecular Probes社から購入した。LC細胞を同定するために使用される一次抗体は、抗-コラーゲンI、抗-コラーゲンIV、抗ラミニン、及び抗-細胞フィブロネクチン、抗グリア線維酸性タンパク質(GFAP)、及び抗アルファ-平滑筋アクチンであった。細胞集合が、コラーゲンI、コラーゲンIV、ラミニン、細胞フィブロネクチン、平滑筋アクチンについて陽性に染色され、かつグリア線維(GFAP)について陰性に染色される場合、細胞集合はLC細胞から構成されるということが確定される。この試験において、2セットのヒトの目を使用して、培養を開始する。LC細胞系列#506及び#517を、83歳男性及び17歳男性の視神経乳頭からそれぞれ確立した。全てのLC細胞系列は、十分に特徴付けられており、そして90%を超えるLC細胞を含むことが分かった。

30

40

【0208】

LC細胞のトランスフェクション

50µMのカンプトテシン(Sigma)及び10ng/mlのTNF-(Leinco Technologies)の組合せを使用して、篩骨篩板細胞に誘導した。カンプトテシン及びTNF-の併用は、アポトーシスを誘導する点で、カンプトテシン又はTNF-いずれかのみより有効

50

であることが分かった。

【0209】

s i R N A の構築及びトランスフェクション

ヒト e I F 5 A 1 に対する低分子抑制 R N A (s i R N A) を使用して、篩骨篩板細胞において、e I F 5 A 1 の発現を特異的に抑制した。6 種の s i R N A を、サイレンサー (S i l e n c e r) (商 標) s i R N A 構築キット (Ambion Inc) を使用して i n v i t r o 転写により作成した。4 種の s i R N A を、ヒト e I F 5 A 1 に対して作成した (s i R N A (# 1 ~ # 4)) 。2 種の s i R N A 、キット内に提供される G A P D H に対する s i R N A 、及び e I F 5 A 1 特異的 s i R N A # 1 の逆配列を有するが、それ自身は e I F 5 A を標的としない s i R N A (s i R N A # 5) を、コントロールとして使用した。s i R N A を製品プロトコルに従って作成した。e I F 5 A 及びコントロール s i R N A 標的は、以下の配列を有した：

s i R N A # 1 5 ' A A A G G A A T G A C T T C C A G C T G A 3 ' ;
s i R N A # 2 5 ' A A G A T C G T C G A G A T G T C T A C T 3 ' ;
s i R N A # 3 5 ' A A G G T C C A T C T G G T T G G T A T T 3 ' ;
s i R N A # 4 5 ' A A G C T G G A C T C C T C C T A C A C A 3 ' ;
s i R N A # 5 5 ' A A A G T C G A C C T T C A G T A A G G A 3 ' .

篩骨篩板細胞に、リポフェクタミン 2000 を使用して s i R N A をトランスフェクションした。細胞集密度が 40 ~ 70 % であるとき、篩骨篩板細胞はトランスフェクションされ、そして一般的に篩骨篩板細胞は、1 ウェルあたり 7500 細胞で、トランスフェクションの 3 日前に 8 ウェル培養スライド上に蒔かれた。8 ウェル培養スライドの 1 ウェルに十分な量のトランスフェクション培地は、25.5 p m o l の s i R N A を、O p t i - M e m (S i g m a) 中に最終体積 21.2 μ l まで希釈することにより調製した。0.425 μ l のリポフェクタミン 2000 を終量 21.2 μ l の O p t i - M e m に 7 ~ 10 分間室温にてインキュベーションした。希釈されたリポフェクタミン 2000 混合体を、次に希釈された s i R N A 混合液に加え、そして室温で 20 ~ 30 分間インキュベーションした。細胞を無血清培地で一回洗浄し、その後 135 μ l の無血清培地を細胞に加え、そして 42.4 μ l のトランスフェクション培地を加えた。細胞を成長チャンバーに 4 時間戻した。インキュベーションの後、65 μ l の無血清培地プラス 30 % F B S を細胞に加えた。ウェスタン・ブロット分析について使用される細胞中への s i R N A のトランスフェクションは、8 ウェルスライドでトランスフェクションした条件と同じ条件であるが、体積を 2.3 倍に増加させた条件を使用して、24 ウェルプレートで行われた。トランスフェクションの後に、50 μ M のカンプトテシン (S i g m a) 及び 10 n g / m l の T N F - α (Leinco Technologies) で処理する前に、篩骨篩板細胞を 72 時間インキュベーションして、アポトーシスを誘導した。細胞ライセートを次にウェスタンブロッティング用に回収するか、又は細胞をアポトーシスについて試験した。

【0210】

アポトーシス細胞の検出

アポトーシスを起している細胞の割合 (%) を測定するために、T N F - α 及びカンプトテシンで 24 時間処理されたトランスフェクションされた細胞を、ヘキスト 33258 で染色した。簡潔に記載すると細胞を、3 : 1 の無水メタノール及び氷酢酸の混合液で固定し、次にヘキスト染色液 (0.5 μ g / m l ヘキスト 33258 を含む P B S) を加えた。暗所で 10 分間インキュベーション後、染色溶液を捨て、培養スライドのウェルを区切るチャンバーを取り除き、そしてスライドを 1 分間脱イオン水で 3 回洗浄した。洗浄後、数滴のマックルバイン緩衝液 (0.021 M クエン酸、0.058 M \cdot N a ₂ H P O ₄ \cdot 7 H ₂ O ; p H 5.6) を細胞に加え、そしてカバーガラスを被せた。染色された細胞を、U V フィルターを使用して蛍光顕微鏡の下で可視化した。明るく染色された細胞又は断片化された核を有する細胞を、アポトーシスを起している細胞として数えた。1 ウェルあたり最低 200 個の細胞を計数した。アポトーシスを起している細胞の特徴である D N A の断片化を検出するために、DeadEnd 蛍光定量 T U N E L (Promega) も使用した。ヘキスト染色の後に

、細胞スライドを蒸留水で簡単に洗浄し、そしてさらにスライドをPBS (137 mM・NaCl、2.68 mM・KCl、1.47 mM・KH₂PO₄、8.1 mM・Na₂HPO₄)中に5分間二回スライドを浸し、洗浄と洗浄との間でスライドをペーパータオル上で拭いた。細胞を0.2%トライトンX-100を含むPBS中に5分間浸すことにより透過処理した。次に、スライドをPBS中に5分間2回浸すことにより再び洗浄し、そして洗浄と洗浄の間にペーパータオル上でスライドを拭き取った。1ウェルあたり25 µlの平衡緩衝液[200 mMカコジル酸カリウム(pH 6.6)、25 mMトリス-HCl(pH 6.6)、0.2 mMジチオスレイトール、0.25 mg/mlウシ血清アルブミン、及び2.5 mM塩化コバルト]を加えて、そして5~10分間インキュベーションした。平衡化の間、30 µlの反応混合液を各ウェルについて、45:5:1の比率の平衡緩衝液、ヌクレオチドミックス[50 µMフルオレセイン-12-dUTP、100 µM・dATP、10 mM・トリス-HCl(pH 7.6)、および1 mM・EDTA]、及び末端デオキシヌクレオチド・トランスフェラーゼ酵素(Tdt、25 U/µl)を混合することにより調製した。平衡緩衝液中でインキュベーションした後に、30 µlの反応混合液を1ウェルあたりに加え、そしてカバーガラスを被せた。反応を暗所にて37℃で1時間進ませた。スライドを、2×SSC[0.3 M・NaCl、及び30 mMクエン酸ナトリウム(pH 7.0)]中に浸し、そして15分間インキュベーションすることにより反応を終わらせた。スライドを次にPBS中に浸すことにより5分間3回洗浄した。PBSをキムワイプで、ウェルの周りを吸い取るにより取り除き、そして標本培地(Oncogene Research Project、Ja1750-4ML)を各ウェルに加え、そしてスライドにカバーガラスを被せた。ヘキスト染色された核を計数するために、UVフィルター(UV-G365、フィルターセット487902)を使用して、細胞を蛍光顕微鏡の下で観察した。明るく染色された核又は断片化された核を有する細胞の全てをアポトーシスを起している細胞として数えた。同じ視野を使用して、次に蛍光フィルター(グリーンH546、フィルターセット48915)を使用して観察し、そして鮮緑色の蛍光を発する核の全てをアポトーシスを起している細胞として計数した。フルオレセイン・フィルターを使用して計数された鮮緑色の核の数をUVフィルターの下計数された核の総数で割ることにより、視野においてアポトーシスを起している細胞の割合(%)を計算した。1ウェルあたり、最低でも200細胞を計数した。

【0211】

タンパク質抽出及びウエスタン・ブロット分析

細胞をPBS (8 g/L・NaCl、0.2 g/L・KCl、1.44 g/L・Na₂HPO₄、及び0.24 g/L・KH₂PO₄)中で2回洗浄し、次に50 µlの溶解緩衝液[2%SDS、50 mMトリス-HCl(pH 7.4)]を加えることにより、24ウェル・プレート内で成長している篩骨篩板細胞からタンパク質をウエスタン・ブロッティング用に単離した。細胞ライセートをマイクロ遠心チューブ内に回収し、5分間煮沸し、そして-20℃で使用するまで貯蔵した。タンパク質濃度を、ビシンコニン酸キット(BCA; Sigma)を使用して測定した。ウエスタン・ブロッティング用に、5 µgの全タンパク質を、12%SDS-ポリアクリルアミド・ゲル上で分離した。分離したタンパク質を、ポリビニリデン・ジフロリド膜に転写した。該膜を次に1時間、ブロッキング溶液(5%スキムミルク粉末、0.02%アジ化ナトリウムを含むPBS)中でインキュベーションし、そしてPBS-T(PBS+0.05%Tween-20)で15分間3回洗浄した。膜を一晚PBS-T中で、4℃で保存した。次の日に室温まで温め、膜を30秒間1 µg/mlのポリビニル・アルコール中でブロッキングした。膜を脱イオン水で5回洗浄し、そしてPBS中の5%ミルクの溶液中で30分間ブロッキングした。一次抗体をPBS中5%ミルクの溶液中で、膜とインキュベーションする前に、30分間ブレインキュベーションした。使用された一次抗体は、1:20000での抗-eIF5A(BD Transduction Laboratories)及び抗-アクチン(Oncogene)であった。膜をPBS-T中で3回洗浄し、そして1%ミルクを含むPBS中に希釈された適切なHRP-結合二次抗体と1時間インキュベーションした。ブロットを洗浄し、そしてECLプラス・ウエスタン・ブロッティング検出キット(Amersham Pharmacia Biotech)を使用して、結合されたペルオキシダーゼ結合抗体を検出した

。

【 0 2 1 2 】

結果

2種の篩骨篩板細胞(LC)細胞系列を、83歳(#506)~17歳(#517)の範囲の男性ドナーから得た視神経乳頭から樹立した。ヒト篩骨篩板から単離された細胞は、他の研究で観察された目立った核を有する広く平らな形態を有した(Lambert et al., 2001)。他の群の性質決定と一致して、LC細胞は、平滑筋アクチン(図82a)、並びに多くの細胞外マトリックスタンパク質、例えば細胞フィブロネクチン(図82b)、ラミニン(図82c)、コラーゲンI及びコラーゲンIV(データ未掲載)に対する免疫反応性を示した(Clark et al., 1995; Hernandez et al., 1998; Hernandez and Yang, 2000; Lambert et al.; 2001)。LC細胞がグリア線維酸性タンパク質(GFAP)に対して免疫反応性を示さないことは、以前の発見と一致して観測された(図82d)(Lambert et al., 2001)。これらの結果は、単離された細胞が、視神経乳頭星状細胞というよりはむしろLC細胞であるという同定を指示した。

【 0 2 1 3 】

TNF- α が、緑内障発症プロセスの間、重要な役割を果たすということが信じられているので、TNF- α の細胞傷害性効果に対するLC細胞の感受性を試験した。コンフルエントLC細胞を、カンプトテシン、TNF- α 、又はカンプトテシン及びTNF- α に38時間晒した(図83)。ヘキスト染色は、TNF- α のみが、LC細胞に対する細胞傷害性がなかったことを示した。カンプトテシンでの処理は、LC細胞のおおよそ30%の細胞死をもたらした。しかしながら、LC細胞がカンプトテシン及びTNF- α の両者で処理されたとき、LC細胞アポトーシスの相乗的増加が観察され、48時間で45%のLC細胞死をもたらした。カンプトテシンによりアポトーシスを刺激したとき、LC細胞がTNF- α の細胞傷害性効果に応答できるということを、これらの結果は示した。

【 0 2 1 4 】

eIF5Aは、細胞分裂に必須であると知られており、そしてアポトーシスに関与することが最近示唆された核細胞質輸送タンパク質である。我々は、カンプトテシン、又はカンプトテシン+TNF- α によりアポトーシスを引き起こされたLC細胞において、eIF5Aタンパク質の発現を試験した。eIF5Aの発現は、カンプトテシンで処理した際には、かすかに減少したことを除いて、有意には変化しなかった(図84A)。しかしながら、eIF5Aタンパク質の有意な上方制御は、カンプトテシン+TNF- α 処理の8時間後及び24時間後で観測された。eIF5A発現が、TNF- α に晒されることにより特異的に誘導され、そしてeIF5Aの発現がアポトーシスの誘導に相関することがこれらの結果により示された。このことは、TNF- α 受容体結合の下流のアポトーシス経路におけるeIF5Aの役割を指摘する。

【 0 2 1 5 】

LC細胞におけるTNF- α 誘導性アポトーシスの間、eIF5A発現の重要性を試験するために、eIF5Aを標的する4種のsiRNA(siRNA#1~#4)が設計され、in vitroトランスクリプションにより合成された。eIF5Aタンパク質発現を抑制する点でのsiRNAの有効性を決定するために、LC細胞系列#506及び#517を、siRNAの各々でトランスフェクションし、そして細胞ライセートにおいてeIF5Aタンパク質の発現を、72時間後に試験した(図85)。比較のため、細胞をGAPDHに対するsiRNA及び/又はsiRNA#1と同じ化学組成を有するが、eIF5Aを認識しないコントロールsiRNA(siRNA#5)でトランスフェクションした。eIF5Aに対する全てのsiRNAは、両方のLC細胞系列において有意にeIF5A発現を抑制することができた(図85)。GAPDH・siRNAを、さらなるコントロールとして使用した。なぜなら、siRNA#1の逆配列を単に有し、細胞内標的を有さないコントロールsiRNA#5と違って、GAPDH・siRNAは、その標的タンパク質GAPDHの発現を抑制することができる活性型のsiRNAであった(データ未掲載)。eIF5Aに対する4種全てのsiRNAもまた、TNF- α 及びカンプトテシンで24時

間処理することにより誘導されたアポトーシスから、トランスフェクションされたLC細胞(#506)を防御することができた(図86)。ヘキスト染色を使用して細胞死を検出すると、siRNA(siRNA#1~#4)は、LC細胞のアポトーシスを、59%(siRNA#1)、35%(siRNA#2)、50%(siRNA#3)、及び69%(siRNA#4)低減することができることが分かった。興味深いことに、GAPDHに対するsiRNAは、LC細胞のアポトーシスを42%低減することができた(図86)。GAPDHは、糖分解酵素としてのその役割のほかに、細胞内機能を有していることが知られており、例えば細胞ニューロンのアポトーシスの間の提案された機能を含む(Ishitani and Chuang, 1996; Ishitani et al., 1996a; Ishitani et al., 1996b)。類似の実験において、siRNA#1は、TNF- α 及びカンプトテシンに応答するLC系列#517のアポトーシスを53%低減することができ、それによりEIF5A・siRNAは、異なる視神経乳頭から単離されたLC細胞を防御するということが示される(図87)。これらの結果により、EIF5Aは、アポトーシスの間に機能を有し、そしてLC細胞中にTNF- α -誘導性アポトーシスを導く経路において重要な介在物でありうるということが示される。

10

20

30

40

50

【0216】

TNF- α 及びカンプトテシンに晒されたLC細胞が、古典的なアポトーシスにより死ぬということを確認するために、末端デオキシヌクレオチド・トランスフェラーゼ媒介性dUTPジゴキシゲニン・ニック末端標識(TUNEL)を使用してDNA断片化をin situで評価した。EIF5A・siRNA(siRNA#1)又はコントロールsiRNA(siRNA#5)のいずれかでトランスフェクションされた3日後、LC細胞(#506)をTNF- α 及びカンプトテシンで24時間処理した。細胞をまた、ヘキストで染色して、核を可視化した。コントロールsiRNAでトランスフェクションされた細胞の46%がTUNEL染色に対し陽性であり、一方EIF5A・siRNA#1でトランスフェクションされた細胞の8%が陽性に標識され、このことから、EIF5A・siRNAがアポトーシスからの80%超の保護を与えたということが示される(図88)。同様の結果を、EIF5A・siRNA#4で得た。該EIF5A・siRNA#4はコントロールsiRNAに対してアポトーシスからの60%超の保護を与えた(データ未掲載)。

【図面の簡単な説明】

【0217】

【図1】図1は、ラット・アポトーシス特異的EIF-5Aの3'末端のヌクレオチド配列及び派生アミノ酸配列を表す。

【図2】図2は、ラット・アポトーシス特異的EIF-5A・cDNAの5'末端のヌクレオチド配列及び派生アミノ酸配列を表す。

【図3】ラット黄体アポトーシス特異的EIF-5Aの全長cDNAのヌクレオチド配列を表す。

【図4】ラット・アポトーシス-特異的DHS・cDNAの3'末端のヌクレオチド配列及び派生アミノ酸配列を表す。

【図5】図5は、ラット黄体アポトーシス-特異的EIF-5A・cDNAの全長ヌクレオチド配列と、ヒトEIF-5A(受託番号:BC000751又はNM_001970,配列番号3)との配列比較である。

【図6】図6は、ラット黄体アポトーシス特異的EIF-5A・cDNAの全長ヌクレオチド配列と、ヒトEIF-5Aのヌクレオチド配列(受託番号NM-020390,配列番号4)との配列比較である。

【図7】図7は、ラット黄体アポトーシス特異的EIF-5A・cDNAの全長ヌクレオチド配列と、マウスEIF-5Aのヌクレオチド配列(受託番号BC003889)との配列比較である。マウス・ヌクレオチド配列(受託番号BC003889)は配列番号5である。

【図8】図8は、ラット黄体アポトーシス特異的EIF-5Aの派生全長アミノ酸配列とヒトEIF-5Aの派生アミノ酸配列(受託番号BC000751又はNM001970)との配列比較である。

【図9】図9は、ラット黄体アポトーシス特異的EIF-5Aの派生全長アミノ酸配列と

、ヒト e I F - 5 A の派生アミノ酸配列(受託番号NM020390)との配列比較である。

【図 1 0】図 1 0 は、ラット黄体アポトーシス特異的 e I F - 5 A の派生全長アミノ酸配列と、マウス e I F 5 A の派生アミノ酸配列(受託番号BC003889)との配列比較である。

