

(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.C1.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 5/06 (2006.01)	C 12 N 5/00 Z NAE	4 B 02 4
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00 A	4 B 06 5
A 61 K 31/7088 (2006.01)	A 61 K 31/7088	4 C 08 4
A 61 K 48/00 (2006.01)	A 61 K 48/00	4 C 08 6
A 61 P 19/02 (2006.01)	A 61 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 ブランズウィック, スイート 420, ジョージ ストリート 303
(86) 國際出願番号	PCT/US2004/006598	
(87) 國際公開番号	W02004/078940	
(87) 國際公開日	平成16年9月16日 (2004.9.16)	
(31) 優先権主張番号	60/451,677	(74) 代理人 100099759
(32) 優先日	平成15年3月5日 (2003.3.5)	弁理士 青木 篤
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人 100077517
(31) 優先権主張番号	10/383,614	弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成15年3月10日 (2003.3.10)	(74) 代理人 100087871
(33) 優先権主張国	米国 (US)	弁理士 福本 橋
(31) 優先権主張番号	60/476,194	(74) 代理人 100087413
(32) 優先日	平成15年6月6日 (2003.6.6)	弁理士 古賀 哲次
(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、IL-1、IL-18、IL-6、又はTNF- である、請求項 2 10
に記載の方法。

【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 siRNA 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 siRNA 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 siRNA 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 siRNA 。

【請求項 12】

p53 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、p53 の発現を低減する、前記方法。

【請求項 13】

Bc1-2 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、p53 の発現を増加する、前記方法。40

【請求項 14】

TNF-アルファのレベルの低減を必要とする患者において、TNF-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】

TNF-アルファのレベルの低減を必要とする患者において、TNF-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 siRNA 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 5a1 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、リュー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、IBD、潰瘍性大腸炎、冠動脈心疾患、囊胞性線維症、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 5A1 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 5A1 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 5a1 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。

20

【請求項 21】

前記薬剤が、アポトーシス因子 5a1 に相補的な配列を有する siRNA を含む、請求項 19 に記載の方法。

【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 siRNA 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 siRNA 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 eIF5A1 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 eIF5A1 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 eIF5A1 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、及びデオキシハイブリシン・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日に出願された継続中の米国出願第10/383,614号であり、2002年10月23日に出願された継続中の米国出願第10/277,969号であり、2002年7月23日に出願された米国出願第10/200,148号であり、2002年5月7日に出願された米国出願第10/141,647号であり、2001年7月23日に出願された米国出願第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日に出願された米国仮出願60/451,677号；2003年6月6日に出願された米国仮出願第60/476,194号、2003年9月22日に出願された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) Int. 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、明確に特徴づけされているが、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。

【0004】

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)。

【0005】

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)。

【0006】

アポトーシスに関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)。

【0007】

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す(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ーゼのタンパク質分解活性の程度からも推察されうる。

10

20

30

40

50

【 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) *Irrit. Rev. Cytol.*, 68, 251-306 ; Thompson (1995) *Science*, 267, 1456-1462 ; Sen & D'Incalci (1992) *FEBS Letters*, 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し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がもたらされうる(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 mRNA 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 mRNA 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。

【 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、そして代わり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。

【 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 mRNA 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; Badié et al. 1998))。

【 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 mRNA 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 mRNA 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 mRNA が、転写されていなければならない。これらの mRNA 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しうる。

【 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 (IOP) が

10

20

30

40

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產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。

【0019】

自己免疫疾患(乾癬、リューマチ様関節炎、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(Dinarello 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、例えばリュー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)。

【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- γ (IFN- γ)、TNF- α 、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- α の產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(Dinarello 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- γ 、TNF- α 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マodel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产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、慢性肝臓疾患を患有患者において上昇し、そして増大したレベルは、疾患の重篤度と相關した(Ludwiczek et al., 2002)。同様にIL-18及びTNF- α は、腎障害を患有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)。

【0022】

サイトカインのTNFファミリーのメンバーであるTNF- α 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

10

20

30

40

50

効果を有する炎症促進性サイトカインである。TNF- α 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- α 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ューマチ様関節炎)、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- α をブロックする有利な効果を示した(Wallach et al., 1999)。TNF- α の抑制は、クローン病(van Deventer, 1999)及びリュウマチ様関節炎(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- α 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- α のレベルは、腫瘍の質量及び疾患ステージと正に相關した(Bojarska-Junak et al., 2002)。インターロイキン1-(IL-1 β)は、TNF- α 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

20

【0023】

デオキシハイプシン・シンターゼ(DHS)及びハイプシンを含む真核生物翻訳開始因子-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プシンは、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ているが、真性細菌では見つかっておらず、そしてeIF-5Aは、唯一知られているハイプ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、デオキシハイプシン・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-N-アミノ基に、スペルミジンの4-N-アミノブチル成分を移すことにより、デオキシハイプシン残基を形成することである。第二ステップは、デオキシハイプシン・ヒドロキシラーゼにより4-N-アミノブチル成分を水酸化して、ハイプシンを形成することを含む。

30

40

【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におけるハイプ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ということを示唆する(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のハイプシン残基は、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。

50

50

【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らす

らし、eIF-5Aが、核から細胞質へのmRNAの特異的クラスを輸送することに関与しう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eIF-5A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、eIF-5A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)。

【0026】

eIF-5Aについての第一cDNA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eIF-5AのcDNA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)。

【0027】

eIF-5A・mRNA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、eIF-5A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)。デオキシハイドロシン・シンターゼ活性が年齢依存的に減少すること、及びeIF-5A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 Physio., 170, 248-254)。

【0028】

研究により、eIF-5A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Revタンパク質、及びT細胞白血病ウイルス1型 Rex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、eIF-5Aが、他のRNA-結合タンパク質、例えばRevと相互作用することにより、RNA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eIF-5AをウイルスRNA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)。

【0029】

こうして、eIF-5A及びDHS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】

【0030】

発明の要約

本発明は、アポトーシス因子5A1又は単純に5A1と呼ばれる、アポトーシス特異的真核生物開始因子5A(eIF-5A)に関する。本発明はまた、アポトーシス因子5A1核酸及びポリペプチド、並びにアンチセンス・スクレオチド又はsiRNAを使用して因子5A1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5A1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5A1の発現を抑制することによって、p53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 5A1 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 5a (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ーベンクに存在する。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 5A、又はアポトーシス特異的 eIF-5A、又は因子 5A1、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 の活性化に関与する DHS である。

【0032】

20

アポトーシス因子 5A 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 5A は、アポトーシス経路に関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 5A 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 5A 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 5A 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 5A 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】

40

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してきた。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变骨格 (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)。

【0035】

好みしくは、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 5A 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5A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54-58は、アンチセンス・アポトーシス因子5A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5A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、アポトーシスを起している細胞の割合(%)の低下を示した。

【0036】

本発明は、アポトーシス因子5Aポリペプチド又はDHS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5A核酸配列)、配列番号6及び8(アポトーシス特異的DHS核酸配列)、配列番号12及び16(アポトーシス因子5A配列)、及び配列番号7(アポトーシス特異的DHS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5A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られた。

【0037】

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DNA、RNA、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DNA-RNA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。

【0038】

本発明は、アポトーシス因子5A又はDHS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、siRNAである。低分子抑制RNA(siRNA)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RNA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してきた。ダイサーと呼ばれるRNase-IIIファミリーの酵素は、これらの長い二本鎖RNAを21~23ヌクレオチドの低分子干渉RNAへとプロセッシングし、該低分子干渉RNAは、次にRISC誘導サイレンシング複合体(RISC)中に組み入れられる。siRNAがほどかれると、RISCを活性化し、そして一本鎖siRNAが、塩基対形成により内在性のmRNAへと複合体形成することを導く。RISCにより内在性mRNAが認識されることにより、内在性mRNAは切断され、そして結果として、翻訳に利用できないものとてしまう。長い二本鎖RNA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siRNAを使用することによりバイパスされ得る(Elbashir et al., 2001)。siRNAは、細胞培養物において広く使用され、そして通常、90%以上の特異的遺伝子発現の減少を達成する。

【0039】

siRNA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しまっている。最近の研究により、ルシフェラーゼに対するsiRNA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 F a s 、 T N F ファミリーの受容体に対する s i R N A 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 F a s 発現を 90 % 減少させることができた (Song et al., 2003) 。 F a s の s i R N A 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。致死量のリポ多糖で処置されたマウスにおける敗血症の発達は、 T N F (Sorensen et al., 2003) に対する s i R N A の使用により抑制された。 s i R N A 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 5 A の s i R N A でトランスフェクションし、そしてアポトーシス因子 5 A 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 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 タンパク質を産生するということを示す。図 64 ~ 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ていない細胞に比較して、アンプトテシン及び T N F - 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ことを示す。

20

【 0041 】

好みしい s i R N A は、配列番号 *1 、 *2 、 *3 、 *4 、及び *5 を有する s i R N A を含む。更なる s i R N A 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 s i R N A 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 s i R N A を含む。

30

【 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・ゲーリング病) 、自己免疫疾患 (例えば、リューマチ様関節炎、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してきた。

40

【 0044 】

緑内障研究の分野における初期の研究により、 I O P 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 e. al., (1995) Exp. Eye Res., 61, 33-44 ; Quigley et al., (1995) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 36, 774-786 ; Monard, (1998) In : Haefliger IO, Flammer J (eds) Nitric Oxide and Endothelin in the Pathogenesis of Glaucoma 50

uconia, New York, NY, Lippincott-Raven, 213-220)。増大したIOP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、腫瘍壞死因子- α (TNF- α)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- α 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- α 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ってきた(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してきた。一時的な網膜全体の虚血のモデルにおいて、カスパー α 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 α 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、視神経のトランスクレーションを起した(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

10

20

30

40

50

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 eIF5A1 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 eIF5A1 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 eIF5A1 は、アポトーシス・プロセスの全体を制御していると思われ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 eIF5A1 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 eIF5A1 の発現抑制は、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又は siRNA 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 eIF5A1 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 eIF5A1 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 eIF5A1 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。好みのアンチセンス・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 eIF5A1 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 eIF5A1 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、eIF5A 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 5A レベルが、2 種のサイトカイン(インターロイキン 1 - “IL-” 及びインターロイキン 18 “IL-18”)レベルの上昇と相關することを発見し、そしてさらに、アポトーシス因子 5A が虚血心臓組織に存在することから、アポトーシス因子 5A 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 5A / インターロイキンの相關は、非虚血心臓組織においては見られなかった。図 50A-F、及び 51 を参照のこと。PCR 計測を使用して、アポトーシス因子 5A、増殖 eIF-5a (eIF5A2 - もう一方の既知のアイソフォーム、又は幾つかの図で eIF5b として記載される)、IL-1 、及び IL-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 eIF-5a を強力なインターロイキンへと相關することによって、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 5A 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 5A 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 (PBMC) が、通常かなり低いレベルの eIF5

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、eIF5A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5A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5AがサイトカインmRNA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、eIF-5A・mRNA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))。eIF-5A・mRNA発現は、T細胞活性化も誘導する種々の刺激により、PBM Cにおいて誘導された(Bevec et al., 1994)。HIV-1患者において、健康なドナーと比較して高いレベルのPBM C・eIF-5A・mRNA発現が観測された。この研究の著者は、eIF-5A mRNAが誘導され、その結果、eIF-5AがT細胞活性化及びHIV-1複製に必要である重要なmRNA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)。eIF5Aは、HIV・Rev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HIV複製に必要とされることが示された(Ruhl et al. 10 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mRNA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eIF5A1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。IL-1に応答して、HepG2細胞は、投与量依存的な様式でTNF- のmRNA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、HepG2細胞は、TNF- 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。HepG2細胞におけるeIF5A1発現の抑制は、アポトーシス因子5Aに対するアンチセンス・ス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TNF 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5A1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5A1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IL-1、IL-18、IL-6、及びTNF- を含む。

【0057】

アポトーシス因子5Aの発現を低下できる薬剤は、アポトーシス因子5Aに相補的な配列を有するアンチセンス・スクレオチドであってよい。好ましくは、アンチセンス・スクレオチドは、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・スクレオチドである。

【0058】

薬剤は、アポトーシス因子5Aに相補的な配列を有するsiRNAを含んでも良い。好ましくは、siRNA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siRNAである。図65～67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、アンプトテシン及びTNF- 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DHSスクレオチドを含んでも良い。

10

20

30

40

50

【0059】

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。

【0060】

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。

【0061】

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。

10

【0062】

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。

20

【0063】

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、こ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。

30

【0064】

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有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。

40

【0065】

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。

【0066】

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(ibd)、潰瘍性大腸炎、冠血管心疾患、囊胞性線維症、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

50

絶、乾癬及び湿疹を含む。

【 0 0 6 7 】

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、ハイブリジングの阻害剤(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、そしてハイブリジング及びそうして 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

【 0 0 6 8 】

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 100 % 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・チーノ反応により 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 100 % の相同性を有した。

20

30

【 0 0 6 9 】

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關し、該制御は次に T 細胞性免疫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 -

40

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))。

【 0 0 7 0 】

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 - 分泌の間上方制御があるので、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。

【0071】

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、異なる種間で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。こうした特徴は、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。

【0072】

さらに、2個のヌクレオチド配列が、その間で少なくとも70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは約90%以上、及び最も好ましくは約95%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50%、好ましくは少なくとも70%、さらにより好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%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。

【0073】

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30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%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。

【0074】

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 Heijne, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991)。

【0075】

10

20

30

40

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。こうした検索は、Altschul, et al. (1990) J Mol Biol. 215: 403-10のNBLAST及びXBLASTプログラム(バージョン2.0)を使用して行われる。BLASTヌクレオチド検索は、NBLASTプログラムで行われる。BLASTタンパク質検索は、XBLAST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BLASTが使用される。BLAST及びギャップBLAST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XBLAST及びNBLAST)のデフォルトのプログラムが使用されうる。

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一部を保持し、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5Aポリペプチドの「機能的な誘導体」は、アポトーシス因子5Aの断片、バリアント、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5Aの活性又はアポトーシス因子5A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5A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】

機能的なバリアントは、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か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】

「バリアント」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アントを指す。「ホモログ」は、異なる動物属又は種由來の断片又はバリアント配列を指す。「アナログ」は、分子全体、バリアント、又はこ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。

40

【0079】

バリアント・ペプチドは、天然バリアント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。こうしたバリアントは、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、こうしたバリアントは、本発明のeIF5A又はDHSタンパク質に対する配列及び/又は構造ホモジーに基いて、他のタンパク質から容易に区別されうる。存在するホモジー/同一性の程度は、そのタンパク質が機能的バリアントであるか又は非機能的バリアントであるか、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。

【0080】

本発明のeIF-5A又はDHSの非天然バリアントが、組換え技術を使用して容易に作成され得る。こうしたバリアントは、非限定的にタンパク質のアミノ酸配列中の欠失、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。こうした置換は、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

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 erとT hrとの交換；酸性残基A spとG luの交換；アミド残基A snとG lnとの間の置換；塩基性残基L ysとA rgの交換；及び芳香族残基P heとT yr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みしい。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、 $6 \times S.S.C$ 、0.01M・EDTA、1×デンhardt溶液及び0.5% SDSを含む。ハイブリダイゼーションは、クローン化されたDNAの断片について、約68で3～4時間、真核生物の全DNA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(Tm)以下である約42まで減らされる。Tm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、DNA又はRNA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よく、例えば、20～30%大きいか又は小さく、好ましくは12～15%以下の範囲で大きいか又は小さいことが理解される。30

【0084】

さらに、ポリペプチドの機能的なバリアントは、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-スキヤン突然変異誘導法(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單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5A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5A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】

こうした組成物は、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、サチエット、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、サチエット、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。こうした方法は、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】

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_α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。500ngのDNAを、0.2μCi [³²P]dCTP、1mMトリス、0.5mM・EDTA、3ユニットのクレノーゼ素、及び0.2pMづつのdTTP、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1mlのSepadex G50カラム40

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度で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、卵巢は、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DHSのcDNAの3'非翻訳領域でプローブされたノーザン・プ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。

【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も明らかである。

【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、卵巢を取り出し、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スペルミジンで1時間インキュベーションし、そしてスペ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スペルミジンで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スペルミジンで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、クレノーゼ素を使用して[-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。

【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/100体重gのスペ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；スペルミジンを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分で卵巢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、クレノーゼ素を使用して[-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、スペルミジンで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

10

20

30

40

50

後 1 時間 3 5 分で屠殺した) ; レーン 4、スペルミジンの 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、スペルミジンの 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、スペルミジンの 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、スペルミジンの 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、30 ml 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 mM · NaOAc、pH 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 10000 g で 30 分間遠心した。上清を次に、11200 g で 20 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 75% エタノールで洗浄し、600 ml の D E P C 処理水中に再懸濁し、そして R N A を -70 にて 1.5 ml の 95% エタノール及び 60 ml の 3 M · NaOAc で沈殿させた。

【 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。500 ng の D N A を 0.2 μ Ci [-³²P] d C T P、1 mM トリス、0.5 mM · E D T A、3 ユニットのクレノーゼ素、及び 0.2 pM づつの d A T P、d G T P、及び d T T P と、室温で 30 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 ml セファデックス G - 50 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 30 分間乾燥し、そして X 線フィルムに -80 で 24 時間露光した。

【 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。

【 0 0 9 8 】

ラット黄体 R N A のノーザン・プロット・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 20 mg の全 R N A を、1% 变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 ³²P - 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、膜をプロープした (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 ³²P - 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プした (7×10^7 c p m)。膜を 1 × S S C、0.1% S D S で室温で 1 回、そして 0.2 × S S C、0.1% S D S で 65 にて 3 回洗浄した。膜を乾燥し、そして -70 で一晩 X 線フィルムに露光した。

【 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

10

20

30

40

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 時間以内にかなり増加し、処理後 8 時間内でさらに増加し、そして処理後 24 時間以内で少し増加した(図 14)。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 時間内でさらに増加し、そして処理後 24 時間以内でさらに少し増加した(図 15)。

【 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

[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 bp 断片が存在することがわかった。該 900 bp の断片を、平滑末端ライゲーションを使用して、pBlue vector script (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 11)。3' 末端の cDNA 配列は、配列番号 11 であり、そして 3' 末端のアミノ酸配列は配列番号 12 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 eIF-5A 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 eIF-5A 配列(配列番号 15)を、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' CAGGGTCTAGAGTTGGAAATCGAACGC 3' (配列番号 13) を有する 24mer であり、該配列は、ヒト eIF-5A 配列から設計された。3' プライマーは、以下の配列：5' ATATCTCGAGCCTTGATTGCAACAGCTGCC 3' (配列番号 14) を有する 30mer であり、該配列は、3' 末端 RT-PCR 断片に従って設計された。リバース・トランスクリプターゼ・ポリメラーゼ・チエーン・リアクション(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 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 R T - P C R 産物の分離は、5 0 0 b p の断片を明らかにし、上流及び下流に存在する Xba I 及び Xho I クローニング・サイトを使用して、該断片を 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 15)。5' 末端の cDNA 配列は、配列番号 15 であり、そして 5' 末端のアミノ酸配列は配列番号 16 である。図 2 を参照のこと。