【図 1 1】図 1 1 は、ラット黄体アポトーシス特異的 D H S ・ c D N A の部分長ヌクレオチド配列と、ヒト D H S のヌクレオチド配列(受託番号BC000333、配列番号 8)との配列比較である。

【図 1 2】図 1 2 は、ラット黄体アポトーシス特異的 e I F - 5 A ・ c D N A の制限酵素マップである。

【図 1 3】図 1 3 は、部分長ラット・アポトーシス特異的 D H S ・ c D N A の制限酵素マップである。

【図 1 4】図 1 4 は、³²P - d C T P で標識されたラット黄体アポトーシス-特異的 e I F - 5 A の c D N A の 3 ' 末端でプローブされた全量 R N A のノーザン・ブロット(図 1 4 A)と臭化エチジウム染色されたゲル(図 1 4 B)である。

【図 1 5】図 1 5 は、³²P - d C T P で標識されたラット黄体アポトーシス特異的 D H S の c D N A の 3 ' 末端でプローブされた全量 R N A のノーザン・ブロット(図 1 5 A)と臭化エチジウム染色されたゲル(図 1 5 B)である。

【図 1 6】図 1 6 は、過排卵されたラットの黄体におけるアポトーシスの度合いが、P G F - 2 で注射された後に試験された D N A ラダー化実験を表す。

【図 1 7】図 1 7 は、アポトーシスを起すラット黄体から単離されたゲノム D N A のアガロースゲルであり、ラットを P G F - 2 で処置した後の D N A ラダー化を示す。

【図 1 8】図 1 8 は、過排卵されたラット黄体の分散細胞においてアポトーシスの度合いが、P G F - 2 を投与する前にスペルミジンで処置されたラット(P G F - 2)において試験された D N A ラダー化実験を表す。

【図 1 9】図 1 9 は、過排卵されたラットの黄体におけるアポトーシスの度合いが、スペルミジン及び/又は P G F - 2 で処置されたラットで試験された D N A ラダー化実験を表す。

【図 2 0】図 2 0 は、³²P - d C T P - 標識されたラットの黄体アポトーシス特異的 e I F - 5 A ・ c D N A の部分長でプローブされたラット・ゲノム D N A のサザン・ブロットである。

【図 2 1】図 2 1 は、哺乳動物エピトープ・タグ発現ベクター、p H M 6 (Roche Molecular Biochemicals)を表す。

【図 2 2】図 2 2 は、血清を取り除くことによりアポトーシスを誘導した後に C O S - 7 細胞から単離された全量 R N A であって、³²P - d C T P - 標識されたラット黄体アポトーシス特異的 D H S ・ c D N A の 3 ' 非翻訳領域でプローブされた R N A のノーザン・ブロット(図 2 2 A)と臭化エチジウム染色されたゲル(図 2 2 B)である。

【図 2 3】図 2 3 は、C O S - 7 細胞の一過的トランスフェクションの方法を記載するフローチャートである。

【図 2 4】図 2 4 は、p H M 6 でトランスフェクションした後に、C O S - 7 細胞において、一過的に発現された外来タンパク質をウエスタンブロットしたものである。

【図 2 5】図 2 5 は、C O S - 7 細胞がラット・アポトーシス特異的 e I F - 5 A の全長をセンス方向で含む p H M 6 で一過的にトランスフェクションされた際に、増大したカスパーゼ活性により示されるアポトーシスの増加を記載する。

【図 2 6】図 2 6 は、C O S - 7 細胞がラット・アポトーシス特異的 e I F - 5 A の全長をセンス方向で含む p H M 6 で一過的にトランスフェクションされた際に、増大された D N A 断片により示されるアポトーシスの増加を記載する。

【図 2 7】図 2 7 は、C O S - 7 細胞がラット・アポトーシス特異的 e I F - 5 A の全長をセンス方向で含む p H M 6 で一過的にトランスフェクションされた際に、増大された核断片により示されるアポトーシスの検出を記載する。

【図 2 8】図 2 8 は、C O S - 7 細胞がラット・アポトーシス特異的 e I F - 5 A の全長をセンス方向で含む p H M 6 で一過的にトランスフェクションされた際に、増大された核断

10

20

30

40

50

片により示されるアポトーシスの増加を記載する。

【図 29】図 29 は、C O S - 7 細胞がラット・アポトーシス特異的 e I F - 5 A の全長をセンス方向で含む p H M 6 で一過的にトランスフェクションされた際に、ホスファチジルセリンを露出することにより示されるアポトーシスの検出を記載する。

【図 30】図 30 は、C O S - 7 細胞がラット・アポトーシス特異的 e I F - 5 A の全長をセンス方向で含む p H M 6 で一過的にトランスフェクションされた際に、増大されたホスファチジルセリンの露出により示されるアポトーシスの増加を記載する。

【図 31】図 31 は、C O S - 7 細胞がラット・アポトーシス特異的 e I F - 5 A の全長をセンス方向で含む p H M 6 で一過的にトランスフェクションされた際に、増大された核断片により示されるアポトーシスの増加を記載する。

10

【図 32】図 32 は、C O S 7 細胞がラット・アポトーシス特異的 e I F - 5 A の全長をセンス方向に含む p H M 6 で一過的にトランスフェクションされた際のアポトーシスの増加を記載する。

【図 33】図 33 は、C O S 7 細胞がラット・アポトーシス特異的 e I F - 5 A の全長をセンス方向に含む p H M 6 で一過的にトランスフェクションされた際の、B c 1 - 2 の下方制御を記載する。図 33 A は、クマシー・ブルー染色されたタンパク質プロット；図 33 B は対応するウエスタン・プロットである。

【図 34】図 34 は、ラット・アポトーシス特異的 e I F - 5 A の全長を、アンチセンス方向で含む p H M 6 で一過的にトランスフェクションされた C O S - 7 細胞のクマシーブルー染色されたタンパク質プロット及び B c 1 - 2 をプローブとして使用した対応するウ

20

エスタンプロットである。

【図 35】図 35 は、ラット・アポトーシス特異的 e I F - 5 A の全長を、センス方向で含む p H M 6 で一過的にトランスフェクションされた C O S - 7 細胞のクマシーブルー染色されたタンパク質プロット及び c - M y c をプローブとして使用した対応するウエスタンプロットである。

【図 36】図 36 は、ラット・アポトーシス特異的 e I F - 5 A の全長を、センス方向で含む p H M 6 で一過的にトランスフェクションされた C O S - 7 細胞のクマシーブルー染色されたタンパク質プロット及び p 5 3 をプローブとして使用した対応するウエスタンプロットである。

【図 37 A】C O S - 7 細胞において p H M 6 - ラット・アポトーシス特異的 e I F - 5 A の全長の発現のクマシーブルー染色されたタンパク質プロット及び抗 - [H A] - ペルオキシダーゼ・プローブを使用する対応するウエスタン・プロットであり、並びに C O S - 7 細胞において p H M 6 - ラット・アポトーシス特異的 e I F - 5 A の全長の発現のクマシーブルー染色されたタンパク質プロット及び p 5 3 プローブを使用した際の対応するウエスタンプロットである。

30

【図 37 B - C】C O S - 7 細胞において p H M 6 - ラット・アポトーシス特異的 e I F - 5 A の全長の発現のクマシーブルー染色されたタンパク質プロット及び抗 - [H A] - ペルオキシダーゼ・プローブを使用する対応するウエスタン・プロットであり、並びに C O S - 7 細胞において p H M 6 - ラット・アポトーシス特異的 e I F - 5 A の全長の発現のクマシーブルー染色されたタンパク質プロット及び p 5 3 プローブを使用した際の対応するウエスタンプロットである。

40

【図 38】図 38 は、R K O 細胞から単離されたヒト e I F 5 A 2 と、ヒト e I F 5 A 2 配列 (Genbank 受託番号 XM_113401) との配列比較である。

【図 39】図 39 は、一過的なトランスフェクションの後の、R K O 及び R K O - E 6 細胞中で生じるアポトーシスの割合 (%) を記載するグラフである。R K O 及び R K O - E 6 細胞は、p H M 6 - L a c Z 又は p H M 6 - e I F 5 A 1 で一過的にトランスフェクションされた。アクチノマイシン D で処理され、そして p H M 6 - e I F 5 A 1 でトランスフェクションされた R K O 細胞は、アクチノマイシン D で処理されずに p H M 6 - L a c Z でトランスフェクションされた細胞に対して、アポトーシスの 240 % の増加を示した。アクチノマイシン D で処理され、そして p H M 6 - e I F 5 A 1 でトランスフェクションさ

50

れた R K O - E 6 細胞は、アクチノマイシン D で処理されていない p H M 6 - L a c Z でトランスフェクションされた細胞に対してアポトーシスの 1 0 5 % の増加を示した。

【図 4 0】図 4 0 は、一過的なトランスフェクションの後に、R K O 細胞において起こるアポトーシスの割合 (%) を記載するグラフである。R K O 細胞は、p H M 6 - L a c Z、p H M 6 - e I F 5 A 1、p H M 6 - e I F 5 A 2、又は p H M 6 - 切り詰めた e I F 5 A 1 で一過的にトランスフェクションされた。p H M 6 - e I F 5 A 1 でトランスフェクションされた細胞は、p H M 6 - L a c Z でトランスフェクションされたコントロール細胞に対して、アポトーシスの 2 5 % の増加を示した。この増加は、p H M 6 - e I F 5 A 2 又は p H M 6 切り詰めた e I F 5 A 1 でトランスフェクションされた細胞では明らかではなかった。

10

【図 4 1】図 4 1 は、一過的トランスフェクションの後で、R K O 細胞において起こるアポトーシスの割合 (%) を記載したグラフである。R K O 細胞は、トランスフェクションされないままであるか、又は p H M 6 - L a c Z 若しくは p H 6 - e I F 5 A 1 で一過的にトランスフェクションされた。トランスフェクション効率を修正した後に、p H M 6 - e I F 5 A 1 でトランスフェクションされた細胞の 6 0 % は、アポトーシスを起した。

【図 4 2】図 4 2 は、一過的なトランスフェクションの後の R K O 細胞のアポトーシスのフローサイトメトリー分析の結果を表す。R K O 細胞は、トランスフェクションされないまま残すか、又は p H M 6 - L a c Z、p H M 6 - e I F 5 A 1、p H M 6 - e I F 5 A 2、又は p H M 6 - 切り詰めた e I F 5 A 1 で一過的にトランスフェクションされた。表は、各ゲートのピークの下の面積に基いて計算されたアポトーシスを起している細胞の割合 (%) を表す。トランスフェクションされていない細胞におけるアポトーシスのバックグラウンドおよびトランスフェクション効率について補正をした後に、p H M 6 - e I F 5 A 1 でトランスフェクションされた細胞の 8 0 % が、アポトーシスを表した。p H M 6 - L a c Z、p H M 6 - e I F 5 A 2、又は p H M 6 - 切り詰めた e I F 5 A 1 でトランスフェクションされた細胞は、アポトーシスのバックグラウンドレベルのみを表した。

20

【図 4 3】図 4 3 は、0.25 μ g/ml のアクチノマイシン D で 0、3、7、24、及び 48 時間処理された R K O 細胞から抽出されたタンパク質のウエスタンブロットを提供する。上パネルは、抗-p53 を一次抗体として使用するウエスタンブロットを表す。真中のパネルは、抗-eIF5A1 を一次抗体として使用するウエスタンブロットを表す。下パネルは、抗-eIF5A1 プロット用に使用された膜であって、ロード量が等しいことを示すために化学発光検出の後にクマシー・ブルーで染色された膜を表す。p53 及び eIF5A1 は、両方ともアクチノマイシン D で処理することにより上方制御される。

30

【図 4 4】図 4 4 は、アポトーシス特異的 eIF-5A (eIF5a) 及び増殖 eIF-5A (eIF5b) の両者が、心臓組織で発現されるということを示す棒グラフである。心臓組織は、冠動脈バイパス・グラフと (C A B G) を受けている患者から採られた。eIF5a の遺伝子発現レベル (薄灰色のバー) は、eIF5b (濃灰色のバー) と比較される。X 軸は、患者識別番号である。Y 軸は、18 s の pg/ng (リボソーム RNA 18 S (ナノグラム) あたりのメッセンジャー RNA (ピコグラム)) である。

【図 4 5】図 4 5 は、アポトーシス特異的 eIF-5A (eIF5a) 及び eIF-5A (eIF5b) の増殖の両者が、心臓組織において発現されるということを示す棒グラフである。心臓組織は、弁置換手術を受けている患者から採られた。eIF5a (薄灰色のバー) の遺伝子発現レベルは、eIF5b (濃灰色のバー) と比較される。X 軸は患者識別番号である。Y 軸は、18 s の pg/ng (リボソーム RNA 18 S (ナノグラム) あたりのメッセンジャー RNA (ピコグラム)) である。

40

【図 4 6】図 4 6 は、虚血前心臓組織及び虚血後心臓組織において、アポトーシス特異的 eIF-5A (eIF5a) と増殖 eIF-5A (eIF5b) のリアルタイム PCR により計測された遺伝子発現レベルを示す棒グラフである。Y 軸は、18 s の pg/ng (リボソーム RNA 18 s (ナノグラム) あたりのメッセンジャー RNA (ピコグラム)) である。

【図 4 7】図 4 7 は、心臓組織で行われた実験を図式的に示す。

【図 4 8】図 4 8 は、虚血が誘導される前及び後における心臓の E K G を示す。

50

【図 4 9】図 4 9 は、図 4 7 に示された実験の装備を備えた研究室のベンチを示す。

【図 5 0 A - B】図 5 0 A - F は、アポトーシス因子 e I F - 5 a (e I F - 5 a 1 又は表上で I F 5 a 1 として記載される)のレベルが I L - 1 及び I L - 1 8 のレベルと相関する患者のデータを記録する。図 5 0 A は、冠動脈バイパス・グラフト(C A B G)患者から得たデータの表である。図 5 0 B は、弁置換手術患者から得たデータの表である。

【図 5 0 C】図 5 0 C は、C A B G タンパク質におけるアポトーシス因子 e I F - 5 a (因子 5 a 1)の I L - 1 8 への相関を表すグラフである。

【図 5 0 D】図 5 0 D は、C A B G 患者において、増殖 e I F - 5 a (因子 a 2)の I L - 1 8 への相関を表すグラフである。

【図 5 0 E】図 5 0 E は、弁置換手術患者において、アポトーシス因子 e I F - 5 a (因子 5 a 1)の I L - 1 8 への相関を表すグラフである。 10

【図 5 0 F】図 5 0 F は、弁置換手術患者における増殖 e I F - 5 a (因子 a 2)の I L - 1 8 への相関を表すグラフである。

【図 5 1】図 5 1 は、図 5 0 A - F において使用される患者データが得られる患者データの表である。

【図 5 1 A】図 5 1 は、図 5 0 A - F において使用される患者データが得られる患者データの表である。

【図 5 1 B】図 5 1 は、図 5 0 A - F において使用される患者データが得られる患者データの表である。

【図 5 1 C】図 5 1 は、図 5 0 A - F において使用される患者データが得られる患者データの表である。 20

【図 5 1 D】図 5 1 は、図 5 0 A - F において使用される患者データが得られる患者データの表である。

【図 5 2】図 5 2 は、(アポトーシス因子 5 A に対する)アンチセンス・オリゴ 1、2、及び 3 で処理された後において R K O 細胞により産生されるタンパク質のレベルを示す。R K O 細胞は、アンチセンス・アポトーシス因子 5 A ヌクレオチドでトランスフェクションした後、より少ないアポトーシス因子 5 A 及び p 5 3 を産生した。

【図 5 3】図 5 3 は、蛍光標識されたアンチセンス・オリゴヌクレオチドの取り込みを示す。

【図 5 4】図 5 4 ~ 5 8 は、アンチセンス・アポトーシス因子 5 A オリゴヌクレオチドで処理しなかった細胞と比較して、アンチセンス・アポトーシス因子 5 A ・オリゴヌクレオチドで処理された細胞において、アポトーシスを受ける細胞の割合(%)が減少することを示す。 30

【図 5 5】図 5 4 ~ 5 8 は、アンチセンス・アポトーシス因子 5 A オリゴヌクレオチドで処理しなかった細胞と比較して、アンチセンス・アポトーシス因子 5 A ・オリゴヌクレオチドで処理された細胞において、アポトーシスを受ける細胞の割合(%)が減少することを示す。

【図 5 6】図 5 4 ~ 5 8 は、アンチセンス・アポトーシス因子 5 A オリゴヌクレオチドで処理しなかった細胞と比較して、アンチセンス・アポトーシス因子 5 A ・オリゴヌクレオチドで処理された細胞において、アポトーシスを受ける細胞の割合(%)が減少することを示す。 40

【図 5 7】図 5 4 ~ 5 8 は、アンチセンス・アポトーシス因子 5 A オリゴヌクレオチドで処理しなかった細胞と比較して、アンチセンス・アポトーシス因子 5 A ・オリゴヌクレオチドで処理された細胞において、アポトーシスを受ける細胞の割合(%)が減少することを示す。

【図 5 8】図 5 4 ~ 5 8 は、アンチセンス・アポトーシス因子 5 A オリゴヌクレオチドで処理しなかった細胞と比較して、アンチセンス・アポトーシス因子 5 A ・オリゴヌクレオチドで処理された細胞において、アポトーシスを受ける細胞の割合(%)が減少することを示す。

【図 5 9】図 5 9 は、篩骨篩板細胞を T N F - 及び/又はカンプトテシンで処理すること 50

により、アポトーシスを起している細胞の数が増加されることを示す。

【図 6 0】図 6 0 及び 6 1 は、アンチセンス・アポトーシス因子 5 A オリゴヌクレオチドでトランスフェクションされていない細胞に比較して、アンチセンス・アポトーシス因子 5 A オリゴヌクレオチドで処理された細胞において、アポトーシスを起している細胞の割合 (%) が減少することを示す。

【図 6 1】図 6 0 及び 6 1 は、アンチセンス・アポトーシス因子 5 A オリゴヌクレオチドでトランスフェクションされていない細胞に比較して、アンチセンス・アポトーシス因子 5 A オリゴヌクレオチドで処理された細胞において、アポトーシスを起している細胞の割合 (%) が減少することを示す。

【図 6 2】図 6 2 は、血清あり又は血清なしのいずれかで、篩骨篩板細胞が標識された s i R N A を取り込むということを示す。

【図 6 3】図 6 3 は、アポトーシス因子 5 a ・ s i R N A でトランスフェクションされた細胞が、より少ないアポトーシス因子 5 a タンパク質しか産生せず、そして加えてより多い B c l - 2 タンパク質を産生することを示す。アポトーシス因子 5 A 発現の減少は、B C L - 2 発現の増加と相関する。

【図 6 4】アポトーシス因子 5 a ・ s i R N A でトランスフェクションされた細胞は、より少ないアポトーシス因子 5 a タンパク質を産生する。

【図 6 5】図 6 5 ~ 6 7 は、アポトーシス因子 5 a ・ s i R N A でトランスフェクションされた細胞がアンプトテシン(amptothecin)及び T N F - に晒された後、アポトーシスを起す細胞の割合 (%) が低いことを示す。

【図 6 6】図 6 5 ~ 6 7 は、アポトーシス因子 5 a ・ s i R N A でトランスフェクションされた細胞がアンプトテシン(amptothecin)及び T N F - に晒された後、アポトーシスを起す細胞の割合 (%) が低いことを示す。

【図 6 7】図 6 5 ~ 6 7 は、アポトーシス因子 5 a ・ s i R N A でトランスフェクションされた細胞がアンプトテシン(amptothecin)及び T N F - に晒された後、アポトーシスを起す細胞の割合 (%) が低いことを示す。

【図 6 8】図 6 8 は、図 6 7 及び実施例 1 3 で記載される実験に由来された、s i R N A でトランスフェクションされ、そしてカンプトテシン及び T N F - で処理された篩骨篩板細胞系列 # 5 0 6 であってヘキスト染色されたものの写真である。アポトーシスを起す細胞は、より明るく染色された細胞として見られる。これらの細胞は、クロマチン凝集のため小さい核を有し、そして小さくかつ不規則な形である。

【図 6 9】図 6 9 は、アポトーシス因子 5 A でトランスフェクションされ、I L - 1 に晒された H e p G 2 細胞が、トランスフェクションされていない細胞より少ない T N F - を分泌するということを示す。

【図 7 0】図 7 0 は、ヒト・アポトーシス因子 5 a の配列(配列番号^{*}A A)及び本発明の 5 種の s i R N A の配列(配列番号^{*}1、^{*}2、^{*}3、^{*}4、及び^{*}5)を示す。

【図 7 1】図 7 1 は、ヒト・アポトーシス因子 5 a の配列(配列番号^{*}A A)及び本発明の 5 s i R N A の配列(配列番号^{*}6、^{*}7、及び^{*}8)を示す。

【図 7 2】図 7 2 は、ヒト e I F 5 A 1 に対して標的された 3 個のアンチセンス・オリゴヌクレオチドの結合位置を示す。

【図 7 3 A】図 7 3 a 及び b は、ヒト e I F 5 A 2 (増殖因子 e I F 5 A) に対するヒト e I F 5 A 1 (アポトーシス因子 5 A) のヌクレオチド・配列比較及びアミノ酸配列比較を示す。

【図 7 3 B】図 7 3 a 及び b は、ヒト e I F 5 A 2 (増殖因子 e I F 5 A) に対するヒト e I F 5 A 1 (アポトーシス因子 5 A) のヌクレオチド・配列比較及びアミノ酸配列比較を示す。

【図 7 4】図 7 4 A は、e I F 5 A 1 に対する s i R N A が、抑制されないならば、トランスフェクションされた H T - 2 9 細胞において T N F - の産生を低減したウエスタン・プロットの写真を提供する。図 7 4 B は、E L I S A の結果を提供する。

【図 7 5】図 7 5 は、E L I S A の結果を提供する。T N F - 産生は、e I F 5 A 1 に

10

20

30

40

50

対する *siRNA* で処理された細胞において、コントロール細胞に比べて減少した。

【図 7 6】図 7 6 は、U-9 3 7 分化実験のタイムコースを示す。実施例 1 6 を参照のこと。

【図 7 7】図 7 7 は、*eIF5A-1* が、単球分化及びそれに続く *TNF- α* の分泌の間、上方制御されるということを示すウエスタン・プロットの結果を示す。

【図 7 8】図 7 8 は、幹細胞分化を表し、並びにサイトカイン産生抑制するための *eIF5A-1* に対する *siRNA* の使用を示す。

【図 7 9】図 7 9 は、*IL-8* が *TNF- α* に応答して並びにインターフェロンに
10
応答して産生されるということを示す棒グラフである。このグラフは、*eIF5A* に対する *siRNA* がインターフェロンに
応答して産生されるほとんど全ての *IL-8* をブロックし、並びにインターフェロン及び *TNF* の併用治療の結果として
産生される *IL-8* の有意な量もブロックしたということを示す。

【図 8 0】図 8 0 は、*IL-8* が *TNF- α* に応答して、並びにインターフェロンに
応答して産生されるということを示す他の棒グラフである。このグラフは、*eIF5A* に対する *siRNA* がインターフェロンに
20
応答して産生されるほとんど全ての *IL-8* をブロックし、並びに有意な量の *IL-8* がインターフェロンと *TNF* との併用療法の結果として
産生される *IL-8* の有意な量もブロックするということを示す。

【図 8 1】図 8 1 は、*IFN* ガンマで 8 時間及び 2 4 時間処理された *HT29* 細胞のウエスタン・プロットである。該プロットは、*HT-29* 細胞において、インターフェロンガン
20
マに
20
応答するアポトーシス *eIF5A* の上方制御 (8 時間で 4 倍) を示す。

【図 8 2】図 8 2 は、免疫蛍光検査による篩骨篩板細胞の特徴付けである。8 3 歳の男性
の視神経乳頭から単離された篩骨篩板細胞 (#506) が、免疫蛍光検査により特徴付けられた。一次抗体は、a) アクチン；b) フィブロネクチン；c) ラミニン；及び d) *GFAp* で
あった。全ての写真を 4 0 0 倍の倍率で撮影した。

【図 8 3】カンプトテシン及び *TNF- α* での処理に応答した篩骨篩板細胞系列 # 5 0 6
のアポトーシスである。篩骨篩板細胞系列 # 5 0 6 細胞を 8 ウェル培養スライド上に、1
ウェルあたり 4 0 0 0 0 細胞で蒔いた。3 日後、コンフルエントの *LC* 細胞に、1 0 n g / m l の *TNF- α* 、5 0 μ M カンプトテシン、又は 1 0 n g / m l の *TNF- α* + 5 0 μ M
カンプトテシンで処理した。等量の *DMSO*、カンプトテシンの溶媒コントロールを、未
30
処理のコントロール細胞に加えた。処理後 4 8 時間にて、ヘキスト 33258 で染色し、そし
て *UV* フィルターを使用して蛍光顕微鏡により観測した。明るく染色され、凝集され又は
断片化された核を有する細胞をアポトーシスを起している細胞として計数した。

【図 8 4】カンプトテシン又は *TNF- α* + カンプトテシン処理の間の、*eIF5A* の発現
。篩骨篩板細胞 # 506 は、2 4 ウェルプレート上に、1 ウェルあたり 4 0 0 0 0 細胞で蒔
いた。3 日後、*LC* 細胞を 5 0 μ M カンプトテシン又は 1 0 n g / m l *TNF- α* + 5 0 μ
M カンプトテシンで処理し、そしてタンパク質ライセートを 1、4、8、及び 2 4 時間後
に採取した。等量の *DMSO* を、溶媒コントロールとしてコントロール細胞に加え、そし
て細胞ライセートを 1 及び 2 4 時間後に採取した。各サンプル由来の 5 μ g のタンパク質
を、*SDS-PAGE* により分離し、*PVDf* 膜へと転写し、そして抗-*eIF5A* 抗体で
40
ウエスタンプロットした。結合された抗体を、化学発光により検出し、そして *X* 線フイル
ムに露光した。膜を次に剥がして、そして抗- アクチンを内部ロード量コントロールと
して再プロットした。

【図 8 5】*siRNA* でトランスフェクションした後の篩骨篩板細胞系列 # 5 0 6 及び #
5 1 7 における *eIF5A* の発現。篩骨篩板細胞 # 5 0 6 及び 5 1 7 細胞は、2 4 ウェル
プレート上に、1 ウェルあたり 1 0 0 0 0 細胞で蒔いた。3 日後、*LC* 細胞を、*GAPDH* *siRNA*、*eIF5A*・*siRNA* # 1-4、又はコントロール *siRNA* # 5 でト
ランスフェクションした。トランスフェクション後 3 日、タンパク質ライセートを、回収
し、そして各サンプル由来の 5 μ g のタンパク質を、*SDS-PAGE* により分離し、*PVDf* 膜へと転写し、そして抗-*eIF5A* 抗体でウエスタンプロットした。結合された抗
50
体を、化学発光により検出し、そして *X* 線フイルムに露光した。膜を次に剥がして、そし

て抗- アクチンを内部コントロールとして再ブロッティングした。

【図 8 6】e I F 5 A s i R N A でトランスフェクションし、そしてT N F - 及びカン
プトテシンで処理した篩骨篩板細胞系列 # 5 0 6 細胞のアポトーシス。篩骨篩板細胞系列
5 0 6 を、8 ウェル培養スライド上に1 ウェルあたり7 5 0 0 個の細胞で蒔いた。3 日
後、L C 細胞をG A P D H ・ s i R N A 、e I F 5 A ・ s i R N A # 1 ~ 4 、又はコント
ロール s i R N A # 5 でトランスフェクションした。7 2 時間後、トランスフェクション
された細胞を、1 0 n g / m l T N F - + 5 0 μ M カンプトテシンで処理した。2 4 時間
後、細胞をヘキスト3 3 2 5 8 で染色し、そしてU V フィルターを使用して蛍光顕微鏡に
より観察した。明るく染色され、凝縮し、又は断片化した核を有する細胞を、アポトーシ
スを起しているものとして計測した。このグラフは、n = 4 の独立した実験の平均を表す 10

。【図 8 7】e I F 5 A ・ s i R N A # 1 でトランスフェクションされ、そしてT N F -
及びカンプトテシンで処理された篩骨篩板細胞系列 # 5 1 7 細胞のアポトーシス。篩骨篩
板細胞系列 # 5 1 7 細胞を、8 ウェル培養スライド上で1 ウェルあたり7 5 0 0 で蒔いた
。3 日後、L C 細胞をe I F 5 A ・ s i R N A # 1 又はコントロール s i R N A # 5 でト
ランスフェクションした。トランスフェクション後7 2 時間で、トランスフェクションさ
れた細胞を、1 0 n g / m l ・ T N F - + 5 0 μ M カンプトテシンで処理した。2 4 時
間後、細胞をヘキスト3 3 2 5 8 で染色し、そしてU V フィルターを使用して蛍光顕微鏡
により観察した。明るく染色され、濃縮され、又は断片化された核を有する細胞をアポト
ーシスを行っている細胞として計数した。2 個の独立した実験の結果が、ここに表される 20

。【図 8 8】e I F 5 A ・ s i R N A # 1 でトランスフェクションされ、そしてT N F -
及びカンプトテシンで処理された篩骨篩板細胞系列 # 5 0 6 細胞のT U N E L 標識。篩骨
篩板細胞系列 # 5 0 6 細胞を、8 ウェル培養スライド上で、1 ウェルあたり7 5 0 0 細胞
を蒔いた。3 日後、L C 細胞をe I F 5 A ・ s i R N A # 1 又はコントロール s i R N A
5 でトランスフェクションした。トランスフェクション後7 2 時間で、トランスフェク
ションされた細胞を、1 0 n g / m l のT N F - + 5 0 μ M カンプトテシンで処理した
。2 4 時間後、細胞をヘキスト3 3 2 5 8 で染色し、そしてD N A 断片を、末端デオキシ
ヌクレオチド・トランスフェラーゼ-仲介性d U T P -ジゴキシゲニン末端標識(R U N E
L)法を使用してi n s i t u で評価した。パネルAは、アポトーシスを起す細胞の断片 30
化されたD N A のT U N E L 標識を可視化する蛍光フィルターを使用して、蛍光顕微鏡に
より観測したスライドを表す。パネルBは、ヘキスト染色された核を可視化するU V フィ
ルターを通すことにより観察された同じスライドを表す。結果は、2 個の独立した実験の
代表的なものである。全ての写真は、4 0 0 倍の倍率で撮影された。

【図 8 9 A】図 8 9 は、e I F 5 A 1 に対する s i R N A の設計を表す。

【図 8 9 B】図 8 9 は、e I F 5 A 1 に対する s i R N A の設計を表す。

【 図 1 】

TCGAAGACCGGTAAACACGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGTATTGATTTTACTGGGAAGAAATAT
 S K T G K H G H A K V H L V G I D I F T G K K Y
 GAAGATATCTCCCGTCGACTCATAACATGGATGCCCAACATCAAAAGGAATGATTTCCAGCTGATTGGC
 E D I C P S T H N M D V P N I K R N D F Q L I G
 ATCCAGGATGGGTACCTATCCCTGCTCCAGGACAGTGGGGAGGTACGAGAGGACCTTCGCTCGCTGAGGSA
 I Q D G Y L S L L Q D S G E V R E D L R L P E G
 GACCTTGGCAAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGGAGAAGAGATCCTGATCAGTGTCTCCGCCATG
 D L G K E I E Q K Y D C G E E I L I T V L S A M
 ACAGAGGAGGACGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAAATAAAGTGGCTTCCAGGGTGGCGGTGGTGGCAGCA
 T E E A A V A I K A M A K
 GTGATCCATGAGCTACAGAGGCCCCCCCCAGCTCTGGCTGGGCTTGGCTGGACTCTATCCAAATTTA
 TTTGACGTTTTATTTTGGTTTTCTCCACCCCTTCAAAGTGTGGGGAGACCTGCTTCCAGCTGCTCCCT
 TGGCCAGGCATGAGGGAGCCATGGCCTTGGTGAAGCTACCTGCTCTTCTCGCAGCCCTGATGGGGGAAA
 GGGAGTGGGTACTGCTGTGGTTAGGTTCCCTCTCCCTTTTCTTTTAAATCAATTTGAATCAGAAAG
 CTGTGGATTTCTGGCAATGGTCTTGTGCTTTATCCCACTCAAAACCATCTGGTCCCTGTTTCTCATAGT
 CCTTCAACCCCAAGCAGCTGACAGACTGGGGACGACCCCTTCCCTGCTGTGTCTTCTCCAAACCCCT
 TCTATAGGGGTGACAAGAAGAGGGGGAGGGGACAGGATCCCTCCTCAGGATCTGGGAAGGCTTGGC
 CCCCATTGGGCTTTACCCCTTCTGTGGGCTTTCTCCCTGACACATTTGTTAAATCAAACTGAATAAAAC
 TACAAGTTTAAATGAAAAAATCAAAAAA
 (972 NT, 109 aa)

FIG.1

【 図 2 】

CAGGTCTAGAGTTGGAATCGAAGCCTCTTAAATGGCAGATGATTGGACTTCGAGACAGGAGATGCAGGGG
 M A D D L D F E T G D A G
 CCTCAGCCACCTTCCCAATGCAAGTGTCTCAGCATTACGTAAAGATGGTTTTGTGGTGTCAAGGGCCGGCCAT
 A S A T F P M Q C S A L R K N G F V V L K G R P
 GTAAGATCGTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAAGCATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGTATTG
 C K I V E M S T S K T G K H G H A K V H L V G I
 ATATTTTACTGGGAAGAAATGAAGATATCTGCCCTGCTGACTCATAACATGGATGTCCCAACATCAAAA
 D I F T G K K Y E D I C P S T H N M D V P N I K
 GGAATGATTTCCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCCCTGCTCCAGGACAGTGGGGAGGTACGAG
 R N D F Q L I G I Q D G Y L S L L Q D S G E V R
 AGGACCTTCTGCTGCTGAGGGAGACCTTGGCAAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGGAGAAGAGATCC
 E D L R L P E G D L G K E I E Q K Y D C G E E I
 TGATCACAGTGTCTCCGCTATGACAGAGGAGGACGCTGTTGCAATCAAGGCTCGAG
 L I T V L S A M T E E A A V A I K A

(488 NT, 151 aa)

FIG.2

【 図 3 】

CAGGTCTAGAGTTGGAATCGAAGCCTCTTAAATGGCAGATGATTGGACTTCGAGACAGGAGATGCAGGGG
 M A D D L D F E T G D A G 13
 CCTCAGCCACCTTCCCAATGCAAGTGTCTCAGCATTACGTAAAGATGGTTTTGGTGGTCAAGGGCCGGCCAT 144
 A S A T F P M Q C S A L R K N G F V V L K G R P
 GTAAGATCGTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAGCATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGTATTG
 C K I V E M S T S K T G K H G H A K V H L V G I 61
 ATATTTTACTGGGAAGAAATGAAGATATCTGCCCTGCTGACTCATAACATGGATGTCCCAACATCAAAA 288
 D I F T G K K Y E D I C P S T H N M D V P N I K
 GGAATGATTTCCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGTACCTATCCCTGCTCCAGGACAGTGGGGAGGTACGAG
 R N D F Q L I G I Q D G Y L S L L Q D S G E V R 109
 AGGACCTTCTGCTGCTGAGGGAGACCTTGGCAAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGGAGAAGAGATCC 432
 E D L R L P E G D L G K E I E Q K Y D C G E E I
 TGATCACAGTGTCTCCGCTATGACAGAGAGGACGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAAATAAAGTGGCTT
 L I T V L S A M T E E A A V A I K A M A K * 154
 CCAGGGTGGCGGTGGTGGCAGCAGTGCATGAGCTACAGAGGCCCCCTCCCAAGCTCTGGCTGGGCGCT 576
 TGGCTGGACTCCTATCCAATTTATTTGACGTTTTATTTGGTTTTCTCCACCCCTTCAAAGTGTGGGGAGA
 CCGTGGCTTCCACCTAGCTCCTTGGCCAGGATGAGGAGGACCATGGCTTGGTGAAGTACCTGCTCTTC 720
 TCTGCGAGCCCTGATGGGGGAAAGGAGTGGGTACTGCTGTGGTTAGGTTCCCTCTCCCTTTTCTTTT
 TAATTCATTTGGAATCAGAAAGCTGTGGATTCTGGCAATGGTCTTGTGCTCTTATCCCACTCAAAACCA 864
 TCTGGTCCCTGTTCTCATAGTCTCTACCCCAAGCAGCACTGACAGACTGGGGAGGACGCCCCCTTCCCT
 GCTGTGTCTCTCCCAACCCCTCTATAGGGGTGACAGAAGAGGAGGGGGAGGGGACAGCATCCCTCC 1008
 TCAGGATCTGGGAAGGCTTGGCCCCATGGGCTTACCTTTCTGTGGGCTTCTCCCTGACACATTTGT 1139
 TAAAAATCAAACTGAATAAAATCAAGTTTAAATGAAAAAATCAAAAAA

(1139 NT, 154 aa)