[0 1 0 4]

ラット・アボトーシス特異的 e I F - 5 A の 3' 末端及び 5' 末端の配列(配列番号 11 と配列番号 15 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。

【 0 1 0 5 】

ヒトDHS配列に基づ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

【 0 1 0 6 】

R T - P C R の産物をアガロース・ゲル上で分離することにより、606 bp 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 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 6)。R T - P C R により得られるラット・アポトーシス特異的黄体 D H S 遺伝子の部分長 c D N A 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。

[0 1 0 7]

ゲノムDNAの単離及びサンプル分析

サザンプロットティング用のゲノムDNAを、切除したラット卵巢から単離した。約100mgの卵巢組織を、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 Manheim; 10mg/ml)を加えた。組織を45℃の振盪水浴中に一晩配置した。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4×13000×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℃で一晩回転させること

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

【0108】

サザンプロット分析では、ラット卵巣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 μg のゲノムDNA、20 μl の10×反応緩衝液、及び100 U の制限酵素を総反応量200 μl 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 中で脱ブリン化し、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×SSC、5×デンハート溶液(1×デンハート溶液は、0.2%フィコール、0.02%PVPA、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[⁻³²P]-dCTPでランダム・プライミングすることにより標識し、そして1×10⁶ cpm/m1で膜に加えた。
10

【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、[⁻³²P]-dCTPでランダム・プライム標識し、そして1×10⁶ cpm/m1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×SSC 及び0.1% SDSで42°にて2回洗浄し、そして1×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。
20

【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³²P-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、サザンプ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eIF5A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においてかなりの程度、保存することが予期される。
30
40

【0111】

図21は、³²P-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tronを含むということが示唆される。
。

【0112】

実施例2

本実施例は、アポトーシス因子5A及びDHSでのアポトーシスの調節を示す。

COS-7細胞の培養及びRNAの単離

COS-7、つまり野生型T抗原をコードするSV40の突然変異体で形質転換されたアフリカミドリザル腎臓線維芽細胞様細胞系列をトランスフェクションに基く全ての実験に使用した。COS-7細胞を、1リットルあたり0.584gのL-グルタミン、1リットルあたり4.5gのグルコース、及び0.37%重炭酸ナトリウムを伴うダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中で培養した。該培養培地に10%ウシ胎児血清(FBS)及び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成長させた。細胞を3~4日毎に、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継代した。引き剥がされた細胞を、新鮮な培地が入った新たな培養ディッシュ中に1:10の分割比で分配した。

10

【0113】

RNAの単離に使用されるCOS-7細胞を、150mm組織培養処理されたディッシュ(Corning)中で成長させた。細胞を、トリプシンEDTAの溶液で引き剥がすことにより回収した。引き剥がされた細胞を、遠心チューブ中に回収し、そして細胞を3000rpmで5分間遠心することによりペレット化した。上清を取り除き、そして細胞ペレットを、液体窒素中で急冷凍した。RNAを冷凍細胞から、製品説明書に従ってジーン・エリュート哺乳動物トータルRNAミニプレップ・キット(GenElute・Mammalian Total RNA・Miniprep・Kit)(Sigma)を使用して単離した。

20

【0114】

組換えプラスミドの構築及びCOS-7細胞のトランスフェクション

ラット・アポトーシスeIF-5Aの全長コード配列をセンスの向きに含み、かつラット・アポトーシスeIF-5Aの3'非翻訳領域(UTR)をアンチセンスの向きに含む組換えプラスミドを、哺乳動物エピトープ・タグ発現ベクター、pHM6(Roche Molecular Biochemicals)を使用して構築され、該プラスミドは、図21に例示される。該ベクターは、以下の:CMVプロモーター-ヒト・サイトメガロウイルス前初期プロモーター/エンハンサー; HA-インフルエンザ・ヘマグルチニン由来のノナペプチド・エピトープ・タグ; BGHPA-ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル; f1ori-F1開始点; SV40ori-SV40初期プロモーター及び開始点; ネオマイシン-ネオマイシン耐性(G418)遺伝子; SV40pA-SV40ポリアデニル化シグナル; ColE1-ColE1開始点; アンピシリン-アンピシリン耐性遺伝子を含む。ラット・アポトーシスeIF-5A及びラット・アポトーシスeIF-5Aの3'UTRの全長コード配列は、pB1uescript中のオリジナルのラットeIF-5A・RT-PCR断片(配列番号1)からPCRにより増幅された。全長eIF-5Aを増幅するために、使用されるプライマーは、以下の:フォワード5'GCCAAGCTTAATGGCAGATGATTGG3'(Hind3)とリバース5'CTGAAATTCCAGTTATTTGCCATGG3'(EcoR1)である。ラットeIF-5Aの3'UTRを増殖させるために、使用されるプライマーは、以下の:フォワード5'AATGAATTCCGCCATGACAGAGGAGGCC3'(EcoR1)とリバース5'GCGAAGCTTCCATGGCTCGAGTTTTTTTTTTTTTT3'(Hind3)である。

30

【0115】

アガロース・ゲル電気泳動後に単離された全長ラット・eIF-5A・PCR産物は、430bpの長さであり、一方3'UTRラットeIF-5A・PCR産物は697bpの長さであった。PCR産物の両者は、pHM6のHind3及びEcoR1サイトにサブクローニングされて、pHM6-全長eIF-5A及びpHM6-アンチセンス3'UTReIF5Aを作った。全長ラットeIF-5A・PCR産物を、抗-[HA]-ペルオキシダーゼ抗体を使用して組換えタンパク質の検出を許容するように、多重クローニング部位の上流のインフルエンザ・ヘマグルチニン(HA)由来のノナペプチド・エピトープタグとフレーム内にサブクローニングした。発現は、ヒト・サイトメガロウイルス前初期プロモーター/エンハンサーにより行われて、哺乳動物細胞系列において高い発現レベルを保証する

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、S V 4 0 巨大T抗原を発現する細胞、例えばC O S - 7 内でエピソーム複製を許容するS V 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C O S - 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 % F B Sを加えたが、ペニシリン/ストレプトマイシンを欠いたD M E M 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D N Aを4 2 . 5 μ l の無血清D M E M 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D N A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D M E M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。

【0 1 1 7】

インキュベーション後、0 . 1 7 m l のD M E M+2 0 % F B Sを細胞に加えた。ウエスタン・プ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D N A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。

【0 1 1 8】

タンパク質抽出及びウエスタン・プロッティング

細胞をP B S(8 g / L · N a C l、0 . 2 g / L · K C l、1 . 4 4 g / L · N a₂H P O₄、及び0 . 2 4 g / L · K H₂P O₄)中で2 回洗浄し、次に1 5 0 μ l の熱S D S ゲル添加液(5 0 m MトリスH C l · p H 6 . 8、1 0 0 m Mジチオスレイトール、2 % S D S、0 . 1 % プロモフェノール・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・プ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 で1 0 分間熱し、そして次に1 3 0 0 0 × 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 で使用するまで貯蔵した。

【0 1 1 9】

ウエスタン・プロッティング用に、2 . 5 又は5 μ g の全タンパク質を、1 2 % S D S - 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、プロッキング溶液(5 %スキムミルク粉末、0 . 0 2 % アジ化ナトリウムを含むP B S)中でインキュベーションし、そしてP B S - T(P B S + 0 . 0 5 % T w e e n - 2 0)で1 5 分間3 回洗浄した。膜を一晩P B S - T 中で、4 で保存した。次の日に室温まで温め、膜を3 0 秒間1 μ g / m l のポリビニル・アルコール中でプロッキングした。膜を脱イオン水で5 回洗浄し、そしてP B S 中の5 %ミルクの溶液中で3 0 分間プロッキングした。一次抗体をP B S 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 分間ブレインキュベーションした。

【0 1 2 0】

幾つかの一次抗体を使用した。抗-[H A]-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、そしてプロットを洗浄し、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(A b - 6)、B c 1 - 2 を認識するもの(A b - 1)、及びc - M y c を認識するもの(A b - 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 / m l の希釈度で使用し、そしてB c 1 - 2 及びc - M y c に対するモノクローナル抗体は、0 . 8 3 μ g / m l 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P B S - T 中で1 5 分間3 回洗浄し

10

20

30

40

50

た。二次抗体を1%ミルクを含むP B S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。p 5 3 (A b - 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I g G (Rockland)であり、1：1000の希釈度であった。B c l - 2 (A b - 1)及びc - M y c (A b - 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I g G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P B S - 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、p 5 3 (A b - 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、0.33 m g /m lニトロ・ブルー・テトラゾリウム、0.165 m g /m l 5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル・ホスフェート、100 mM · N a C l、5 mM · M g C l₂、及び100 mM · トリス - H C l (p H 9.5)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2 mM · E D T Aを含むP B S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-[H A] - ペルオキシダーゼ、B c l - 2 (A b - 1)、及びc - M y c (A b - 2)を含む他の一次抗体全てについて使用された。E C L プラス · ウエスタン · ブロッティング検出キット(ECL Plus Western blotting detection kit)(Amersham Pharmacia Biotech)を使用して、ペル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】

C O S 7 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C O S - 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 s p (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D M E Mと置換した。10%F B Sを加えた抗生物質を伴わないD M E M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%F B S及びメタノール中に溶解した1 μ g /m lアクチノマイシンDを加えた抗生物質を含まないD M E Mと置換された。コントロール細胞を、10%F B S及び等量のメタノールを加えた抗生物質を含まないD M E M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 - C y - 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プ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C O S - 7 の細胞の核を標識した。3：1の無水メタノール及び冰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C O S - 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1 m lの固定液を細胞に加えた。5分後、固定液をすて、そして1 m l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、1 m lのマックルバイン(McIlvane's)緩衝液(0.021 Mクエン酸、0.058 M · N a₂H P O₄ 7 H₂O；p H 5.6)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

10

20

30

40

50

ベクターシールド(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-Cy3染色

アネキシンV-Cy3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で二回洗浄し、そして1×結合緩衝液で3回洗浄した。150μlの染色溶液(1×結合緩衝液中の1μg/ml Annexin Cy3)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。チャンバ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。

10

【0125】

実施例3

本実施例は、アポトーシス因子5A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。

30

【0126】

図22は、pHM6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プロットである。偽トランスフェクション、或いはpHM6-LacZ、pHM6-アンチセンス3'rif5A(pHM6-アンチセンス3'UTRアポトーシスeIF-5A)、又はpHM6-センスrif5A(pHM6-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5μgのタンパク質をSDS-PAGEにより分画し、PVDF膜に転写し、そして抗-[HA]-ペルオキシダーゼでウエスタンプロットした。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、明らかに見ることができる。

30

【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pHM6-センスrif5A(pHM6-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。

40

【0128】

更なるCOS-7細胞を、偽トランスフェクションし、或いはpHM6-センスrif5

50

A (pHM6-全長ラットeIF-5A)でトランスフェクションした。トランスフェクション後40時間で、細胞を血清を含む通常培地中でさらに48時間成長させるか、48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48時間0.5μg/ml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33258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-Cy3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。

【0129】

図25は、COS-7細胞が全長ラット・アポトーシス誘導性eIF-5Aをセンスの向きで含むpHM6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eIF-5Aの発現は、カスパーゼ活性の60%増加をもたらす。

【0130】

図26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たとき、増大されたDNA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eIF-5Aの発現は、DNA断片の273%の増加をもたらした。図27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eIF-5A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28は、COS-7細胞が、全長ラット・アポトーシス誘導性eIF-5Aをセンスの向きで含むpHM6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eIF-5A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27%及び63%増加した。

【0131】

図29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30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、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eIF-5A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140%及び198%の増加をもたらした。

【0132】

図31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eIF-5A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115%及び62%の核断片の増加をもたらした。図32は、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COS-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。

【0133】

実施例4

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

COS-7細胞は、偽トランスフェクションされるか、pHM6-LacZ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eIF-5A)

10

20

30

40

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Bc1-2を認識するモノクローナル抗体でウエスタン・プロットした。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Bc1-2より少ないBc1-2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、Bc1-2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Bc1-2を認識するモノクローナル抗体でウエスタンプロットした。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。

【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・プロットした。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。

【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プした。対応するタンパク質のプロットを、抗[HA]-ペルオキシダーゼでプロープして、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。

【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、Bc1-2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。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Bc1-2に比較して、より少ないBc1-2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。

【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Bc1-2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。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Bc1-2に比較して、より多くのBc1-2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】

10

20

30

40

50

図35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、c-Myc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。pHM6-LacZ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-Mycと比較して、より多くのc-Mycが、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。

【0140】

図36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、p53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。pHM6-LacZ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p53と比較して、より多くのp53が、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。

【0141】

図37は、COS-7細胞において、pHM6-全長ラット・アポトーシス-誘導性eIF-5Aの発現の際、P53上方制御の依存性を表す。抗-[HA]-ペルオキシダーゼでプローブされたウエスタン・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eIF-5Aが第一トランスフェクションにおいて検出できる。抗-p53でプ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、p53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、pHM6-LacZ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-Mycと比較して、より多くのp53が、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。ラット・アポトーシス-誘導性eIF-5Aの発現が少ない第二のトランスフェクションでは、pHM6-センスrF5A、pHM6-LacZ、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p53レベルの検出可能な差異はない。

【0142】

実施例5

図47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49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eIF-5A(eIF-5a)及び増殖eIF-5A(eIF5b)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46を参照のこと。虚血前心臓組織において、eIF-5a及び5eIF5b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、92.5%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、通常の酸素レベルに晒し、そしてアポトーシス特異的eIF-5A(eIF-5a)及び増殖eIF-5A(eIF5b)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eIF-5a及び増殖eIF-5A(eIF5b)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eIF-5Aレベルの発現レベルは有意に増加したが、一方増殖eIF-5A(eIF5b)の発現レベルの増加は、著しく少なかった。図46を参照のこと。

【0143】

10

20

30

40

50

「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】

EKGの結果は、図48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、EKGは、筋肉細胞死のため活動性の低下を示す。EKG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

10

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)視神經乳頭を取り出し、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。視神經乳頭(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の小片にした。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產生した。特異的に、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フラスコ内で継代した。ここで、星状細胞を、FBSを含まないEBM完全培地(Clonetics)を含んだ25cm²フラスコ内で成長させた。FBSを、10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。

20

【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(BSA)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。DPBSで洗浄した後に、培養スライドのウェルを区切るチャンバーを、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22×60mmのカバーガラスを被せた。

30

【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 Prove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-A2B5(Chemicon International)、抗-NCAM、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(GFAP)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。細胞集合は、NCAM、グリア線維(GFAP)について陽性に染色され、かつガラクトセレブロシ、A2B5、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。

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。L C 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 L C 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 L C 細胞を含むことが分かっている。

【0149】

R K O 細胞培養

R K O (American Type Culture Collection CRL-2577)、野生型 p 53 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、e I F 5 A 1 タンパク質発現を抑制する能力について試験した。R K O 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 (M E M) 中で培養した。培養培地に 10 % ウシ胎児血清 (F B S)、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 % C O₂、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 % トリブシン及び 1 m M · E D T A 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。

【0150】

H e p G 2 細胞培養

ヒト e I F 5 A 1 に対するアンチセンス・オリゴが I L - 1 での処理に応答する T N F - の産生を抑制する能力を試験するために、H e p G 2、ヒト肝細胞癌細胞系列を使用した。H e p G 2 細胞を、ゲンタマイシン、グルタミン、及び 10 % F B S を加えた D M E M 中で培養し、そして 5 % C O₂ 及び 95 % 空気の加湿環境中で、37 ℃ にて成長させた。

【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、R K O 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 0.25 μg / m l で使用し、そしてカンプトテシンを 20、40、又は 50 μM 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 (50 μM) と T N F - (10 ng / m l) の組合せを使用して誘導された。カンプトテシンと T N F - の組合せは、単独のカンプトテシン又は T N F - 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。

【0152】

アンチセンス・オリゴヌクレオチド

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 e I F - 5 A 1 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' C C T G T C T C G A A G T C C A A G T C 3' であった。ヒト e I F 5 A 1 に対して標的された第二アンチセンスの配列 (# 2) は、5' G G A C C T T G G C G T G G C C G T G C 3' であった。ヒト e I F 5 A 1 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' C T C G T A C C T C C C C G C T C T C C 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' C G T A C C G G T A C G G T T C C A G G 3' であった。蛍光イソチオシアネート (F I T C)-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' G G A C C T T G G C G T G G C C G T G C X 3' を有し、ここで X は F I T C 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。

【0153】

10

20

30

40

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

eIF5A1タンパク質発現を阻害するeIF5A1アンチセンス・オリゴヌクレオチドの能力は、RKO細胞において試験された。RKO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%FBSを加えたが、ペニシリン/ストレプトマイシンを欠くMEM培地で、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。RKO細胞は、偽トランスフェクションされるか、又は100nM又は200nM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、1.10
2.5、又は2.5μlのアンチセンス・オリゴヌクレオチドの20μMストックを、無血清MEMで42.5μl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。1.5μlのオリゴフェクタミンを、6μlの無血清MEM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、DNA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MEMで1回洗浄し、その後200μlのMEMを細胞に加え、そして50μl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、125μlのMEM+30%FBSを細胞に加えた。細胞を次にさらに48時間培養し、0.25μg/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エスタンプロット分析用に回収した。
20

【0154】

100及び200nM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、RKO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、1μM~10μM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。
20

【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、eIF5A1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FITCに結合されたFITC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。RKO及び篩骨篩板細胞を、8ウェル培養スライド上で、FITC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PBSで洗浄し、そして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、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UV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】

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冰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
40
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 μg / m l 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 · Na₂HPO₄ · 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。

【0157】

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(商標)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 · 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 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 / m l 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。

【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 eIF5A1 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・プロッティング

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 4

10

20

30

40

50

0 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・プロット分析用に回収した。細胞を搔き剥がし、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 度貯蔵した。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。

【0160】

ウエスタン・プロッティング用に、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。膜を一晩 PBS-T 中で 4 度にて貯蔵した。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。

【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-C R L P E G D L G K E I E Q K Y D -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 μg / 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 回洗浄した。

【0162】

ECL プラス・ウエスタン・プ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 度 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。

【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

10

20

30

40

50

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 1 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。これらの s i R N A を製品プロトコルに従って作成した。簡潔に記載すると、T 7 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 s i R N A 鎖をコードする DNA オリゴヌクレオチドを、T 7 R N A ・ポリメラーゼのテンプレートとして使用して、s i R N A 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 s i R N A 鎖をアニールし、D N a s e 及びR N a s e で処理し、そして次にカラム精製した。s i R N A 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 (T 7 プライマーがアニールする部位に下線を引いた)は：

【化1】

siRNA #1 アンセンス 5' AAAGGAATGACTTCCAGCTGACCTGTCTC 3' と
 siRNA #1 センス 5' AATCAGCTGGAAGTCATTCCTGTCTC 3';
 siRNA #2 アンセンス 5' AAGATCGTCGAGATGTCTACTCCTGTCTC 3' と
 siRNA #2 センス 5' AAAGTAGACATCTCGACGATCCCTGTCTC 3';
 siRNA #3 アンセンス 5' AAGGTCCATCTGGTTGGTATTCCTGTCTC 3' と
 siRNA #3 センス 5' AAAATACCAACCAGATGGACCCCTGTCTC 3';
 siRNA #4 アンセンス 5' AAGCTGGACTCCTCCTACACACCTGTCTC 3' と
 siRNA #4 センス 5' AATGTGTAGGAGGAGTCCAGCCCTGTCTC 3';
 siRNA #5 アンセンス 5' AAAGTCGACCTTCAGTAAGGACCTGTCTC 3' と
 siRNA #5 センス 5' AATCCTTACTGAAGGTCGACTCCTGTCTC 3'.