FIG.3

【 図 4 】

GCTGTGATTATTGGGCCCATAAGAACCACATACCTGTGCTGAGTCTGCACTCAGACGSGCTCACTGGGT
 A V Y Y W A H K N H I P V L S P A L T D G S L G
 GACATGATCTTTTCCATTCCTATAAAAAACCAAGCTTGGTCTGGACATCGTTGAAGACCTCGGCTCATC
 D M I F F H S Y K N P G L V L D I V E D L R L I
 AACATGAGGCCATTTTCCCAAGCGCACTGGGATGATCATCTGGGTGGAGCGTGGTCAAGCACCACATC
 N M Q A I F A K R T G M I I L G G G V V K H H I
 GCCATGCTAACCTCATGCGGAATGGAGCTGACTACGCTGTTTATATCAACACAGCCAGGAGTTTGATGGC
 A N A N L M R N G A D Y A V Y I N T A Q E F D G
 TCAGACTCAGGAGCCCGGCGAGATGAGGCTGTCTCTGGGGCAAGATCCGGATGGATGCACAGCCAGTAAAG
 S D S G A R P D E A V S W G K I R M D A Q P V K
 GTCTATGCTGATCATCTCTGTTTTCCCTTGTGCTGAGACATTGCCCCAAAGGAGATGCTTC
 V Y A D A S L V F P L L V A E T F A Q K A D A F
 AGAGCTGAGAAGAATGAGGACTGAGCAGATGGGTAAGAGACGGAGGCTTCTGCCACACCTTTATTTATTAT
 R A E K N E D
 GCATACCAACCCCTCTGGGCTCTCTTGGTCAAGCAGATCTTGAGAATAAATGGCTTTTGTGGTTT
 CTGTAAAAAAGGACTTTAAAAA

(606 NT, 151 aa)

FIG.4

【図 5】

ラットvs. ヒト(BC000751 or NM_001970) 96.5% 同一性(コード領域)

```
ラット 10 20 30 40 50 60
ラット ATGGCAGATGATTGGACTTCGAGACAGGAGATGCGAGGGCCCTCAGCCACCTTCCCAATG
ヒト ATGGCAGATGATTGGACTTCGAGACAGGAGATGCGAGGGCCCTCAGCCACCTTCCCAATG
.....
ラット 70 80 90 100 110 120
ラット CAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGTTTGTGGTGCTCAAGGGCCGCGCATGTAAGATC
ヒト CAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGTTTGTGGTGCTCAAGGGCCGCGCATGTAAGATC
.....
ラット 130 140 150 160 170 180
ラット GTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAAGCATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGT
ヒト GTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAAGCATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGT
.....
ラット 190 200 210 220 230 240
ラット ATTGATATTTTACTGGGAAGAAATATGAAGATATCTGCCGTGCACTCATAACATGGAT
ヒト ATTGATATTTTACTGGGAAGAAATATGAAGATATCTGCCGTGCACTCATAACATGGAT
.....
ラット 250 260 270 280 290 300
ラット GTCCCCAACATCAAAAGGAATGATTTCCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCC
ヒト GTCCCCAACATCAAAAGGAATGATTTCCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCA
.....
ラット 310 320 330 340 350 360
ラット CTGCTCCAGGACAGTGGGAGGTACGAGAGGACCTTCGTCTGCTGAGGGAGACCTTGGC
ヒト CTGCTCCAGGACAGTGGGAGGTACGAGAGGACCTTCGTCTGCTGAGGGAGACCTTGGC
.....
ラット 370 380 390 400 410 420
ラット AAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGGAGAAGATCCTGATCACAGTGCTGTCCGCC
ヒト AAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGGAGAAGATCCTGATCACAGTGCTGTCCGCC
.....
ラット 430 440 450 460
ラット ATGACAGAGGAGGACGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAAA
ヒト ATGACAGAGGAGGACGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAAA
```

FIG.5

【図 6】

ラットvs. ヒト(NM_020390) 72.5% 同一性(コード領域)

```
ラット 10 20 30 40 50 60
ラット ATGGCAGATGATTGGACTTCGAGACAGGAGATGCGAGGGCCCTCAGCCACCTTCCCAATG
ヒト ATGGCAGAGAAATGATTTCACCTACTGGAGATGCGGGGCTTCCAGCCTTACCTATG
.....
ラット 70 80 90 100 110 120
ラット CAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGTTTGTGGTGCTCAAGGGCCGCGCATGTAAGATC
ヒト CAGTGCTCGGCTTGGCAAAACGGCTCGTGCTCAAGGACGACCATGCAAAATA
.....
ラット 130 140 150 160 170 180
ラット GTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAAGCATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGT
ヒト GTGGAGATGTCAACTTCCAAACTGGAAGCATGGTCCATGCCAAGGTTCACCTTGTGGGA
.....
ラット 190 200 210 220 230 240
ラット ATTGATATTTTACTGGGAAGAAATATGAAGATATCTGCCGTGCACTCATAACATGGAT
ヒト ATTGATATTTTACGGGCAAAAAATATGAAGATATTTGCTCTACTCACAACATGGAT
.....
ラット 250 260 270 280 290 300
ラット GTCCCCAACATCAAAAGGAATGATTTCCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCC
ヒト GTTCCAAATATTAGAGAATGATTATCACTGATGATTCAGATTCAGATGGTTACCTTCC
.....
ラット 310 320 330 340 350 360
ラット CTGCTCCAGGACAGTGGGAGGTACGAGAGGACCTTCGTCTGCTGAGGGAGACCTTGGC
ヒト CTGCTGACAGAACTGGTGAAGTTCGTGGAGATCTAAACTGCCAGGAGTGAACATAGGC
.....
ラット 370 380 390 400 410 420
ラット AAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGGAGAAGATCCTGATCACAGTGCTGTCCGCC
ヒト AAGGAAATAGAGGGAAATACAATGCAAGTGAAGATGACAGGTGTCTGTATGTGTGCA
.....
ラット 430 440 450 460
ラット ATGACAGAGGAGGACGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAAA
ヒト ATGAGTGAAGAATATGCTGTAGCCATAAAACCTT--GCAAT
```

FIG.6

【図 7】

ラットvs. マウス(BC003889) 98.3% 同一性(コード領域)

```
ラット 10 20 30 40 50 60
ラット ATGGCAGATGATTGGACTTCGAGACAGGAGATGCGAGGGCCCTCAGCCACCTTCCCAATG
マウス ATGGCAGATGATTGGACTTCGAGACAGGAGATGCGAGGGCCCTCAGCCACCTTCCCAATG
.....
ラット 70 80 90 100 110 120
ラット CAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGTTTGTGGTGCTCAAGGGCCGCGCATGTAAGATC
マウス CAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGTTTGTGGTGCTCAAGGGCCGCGCATGTAAGATC
.....
ラット 130 140 150 160 170 180
ラット GTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAAGCATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGT
マウス GTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAAGCATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGC
.....
ラット 190 200 210 220 230 240
ラット ATTGATATTTTACTGGGAAGAAATATGAAGATATCTGCCGTGCACTCATAACATGGAT
マウス ATTGATATTTTACTGGGAAGAAATATGAAGATATCTGCCGTGCACTCATAACATGGAT
.....
ラット 250 260 270 280 290 300
ラット GTCCCCAACATCAAAAGGAATGATTTCCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCC
マウス GTCCCCAACATCAAAAGGAATGATTTCCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCC
.....
ラット 310 320 330 340 350 360
ラット CTGCTCCAGGACAGTGGGAGGTACGAGAGGACCTTCGTCTGCTGAGGGAGACCTTGGC
マウス CTGCTCCAGGACAGTGGGAGGTACGAGAGGACCTTCGTCTGCTGAGGGAGACCTTGGC
.....
ラット 370 380 390 400 410 420
ラット AAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGGAGAAGATCCTGATCACAGTGCTGTCCGCC
マウス AAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGGAGAAGATCCTGATCACAGTGCTGTCCGCC
.....
ラット 430 440 450 460
ラット ATGACAGAGGAGGACGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAAA
マウス ATGACAGAGGAGGACGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAAA
```

FIG.7

【図 8】

ラットvs. ヒト(BC000751 or NM_001970) 100.0% 同一性

```
ラット 10 20 30 40 50 60
ラット MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNFVVLKGRPKIVEMSTSKTGKHGKHAHVHLVG
ヒト MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNFVVLKGRPKIVEMSTSKTGKHGKHAHVHLVG
.....
ラット 70 80 90 100 110 120
ラット IDIFTGKKYEDICPSTHNMVFNKRNDFQLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGD LG
ヒト IDIFTGKKYEDICPSTHNMVFNKRNDFQLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGD LG
.....
ラット 130 140 150
ラット KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEEAIVAIAKAMAK
ヒト KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEEAIVAIAKAMAK
```

FIG.8

【図 9】

ラット vs. ヒト (NM_020390) 82.5% 同一性

	10	20	30	40	50	60
ラット	MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHGKHAHVHLVG					
ヒト	MADEIDFTTGDAGASSTYPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHGKHAHVHLVG					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
ラット	IDIFTGKKYEDICPSTHNDVPNIKRNDFQLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGDLG					
ヒト	IDIFTGKKYEDICPSTHNDVPNIKRNDFQLIGIQDGYLSLLTETGEVREDLRLPEGELG					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150			
ラット	KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEEAATAIKAMAK					
ヒト	KEIEGKYNAGEDVQVSMCAMSEEAATAIKP-CK					
	130	140	150			

FIG.9

【図 10】

ラット vs. マウス (BC003889) 100.0% 同一性

	10	20	30	40	50	60
ラット	MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHGKHAHVHLVG					
マウス	MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHGKHAHVHLVG					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
ラット	IDIFTGKKYEDICPSTHNDVPNIKRNDFQLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGDLG					
マウス	IDIFTGKKYEDICPSTHNDVPNIKRNDFQLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGDLG					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150			
ラット	KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEEAATAIKAMAK					
マウス	KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEEAATAIKAMAK					
	130	140	150			

FIG.10

【図 11】

ラット vs. ヒト (BC000333) 87.4% 同一性(コード領域)

	10	20	30	40	50	60
ラット	GCTGTGATTATTGGGCCCATAGAACCACATACCTGTGCTGAGTCCCTGCACCTACAGAC					
ヒト	TCCGTGATTACTGGGCCCAGAGAACCACATCCCTGTGTTAGTCCCGCACTTACAGAC					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
ラット	GGCTCCTGCTGGGTGACATGATCTTTCCATTCCATATAAAACCCAGGCTTGGTCTGGAC					
ヒト	GGCTCCTGCTGGGTGACATGATCTTTCCATTCCATAGAAGCCCGGCTGCTGGTCTGGAC					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150	160	170	180
ラット	ATCGTTGAGACCTGGGCTCATCAACATGACAGGCATTTCGCAAGCGCACTGGGATG					
ヒト	ATCGTTGAGGACCTGAGGCTCATCAACACAGGCATTTCGCAAGTGCACCTGGGATG					
	130	140	150	160	170	180
	190	200	210	220	230	240
ラット	ATCATCTGGGTGGAGGCTGGTCAAGCACACATGCGCAATGCTAACCTCATGCGGAAT					
ヒト	ATCATCTGGGCGGGGCGTGGTCAAGCACACATGCGCAATGCGCAATCATGCGGAAC					
	190	200	210	220	230	240
	250	260	270	280	290	300
ラット	GGAGCTGACTACGCTGTTTATATCAACACAGCCAGGAGTTTGATGGCTCAGACTCAGGA					
ヒト	GGGCGGACTACGCTGTTTATATCAACACAGCCAGGAGTTTGATGGCTCAGACTCAGGT					
	250	260	270	280	290	300
	310	320	330	340	350	360
ラット	GCCCGGCCAGATGAGGCTGCTCCTCGGGCAAGATCCGATGGATGCACAGCCASTAAG					
ヒト	GCCCGGCCAGAGGCTGCTCCTCGGGCAAGATCCGATGGATGCACAGCCCGTCAAG					
	310	320	330	340	350	360
	370	380	390	400	410	420
ラット	GTCTATGCTGATGATCTCTGTTTCCCTTCTGCTGGTGGCTGAGACATTGCCCCAAAG					
ヒト	GTCTATGCTGATGATCTCTGTTTCCCTTCTGCTGGTGGCTGAAACCTTGGCCAGAAG					
	370	380	390	400	410	420
	430	440	450			
ラット	GCAGATGCCTTCAGAGCTGAGAAGATGAGGAC					
ヒト	ATGATGCCTTCATGATGAGAAGAACGAGGAC					
	430	440	450			

FIG.11

【図 12】

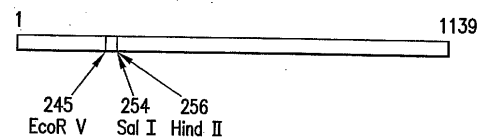


FIG.12

【図 13】

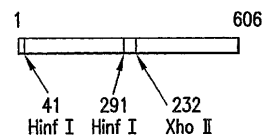


FIG.13

【図 14】

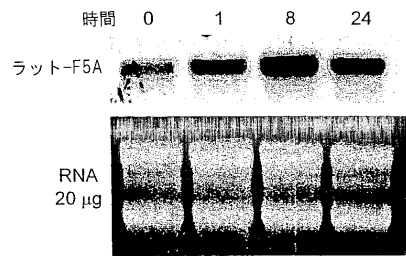


FIG.14

【図 15】

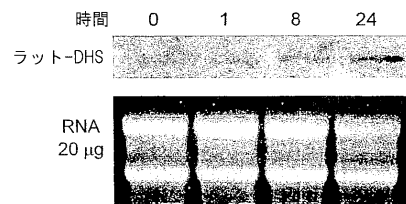


FIG.15

【図 16】



FIG.16

【図 17】

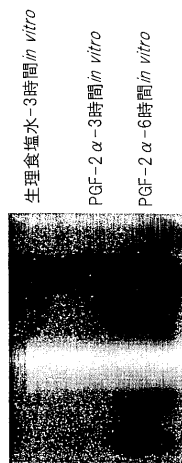


FIG.17

【図 18】

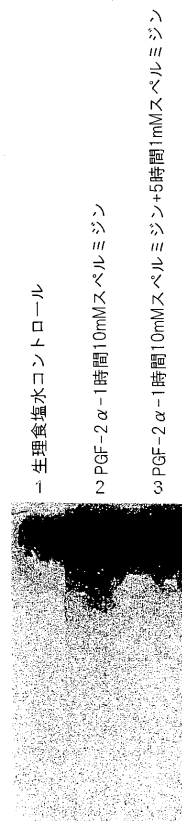


FIG.18

【図 19】

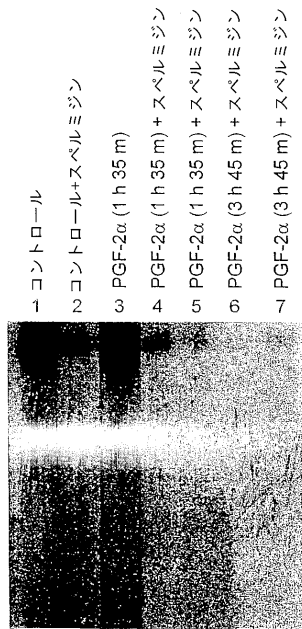


FIG.19

【図 20】

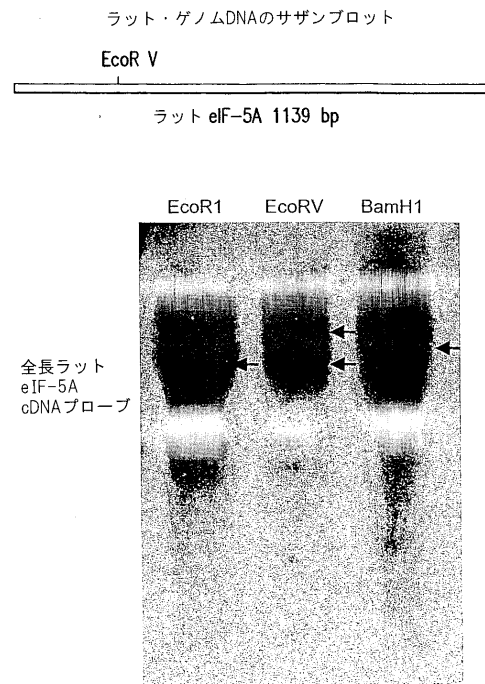


FIG.20

【図 21】

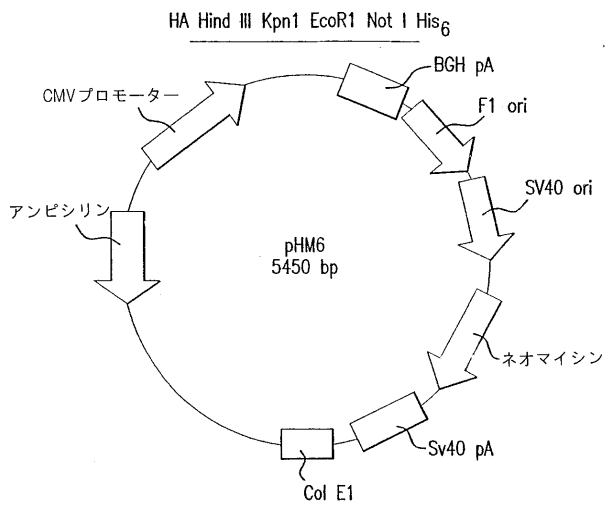


FIG.21

【図 22】

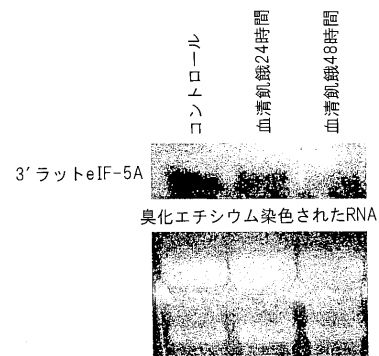


FIG.22

【図 2 3】

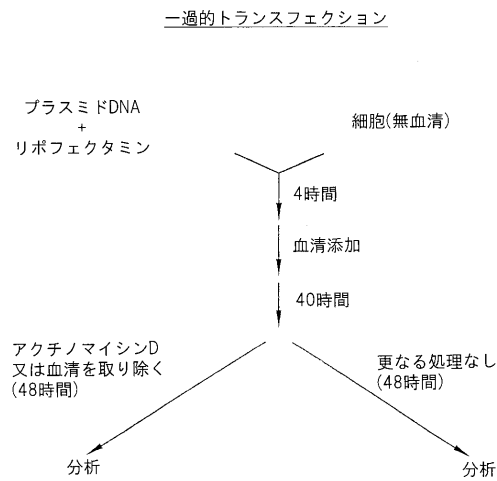


FIG.23

【図 2 4】

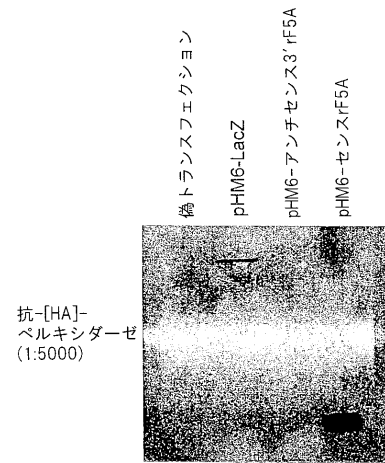


FIG.24

【図 2 5】

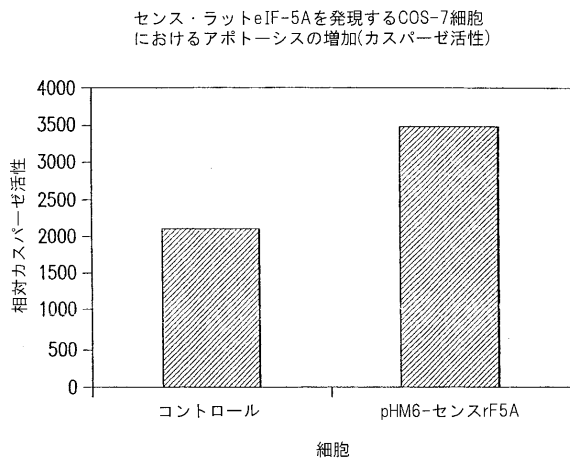


FIG.25

【図 2 6】

トランスフェクションされたCOS-7細胞・血清におけるアポトーシスを起こしている細胞数の増加割合(%)

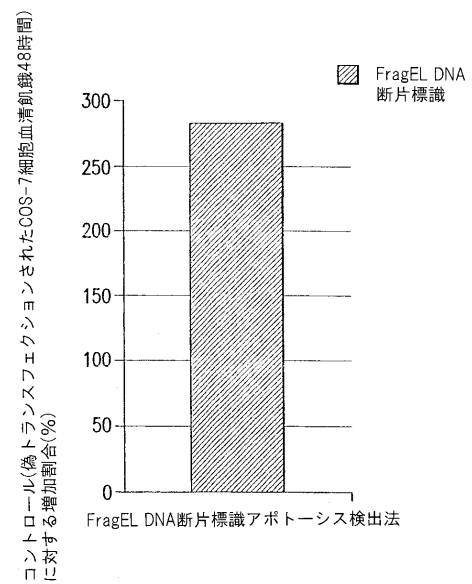


FIG.26

【図 27】

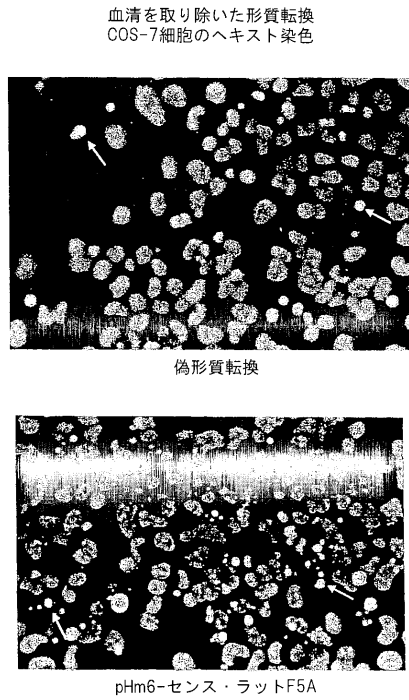


FIG.27

【図 29】

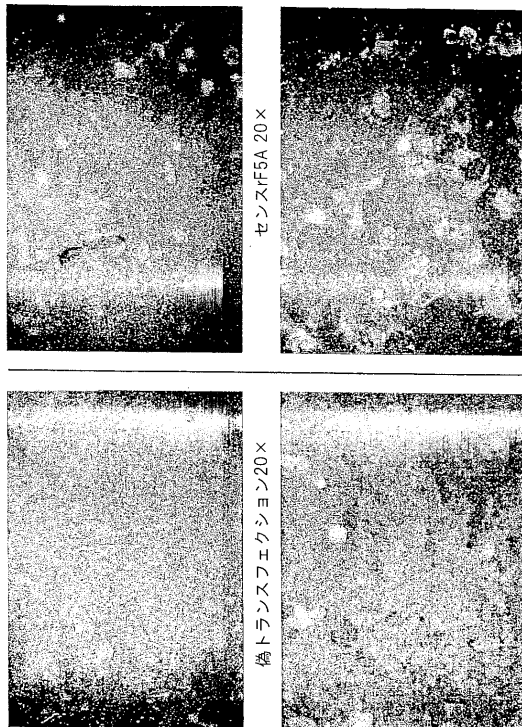


FIG.29

【図 28】

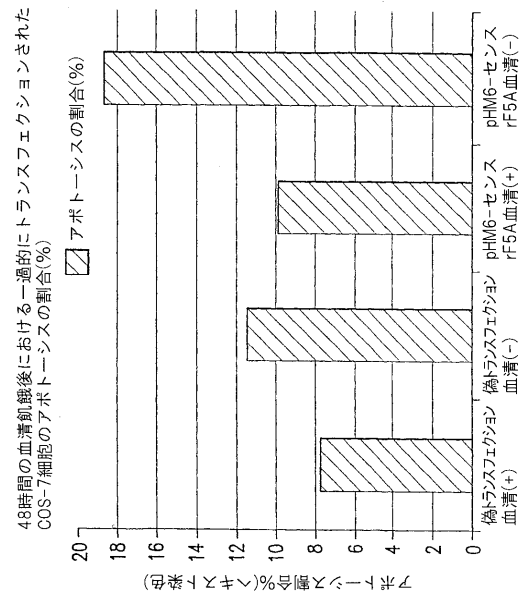


FIG.28

トランスフェクション・ベクター

【図 30】

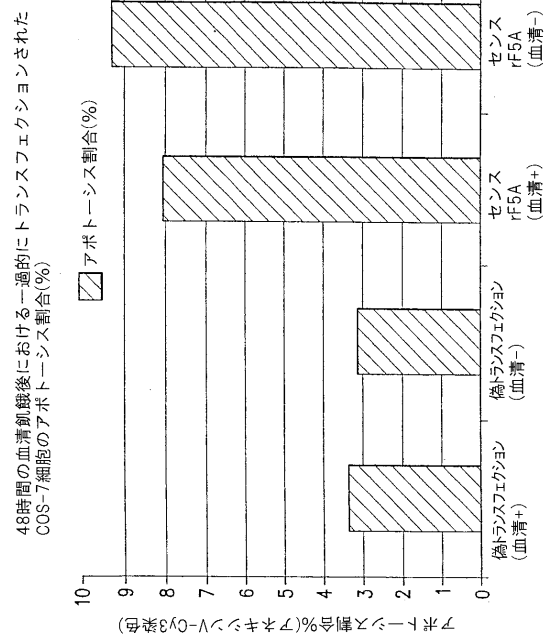


FIG.30

トランスフェクション・プラスミド

【図 3 5】

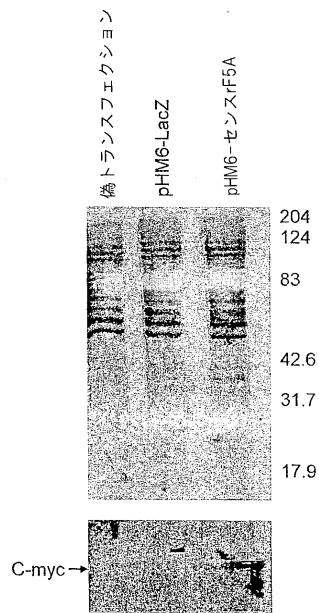


FIG.35

【図 3 6】

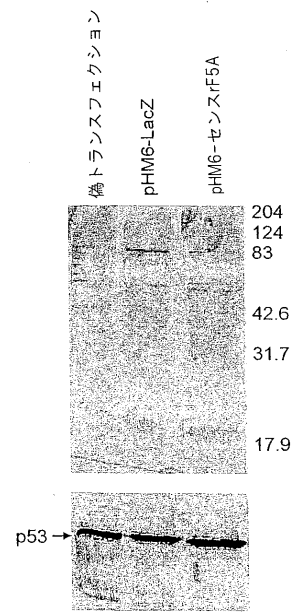


FIG.36

【図 3 7 A】

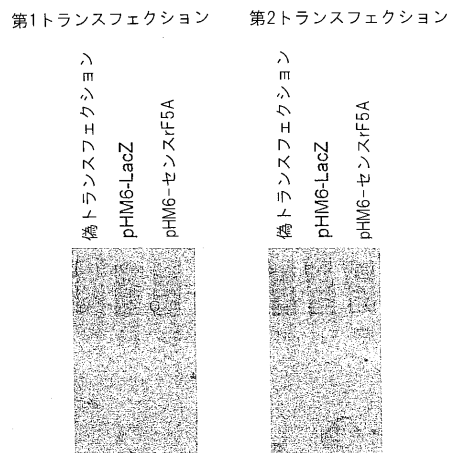


FIG.37A

【図 3 7 B - C】

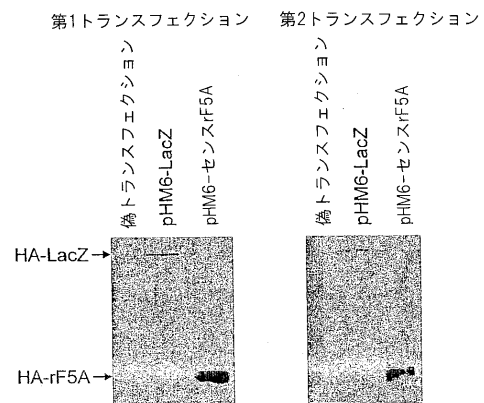


FIG.37B

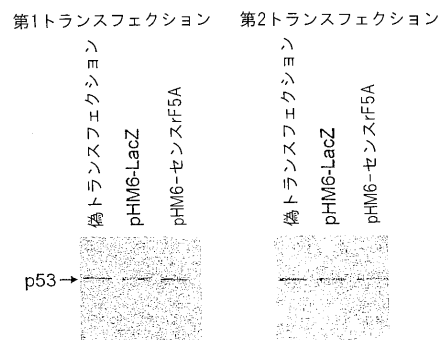


FIG.37C

【図38】

RKO細胞から単離されたヒトeIF5A2とGenbankのヒトeIF5A2の配列(受託番号XM_113401)との配列比較

XM_113401	MADEIDFTTG	DAGASSTYPM	QCSALRKNGF	VVLKGRPCKI	DEMSTSKTGK
PCR	MADEIDFTTG	DAGASSTYPM	QCSALRKNGF	VVLKGRPCKI	DEMSTSKTGK
コンセンサス	MADEIDFTTG	DAGASSTYPM	QCSALRKNGF	VVLKGRPCKI	DEMSTSKTGK
	51				100
XM_113401	HGHAKVHLVG	IDIFTGKKYE	DICPSTHND	VPNIKRNQYQ	LICIQDGYLS
PCR	HGHAKVHLVG	IDIFTGKKYE	DICPSTHND	VPNIKRNQYQ	LICIQDGCLS
コンセンサス	HGHAKVHLVG	IDIFTGKKYE	DICPSTHND	VPNIKRNQYQ	LICIQDGCLS
	101				150
XM_113401	LLTETGEVRE	DLKLPEGELG	KEIEGKYNAG	EDVQVSMCA	MSEYAVAIK
PCR	LLTETGEVRE	DLKLPEGELG	KEIEGKYNAG	EDVQVSMCA	MSEYAVAIK
コンセンサス	LLTETGEVRE	DLKLPEGELG	KEIEGKYNAG	EDVQVSMCA	MSEYAVAIK
	151				
XM_113401	PCK				
PCR	PCK				
コンセンサス	PCK				

FIG.38

【図39】

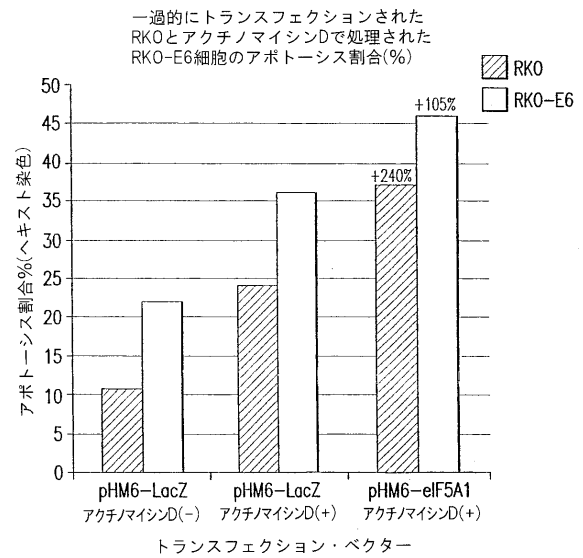


FIG.39

【図40】

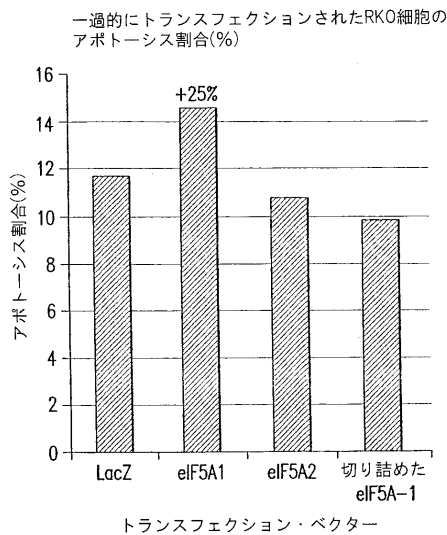


FIG.40

【図41】

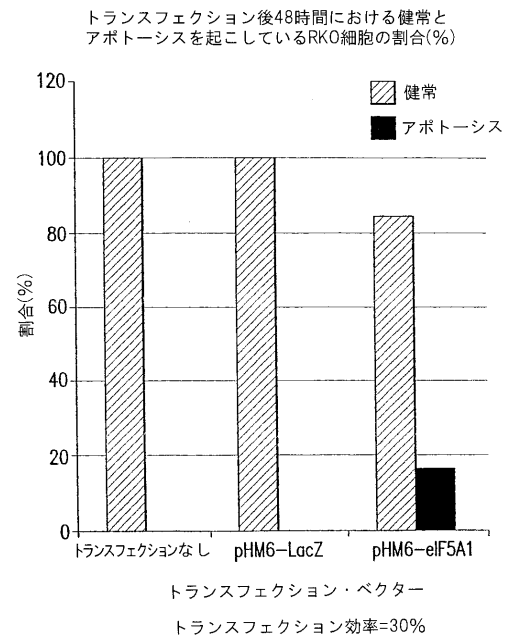


FIG.41

【 図 4 2 】

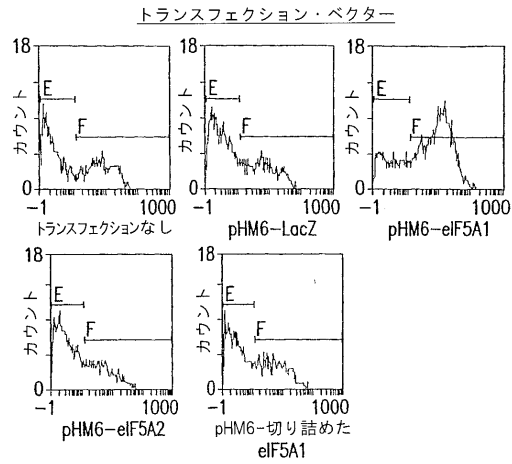


FIG.42A

トランスフェクションされたプラスミド*	アポトーシス割合(%)
トランスフェクションなし	21.2%
pHM6-Lac Z	21.7%
pHM6-eIF5A1	60.7% (80%)*
pHM6-eIF5A2	20.5%
pHM6-切り詰めたeIF5A1	24.1%