10

20

30

であった。

【0164】

s i R N A を R K O 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)s i R N A 標識キット-F A M (Ambion)を使用して、G A P D H の s i R N A を F A M 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 P S S で洗浄し、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)を加えた後、カバーガラスを被せた。F A M 標識 s i R N A の取り込みは、フルオレセイン・フィルターを使用して U V 光の下蛍光顕微鏡下で可視化された。G A P D H・s i R N A を製品プロトコルに従って標識した。

40

【0165】

s i R N A のトランスフェクション

R K O 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、s i R N A 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、R K O 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4 6 0 0 0 及び1 0 5 8 0 0 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7 5 0 0 ~ 1 0 0 0 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、2 5 . 5 p m o l の s i R N A ストックを、O p t i - M e m (S i g m a) 中に最終体積

50

21.2 μlまで希釈することにより調製した。0.425 μlのリポフェクタミン2000を終量21.2 μl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 μlの無血清培地を細胞に加え、そして42.4 μl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 μlの無血清培地+30%FBSを細胞に加えた。ウエスタン・プ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て、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・プ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。アポトーシスをプロックする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 μMのカンプトテシン(Sigma)及び10ng/mlのTNF-(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冰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1mlの固定液を細胞に加えた。5分後、固定液を捨て、そして1ml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1mlのヘキスト染色液(0.5 μg/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(0.021Mクエン酸、0.058M·Na₂HPO₄·7H₂O; 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

【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·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、洗浄と洗浄との間に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

40

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・トランスクレオチズ酵素(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

30

40

50

【0169】

タンパク質抽出及びウエスタン・プロッティング

トランスクレオチズされた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・プロット分析用に回収した。細胞を搔き剥がし、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℃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。

【0170】

ウエスタン・プロッティング用に、5 μgの全タンパク質を、12% SDS-PAGE上に分離した。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。膜を一晩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 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中でブレインキュベーションした。

【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c-IF5A1のc末端に相同性を有する合成ペプチド(アミノ-CRLPEGDLGKEIEQKYD-カルボキシ)に対するポリクローナル抗体であって、トリにおいて產生された抗体(Gallus Immunotech)を使用した。抗-β-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見た。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、c-IF5A1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・ウェスタン・プ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 [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 度 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 10HepG2 の TNF- 産生の定量

HepG2 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 eIF5A1 #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 (IL-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。TNF- 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 IL-1 を含まない) 及び IL-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 TNF- を、製品プロトコルに従って ELSA 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】

40

RKO 細胞を未トランسفエクションのままにするか、偽トランسفエクションするか、又は 200 nM のアンチセンスオリゴヌクレオチド、eIF5A1 #1、#2、又は #3 でトランسفエクションした。RKO 細胞を 100 nM のアンチセンスオリゴヌクレオチド eIF5A1 #2 でトランسفエクションした。トランسفエクション後 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、SDS-PAGE ゲル上で分離し、PVDF 膜へ転写し、そして eIF5A1 に対する抗体でウェスタン・プロットした。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プした。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プした。(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、RKO 細胞により產生されるタンパク質のレベルを示す図 52 を参照のこと。RKO 細胞は、アン

50

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された後では、より少ない量のアポトーシス因子 5 A 並びにより少ない量の p 5 3 を産生した。

【 0 1 7 6 】

実施例 1 2

以下の実験により、アンチセンスアポトーシス因子 5 A ヌクレオチドがアポトーシスを低減することができるということが示される。

1 の実施態様では、篩骨篩板細胞系列 # 5 0 6 は、(A)オリゴフェクタミン・トランスフェクション試薬を使用して、1 0 0 n M の F I T C 標識されたアンチセンス・オリゴヌクレオチドでトランスフェクションされるか、又は(B)無血清培地中に直接希釈される 1 0 μ M の剥き出しの 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された。24 時間後、1 0 % F B S を含む新たな培地及び 1 0 μ M に希釈される新たなアンチセンス・オリゴヌクレオチドを、細胞に加えた。細胞、(A)及び(B)を全体で 48 時間後に固定し、そしてフルオレセイン・フィルターを使用して、U V 光の下で蛍光顕微鏡上で可視化した。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。
10

【 0 1 7 7 】

他の実験において、篩骨篩板細胞系列 # 5 0 6 を、1 0 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 で、合計 4 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 48 時間で、細胞を 2 0 μ M 又は 4 0 μ M のカンプトテシンで 48 時間処理した。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。アポトーシスを起こしている細胞の割合(%)を、細胞をヘキスト及び T U N E L で標識することにより測定した。図 5 4 を参照のこと。
20

【 0 1 7 8 】

別の実験では、篩骨篩板細胞系列 # 5 0 6 を、1 0 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 でトランスフェクションした。24 時間後、培地を交換し、そして新たなアンチセンスオリゴヌクレオチドを加えた。アンチセンス・オリゴヌクレオチド処理を始めた後 48 時間で、アンチセンス・オリゴヌクレオチドを取り除き、そして細胞を 2 0 μ M カンプトテシンで 3 日間処理した。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、細胞をヘキスト及び T U N E L で標識することにより測定した。図 5 5 を参照のこと。
30

【 0 1 7 9 】

さらに別の実験において、篩骨篩板細胞系列 # 5 1 7 を 1 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 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 48 時間で、細胞を 2 0 μ M カンプトテシンで 3 又は 4 日処理した。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。アポトーシスを起こしている細胞の割合(%)を細胞をヘキスト及び T U N E L で標識することにより測定した。図 5 6 を参照のこと。
40

【 0 1 8 0 】

別の実験では、篩骨篩板細胞系列 # 5 1 7 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 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 48 時間で、細胞を 4 0 μ M のカンプトテシンで 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計測した。図 5 7 を参照のこと。

【 0 1 8 1 】

別の実験では、篩骨篩板細胞系列 # 5 1 7 を 1 μ M 又は 2 . 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
50

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 48 時間で、細胞を $40 \mu M$ 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 $10 ng / ml$ · TNF- 、 $50 \mu M$ カンプトテシン、又は $10 ng / ml$ · TNF- 及び $50 \mu M$ 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 $2.5 \mu M$ 又は $5 \mu M$ 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 IF 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 24 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 48 時間で、細胞を $50 \mu M$ のカンプトテシン及び $10 ng / ml$ · TNF- 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、 $2.5 \mu M$ 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 IF 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、24 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 48 時間で、細胞を $50 \mu M$ カンプトテシン及び $10 ng / ml$ TNF- 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 si RNA 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 si RNA 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 2000 · トランスフェクション試薬を使用して、 $100 nM$ · FAM 標識 si RNA でトランスフェクションした。(A)及び(B)の細胞を、合計 24 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 UV 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、RKO 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、 $100 nM$ · si RNA とトランスフェクションした。6 種の si RNA 、つまり 2 個のコントロール si RNA (si RNA # 5 及び GAPDH に対して標的された si RNA)と 4 種の e IF 5 A を標的とした si RNA (si RNA # 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、そして各サンプルからの $5 \mu g$ のタンパク質を、 SDS-PAGE ゲル上で分離し、 PVDF 膜に転写し、そして e IF 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、100 nM siRNA でトランسفエクションした。6種の siRNA、つまり2種のコントロール (siRNA # 5 及び GAPDH を標的とする siRNA) 及び 4種の eIF5A1 を標的とする siRNA (siRNA # 1 ~ # 4)をトランسفエクションした。トランسفエクション後 72 時間で、細胞抽出液を回収し、そして各サンプル由来の 5 μg のタンパク質を、SAS-PAGE ゲル上で分離し、PVDF 膜へと転写し、そして eIF5A1 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プした。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 100 nm の siRNA でトランسفエクションした。6種の siRNA、つまり2種のコントロール siRNA (siRNA # 5 及び GAPDH を標的とする siRNA) 及び 4種の eIF5A1 を標的とする siRNA (siRNA # 1 ~ # 4)をトランسفエクションした。トランسفエクション後 48 時間で、培地を 50 μM カンプトテシン及び 10 ng / ml · TNF-_α 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、100 nm の siRNA とトランسفエクションした。6種の siRNA、つまり2種のコントロール siRNA (siRNA # 5 及び GAPDH を標的とする siRNA) 及び 4種の eIF5A1 を標的とする siRNA (siRNA # 1 ~ # 4)でトランسفエクションした。トランسفエクション後 72 時間で、培地を 50 μM のカンプトテシン及び 10 ng / ml · TNF-_α 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سفエクションされないままにするか、又は 100 nm の siRNA でトランسفエクションした。6種の siRNA、つまり2種のコントロール siRNA (siRNA # 5 及び GAPDH を標的とする siRNA) 及び eIF5A1 を標的とする 4種類の siRNA (siRNA # 1 ~ # 4)をトランسفエクションした。トランسفエクション後 72 時間後、培地を 50 μM カンプトテシン及び 10 ng / ml · TNF-_α を含む培地と置き換えた。新たな培地をトランسفエ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سفエクションされ、そしてカンプトテシン及び TNF-_α 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ういては、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理することにより、細胞の TNF-_α の産生が少なくなることが本実施例により示される。

HepG2 細胞を、合計 2 日間、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アンチセンス・オリゴヌクレオチド eIF5A1 # 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-_α 定量用に、培地を回収し、そして冷凍した(-20°C)。培地中に放出される TNF-_α を、Assay Designs Inc. から購入した ELISA アッセイを使用して計測した。

【0194】

10

20

30

40

50

実施例 15

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'

【0195】

10

4 8 時間後、細胞をインターフェロン-ガンマ(IFN-ガンマ)で 1 6 時間処理した。16 時間後、細胞を新たな培地で洗浄し、そしてリボ多糖(LPS)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 TNF- α を、ELISA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 TNF- α 値を、pg/mg 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 ELISA 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。

【0196】

20

実施例 16U - 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 mM · 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、10 mM · H E P E S、1.0 mM ピルビン酸ナトリウム、及び 10% ウシ胎児血清を含む R P M I 1 6 4 0 内で、37 °C CO₂(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 10⁵ 及び 2 × 10⁶ 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。

30

【0197】

タイムコース実験

実験の開始 2 日前に、細胞密度を、3 × 10⁵ 細胞 / m l 培地に調節した。実験の日に、細胞を対数期で回収した。細胞懸濁液を、15 m l チューブに移し、そして 400 × g で 10 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 400 × 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 × 10⁵ 細胞 / m l に希釈した。

40

【0198】

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、24 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、37 °C CO₂(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。

【0199】

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

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(100ng/ml)を加え、そして細胞を3hか99h)及び6h(102h)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(1ml、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(50mM・トリスpH7.4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。

【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(5μg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(1μg/ml、30秒)でプロッキングし、そして5%スキム・ミルクを含むPBS-t(1時間)プロッキングした。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(EL検出システム、Amersham Pharmacia Biotech)。

【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プ化した。膜を剥離し(100mM・2メルカプトエタノール、2%SDS、62.5mMトリス-HCl・pH6.7; 50で30分間)、洗浄し、次に上記のようにプロッキングした。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。

【0203】

図77は、eIF5Aが、単球(U-397)が分化する間上方制御され、そしてその後に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سفエクションした。トランسفエクション後約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。

【0205】

図79及び80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IL-8を産生するようになる。これは、インターフェロンに応答するTNF受容体の知られている上方制御のためのようであ

10

20

30

40

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4~8時間以内に得た。(付着された極を伴う)視神經乳頭を取り出し、そして抗生物質/抗真菌剤、グルタミン、及び10%FBSを含むダルベッコ変形イーグル培地(DMEM)中に3時間置いた。視神經乳頭(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の小片にした。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 Probe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歳男性の視神經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

【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

40

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(Silencer)(商標)s i R N A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 pmolのs i R N Aを、Opti-Mem(Sigma)中に最終体積21.2 μlまで希釈することにより調製した。0.425 μlのリポフェクタミン2000を終量21.2 μl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 μlの無血清培地を細胞に加え、そして42.4 μl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 μlの無血清培地プラス30%FBSを細胞に加えた。ウエスタン・プ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 μMのカンプトテシン(Sigma)及び10ng/mlのTNF-(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エ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、TNF- 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冰酢酸の混合液で固定し、次にヘキスト染色液(0.5 μg/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(0.021Mクエン酸、0.058M·Na₂HPO₄·7H₂O；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。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)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P B S (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、洗浄と洗浄との間に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-HC1(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-HC1(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、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・プロット分析

細胞をP B S (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-HC1(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・プ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・プロッティング用に、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P B S)中でインキュベーションし、そしてP B S-T(P B S + 0.05% Tween-20)で15分間3回洗浄した。膜を一晩P B S-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P B S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P B S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P B S-T中で3回洗浄し、そして1%ミルクを含むP B S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。プロットを洗浄し、そしてECLプラス・ウエスタン・プ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

10

20

30

40

50

。

【0212】

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、例えば細胞フィプロネクチン(図82b)、ラミニン(図82c)、コラーゲンI及びコラーゲンIV(データー未掲載)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。

10

【0213】

TNF- α が、縫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ということを示した。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。

20

【0214】

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、eIF-5Aタンパク質の発現を試験した。eIF-5A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。eIF-5A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eIF-5Aの発現がアポトーシスの誘導に相關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。

30

【0215】

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(データー未掲載)。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

40

50

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事が分かった。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ことが示される。

10

20

【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かめるために、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。eIF5AsiRNA(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eIF5AsiRNA#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、eIF5AsiRNA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、eIF5AsiRNA#4で得た。該eIF5AsiRNA#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(データー未掲載)。

20

【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。

30

【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。

40

【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。

50

【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 10】図 10 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 11】図 11 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 12】図 12 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 13】図 13 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 14】図 14 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・プロット(図 14 A)と臭化工チジウム染色されたゲル(図 14 B)である。

【図 15】図 15 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・プロット(図 15 A)と臭化工チジウム染色されたゲル(図 15 B)である。

【図 16】図 16 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 17】図 17 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 18】図 18 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 19】図 19 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 20】図 20 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・プロットである。

【図 21】図 21 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 22】図 22 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・プロット(図 22 A)と臭化工チジウム染色されたゲル(図 22 B)である。

【図 23】図 23 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 24】図 24 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プロットしたものである。

【図 25】図 25 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 26】図 26 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 27】図 27 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 28】図 28 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、COS-7細胞がラット・アポトーシス特異的eIF-5Aの全長をセンス方向で含むpHM6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、COS-7細胞がラット・アポトーシス特異的eIF-5Aの全長をセンス方向で含むpHM6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、COS-7細胞がラット・アポトーシス特異的eIF-5Aの全長をセンス方向で含むpHM6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。

【図32】図32は、COS7細胞がラット・アポトーシス特異的eIF-5Aの全長をセンス方向に含むpHM6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、COS7細胞がラット・アポトーシス特異的eIF-5Aの全長をセンス方向に含むpHM6で一過的にトランスフェクションされた際の、Bc1-2の下方制御を記載する。図33Aは、クマシーブルー染色されたタンパク質プロット；図33B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eIF-5Aの全長を、アンチセンス方向で含むpHM6で一過的にトランスフェクションされたCOS-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Bc1-2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35】図35は、ラット・アポトーシス特異的eIF-5Aの全長を、センス方向で含むpHM6で一過的にトランスフェクションされたCOS-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-Myc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eIF-5Aの全長を、センス方向で含むpHM6で一過的にトランスフェクションされたCOS-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p53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37A】COS-7細胞においてpHM6-ラット・アポトーシス特異的eIF-5A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-[HA]-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COS-7細胞においてpHM6-ラット・アポトーシス特異的eIF-5A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p53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。

【図37B-C】COS-7細胞においてpHM6-ラット・アポトーシス特異的eIF-5A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-[HA]-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COS-7細胞においてpHM6-ラット・アポトーシス特異的eIF-5A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p53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。

【図38】図38は、RKO細胞から単離されたヒトeIF5A2と、ヒトeIF5A2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、RKO及びRKO-E6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。RKO及びRKO-E6細胞は、pHM6-LacZ又はpHM6-eIF5A1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pHM6-eIF5A1でトランスフェクションされたRKO細胞は、アクチノマイシンDで処理されずにpHM6-LacZ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pHM6-eIF5A1でトランスフェクションさ

10

20

30

40

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سفェクションされた細胞に対してアポトーシスの 105 % の増加を示した。

【図 4 0】図 4 0 は、一過的なトランسف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سفェクションされた。p H M 6 - e I F 5 A 1 でトランسفェクションされた細胞は、p H M 6 - L a c Z でトランسف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 25 % 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سفェクションされた細胞では明らかではなかった。

【図 4 1】図 4 1 は、一過的トランسف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سف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 M 6 - e I F 5 A 1 で一過的にトランسفェクションされた。トランسف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سفェクションされた細胞の 60 % 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سف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سف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سف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سف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سف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سفェクションされた細胞の 80 % 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سف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。

【図 4 3】図 4 3 は、0.25 μg / m l 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プロットを提供する。上パネルは、抗 - p 53 を一次抗体として使用するウエスタンプロットを表す。真中のパネルは、抗 - e I F 5 A 1 を一次抗体として使用するウエスタンプロットを表す。下パネルは、抗 - e I F 5 A 1 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 - ブルーで染色された膜を表す。p 53 及び e I F 5 A 1 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。