*トランスフェクションなしにおけるアポトーシスのバックグラウンドについて、及びトランスフェクション効率について補正を行った

FIG.42B

【 図 4 4 】

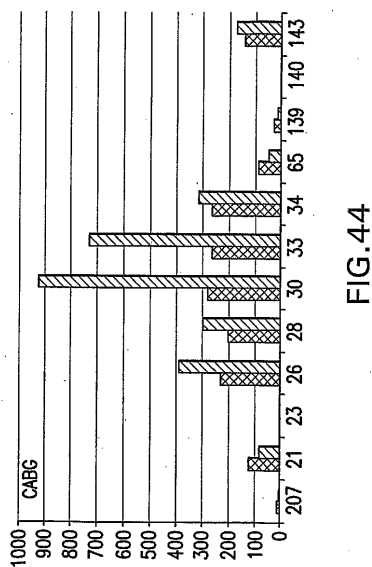


FIG.44

【 図 4 3 】

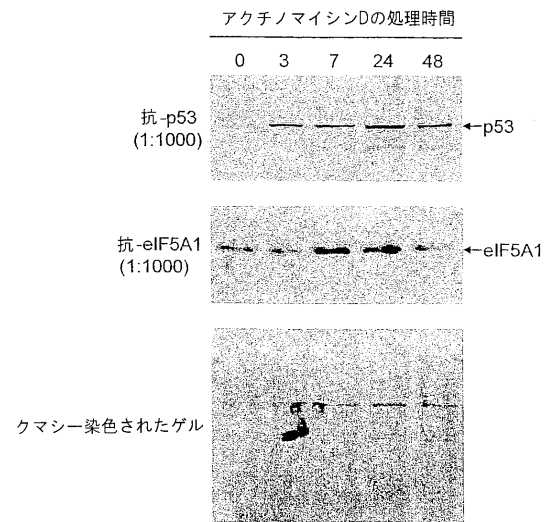


FIG.43

【 図 4 5 】

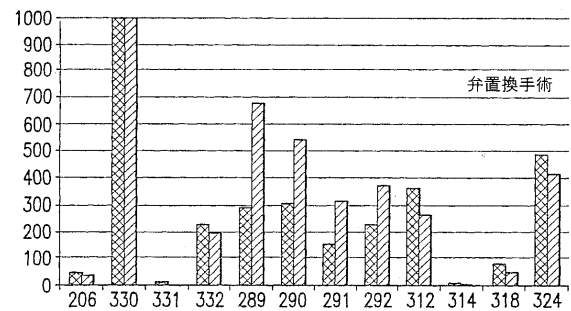


FIG.45

【図 46】

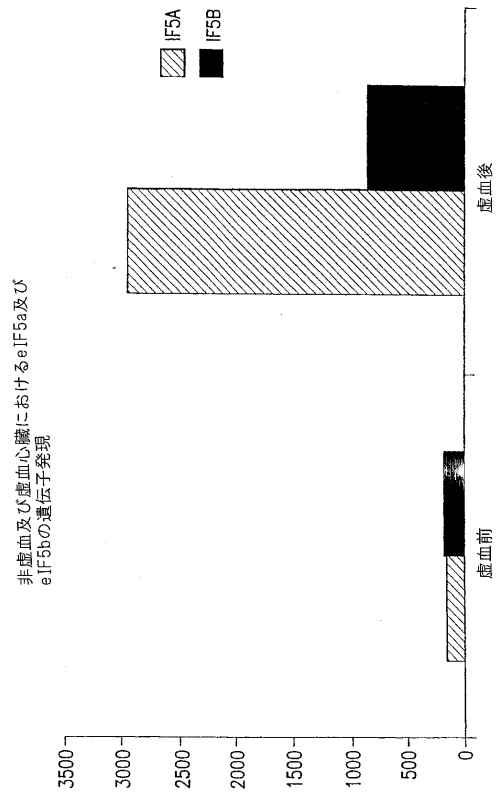


FIG.46

【図 47】

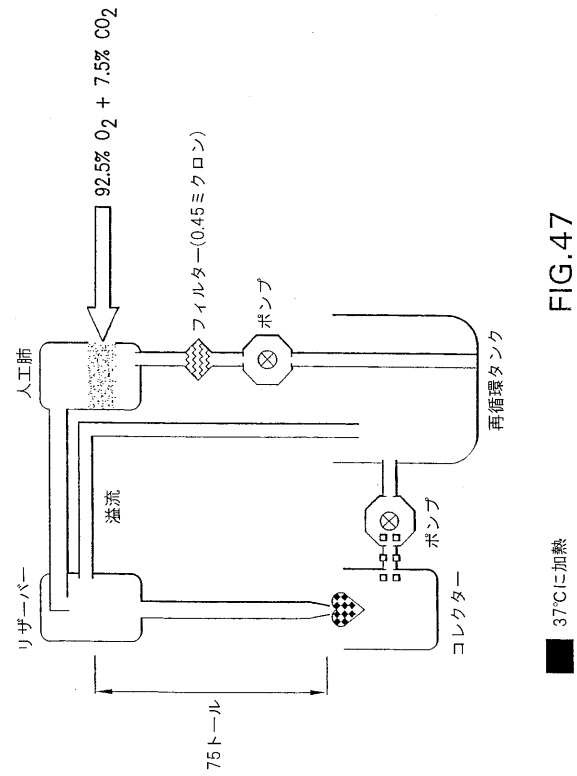


FIG.47

【図 48】



FIG.48

【図 49】

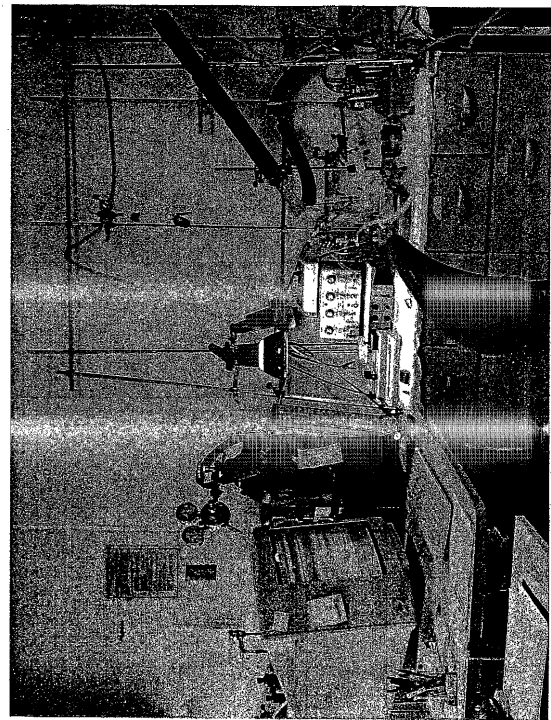


FIG.49

【図 50A - B】

患者	Ds	IF5a1 pg/ng rRNA	IF5a2 pg/ng rRNA	0.5	2.0	IL-18 pg/ng rRNA	IL-1b pg/ng rRNA
207	CABG	9.0	2.4	3.8	0.3	10.1	7.2
21	CABG	123.2	81.6	1.5	0.7	405.9	41.5
23	CABG	0.1	0.0	11.0	0.1	0.0	0.0
26	CABG						
28	CABG	200.4	294.6	0.7	1.5	894.1	49.7
30	CABG	279.4	921.2	0.3	3.3	669.8	71.0
33	CABG	260.1	723.9	0.4	2.8	545.6	105.1
34	CABG	263.4	309.3	0.9	1.2	520.0	19.9
65	CABG	82.9	43.1	1.9	0.5	98.2	20.2
139	CABG	23.9	7.0	3.4	0.3	22.7	57.3
140	CABG	0.9	0.0	#DIV/0!	0.0	0.1	0.0
143	CABG	137.7	169.5	0.8	1.2	338.7	77.9

FIG.50A

患者	Ds	IF5a1 pg/ng rRNA	IF5a2 pg/ng rRNA	0.5	2.0	IL-18 pg/ng rRNA	IL-1b pg/ng rRNA
206	弁置換手術	44.4	33.1	1.3	0.7	50.0	67.2
330	弁置換手術						
331	弁置換手術	11.3	0.2	68.9	0.0	0.1	0.0
332	弁置換手術	224.5	194.0	1.2	0.9	510.5	37.2
289	弁置換手術	286.3	674.1	0.4	2.4	888.0	167.5
290	弁置換手術	303.9	540.4	0.6	1.8	545.8	20.6
291	弁置換手術	148.1	311.8	0.5	2.1	229.2	31.1
292	弁置換手術	221.1	367.2	0.6	1.7	280.8	55.0
312	弁置換手術	361.1	262.5	1.4	0.7	198.0	44.2
314	弁置換手術	6.5	1.6	4.0	0.2	74.7	18.6
318	弁置換手術	83.3	48.5	1.7	0.6	69.3	13.3
324	弁置換手術	485.9	414.1	1.2	0.9	584.9	98.6

FIG.50B

【図 50C】

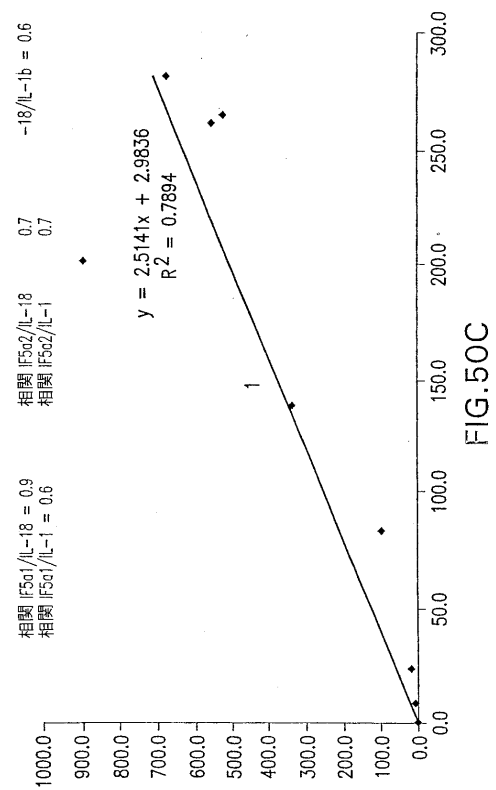


FIG.50C

【図 50D】

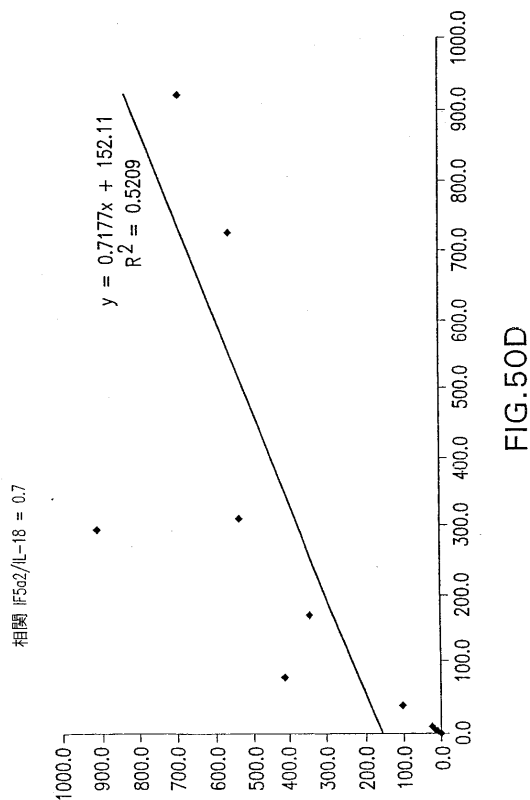


FIG.50D

【図 50E】

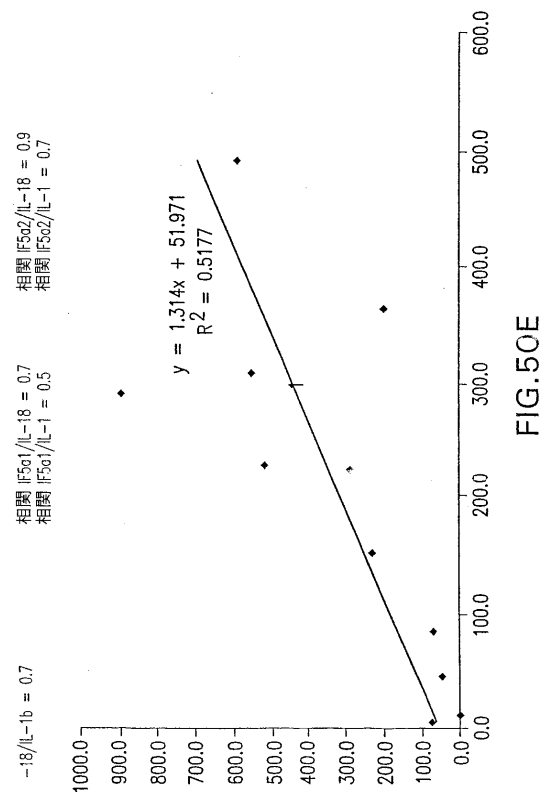
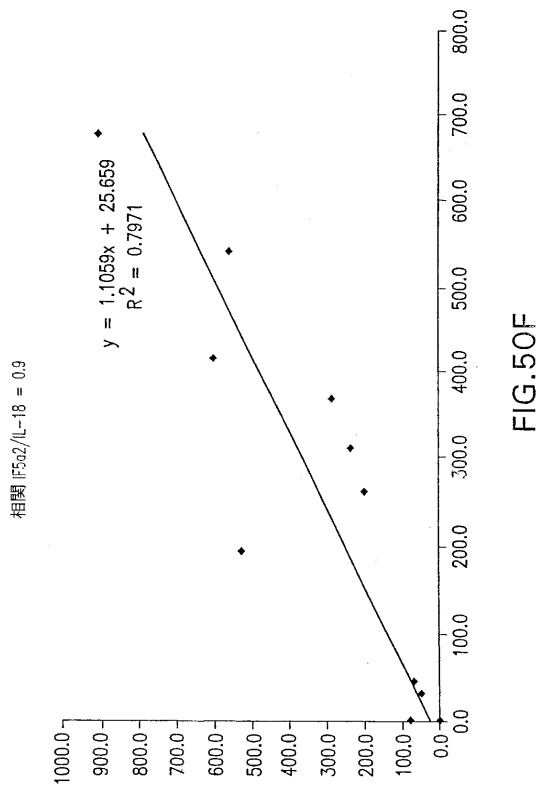


FIG.50E

【図 50 F】



【図 51 A】

FIG.51Aからの続き

39	77	M	N	N	CABG	コウマチン、コザール、ゾコールHCTZ、コルチアアロン(Cortiaone)
41	74	F	N	Y	AVR/CABG	Dig、セストリル
42	59	M	Y	N	CABG	スタチン、アテノロール、グルコトロール(Glucofrol)、リシノプリル
44	64	M	Y	N	CABG	アテノロールNTG、リシノプリル、シンバスタチン、ベラパミル
47	64	M	N	N	CABG	NTG、リシノプリル、シンバスタチン
48	56	M	Y	Y	CABG	NTG、メトプロロール、グリベジド、シンバスタチン
52	70	M	Y	N	CABG	ホシノプリル、グリベジドHCTZ、フェロジペン、メトプロロール、
53	55	M	Y	N	CABG	ラシックス、リシノプリル、グリベジド、ニフェジピン
54	48	M	Y	Y	CABG	リシノプリル、メトプロロールNTG、ラシックス(Lasix)、ASA、シンバスタチン、INS
55	67	M	N	N	CABG	ASA、プレドニゾン、アテノロール
56	71	M	Y	N	CABG	ASA、シンバスタチン、アテノロール、リシノプリルNTG
58	70	M	Y	N	CABG	コウマチン、シンバスタチン、アテノロール、リシノプリル、グリベジド
59	55	M	Y	N	CABG	リシノプリルNTG、グリベジド、メトプロロール、シンバスタチン
60	55	M	Y	N	CABG	メトホルミン、グリベジド、ASA、アテノロール、リシノプリル、シンバスタチン
61	68	M	Y	N	CABG	アテノロール、ラシックス、ホシノプリル、シンバスタチン、グリベジド
61	68	M	Y	N	CABG	アテノロール、ラシックス、ホシノプリル、シンバスタチン、グリベジド
62	76	M	N	N	CABG	ゲンフィプロジル、ASA、メトプロロールNTG
64	61	M	N	N	MAR	

FIG.51A

FIG.51Bに続く

【図 51】

不安定狭心症(unstable engine)

実験番号	年齢	性別	DM	手術	その他	RNAデータ
19	61	M	Y	N	CABG	メトプロロール、ロバスタチン、NTG
20	72	M	Y	N	CABG	メトプロロール、リベトール
21	55	M	N	N	CABG	CYA、イムラン、プレドニゾン、ラシックス、INS、メトプロロール
23	71	M	N	N	CABG	イミプラミン、イソゾール(Isordil)、NTG、メトプロロール
24	75	M	Y	Y	CABG	リシノプリル、グリベジド、メトプロロール、NTG
?	61	M	N	N	CABG	リシノプリル、ジゴキシン、ラシックス、NTG、ASA
26	57	M	N	N	CABG	アテノロール、ノルバスタク、HCTZ、NTG、ASA
28	48	F	N	N	CABG	アテノロール、INS、リシノプリル
29	64	M	N	N	MAR	ラシックス、リシノプリル
30	76	M	N	N	CABG	
31	65	M	Y	N	CABG	
33	54	M	N	N	CABG	シンバスタチン、メトプロロール
34	63	M	N	N	CABG	リシノプリル、フェロジペン(Felodipine)、NTG
35	74	M	Y	N	CABG	アムロジピン、グリベジド、プラザチン
36	62	M	Y	N	CABG	シンバスタチン、INS、フェロジペン、ピロラクトン、メトプロロール、リシノプリル
37	63	M	N	N	CABG	ファモチジン、アテノロール、ホシノプリル、プロカーディア、ゾコール、NTG
38	63	M	N	N	CABG	A-fib、Dig、アテノロール、ゾコール、コウマチン

FIG.51

FIG.51Aに続く

【図 51 B】

FIG.51Aからの続き

64	61	M	N	N	MAR		9月12日
65	72	M	N	Y	CABG	ASA、NTG	
67	69	M	Y	N	CABG		
138	75	M	Y	N	CABG	リシノプリル、シンバスタチン、メトプロロール、メトホルミン、グリベジド	
139	71	M	N	Y	CABG	メトプロロール、タイジド(Tiazide)、リベトール、カルチラ(Cardura)、ロトレル(Lotrel)	9月12日
140	86	M	N	Y	CABG	メトプロロール、アムロジピン、NTG、ヘパリン	9月12日
141	65	M	Y	N	CABG	ASA、クロビド、グリベジド、リシノプリル、INS	
142	75	F	Y	N	CABG	グリベジド、アテノロール、リシノプリル、マキシド(Maxide)、メチルドパ	
141	44	M	N	N	CABG	アテノロール、リシノプリル、シンバスタチン	9月12日
144	57	M	N	N	MAR	アロプリノール、コルチン、ミノキシジル、アテノロール、ラシックス、プレドニゾン、シンバスタチン	
145	67	M	N	N	CABG	リベトール、メトプロロール、NTG、ASA	
146	42	M	N	N	CABG	アテノロール、ノルバスタク、NTG	
147	71	M	N	N	MAR	Dig、ベラパミル、コウマチン	
148	71	F	N	N	CABG		
150	70	M	Y	N	CABG	フェロジピン、HCTZ、INS、シンバスタチン、ロサルタン(Losartan)、シンバスタチン、アテノロール	
151	78	F	Y	N	CABG	Dig、NTG、リシノプリル、カベドロール(Cavedolol)、INS	

FIG.51B

FIG.51Cに続く

【図 5 1 C】

FIG.51Bの続き									
152	50	M	N	N	N	CABG	リシノプリル,NTG,ランソックス,メトプロロール		
153	48	M	N	N	N	AVR			
154	67	M	N	N	N	CABG	シンバスタチン,リシノプリル,アテノロール		
155	59	M	N	N	N	CABG	リシノプリル,ASA,メトプロロール,シンバスタチン		
156	62	M	Y	N	N	CABG	NTG,グリブライド,アトルバスタチン,アテノロール		
161	56	M	Y	N	N	MR	INS,メトプロロール,NTG,シンバスタチン,リシノプリル		
162	23	F	N	N	N	MR			
163	72	M	N	N	N	AVR	シンバスタチン,フェロジピン,シメチジン		
164	65	F	N	N	N	MR	多弁(Multi valve)Dz. A-fluメトプロロール,DIG,コウマデイン		
166	57	F	N	N	N	MR	シンスロイド		
173	60	M	N	N	N	AVR			
177	66	F	N	N	N	MR	重篤(MR(Severe MR)),リシノプリル		
184	46	M	N	N	N	MR	ランソックス		
185	75	M	N	Y	N	CABG,MR	トプロロール(Tropolo),カボテン,ブラベックス,シンスロイド		
201	50	M	N	N	N	AVR	ランソックス,D/O前に氷でインキュベーションした		

FIG.51C

FIG.51Dに続く

【図 5 1 D】

FIG.51Cの続き									
206	58	M	N	N	N	AVR	ランソックス		
207	68	M	N	N	N	CABG	シンバスタチン,アテノロール		
211	51	M	N	N	N	AVR	EF<20%		8月9日
289	45	M	N	N	N	AVR			8月9日
290	77	M	N	N	N	MR			8月9日
291	55	F	N	N	N	AVR			8月9日
292	39	M	N	N	N	MR			8月9日
310	67	F	N	N	N	AVR,MY			9月12日
312	72	F	N	N	N	AVR			9月12日
314	75	F	N	N	N	AVR			9月12日
318	62	M	N	N	N	AVR			9月12日
329	70	M	N	N	N	AVR			9月12日
330	67	M	N	N	N	AVR			7/30/02
331	58	M	N	N	N	AVR			7/30/02
339	69	M	N	N	N	AVR			7/30/02