【図 4 4】図 4 4 は、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。e I F 5 a の遺伝子発現レベル(薄灰色のバー)は、e I F 5 b (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 e I F - 5 A (e I F 5 a) 及び e I F - 5 A (e I F 5 b) 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。e I F 5 a (薄灰色のバー)の遺伝子発現レベルは、e I F 5 b (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 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 e I F - 5 A (e I F 5 a) と 増殖 e I F - 5 A (e I F 5 b) のリアルタイム P C R 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。

【図49】図49は、図47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50A-B】図50A-Fは、アポトーシス因子eIF-5a(eIF-5a1又は表上でIF5a1として記載される)のレベルがIL-1⁺及びIL-1⁻のレベルと相関する患者のデーターを記録する。図50Aは、冠動脈バイパス・グラフト(CABG)患者から得たデーターの表である。図50Bは、弁置換手術患者から得たデーターの表である。

【図50C】図50Cは、CABGタンパク質におけるアポトーシス因子eIF-5a(因子5a1)のIL-1⁺への相関を表すグラフである。

【図50D】図50Dは、CABG患者において、増殖eIF-5a(因子a2)のIL-1⁺への相関を表すグラフである。

【図50E】図50Eは、弁置換手術患者において、アポトーシス因子eIF-5a(因子5a1)のIL-1⁺への相関を表すグラフである。10

【図50F】図50Fは、弁置換手術患者における増殖eIF-5a(因子a2)のIL-1⁺への相関を表すグラフである。

【図51】図51は、図50A-Fにおいて使用される患者データーが得られる患者データーの表である。

【図51A】図51は、図50A-Fにおいて使用される患者データーが得られる患者データーの表である。20

【図51B】図51は、図50A-Fにおいて使用される患者データーが得られる患者データーの表である。

【図51C】図51は、図50A-Fにおいて使用される患者データーが得られる患者データーの表である。

【図51D】図51は、図50A-Fにおいて使用される患者データーが得られる患者データーの表である。20

【図52】図52は、(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で処理された後においてRKO細胞により産生されるタンパク質のレベルを示す。RKO細胞は、アンチセンス・アポトーシス因子5Aス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5A及びp53を産生した。

【図53】図53は、蛍光標識されたアンチセンス・オリゴスクレオチドの取り込みを示す。30

【図54】図54～58は、アンチセンス・アポトーシス因子5Aオリゴス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5A・オリゴス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55】図54～58は、アンチセンス・アポトーシス因子5Aオリゴス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5A・オリゴス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56】図54～58は、アンチセンス・アポトーシス因子5Aオリゴス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5A・オリゴス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57】図54～58は、アンチセンス・アポトーシス因子5Aオリゴス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5A・オリゴス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58】図54～58は、アンチセンス・アポトーシス因子5Aオリゴス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5A・オリゴス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59】図59は、篩骨篩板細胞をTNF-⁺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60】図60及び61は、アンチセンス・アポトーシス因子5A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5A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61】図60及び61は、アンチセンス・アポトーシス因子5A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5A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62】図62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siRNAを取り込むということを示す。 10

【図63】図63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タンパク質しか産生せず、そして加えてより多いBc1-2タンパク質を産生することを示す。アポトーシス因子5A発現の減少は、BCL-2発現の増加と相関する。

【図64】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は、より少ないアポトーシス因子5aタンパク質を産生する。

【図65】図65～67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アンプトテシン(amptothecin)及びTNF- α 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。 20

【図66】図65～67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アンプトテシン(amptothecin)及びTNF- α 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67】図65～67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アンプトテシン(amptothecin)及びTNF- α 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68】図68は、図67及び実施例13で記載される実験に由来された、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- α 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。 30

【図69】図69は、アポトーシス因子5Aでトランスフェクションされ、IL-1に晒されたHePG2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TNF- α を分泌するということを示す。

【図70】図70は、ヒト・アポトーシス因子5aの配列(配列番号*AA)及び本発明の5種のsiRNAの配列(配列番号*1、*2、*3、*4、及び*5)を示す。

【図71】図71は、ヒト・アポトーシス因子5aの配列(配列番号*AA)及び本発明の5siRNAの配列(配列番号*6、*7、及び*8)を示す。

【図72】図72は、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結合位置を示す。 40

【図73A】図73a及びbは、ヒトeIF5A2(増殖因子eIF5A)に対するヒトeIF5A1(アポトーシス因子5A)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73B】図73a及びbは、ヒトeIF5A2(増殖因子eIF5A)に対するヒトeIF5A1(アポトーシス因子5A)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74A】図74Aは、eIF5A1に対するsiRNAが、抑制されないならば、トランスフェクションされたHT-29細胞においてTNF- α 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74Bは、ELISAの結果を提供する。

【図75】図75は、ELISAの結果を提供する。TNF- α 産生は、eIF5A1に 50

に対する si RNA 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-937 分化実験のタイムコースを示す。実施例 1 6 を参考のこと。

【図 7 7】図 7 7 は、e IF 5 A-1 が、単球分化及びそれに続く TNF- 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 e IF -5 A 1 に対する si RNA の使用を示す。

【図 7 9】図 7 9 は、IL-8 が TNF- に応答して並びにインターフェロンに応答して產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、e IF 5 A に対する si RNA がインターフェロンに応答して產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產生される IL-8 の有意な量もブロックしたということを示す。
10

【図 8 0】図 8 0 は、IL-8 が TNF- アルファに応答して、並びにインターフェロンに応答して產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、e IF 5 A に対する si RNA がインターフェロンに応答して產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產生される 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 24 時間処理された HT 29 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マに応答するアポトーシス e IF 5 A の上方制御(8 時間で 4 倍)を示す。
20

【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。83 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) フィプロネクチン； c) ラミニン； 及び d) GFAP であった。全ての写真を 400 倍の倍率で撮影した。

【図 8 3】カンプトテシン及び TNF- での処理に応答した篩骨篩板細胞系列 #506 のアポトーシスである。篩骨篩板細胞系列 #506 細胞を 8 ウェル培養スライド上に、1 ウェルあたり 40000 細胞で蒔いた。3 日後、コンフルエントの LC 細胞に、10 ng / ml の TNF- 、 50 μM カンプトテシン、又は 10 ng / ml の TNF- + 50 μM 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、未処理のコントロール細胞に加えた。処理後 48 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。
30

【図 8 4】カンプトテシン又は TNF- + カンプトテシン処理の間の、e IF 5 A の発現。篩骨篩板細胞 #506 は、24 ウェルプレート上に、1 ウェルあたり 40000 細胞で蒔いた。3 日後、LC 細胞を 50 μM カンプトテシン又は 10 ng / ml TNF- + 50 μM 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 24 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 24 時間後に採取した。各サンプル由来の 5 μg 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-e IF 5 A 抗体で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 線フィルムに露光した。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。
40

【図 8 5】si RNA でトランスフェクションした後の篩骨篩板細胞系列 #506 及び #517 における e IF 5 A の発現。篩骨篩板細胞 #506 及び #517 細胞は、24 ウェルプレート上に、1 ウェルあたり 10000 細胞で蒔いた。3 日後、LC 細胞を、GAPDH si RNA、e IF 5 A · si RNA #1-4、又はコントロール si RNA #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 μg のタンパク質を、SDS-PAGE により分離し、PVDF 膜へ転写し、そして抗-e IF 5 A 抗体で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 線フィルムに露光した。膜を次に剥がして、そ
50

て抗- アクチンを内部コントロールとして再プロッティングした。

【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一ウェルあたり 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 UV 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 UV 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 in situ で評価した。パネル A は、アポトーシスを起す細胞の断片化された 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 UV フィルターを通して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。
30

【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 】

TCGAAGACGCCGTAAGCAGGCCATGCCAAGGTCTGGTTGGTATTGATATTTCATGGGAAAGATA
 SK T K G H G A K V H L V G I D I F T G K K Y
 GAAGATATCTGCCCGTGCACTATAACATGGATGCCAACATCAAAGGAATGATTCCAGCTGATTGGC
 E D I C P S T H M D V P N I K R N D F Q L I G
 ATTCAGAGATGGTACCTATCCCTGCTCCAGACAGTGGGAGGATCAGGAGGACCTTCGCTGCCAGGGA
 I Q D G M S L L Q D S G E V R E D L L R P E G
 GACCTGGCAAGGGAGTTGAGCAGAAGTACTGGAGAACAGATCTGATCACAGTGCTGCCAGT
 D L G K C E I E Q K Y D C G E E I L I T V L S A M
 ACAGAGGGCAGCTGGTCAATCAGGCCATGGCAAATAACTGCTTCCAGGGTGGCGTGGAGCAGCA
 T E E A A V A I K A M A K
 GTGATCATGAGCTTACAGAGGCCCTCCCCAGCTCTGGCTGGCCCTTGGCTGGACTCTATCCAATT
 TTGAGCTTATTTGGTTCTCCACCTTCAAGGAACTGGGAGACCCCTGCCCTAACCTAGCTCC
 GGCAAGGAGGAGGAGCATGCCCTGGTGGAAAGCTACCTGGCTCTTCCAGGGGGGGGGGGGG
 GGGAGTGGGACTGCTCTGGTTAGGTCCTCCCTCTCCCTTTTTAACTTAAATTGGGAATCAGAAG
 CTGGTGGCTTCAGGAAATGGTCTGGTCTTCTCCACTAAACCCATCTGGTCCCTGTTCTCCATAG
 CCTTCAACCAAGGACACTGAGCACGACTGGGGACAGCCGGCTTCCCTGGTCTGTCCTCCACCC
 TCTATAGGGGTGACAAGAAGAAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 CCCATGGCTTACCCCTTCTGGTGGGGCTTCTCCCTGACACATTGTTAAATCAACCTGTAIAAAC
 TACAAGTTAATGAAAAAAA
 (972 nt, 109 aa)

(972 NT, 109 aa)

FIG. 1

【 図 2 】

```

CAGGTCTAGTGGATCGAACGCTCTAAATGGCAGATGTTGGACTTCGAGACAGGAGATGCAGGGG
M A D L T G D A G
CCTCGACCCCTTCCAAATGCAGTCTCAGTAGCTAAGAATGGTTTGTTGGCTCAAGGGCGGCCAT
A S A T F P M Q C S A L R K N G F V V L K G R P
GTAAGATGCTCGAGATGCTACTCTGGAAAGCTGGCAAGCATGGCCATGGCAAGCTGTCATCTGGTTGATG
C K I V E M S T D P T K G H G A V H L V L G
ATATTTTACTGGAAAATAATGAAAGATATCTGGCTCGACTCATACATGATGTCCTAACACAT
D I F T G K Y E D I C P S T H N M D V P N I K
GGAAATGATTCTGGACCTGATGGCATTCCAGGGATGGTACCTATCCCTGCTCCAGGAGCTGGGGAGGTAGAG
R D N D F Q L G I Q D G Y L S L Q D S G E V R
AGGACCTTCGCTGCTGGAGGGAGACCTTGGCAAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTTGGAGAAGAGATCC
E D L R L P E G D L G K E I E O K Y D C G E E I
TGATCACAGTGTCTGGCCATGACAGGAGGGCAGCTGTCATCAAGGCTGAG
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 】

CAGCTTAGAGTTGGAACTGAGCCTTAAATGGCAGATGATTGGACTTCAGAGCAGGAGATGCAGGG
 CCTCAGGCCACCTTCCCAATGCGATGTCAGCATTACCTAAAGAATGGTTGTGTCAGGCCCCGCGCAT
 A S A T F P M Q C S A L R K N G F V V L K G R P 13
 GTAAGATCTGCGAGATGTCATCTCGAACAGTCGCCAAGCATGCCATGCCAGGTCATCTGGTTGATG
 C K I V E M S T S K T G H G H A V K W L V G T 144
 ATATTTTACTGGAAAAGAATATGAAGATCTGCCGTCGACTCATACATGGATGTCCCCAACATCAA
 D I F T G K K Y E D I C P S T H M D V P N I K 61
 GGGATGATTTCCACGCTGATGGCCATCCAGGATGGTCACTATCCCTGCTCCAGGAGCTGGAGGTAGAG
 R N D F Q L I G I Q D G Y L S L L Q D S G E V R 288
 AGGACCTCTGCTGCGTGAAGGGAGACCTTGGCAAGGAGATTGAGCAGAAGATGACTGTGAGAAGAGATCC
 E D L R L P E G D L G K E I E Q K Y D C G E E I 109
 TGATCACAGTGTCTGCCCATGACAGAGGAGCCTGGCAGCTGGAGAAGATTCAGGAAATAATCTGGCT
 L I T V L S A M T E E A V A V I K A M A K * 432
 CCAGGGTGGCGGTGGCAGCAGTGCATGCCATGAGCTCAGAGGCCCTCCCGAGCTCTGGCTGGGCC
 TGGCTGACTCTTCTTAAATTATTTGGATTTTGTGTTCTTCCACCTTCAAACTGTCGGAGGAGA
 CTGGCCCTTCACTGGCTCCCTGGCAGGAGCTGGGGCTTGGCTGGAGACTCTGGCTCTTC
 TCTGGCGCCCTGATGGGGAAAGGGAGCTGGTCTGGCTTGTTAGTTCTCTCCCTTCTTCTTCTT
 TAATTCATTTGGGAGAAGGGAGCTGGTCTGGGGAAATTTGGCTGGAAATTTGGCTGGCTTCTTCACTAAACCA
 TCTGGCTGGCTTCTTCACTGGCTTCCACCTGGAGGAGCAACACTGGGGAGCAGGCCCTTCTC
 GCGCTTGTCTCTCCACCAAGGGCTCTATGGGGTCAAGAAGAGGGGGGGGGAGGAGCAGGATCC
 TCGACCTCTGGAGGGCTTCCCTGGGGCTTCACTCTGGCTGGCTTCTCCTGGAGACATTTGT
 TAAAAATCAACCTGATAAAATACAAAGTTGATGAAAANAAAANAAAANAAA
 1139

(1139 NT, 154 aa)

FIG.3

〔 四 4 〕

GCTGTGTTATTTGGGCCATAAGAACCCACATCCTGTGCTGAGTCCTGCACACTACAGCGCTCACTGGT
A V Y W H N K H P I P V L S P A L T D G S S L G
GACATGATCTTTCTTCACTTCTATAAAAACCCAGGGCTGGCTCCGGACATCTGGTAAAGACCTCCGGCTCATC
D M I F F H S Y K N P G L D I V E D L R L I
AACATGCAGGCCATTTCGCCAACGGCTACGGGTGATCATCTCCTGGGAGGCGCTGGTCAACGACACCATC
N M Q A I F A K R T G M I I L G G V V K H I
GCCAATGCTAACCTCTGGGAATGGAGCTGACTACGCTGTTATATACACAGCCAGGAGTTGATGGC
A N A N L M R G N A D Y A V Y I N T A Q E F D G
TCAGACTCAGGAGGCCGGCAGATGAGCTGTCCTCTGGCGCAAGATCCGGATGATGAGCACAGCCATTAGAA
S D S G A R P D E A V S W G K I R M D A Q P V K
GTCATGCTGATGTCATCTCTGGTTTCTCCCTTGCTGTGGAGACATTGCCCAAAGGCGAGATGCTTC
V Y A D A S L V F P L L V A E T F I Q A K D A F
R A E K N E D
GCTACATACACCCCTCTGGGCCCTCTCTGGTCAAGCAGATCTGGAGAATAATGGCTTCTGGTGGTT
CTGTAAGAAAAGGACTTTAAAAAAAAGAAA

(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	ATGGCAGATGATTGGACTTCGAGACAGGAGATGCAGGGGCCCTAGCCACCTTCCCCAATG	10	20	30	40	50	60
ヒト	ATGGCAGATGACTGGACTTCGAGACAGGAGATGCAGGGGCCCTAGCCACCTTCCCCAATG	10	20	30	40	50	60
ラット	CAGTGCCTACGATTACGTAAAGATGGTTTGTTGCTCAAGGGCGGCCATGTAAGATC	70	80	90	100	110	120
ヒト	CAGTGCCTACGATTACGTAAAGATGGCTTGTGCTCAAGGGCGGCCATGTAAGATC	70	80	90	100	110	120
ラット	GTCCGAGATGCTACTTCGAAGACTGCAAGCATGCCATGGCAAGGTCATCTGGTTGT	130	140	150	160	170	180
ヒト	GTCCGAGATGCTACTTCGAAGACTGCAAGCACGGCCACCCAAAGGTCATCTGGTTGT	130	140	150	160	170	180
ラット	ATTGATATTCTTACTGGAAAGATAATGAAAGATATCTGCCGTGACTCATACATGGAT	190	200	210	220	230	240
ヒト	ATTGACATCTTACTGGAAAGATAATGAAAGATATCTGCCGTGACTCATACATGGAT	190	200	210	220	230	240
ラット	GTCCTTCAACATCAAAGGAATGATTCCACGTGATTGCGCATCCAGGATGGGTACCTATCC	250	260	270	280	290	300
ヒト	GTCCTTCAACATCAAAGGAATGATTCCACGTGATTGCGCATCCAGGATGGGTACCTATCC	250	260	270	280	290	300
ラット	CTGCTCCAGACAGTGGGAGGAGTACAGGAGAGCTTCGCTGCCAGGGAGACCTTGGC	310	320	330	340	350	360
ヒト	CTGCTCCAGACAGCAGGGAGGTACAGGAGGACCTTGGCTCCCTGAAGGGAGACCTTGGC	310	320	330	340	350	360
ラット	AAGGAGATGAGCAGAAAGTATGACTGTGAGAAGAGATCTGATCACAGTGTGTCGCC	370	380	390	400	410	420
ヒト	AAGGAGATGAGCAGAAAGTACGACTGTGAGAAGAGATCTGATCACAGTGTGTCGCC	370	380	390	400	410	420
ラット	ATGACAGAGGGCAGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAA	430	440	450	460		
ヒト	ATGACAGAGGGCAGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAA	430	440	450	460		

FIG.5

【図7】

ラットvs. マウス(BC003889) 98.3% 同一性(コード領域)

ラット	ATGGCAGATGATTGGACTTCGAGACAGGAGATGCAGGGGCCCTAGCCACCTTCCCCAATG	10	20	30	40	50	60
マウス	ATGGCAGATGATTGGACTTCGAGACAGGAGATGCAGGGGCCCTAGCCACCTTCCCCAATG	10	20	30	40	50	60
ラット	CAGTGCCTACGATTACGTAAAGATGGTTTGTTGCTCAAGGGCGGCCATGTAAGATC	70	80	90	100	110	120
マウス	CAGTGCCTACGATTACGTAAAGATGGCTTGTGCTCAAGGGCGGCCATGTAAGATC	70	80	90	100	110	120
ラット	GTCCGAGATGCTACTTCGAAGACTGCAAGCATGCCATGGCAAGGTCATCTGGTTGT	130	140	150	160	170	180
マウス	GTCCGAGATGCTACTTCGAAGACTGCAAGCATGCCATGGCAAGGTCATCTGGTTGT	130	140	150	160	170	180