FIG.51D

【図 5 2】

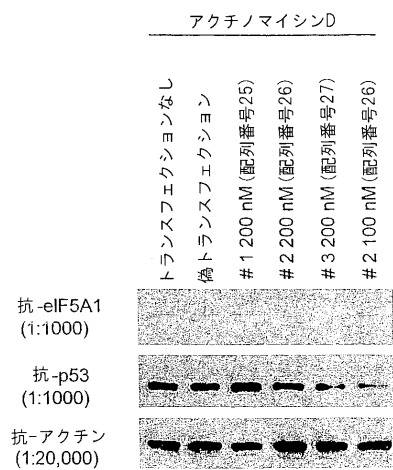


FIG.52

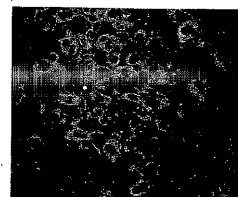


FIG.53A

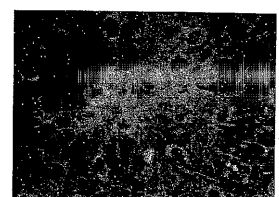


FIG.53B

【図 5 4】

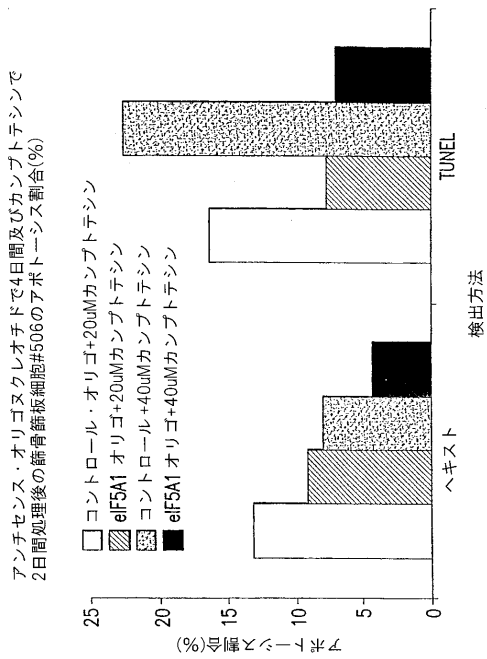


FIG.54

【図 5 5】

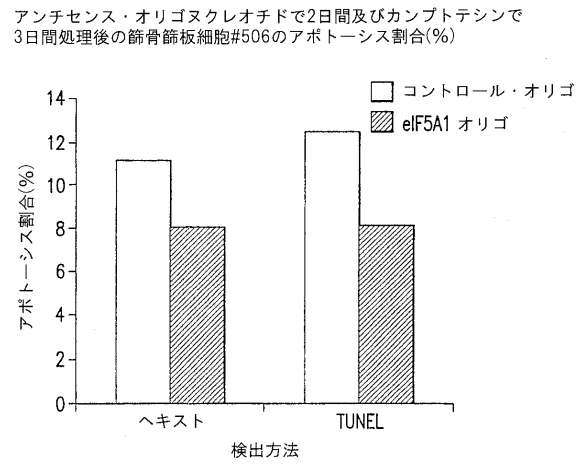


FIG.55

【図 5 6】

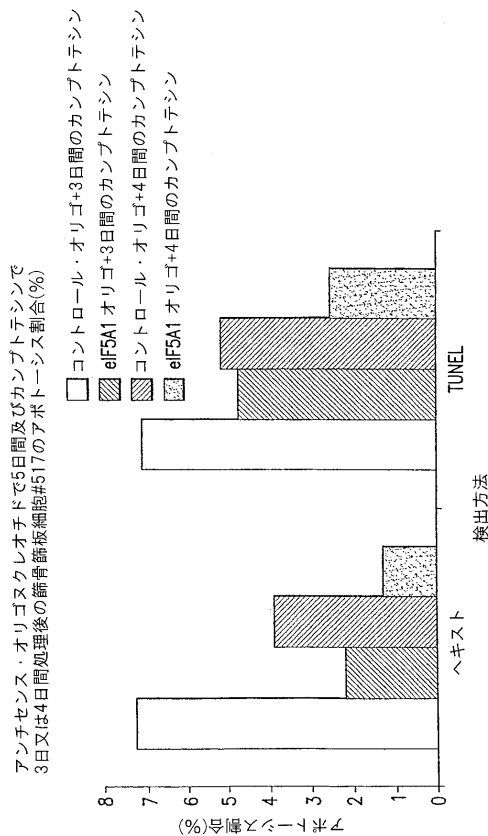


FIG.56

【図 5 7】

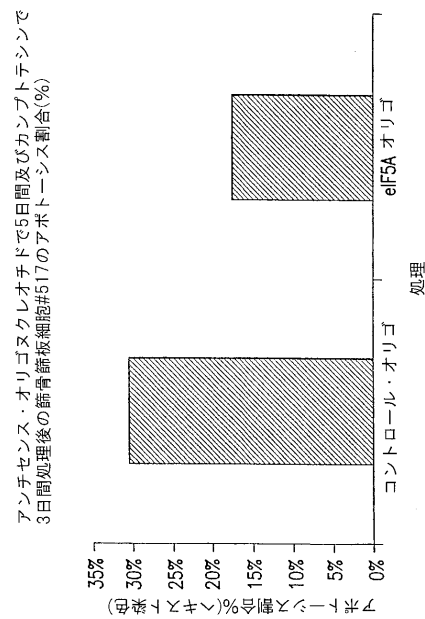
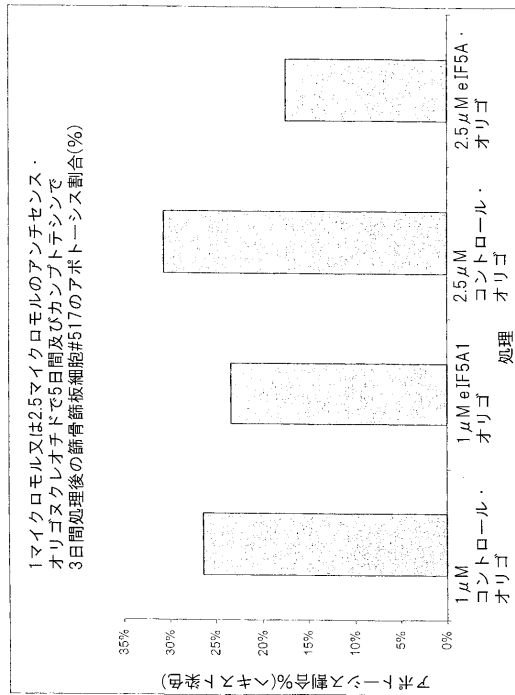


FIG.57

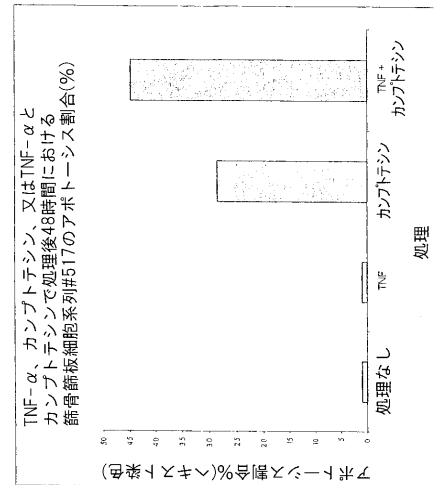
【図 58】

Figure 58



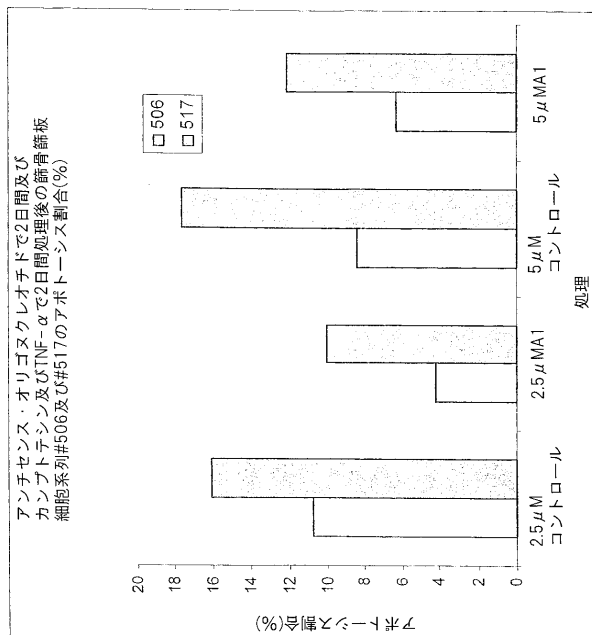
【図 59】

Figure 59



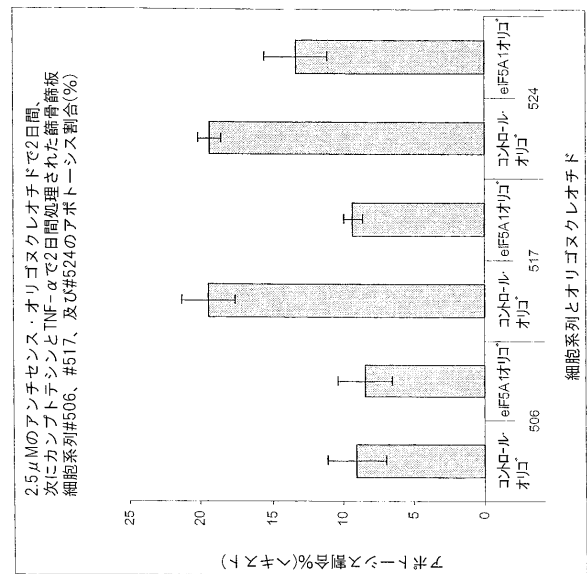
【図 60】

Figure 60

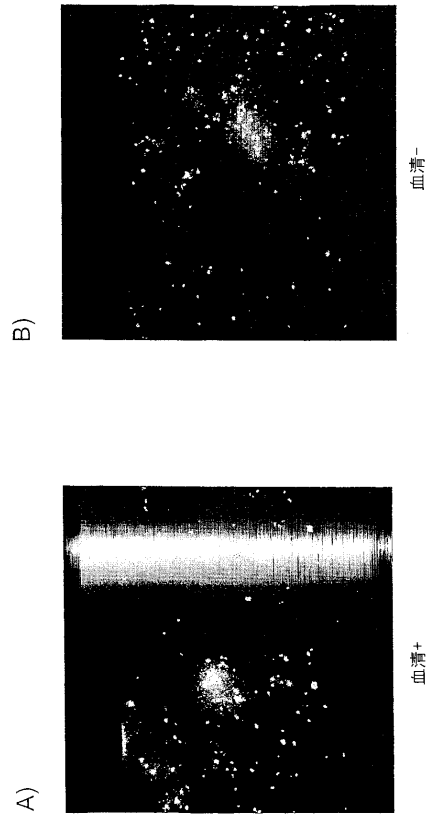


【図 61】

Figure 61

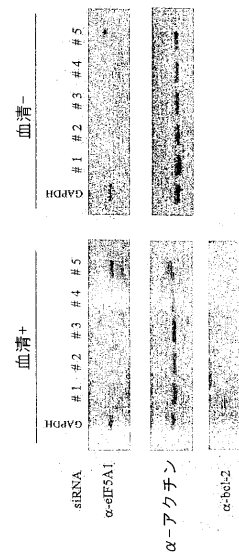


【図 6 2】



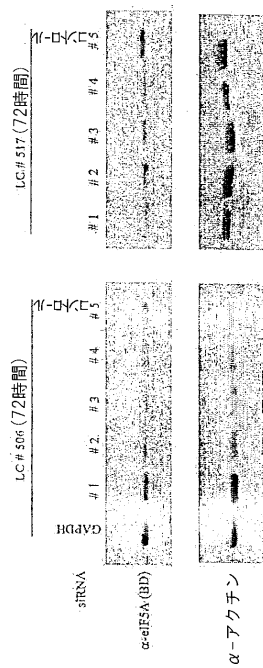
【図 6 3】

Figure 63



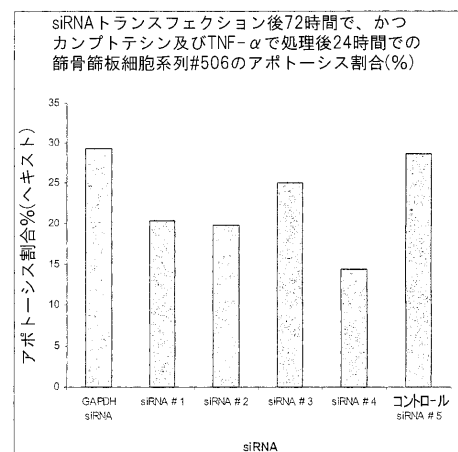
【図 6 4】

Figure 64



【図 6 5】

Figure 65



【図 6 6】

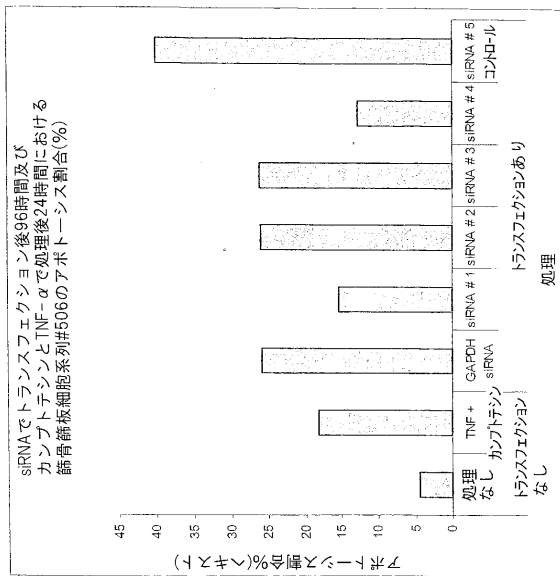


Figure 66

【図 6 7】

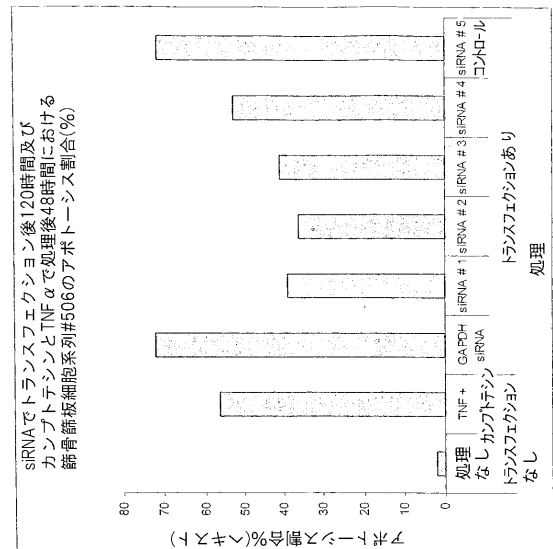


Figure 67

【図 6 8】

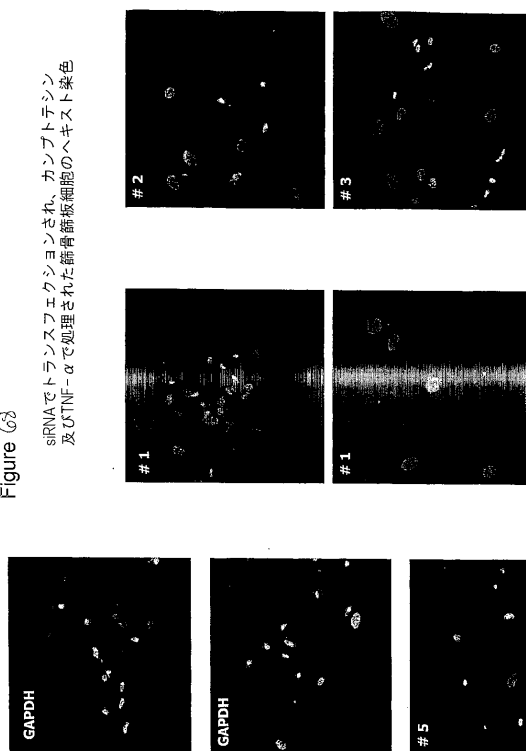


Figure 68

【図 6 9】

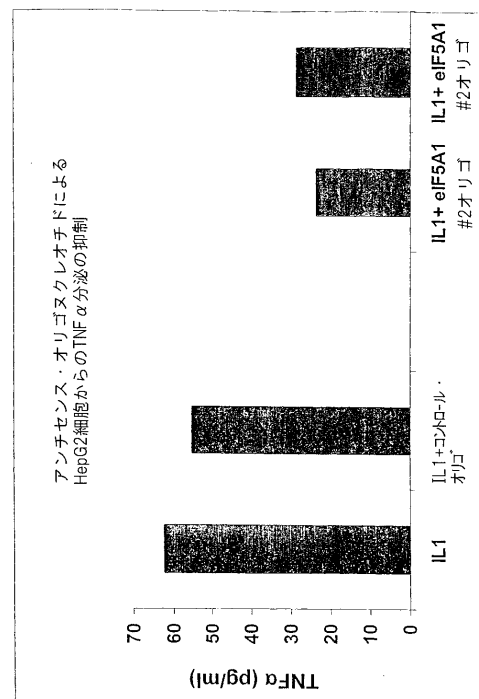


Figure 69

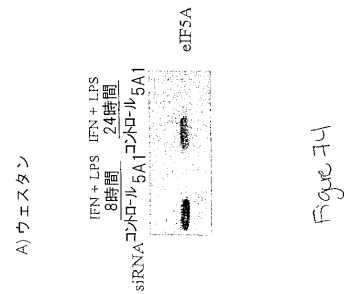
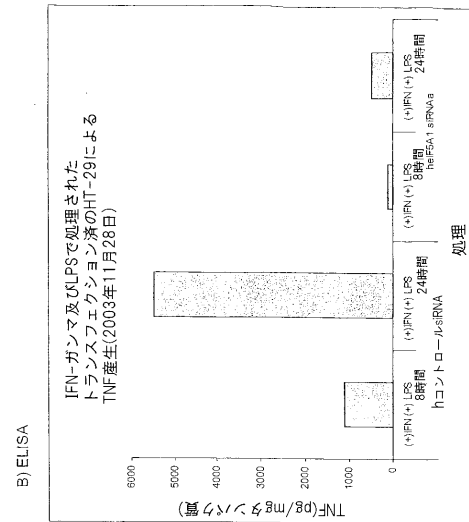
【図 7 3 B】

ヒトeIF5A1(受託番号NM_001970)及びヒトeIF5A2(受託番号NM_020390)のアミノ酸配列比較

eIF5a1	MADLDDETG	DAGASATFRM	QCSALRKNF	VVLGWPCKI	VENHASKTGK
eIF5a2	MADEIDFTTG	DAGASSTYPM	QCSALRKNF	VVLGWPCKI	VENHASKTGK
eIF5a1	HGHAKVHLVG	IDIFTGKKYE	DICPSTHMD	VPNIKRNDFQ	LIGIQDGYLS
eIF5a2	HGHAKVHLVG	IDIFTGKKYE	DICPSTHMD	VPNIKRNDFQ	LIGIQDGYLS
eIF5a1	LLQDSGEVPE	DRLRPEGLG	KEIEQKYDCG	EEILITLLSA	MTEEAARAIK
eIF5a2	LLTETGEVRE	DLKPEGLG	KEIEGKYNAG	EDVQNSVICA	YSEETAVAIK
eIF5a1				amak	
eIF5a2				151 pck	