ラット	ATTGATATTCTTACTGGAAAGATAATGAAAGATATCTGCCCTGGACTCATACATGGAT	190	200	210	220	230	240
マウス	ATTGACATTTTACTGGAAAGATAATGAAAGATATCTGCCCTGGACTCATACATGGAT	190	200	210	220	230	240
ラット	GTCCTTCAACATCAAAGGAATGATTCCACGTGATTGCGCATCCAGGATGGGTACCTATCC	250	260	270	280	290	300
マウス	GTCCTTCAACATCAAAGGAATGATTCCACGTGATTGCGCATCCAGGATGGGTACCTATCC	250	260	270	280	290	300
ラット	CTGCTCCAGGACAGTGGGAGGAGTACAGGAGAGCTTCGCTGCCAGGGAGACCTTGGC	310	320	330	340	350	360
マウス	CTGCTCCAGGACAGCAGGGAGGTACAGGAGGACCTTGGCTCCCTGAAGGGAGACCTTGGC	310	320	330	340	350	360
ラット	AAGGAGATGAGCAGAAAGTATGACTGTGAGAAGAGATCTGATCACAGTGTGTCGCC	370	380	390	400	410	420
マウス	AAGGAGATGAGCAGAAAGTACGACTGTGAGAAGAGATCTGATCACAGTGTGTCGCC	370	380	390	400	410	420
ラット	ATGACAGAGGGCAGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAA	430	440	450	460		
マウス	ATGACAGAGGGCAGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAA	430	440	450	460		

FIG.7

【図6】

ラットvs. ヒト(NM_020390) 72.5% 同一性(コード領域)

ラット	ATGGCAGATGATTGGACTTCGAGACAGGAGATGCAGGGGCCCTAGCCACCTTCCCCAATG	10	20	30	40	50	60
ヒト	ATGGCAGACGAAATGATTCTACTGQGAGATGCAGGGGCCCTAGCCACCTTCCCCAATG	10	20	30	40	50	60
ラット	CAGTGCCTACGATTACGTAAAGATGGTTTGTTGCTCAAGGGCGGCCATGTAAGATC	70	80	90	100	110	120
ヒト	CAGTGCCTCGGCCCTGGCAAAACCGCTCTGCTGCTCAAAGGGACGACCATGCAAATAA	70	80	90	100	110	120
ラット	GTCCGAGATGCTACTTCGAAGACTGCAAGCATGCCATGGCAAGGTCATCTGGTTGT	130	140	150	160	170	180
ヒト	GTCCGAGATGCTACTTCGAAGACTGCAAGCACGGCCACCCAAAGGTCATCTGGTTGT	130	140	150	160	170	180
ラット	ATTGATATTCTTACTGGAAAGATAATGAAAGATATCTGCCGTGACTCATACATGGAT	190	200	210	220	230	240
ヒト	ATTGATATTCTTACTGGAAAGATAATGAAAGATATCTGCCGTGACTCATACATGGAT	190	200	210	220	230	240
ラット	GTCCTTCAACATCAAAGGAATGATTCCACGTGATTGCGCATCCAGGATGGGTACCTATCC	250	260	270	280	290	300
ヒト	GTCCTTCAACATCAAAGGAATGATTCCACGTGATTGCGCATCCAGGATGGGTACCTATCC	250	260	270	280	290	300
ラット	CTGCTCCAGACAGTGGGAGGAGTACAGGAGAGCTTCGCTGCCAGGGAGACCTTGGC	310	320	330	340	350	360
ヒト	CTGCTCCAGACAGCAGGGAGGTACAGGAGGACCTTGGCTCCCTGAAGGGAGACCTTGGC	310	320	330	340	350	360
ラット	AAGGAGATGAGCAGAAAGTATGACTGTGAGAAGAGATCTGATCACAGTGTGTCGCC	370	380	390	400	410	420
ヒト	AAGGAGATGAGCAGAAAGTACGACTGTGAGAAGAGATCTGATCACAGTGTGTCGCC	370	380	390	400	410	420
ラット	ATGACAGAGGGCAGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAA	430	440	450	460		
ヒト	ATGACAGAGGGCAGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAA	430	440	450	460		

FIG.6

【図8】

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

ラット	MADDLDFTGDAGASATPQMCSALRKNGFVVLKGRPKIVENSTSKTGKHAKVHLVG	10	20	30	40	50	60
ヒト	MADDLDFTGDAGASATPQMCSALRKNGFVVLKGRPKIVENSTSKTGKHAKVHLVG	10	20	30	40	50	60
ラット	IDIFTGKYEDICPSTHNMVDPNIRNDOLIGI0DGYLSLQDSGEVRDRLRPEGDLG	70	80	90	100	110	120
ヒト	IDIFTGKYEDICPSTHNMVDPNIRNDOLIGI0DGYLSLQDSGEVRDRLRPEGDLG	70	80	90	100	110	120
ラット	KEIEQKYDCGEELITVLSAMTEEAAVAIAKAMAK	130	140	150			
ヒト	KEIEQKYDCGEELITVLSAMTEEAAVAIAKAMAK	130	140	150			

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	MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTS	KTGKHGHAKVHLVG			
ヒト	MADEIDFTTGADAGSSTYPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTS	KTGKHGHAKVHLVG			
10	20	30	40	50	60
ラット	IDIFTGKKYEDICPSTHNMDVPNIKRNDFLQLIGI	QDGYLSLLQDSGEVR	EIDLRLPEGDLG		
ヒト	IDIFTGKKYEDICPSTHNMDVPNIKRNDYQLIC	IQDGYLSLLTETGEV	REDLKLPEGLG		
70	80	90	100	110	120
ラット	KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEAAVAKAMAK				
ヒト	KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEAAVAKAMAK				
130	140	150			
ラット	130	140	150		
ヒト	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	MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTS	KTGKHGHAKVHLVG			
マウス	MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTS	KTGKHGHAKVHLVG			
10	20	30	40	50	60
ラット	IDIFTGKKYEDICPSTHNMDVPNIKRNDFLQLIGI	QDGYLSLLQDSGEVR	EIDLRLPEGDLG		
マウス	IDIFTGKKYEDICPSTHNMDVPNIKRNDYQLIC	IQDGYLSLLTETGEV	REDLKLPEGLG		
70	80	90	100	110	120
ラット	KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEAAVAKAMAK				
マウス	KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEAAVAKAMAK				
130	140	150			
ラット	130	140	150		
マウス	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	GCTGTGATTATTGGGCCATAAGAACACATACCTGTGCTAGTCCTGCACTCACAGAC					
ヒト	TCCGTGATTACTGGGCCAGAAGAACACATCCCTGTGTTAGTCCTGCACCTACAGAC					
10	20	30	40	50	60	
ラット	GGCTCACTGGTGACATGATCTTTCCATTCTATAAAAACAGCCTTGGCTCTGGAC					
ヒト	GGCTCGCTGGCGACATGATCTTTCCATTCTACAAGAACCCGGGCTTGGCTCTGGAC					
70	80	90	100	110	120	
ラット	130	140	150	160	170	180
ヒト	ATCGTTGAAGACCTGGGCTCATCACATCGAGCCATTTCGCCAACGGCACTGGGATG					
130	140	150	160	170	180	
ラット	ATCATCC1GGGTGGAGCGTGGTCAGGACACATCGCCATGCTAACCTCATCGGGAT					
ヒト	ATCATTCGGCGGGGGCTGGTCAAAGAACACATGGCCAACTGCCAACCTCATCGGGAAC					
190	200	210	220	230	240	
ラット	250	260	270	280	290	300
ヒト	GGAGCTGACTACGCTGTTATCACACACAGCCCAGGAGTTTGTGCTCAGACTCGAGA					
250	260	270	280	290	300	
ラット	GGGGCGACTACGCTGTTACATCACACACAGCCAGGGAGTTTGTGCTCAGACTCGAGT					
ヒト	310	320	330	340	350	360
ラット	GCCCCGGGACAGATGGGCTGCTCTGGGCAAGATCCGGGATGGATGCCAGCGTAGAAG					
ヒト	GCCCGAACAGAACGGGCTGCTCTGGGCAAGATCCGGGATGGATGCCAGCGTAGAAG					
310	320	330	340	350	360	
ラット	370	380	390	400	410	420
ヒト	GTCTATGCTGATGCATCTGGTTCCCTTGCTGGTGCTGAGACATTGCCAAAG					
370	380	390	400	410	420	
430	440	450				
ラット	GTCTATGCTGATGCATCTGGTTCCCTTGCTGGTGCTGAGACATTGCCAAAG					
ヒト	ATGGATGCCTCATGCATGAGAAGACAGGGAC					
430	440	450				

FIG.11

【図12】

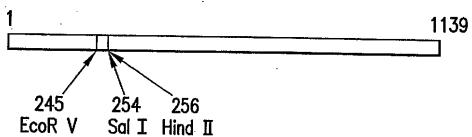


FIG.12

【図13】

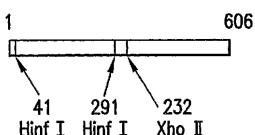


FIG.13

【図14】

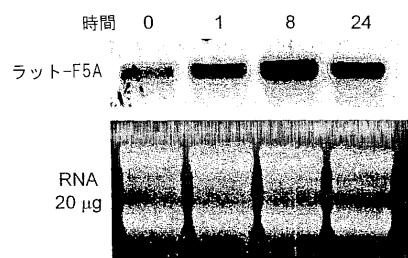


FIG.14

【図16】



FIG.16

【図15】

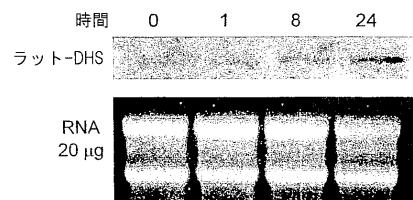


FIG.15

【図17】

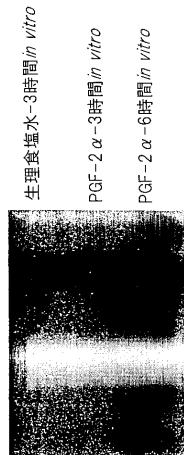


FIG.17

【図18】

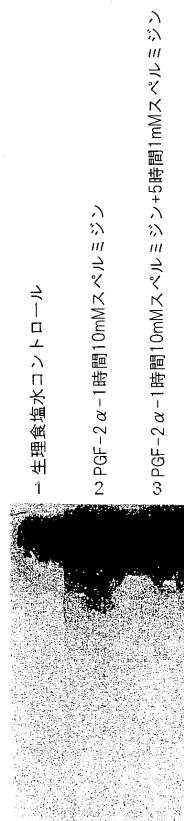


FIG.18

【図19】

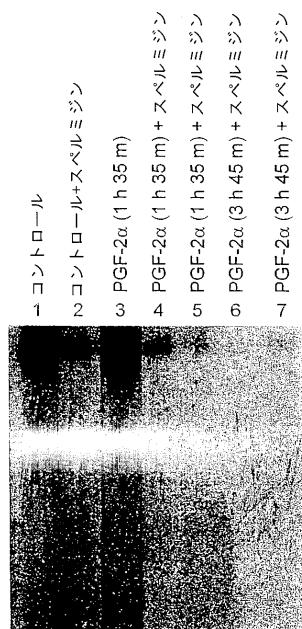


FIG.19

【図20】

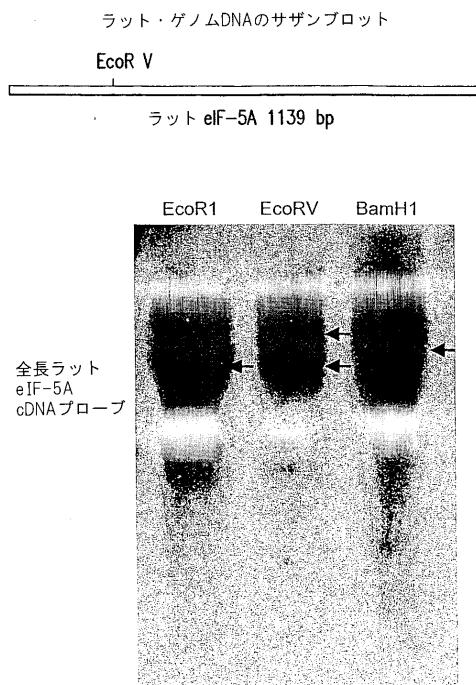


FIG.20

【図21】

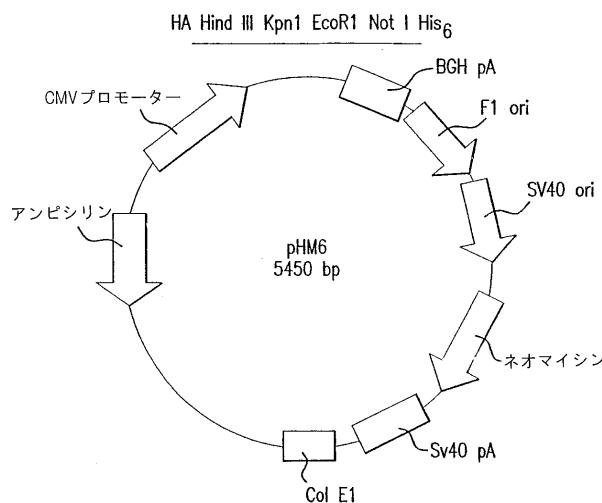


FIG.21

【図22】

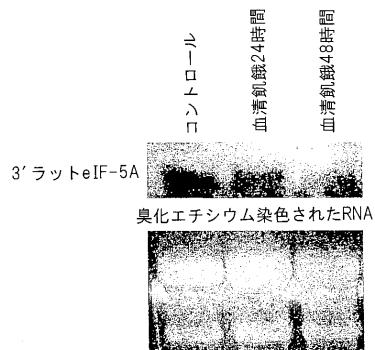


FIG.22

【図23】

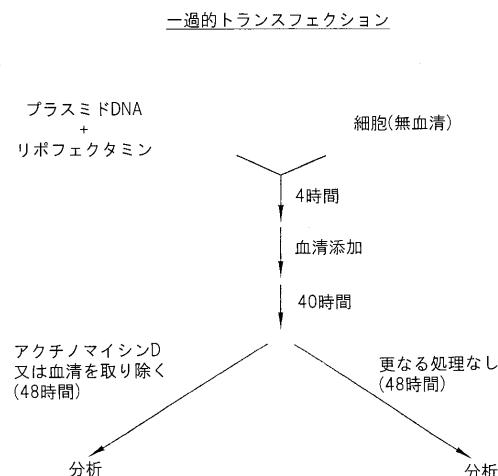


FIG.23

【図24】

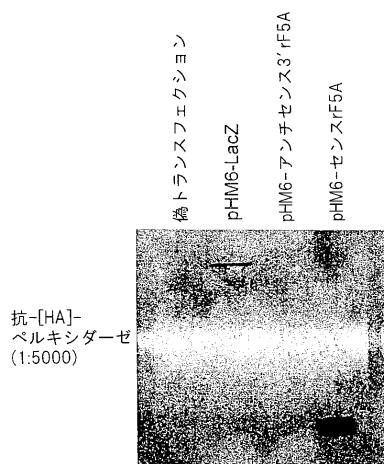


FIG.24

【図25】

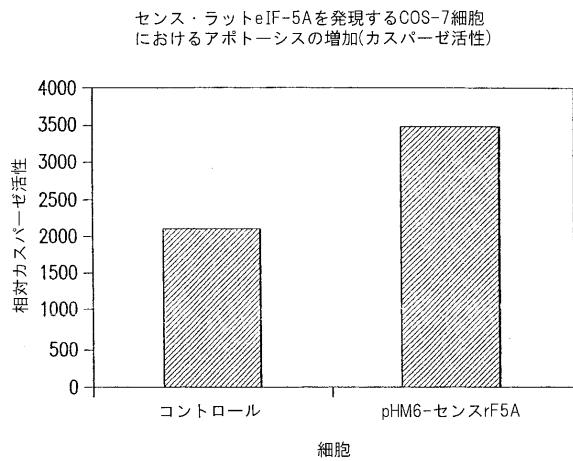


FIG.25

【図26】

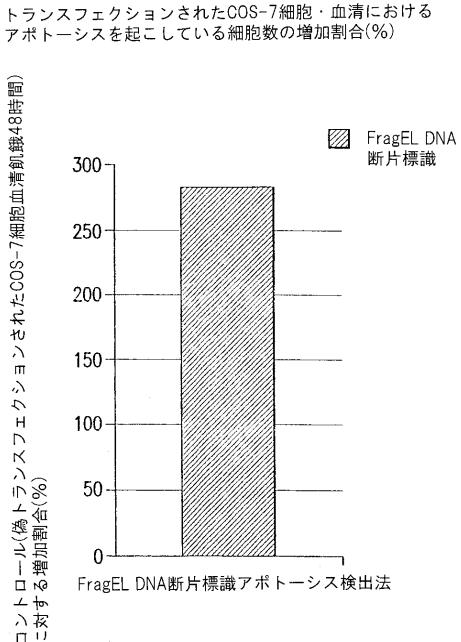
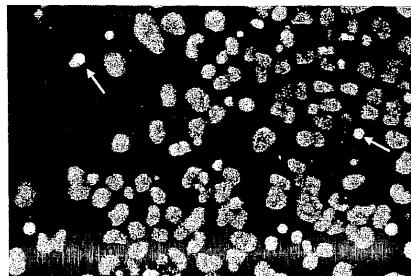


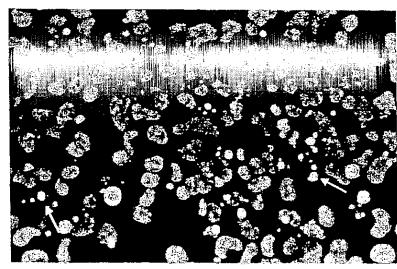
FIG.26

【図27】

血清を取り除いた形質転換
COS-7細胞のヘキスト染色



偽形質転換



pHm6-センス・ラットF5A

FIG.27

【図28】

48時間の血清剝離後における一過的にトランスフェクションされた
COS-7細胞のアボトーシスの割合(%)

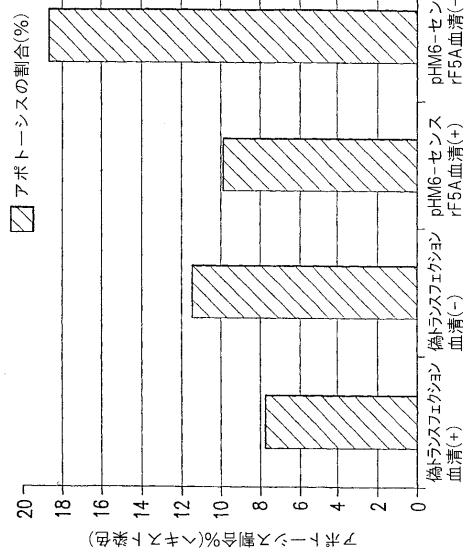
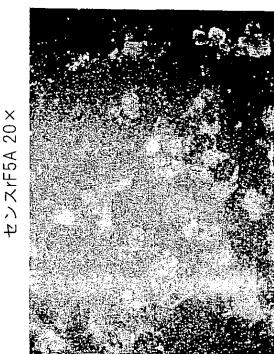
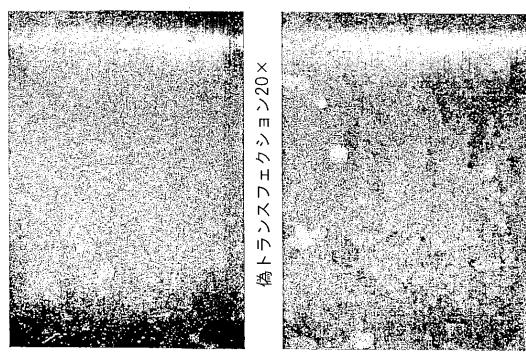


FIG.28

【図29】



センス・F5A 20×



偽トランスフェクション 20×

FIG.29

【図30】

48時間の血清剝離後における一過的にトランスフェクションされた
COS-7細胞のアボトーシス割合(%)

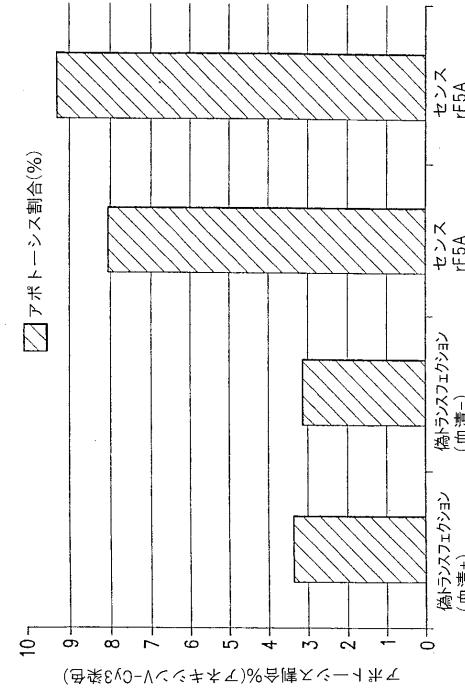


FIG.30

【図31】

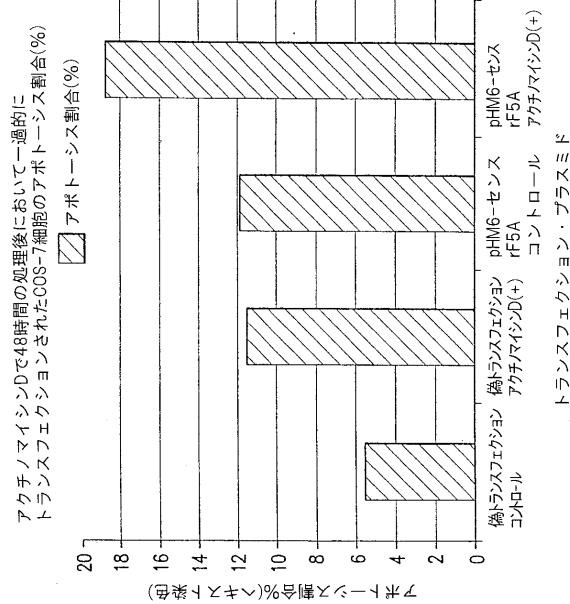


FIG.31

【図32】

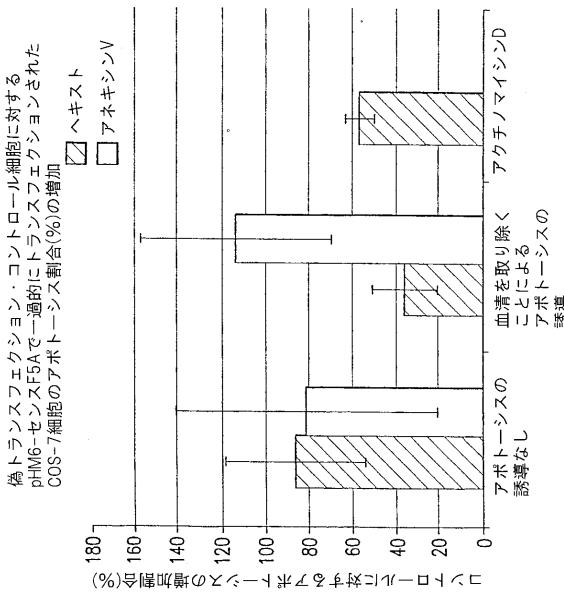


FIG.32

【図33】

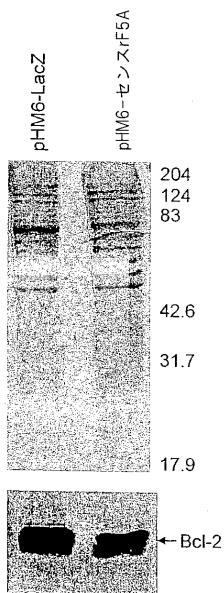


FIG.33

【図34】

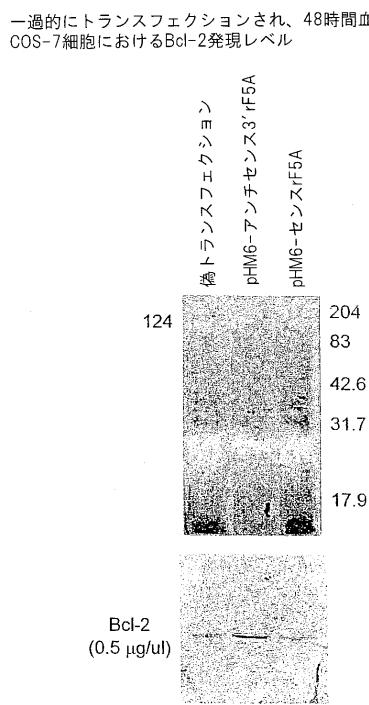


FIG.34

【図35】

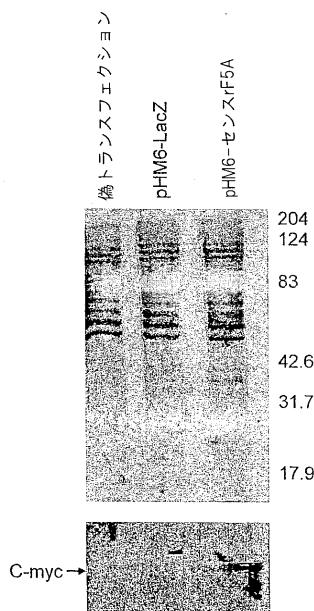


FIG.35

【図36】

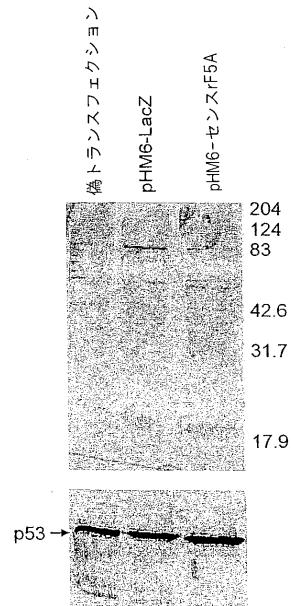


FIG.36

【図37A】

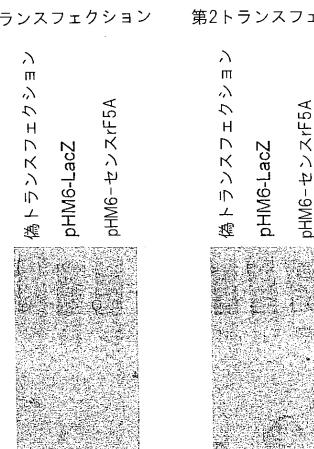
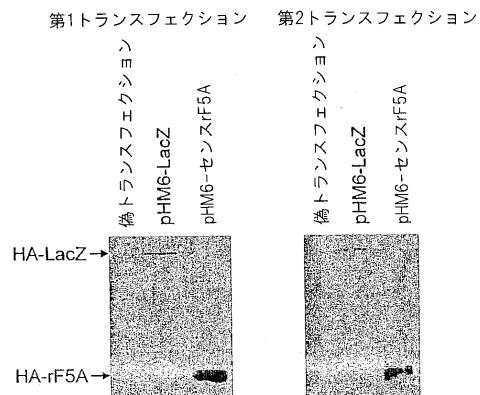


FIG.37A

【図37B - C】



第1トランスクエクション 第2トランスクエクション

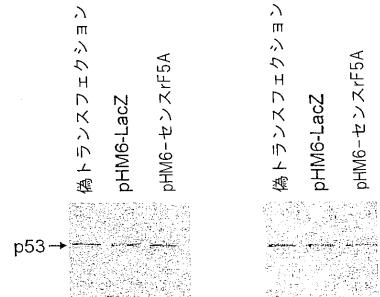


FIG.37C

【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 VEMSTSKTGK
PCR	MADEIDFTTG DAGASSTYPM QCSALRKNGF VVLKGRPCKI VEMSTSKTGK
コンセンサス	MADEIDFTTG DAGASSTYPM QCSALRKNGF VVLKGRPCKI VEMSTSKTGK
51	100
XM_113401	HGHAKVHLVG IDIFTGKKYE DICPSTHNMD VPNIKRNDYQ LICIQDGYLS
PCR	HGHAKVHLVG IDIFTGKKYE DICPSTHNMD VPNIKRNDYQ LICIQDGCLS
コンセンサス	HGHAKVHLVG IDIFTGKKYE DICPSTHNMD VPNIKRNDYQ LICIQDGCLS
101	150
XM_113401	LLTETGEVRE DLKLPEGELG KEIEGKYNAG EDVQVSVMCA MSEYYAVAIIK
PCR	LLTETGEVRE DLKLPEGELG KEIEGKYNAG EDVQVSVMCA MSEYYAVAIIK
コンセンサス	LLTETGEVRE DLKLPEGELG KEIEGKYNAG EDVQVSVMCA MSEYYAVAIIK
151	
XM_113401	PCK
PCR	PCK
コンセンサス	PCK

FIG.38

【図39】

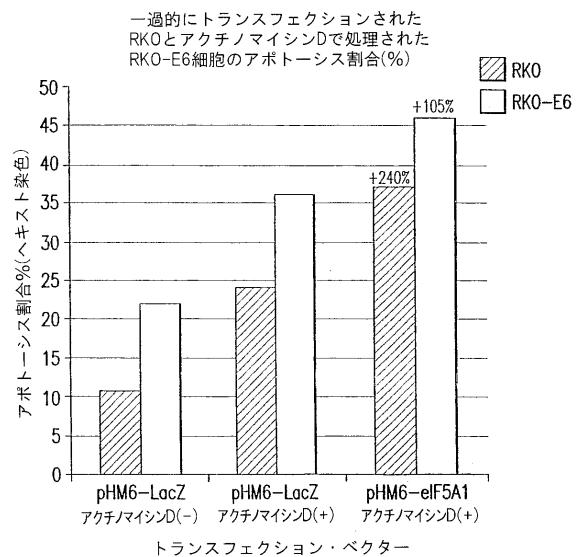


FIG.39

【図40】

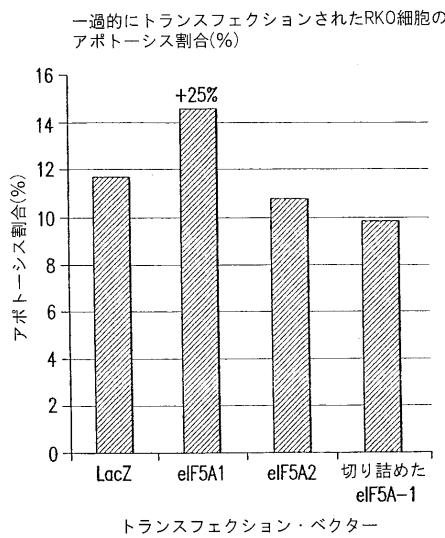


FIG.40

【図41】

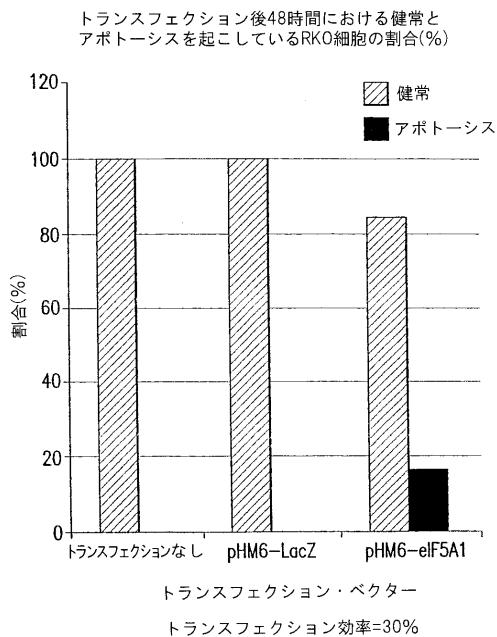


FIG.41

【図42】

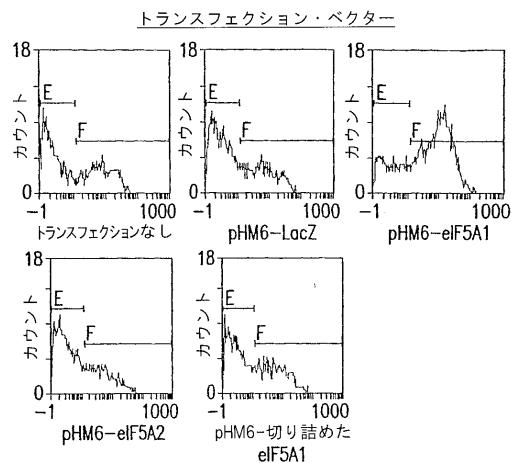


FIG.42A

トランسفエクションされたプラズミド	アボトーシス割合(%)
トランسفエクションなし	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سفエクションなしにおけるアボトーシスのバックグラウンドについて、及びトランسفエクション効率について補正を行った

FIG.42B

【図44】

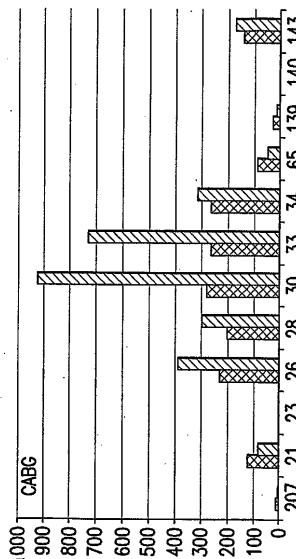


FIG.44

【図45】

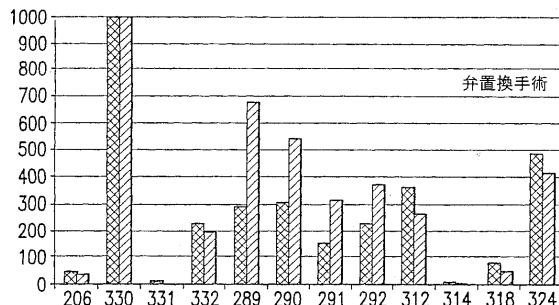


FIG.45

【図43】

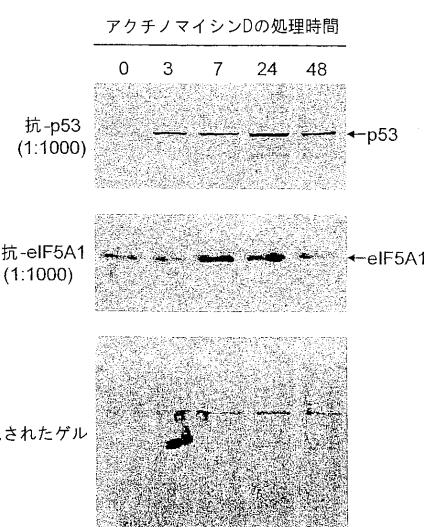
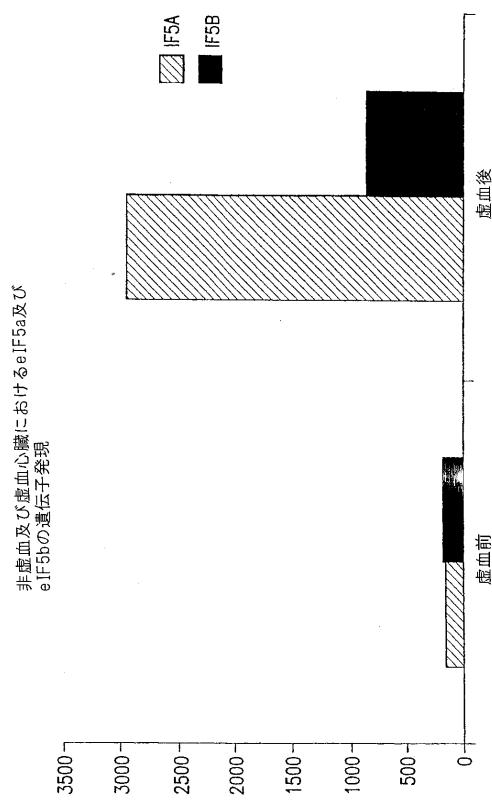


FIG.43

【図46】



【図47】

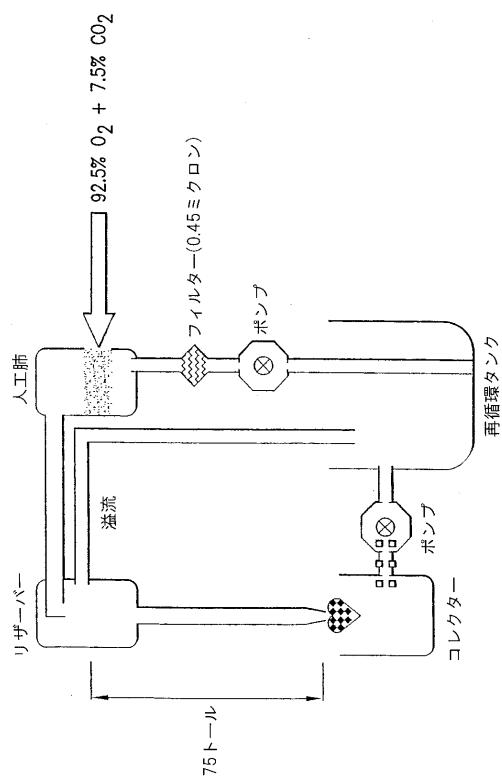


FIG.47

■ 37°Cに加熱

【図48】

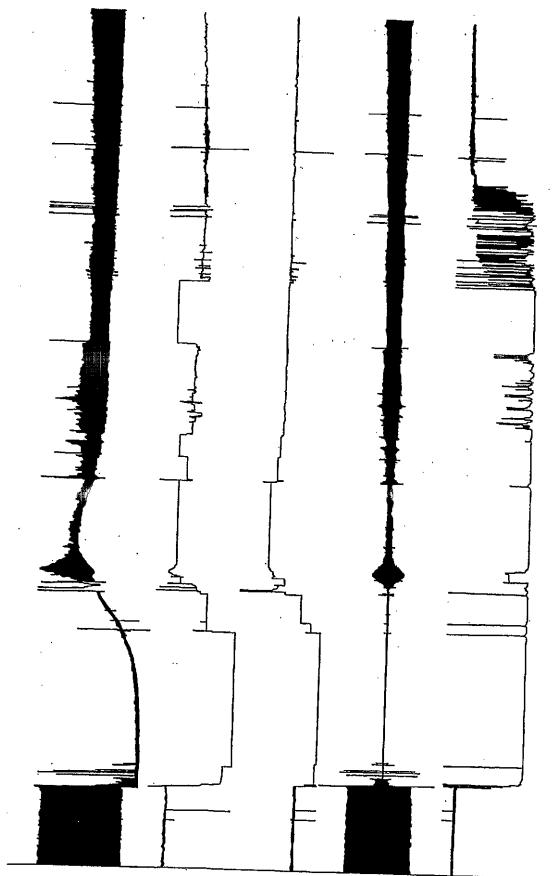


FIG.48

【図49】

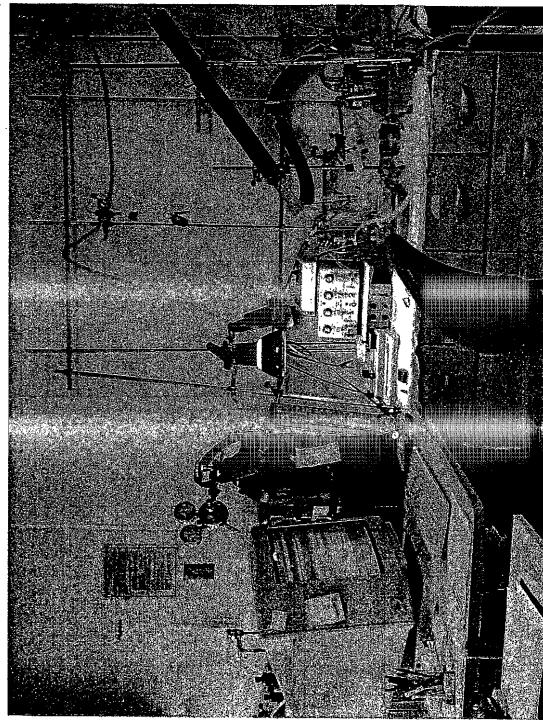


FIG.49

【図50A-B】

患者	Ds	IF5a1		IF5a2		0.5	2.0	IL-18		IL-1b
		pg/ng rRNA	pg/ng rRNA	pg/ng rRNA	pg/ng rRNA			pg/ng rRNA	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	#DN/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		IF5a2		0.5	2.0	IL-18		IL-1b
		pg/ng rRNA	pg/ng rRNA	pg/ng rRNA	pg/ng rRNA			pg/ng rRNA	pg/ng rRNA	
206	弁置換手術	44.4	33.1	1.3	0.7	50.0	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

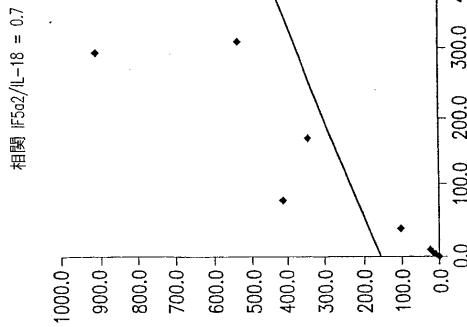


FIG.50D

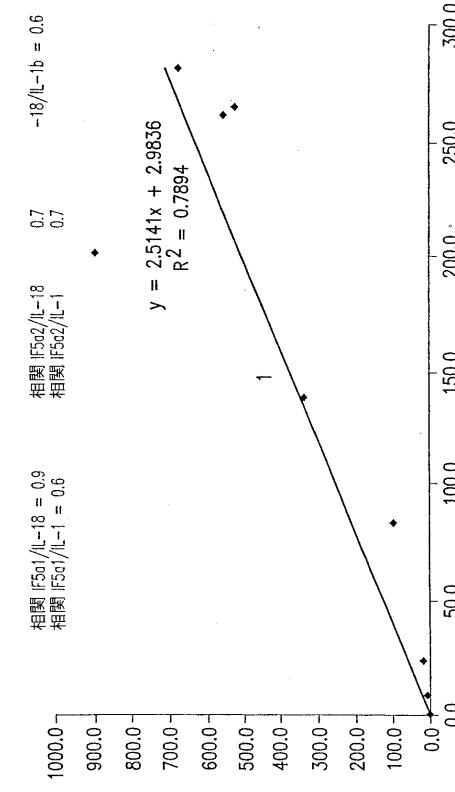


FIG.50C

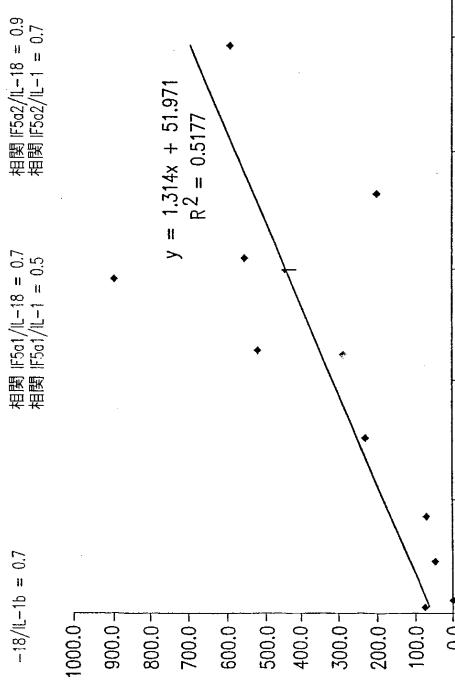


FIG.50E

【図 50F】

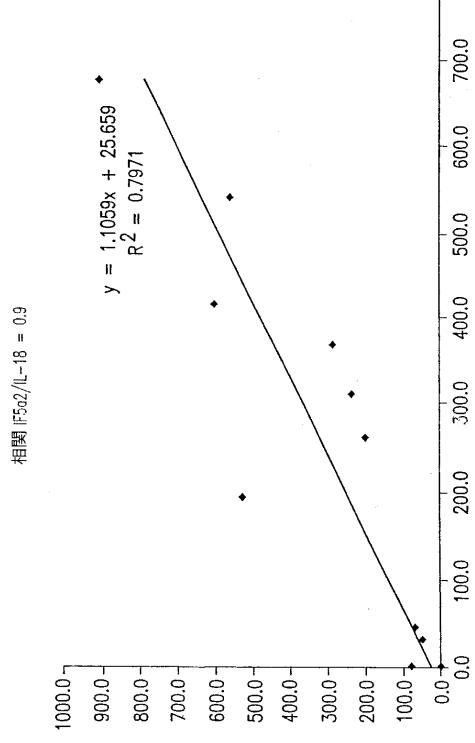


FIG.50F

【図 51A】

FIG.51からのお焼き						
39	77	M	N	CABG	コウマディン, コヨザール, ジコール, HOTZ, コルチオアロン(Corticosterone)	
41	74	F	Y	AIR/CABG	Dig.ゼストリル	
42	59	W	Y	CABG	スタチン, アテノロール, グルコトロール, シンバスタチン, ベラバミル	
44	64	M	Y	CABG	アテノロール, NTG, リシンブリジン, ベラバミル	
47	64	M	N	CABG	NTG, リシンブリジン, シンバスタチン	
48	56	M	Y	CABG	NTG, メトプロロール, グリビジド, シンバスタチン	
52	70	M	Y	CABG	ホノノブリル, グリビジド, HCIZ, フェジビン, メトプロロール,	
53	55	M	Y	CABG	ラシックブリド, グリブリド, ニフェジビン	
54	48	N	Y	CABG	ラシックブリド, メトブロロール, NTG, ラシックス(aspirin), ASA, シンバスタチン, INS	
55	67	W	N	CABG	ASA, ブレニゾン, アテノロール, リシンブリル, NTG	
56	71	W	Y	CABG	ASA, シンバスタチン, アテノロール, リシンブリル	
58	70	M	Y	CABG	コウマディン, シンスロロイド, NTG, グリブリド	
59	55	M	Y	CABG	リシンブリル, NTG, グリブリド, メトブロロール, シンバスタチン	
60	55	N	Y	CABG	メトホルミン, グリブリド, ASA, アテノロール, リシンブリル, シンバスタチン	
61	68	M	Y	CABG	アテノロール, ラシックス, ホノノブリル, シンバスタチン, グリブリド	
61	68	M	Y	CABG	アテノロール, ラシックス, ホノノブリル, シンバスタチン, グリブリド	
62	76	M	N	CABG	ゲンフィロジル, ASA, メトブロロール, NTG	
64	61	W	N	MR		

FIG.51Aに続く