FIG. 73B

【図 7 4】



【図 7 5】

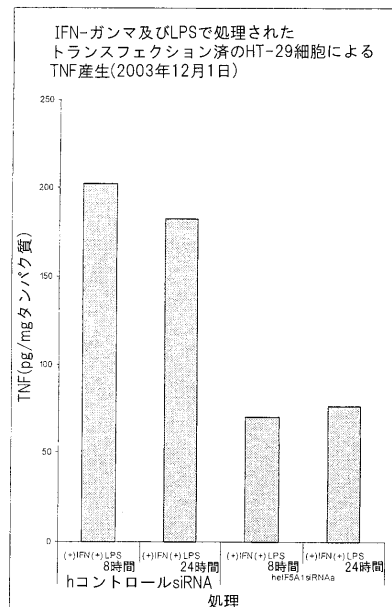


Figure 75

【図 7 6】

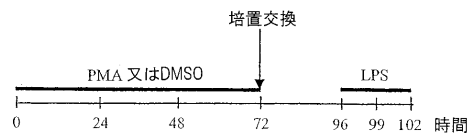


Figure 76 U-937分化実験のタイムコース

【図 7 7】

eIF5A1は、単球(U-937)の分化並びにそれに続くTNF- α 分泌の間、上方制御される

ウェスタンプロット

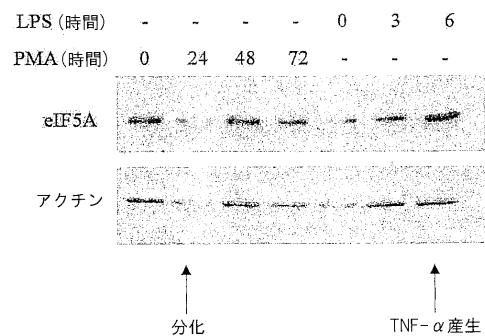
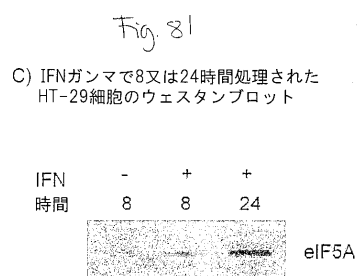
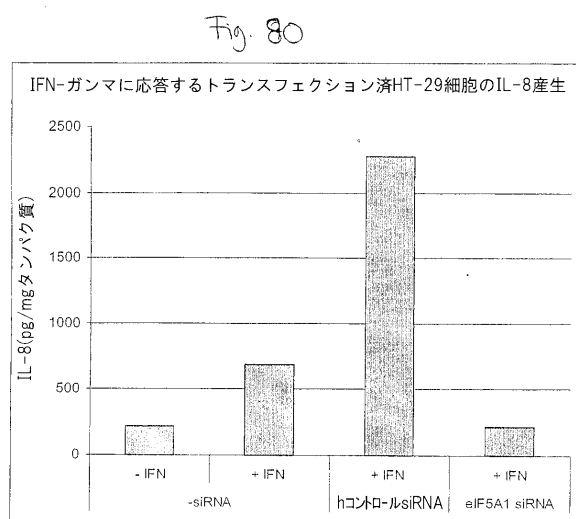


Fig. 77

【 図 7 9 】

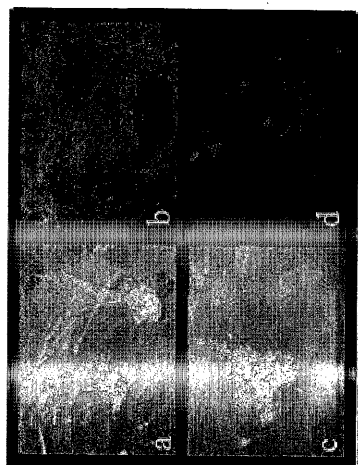


【 図 8 1 】



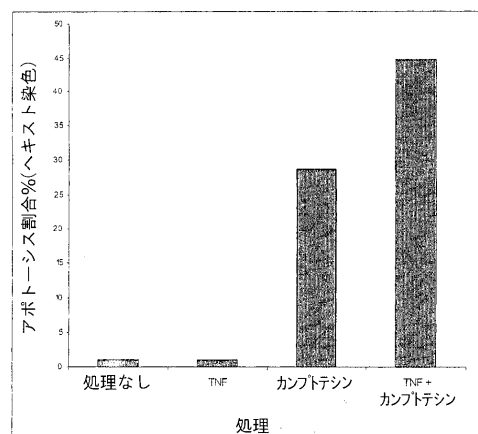
【図 8 2】

Figure 82



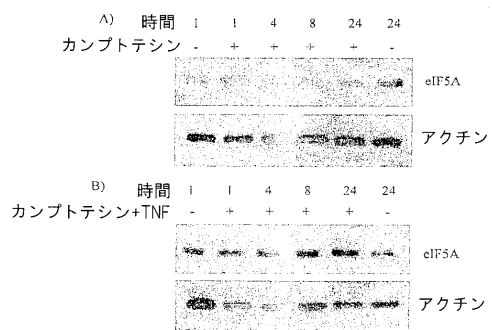
【図 8 3】

Figure 83



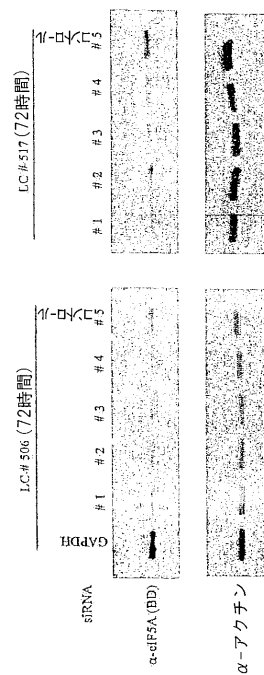
【図 8 4】

Figure 84



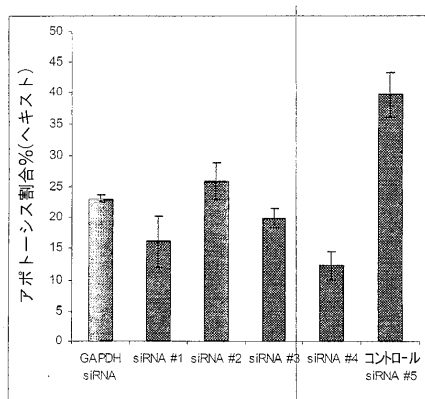
【図 8 5】

Figure 85



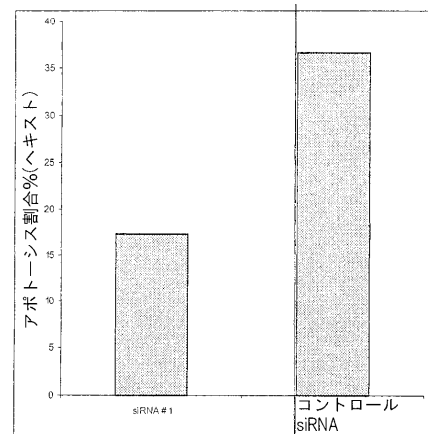
【図 86】

Figure 86



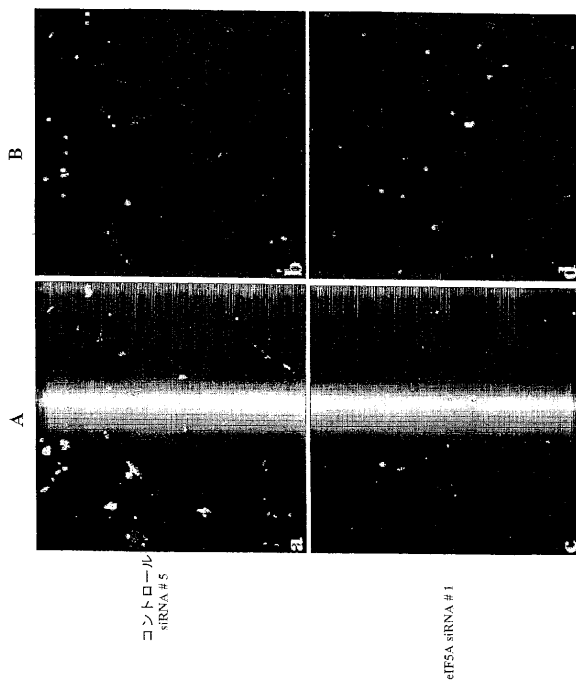
【図 87】

Figure 87



【図 88】

Figure 88



【図 89 A】

eIF5A1に対するsiRNAの設計

eIF5A1 mRNA内におけるsiRNAの位置

* 翻訳開始点及び終結点をボールド体にし、下線を引いた

```

1  ggacgaggg tagaggggg ggagggggg gcagggggg cggagggag ggttggggtc
61  gggggaggg gacgggggt agtcagtggt ttgcggcag ttggaatcga agcctcttaa
121 aatggcagat gacttgaat tggagacagg agatgcagg gctcagcca ccttcccaat
181 gcagtgctca gcattacgt agaagggctt tgtgggtgtc aaaggccggc catgtaagat
241 cgtcgagatg tctactcga agactggcaa gcaaggccac gccaggtccc atctggttgg
301 tatggacatc ttactggga agaaataga agatcttgc ccgtcaatc ataatatgga
361 tgtccccaac atcaaaagg atgacttcaa gctgattggc atccaggatg ggtacactatc
421 actgtccag gacagcggg aggtacgaga ggaactctgt ctccctgagg gagaccttgg
481 caaggagatt gacgagaagt acgactgtgg agaagagatc ctgatcagg tgcgtgtctg
541 catgacagag gaggcagctg ttgcaatcaa ggccatggca aataaactgg ctccaggat
601 ggcggtggtg gcagcagtg tctctgaac ctgcagaggc cccctccccc agcctggcct
661 ggctcggggc cgtctctat cctctctat cctctctat ttattttttg ttattttttg
721 gttttcccca cccctccaat ctgtcgggga gcccctgccc ttactcagc tcccttggcc
781 aggagcagag gaagctgtgg ccttggtgaa gcttgcctcc tcttctcccc tcaactacaa
841 gccctggtgg gggagaagg ggtgggtgct gcttgggttt tagctttttt tttttttttt
901 tttttttttt aaatcaatc tgggaatcga agcgggtgga ttctggcaaa tggctcttgt
961 gccctcccca ctcacccctg gctgggtccc ctgttgccca tagccttta cctgagcac
1021 ccccccaaca gactggggag cagcccccct gectgectgt gtctctcccc aaaccccttt
1081 agatgggggag ggaagaggag gagaggggag ggaacctgac cctctctcag gcatctggga
1141 gggcctgccc ccaatgggct ttacccctcc ctgggggttc tctcccgag acatttggta
1201 aaatcaaac tgaataaac tacaagttta atatgaaaa aaaaaaaan aaaaaaaan
1261 aaaaaaaan aaaaaaaan aaaaaaaan aaaaaaaan

```

siRNA #1 標的
siRNA #2 標的
siRNA #3 標的

Fig 89

【 図 8 9 B 】

siRNA標的の位置及び配列、並びにBLAST結果

siRNA #1 標的の位置375~395bp(開始点に対し位置254~274bp)%G/C=39.1
BLAST=eIF5Aそのもの

標的 5' AA(AGGAATGACTTCCAGCTGA) 3'

siRNA 5' AAAGGAAUGACUCCAGCUGAdTdT 3'
3' dTdTUUUCCUUACUGAAGGUCGACU 5'

siRNA #2 標的の位置236~256(開始点に対し115~135bp)%G/C=43.4
BLAST=ラットの仮タンパク質に同一

標的 5' AA(GATCGTCGAGATGTCTACT) 3'

siRNA 5' AAGAUCGUCGAGAUGUCUACUdTdT 3'
3' dTdTUUUCUAGCAGCUCUACAGAUGA 5'

siRNA #3 標的の位置284~304(開始点に対し163~183bp)%G/C=43.4
BLAST=eIF5Aそのもの

標的 5' AA(GGTCCATCTGTTGGTATT) 3'

siRNA 5' AAGGUCCAUCUGGUUGGUAUUMdTdT 3'
3' dTdTUUCCAGGUAGACCAACCAUAA 3'

siRNA #4 標的の位置678~698(3' UTR ; 開始点に対し557~577bp)%G/C=48
BLAST=eIF5Aそのもの

標的 5' AA(GCTGGACTCCTCCTACACA) 3'

siRNA 5' AAGCUGGACUCCUCCUACACAdTdT 3'
3' dTdTUUCCAGGAGGAGGAUGUGU 5'

siRNA #5 コントロール ; siRNA#1の逆配列

%G/C = 39.1 BLAST=良好、17/23%以下の同一性

標的 5' AA(AGTCGACCTCAGTAAGGA) 3'

siRNA 5' AAAGUCGACGUUCAGUAAGGAdTdT 3'
3' dTdTUUUCAGCUGGAAGUCAUCCU 5'

Fig 89
continued

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Application No JP 2004/006598						
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/11 A61K31/713 A61P27/00 A61P37/00								
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) IPC 7 C12N A61K A61P								
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE, Sequence Search								
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td> WO 03/010286 A (SENECO INC) 6 February 2003 (2003-02-06) cited in the application page 11, line 5 - line 11 page 27 page 31, last paragraph - page 32 figures 33,34,36; example 4 ----- -/- </td> <td> 12,13, 16,17, 31,32, 35,36 </td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 03/010286 A (SENECO INC) 6 February 2003 (2003-02-06) cited in the application page 11, line 5 - line 11 page 27 page 31, last paragraph - page 32 figures 33,34,36; example 4 ----- -/-	12,13, 16,17, 31,32, 35,36
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
X	WO 03/010286 A (SENECO INC) 6 February 2003 (2003-02-06) cited in the application page 11, line 5 - line 11 page 27 page 31, last paragraph - page 32 figures 33,34,36; example 4 ----- -/-	12,13, 16,17, 31,32, 35,36						
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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		Date of mailing of the international search report						
16 August 2004		31/08/2004						
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Andres, S						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
US2004/006598

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEN KUANG YU ET AL: "RNA interference analysis of the function of hypusine-containing eukaryotic initiation factor 5A in <i>C. elegans</i> " FASEB JOURNAL, vol. 16, no. 4, 20 March 2002 (2002-03-20), page A162, XP008033807 ISSN: 0892-6638 * Abstract 154.6 * the whole document & ANNUAL MEETING OF THE PROFESSIONAL RESEARCH SCIENTISTS ON EXPERIMENTAL BIOLOGY; NEW ORLEANS, LOUISIANA, USA; APRIL 20-24, 2002	1,5,19, 21
A	RUHL M ET AL: "EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 5A IS A CELLULAR TARGET OF THE HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 REV ACTIVATION DOMAIN MEDIATING TRANS-ACTIVATION" JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 123, no. 6, 1 December 1993 (1993-12-01), pages 1309-1320, XP000571505 ISSN: 0021-9525	
A	CARAGLIA M ET AL: "The role of eukaryotic initiation factor 5A in the control of cell proliferation and apoptosis" AMINO ACIDS (VIENNA), vol. 20, no. 2, 2001, pages 91-104, XP002291822 ISSN: 0939-4451	
P,X	US 2003/225022 A1 (HEIKKILA ELIZABETH MARGARET ET AL) 4 December 2003 (2003-12-04) cited in the application paragraph '0118! - paragraph '0123! paragraph '0136! - paragraph '0147! paragraph '0275! - paragraph '0280! paragraph '0286!	1-4,6,7, 10,16, 17,26, 27,31, 32,35,36
P,X	WO 03/095613 A (SENECO TECHNOLOGIES INC) 20 November 2003 (2003-11-20) cited in the application page 9, line 18 - line 23 page 22 - page 24 page 27	12,13, 16,17, 31,32, 35,36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2004/006598

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☒ in written format
- ☒ in computer readable form
- c. time of filing/furnishing
- ☐ contained in the international application as filed
- ☐ filed together with the international application in computer readable form
- ☒ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/006598

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 1-9,12-36 encompass methods of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
JP 2004/006598

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03010286	A	06-02-2003	US 2003064952 A1	03-04-2003
			CA 2454822 A1	06-02-2003
			WO 03010286 A2	06-02-2003
			US 2003016710 A1	23-01-2003
			US 2003050272 A1	13-03-2003
			US 2003144238 A1	31-07-2003
			US 2003225022 A1	04-12-2003
			WO 03095613 A2	20-11-2003
US 2003225022	A1	04-12-2003	US 2003144238 A1	31-07-2003
			US 2003050272 A1	13-03-2003
			US 2003064952 A1	03-04-2003
			WO 2004037984 A2	06-05-2004
			WO 03095613 A2	20-11-2003
			CA 2454822 A1	06-02-2003
			WO 03010286 A2	06-02-2003
			US 2003016710 A1	23-01-2003
WO 03095613	A	20-11-2003	US 2003064952 A1	03-04-2003
			US 2003050272 A1	13-03-2003
			CA 2454822 A1	06-02-2003
			WO 03010286 A2	06-02-2003
			WO 03095613 A2	20-11-2003
			US 2003016710 A1	23-01-2003
			US 2003144238 A1	31-07-2003
			US 2003225022 A1	04-12-2003

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 1
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 17/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
	A 6 1 P 17/06	
	A 6 1 P 17/04	

(31)優先権主張番号 60/504,731

(32)優先日 平成15年9月22日(2003.9.22)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/528,249

(32)優先日 平成15年12月10日(2003.12.10)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, 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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 トンプソン, ジョン イー.

カナダ国, オンタリオ エヌ2ケー 4エヌ1, ワーテルロー, ユニバーシティ アベニュー イースト 901

(72)発明者 テイラー, キャサリン

カナダ国, オンタリオ エヌ2ケー 3エヌ1, ワーテルロー, フォックスハント ロード 122

(72)発明者 クリシュ, ドミニク

カナダ国, オンタリオ エヌ2エー 2ジー4, キッチナー, オールド チコピー ドライブ 5

2 - 7 5

(72)発明者 ヘイッキラ, エリザベス マーガレット

カナダ国, オンタリオ エヌ２エル ３ジー １, ワーテルロー, サンド ウッド プレイス ２ ２
４

(72)発明者 センカイナ, ダイアナ ミッシェル

アメリカ合衆国, テキサス ７ ６ １ ３ ２, フォート ワース, ゴールデン ゲート ドライブ ７
０ ３ ３

(72)発明者 フラナガン, ジョーン ジェラルド

カナダ国, オンタリオ エヌ２ティー ２ ４ エヌ, ワーテルロー, チャンセリー レーン ５ ４ ６

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 CA01 CA11 EA10 GA11 HA17

4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA44

4C084 AA13 MA01 NA14 ZA012 ZA312 ZA332 ZA362 ZA402 ZA512 ZA592

ZA662 ZA672 ZA812 ZA892 ZA962 ZB072 ZB112 ZB132 ZB152 ZB212

ZB262 ZC352

4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA31

ZA33 ZA36 ZA40 ZA51 ZA59 ZA66 ZA67 ZA81 ZA89 ZA96

ZB07 ZB11 ZB13 ZB15 ZB21 ZB26 ZC35