【図 51】

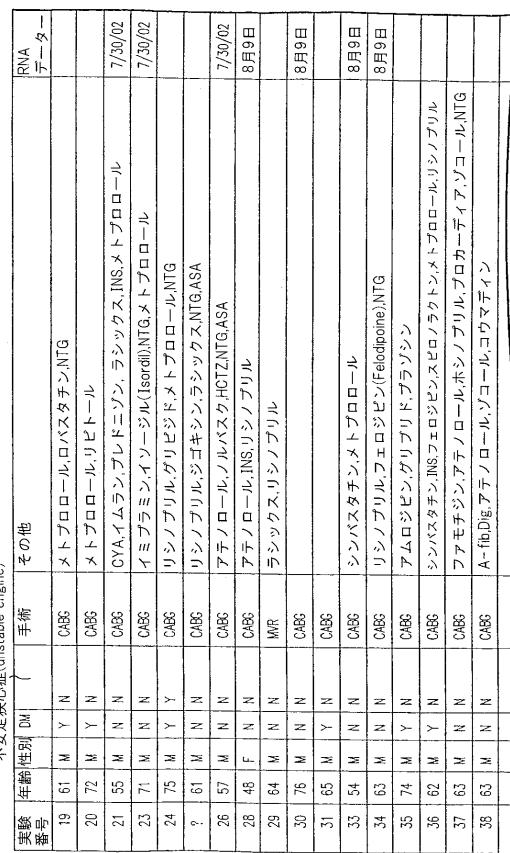


FIG.51Aに続く

FIG.51

【図 51B】

FIG.51Aからの焼き						
64	61	M	N	MOR		
65	72	M	N	Y	CABG	ASA, NTG
67	69	M	Y	N	CABG	
138	75	M	Y	N	CABG	リシンブリル, シンバスタチン, メトホルミン, グリブリド
139	71	M	N	Y	CABG	メトプロロール, ダイアジド(Diazide), リビートカルデュラ, アムロジド, NTG, ヘパリン
140	86	M	N	Y	CABG	メトプロロール, アムロジド, NTG, ヘパリン
141	65	M	Y	N	CABG	ASA, クロビドグレル, グリビド, リシンブリル, INS
142	75	F	Y	N	CABG	グリブリド, アテノロール, リシンブリル, マキシンド(Maxide), メチルドバ
141	44	M	N	N	CABG	アテノロール, リシンブリル, リシンバスタチン
144	57	M	N	N	AIR	アブリノール, コルチゾン, ミノシジル, アテノロール, ラシックス, プレニゾン, シンバスタチン
145	67	M	N	N	CABG	リビートレ, メトブロロール, NTG, ASA
146	42	M	N	N	CABG	アテノロール, ノルバスク, NTG
147	71	M	N	N	MR	Dig, ベラバミル, コウマデイン
148	71	F	N	N	CABG	リシンブリル, フエロジビン(Endophytone), NTG
150	70	M	Y	N	CABG	フェロジビン, HCIZ, INS, シンスロロイド, ロサリターン, アテノロール, リシンブリル
151	78	F	Y	N	CABG	Dig, NTG, リシンブリル, カベドロール(Cavedolol), INS

FIG.51Dに続く

FIG.51B

【図 5 1 C】

FIG.5IBの続き						
152	50	M	N	N	CABG	リシノブリル,NTG,ラシックス,メトプロロール
153	48	M	N	N	AVR	
154	67	M	N	N	CABG	シンバスタチン,リシノブリル,アテノロール
155	59	M	N	N	CABG	リシノブリルASA,メトプロロール,シンバスタチン
156	62	M	Y	N	CABG	NTG,グリブリド,アトルバスタチン,アテノロール
161	56	M	Y	N	MVR	INS,メトプロロール,NTG,シンバスタチン,リシノブリル
162	23	F	N	N	MVR	
163	72	M	N	N	AVR	シンバスタチン,フェロジビン,ジメチジン
164	65	F	N	N	MVR	多弁(Multi valve)Dz, A-fib,メトプロロール,DIG,コウマディン
166	57	F	N	N	MVR	シンスロイド
173	60	M	N	N	AVR	
177	66	F	N	N	MVR	重篤MR(Severe MR),リシノブリル
184	46	M	N	N	MVR	バソテック
185	75	M	N	Y	CABG,MVR	トプロール(Tropocal),カボテン,プラビックス,シンスロイド
201	50	M	N	N	AVR	ラシックスD/(前)に氷でインキュベーションした

【図 5 1 D】

FIG.5ICの続き						
206	58	M	N	N	AVR	バソテック
207	68	M	N	N	CABG	シンバスタチン,アテノロール
211	51	M	N	N	AVR	FF<20%
289	45	M	N	N	AVR	
290	77	M	N	N	MVR	
291	55	F	N	N	AVR	
292	39	M	N	N	MVR	
310	67	F	N	N	AVR/MVC	
312	72	F	N	N	AVR	
314	75	F	N	N	AVR	
318	62	M	N	N	AVR	
329	70	M	N	N	AVR	
330	67	M	N	N	AVR	
331	58	M	N	N	AVR	
339	69	M	N	N	AVR	

【図 5 2】

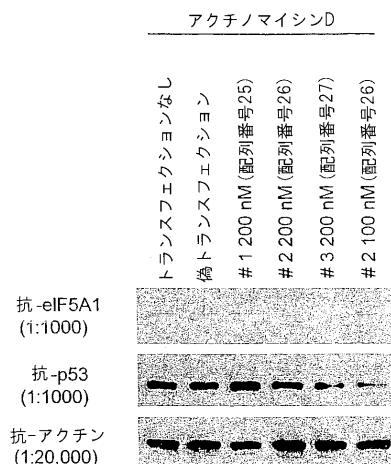


FIG.52

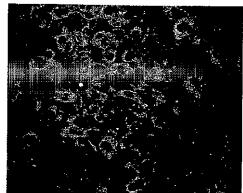


FIG.53A

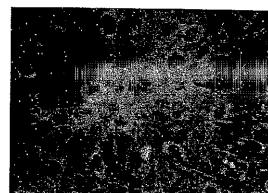


FIG.53B

【図 5 4】

アンチセンス・オリゴヌクレオチドで4日間及びカンプトテシンで2日間処理後の筋骨筋板細胞#506のアポトーシス割合(%)

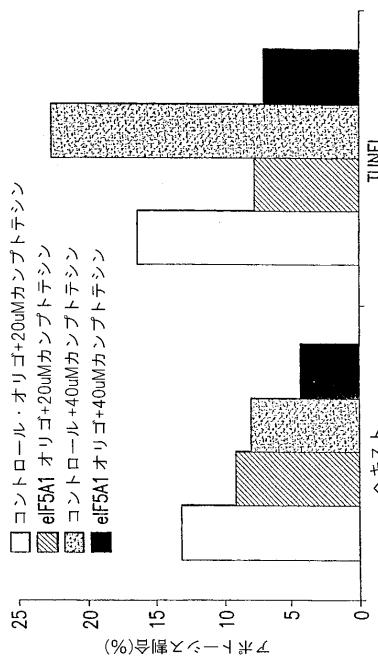


FIG.54

【図 5 5】

アンチセンス・オリゴヌクレオチドで2日間及びカンプトテシンで3日間処理後の筋骨筋板細胞#506のアポトーシス割合(%)

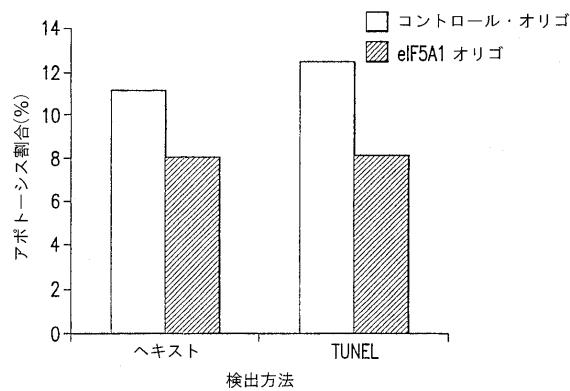


FIG.55

【図 5 6】

アンチセンス・オリゴヌクレオチドで5日間及びカンプトテシンで3日又は4日間処理後の筋骨筋板細胞#517のアポトーシス割合(%)

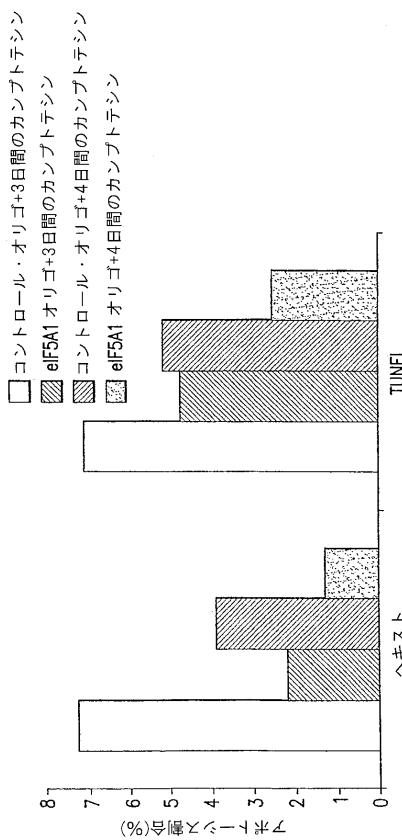


FIG.56

【図 5 7】

アンチセンス・オリゴヌクレオチドで5日間及びカンプトテシンで3日間処理後の筋骨筋板細胞#517のアポトーシス割合(%)

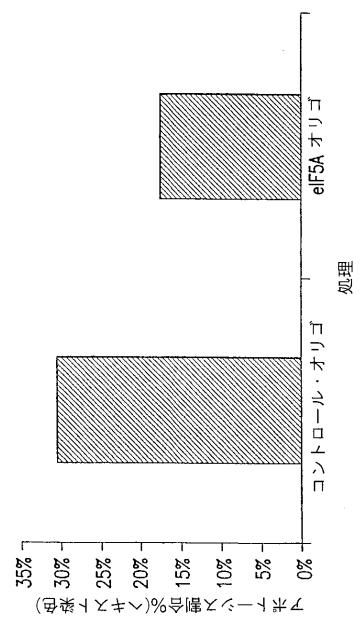
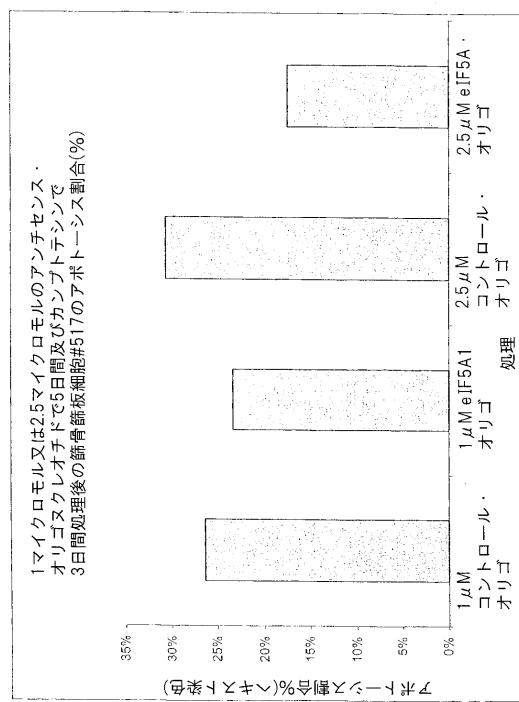
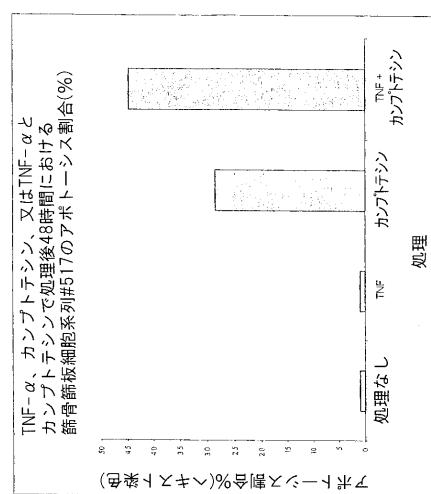


FIG.57

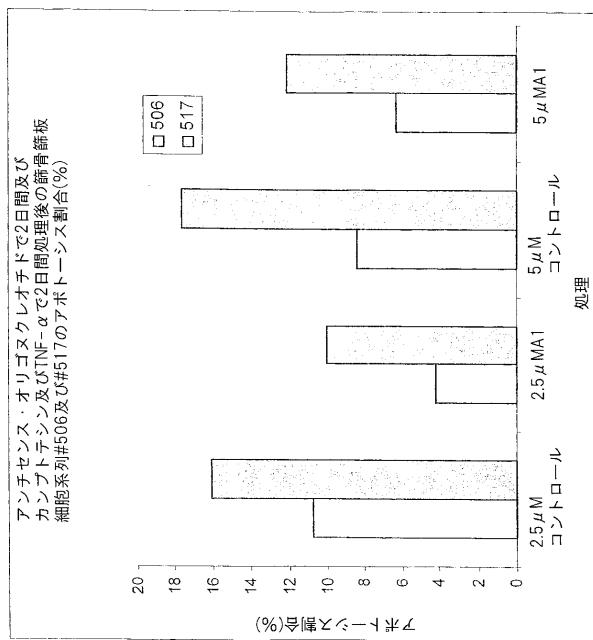
【図 5 8】



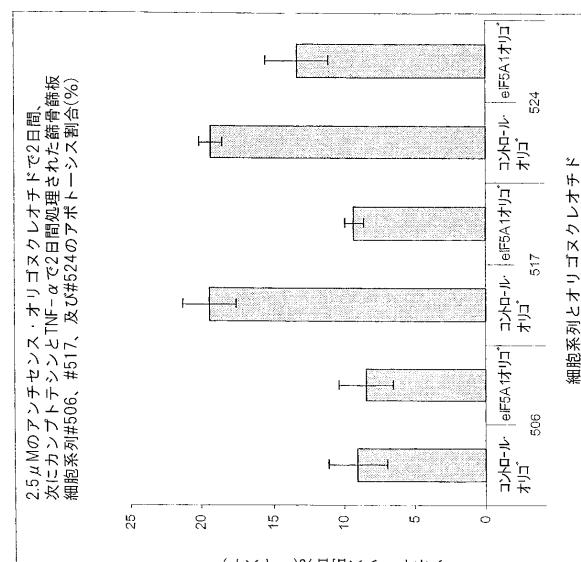
【図 5 9】



【図 6 0】

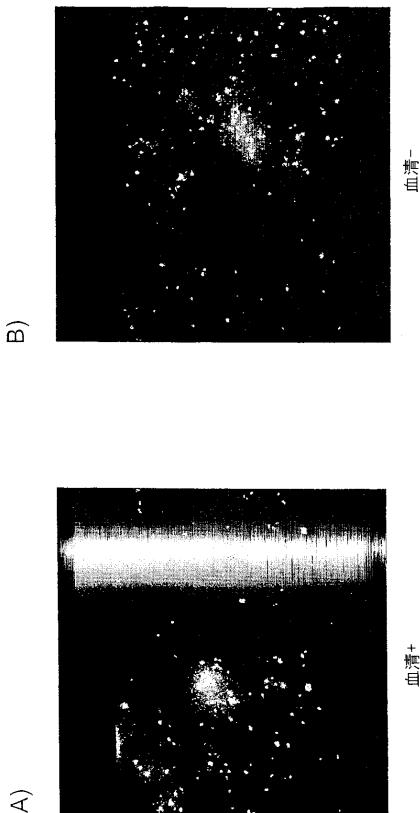


【図 6 1】



【図62】

Figure 62



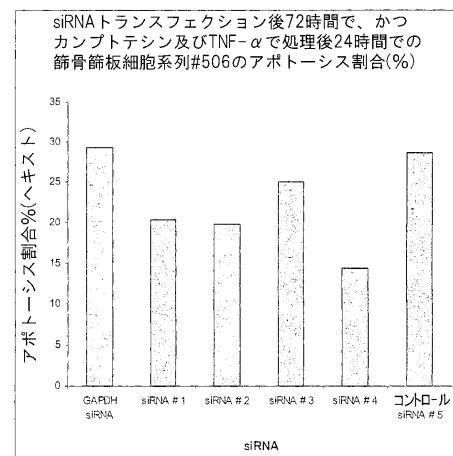
【図64】

Figure 64

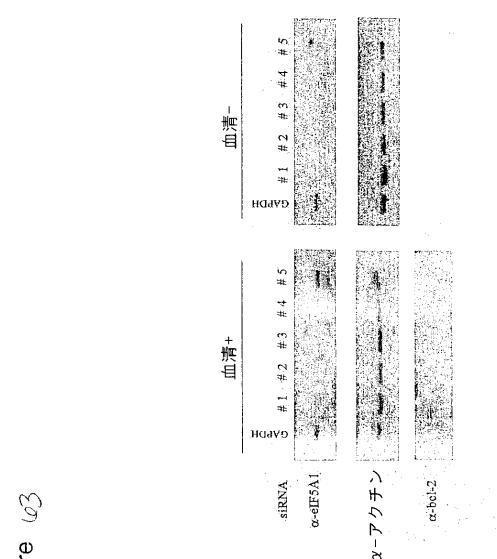


【図65】

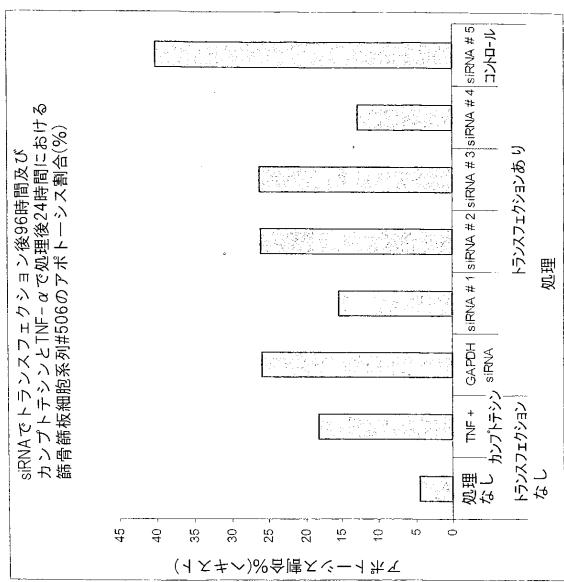
Figure 65



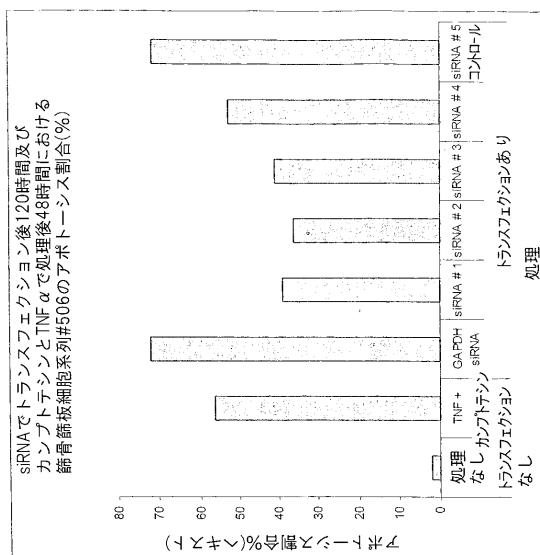
【図63】



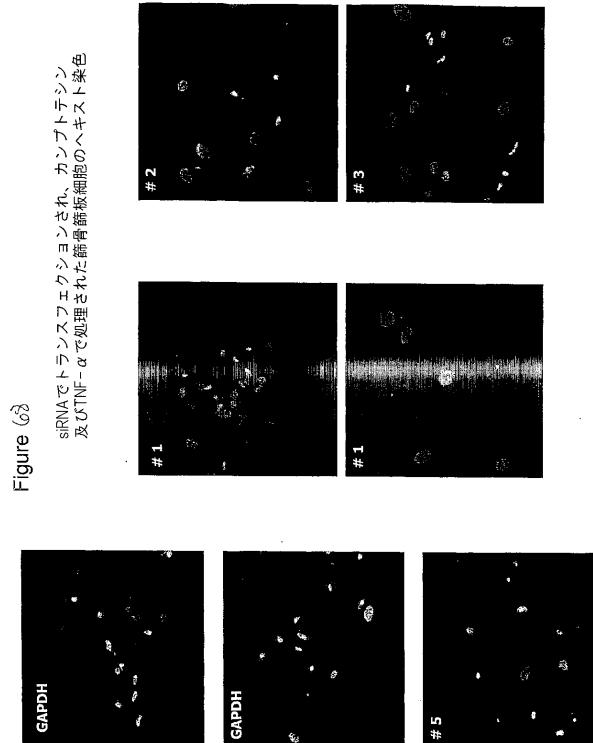
【図 6 6】



【図 6 7】



【図 6 8】



【図 6 9】

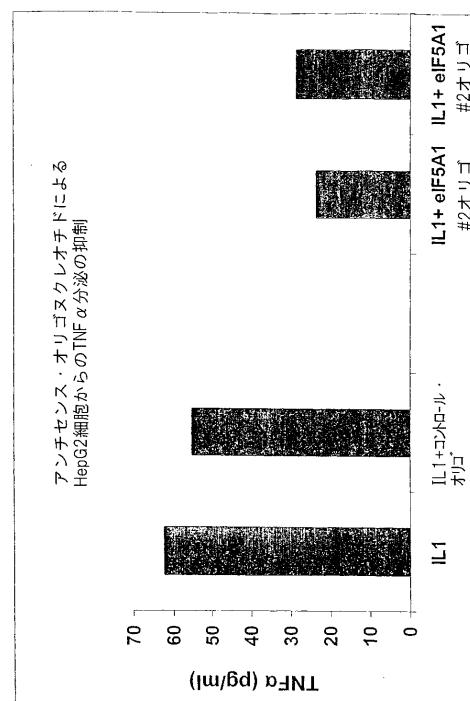


Figure 69

【 図 7 0 】

Figure 70

【図 7-2】

【図71】

標的	5'- CCT GTC TCG AAG TCC AAG TC -3' (配列番号*6)
標的	5'- GACTTGGACTCTGAGACAA GG-3'
標的	5'- AGAACCTTGG CGT CCT GC -3' (配列番号*7)
標的	5'- GCAAGCCGC AGCCAAAGGTC -3'
標的	5'- CTC GTAA CCT CCC CGC CCT TTG C -3' (配列番号*8)
標的	5'- GGACAGCGG GGAAAGTACGA -3'

Figure 71

【図73A】

ヒトeIF5A1(受託番号NM_001970)及びヒトeIF5A2(受託番号NM_020390)のスクレオチド配列比較を行った

eIF5a1	1	ATGGCAGATG ACTTGGACTT CGGACAGGA GATGCAGGG CCTCACGCC
eIF5a2	1	ATGGCAGACG AAATTGATTT CACTACTGGA GATGCCGGG CCTCCAGCAC
eIF5a1	51	CTTCCAATG CAGTGCCTCG CATTACGAA GAATGGCTT GTGGTGTCTA
eIF5a2	51	TTACCCATG CAGTGCCTCG CTTGCGCAA AAACGGCTTC GTGGTGTCTA
eIF5a1	101	AAGGCCGCC ATGAAAGATC GTCCGAGATGT CTACTTGGAA GACTGCCAAG
eIF5a2	101	AAGGACGACC ATGCAAAATC GTGGAGATGT CAACCTTCAA AAATGGAAAG
eIF5a1	151	CAGGCCACG CCAAGGTC A TCTGGTTGGT ATTGACATCT TtACTGGAA
eIF5a2	151	CAAGGTCATG CCAAGGTC A CTTGGTTGG ATTGATATTCT TcACGGCAA
eIF5a1	201	GAAATATGAA GATATCTGCC CGTCAACTCA tATATGATG GTCCCAAACA
eIF5a2	201	AAAATATGAA GATATTGTC CTTCTACTCA cAACATGGAT GTCCCAAATA
eIF5a1	251	TCAAAAGGAA TGACTtCAG CTGATTGGCA TCCAGGATGG GTACSTATCA
eIF5a2	251	TTAACGAGAAA TGATTatCAA CTGATATGCA TTCAAGATGG TTACCTTTC
eIF5a1	301	CTGCTccag ACAGCGGGGA GGTACGAGAG GACCTTCTGC TcCCGTAGGG
eIF5a2	301	CTGCTgacG AAACCTGGTA AGTTCTGTAG GATCTTAAAC TgCCAGAAGG
eIF5a1	351	AGACCTTGGC AAAGGAGATT AGcagAGTA CGACTGTGGA AAAGAGATCC
eIF5a2	351	TGAACTAGGC AAAGAAAATAG AGggAAATA CAATGCAAGT GAAGATGTAC
eIF5a1	401	TGATCACCGT GCTGtCTGCC ATGACAGGG AGGCAGCTGT TGCAATCAAG
eIF5a2	401	AGGTGCTGT CATGtgTCGA ATGAGTGAAG AATATGCTGT AGCCATAAAA
eIF5a1	451	GCCatGCAA AATaa
eIF5a2	451	CCt...GAA ATAA.

FIG. 73A

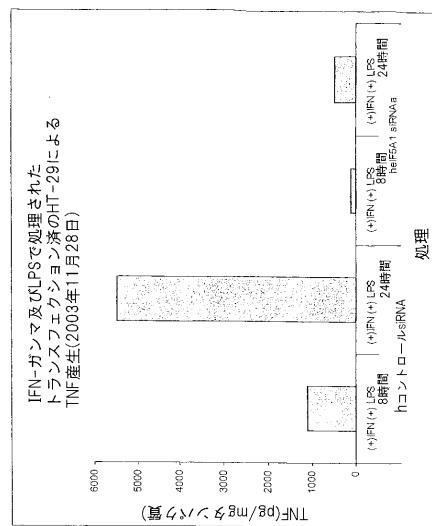
【図 7 3 B】

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

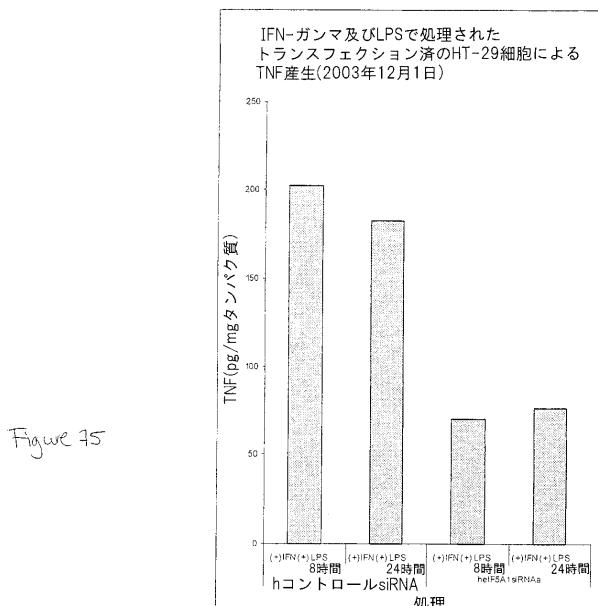
eIF5A1	1	MADDLDEFG DAGASATIHM QCSALKRKG F WLKGPKKI VENSASTKTK
eIF5A2	1	MAADEDFTTG DAGASATIHM QCSALKRKG F WLKGPKKI VENSASTKTK
eIF5A1	51	HGHAKVHLNG IDITGKKE DICPSTHNM D VPNIKRNDQ LIGIODOGLS
eIF5A2	51	HGHAKVHLNG IDITGKKE DICPSTHNM D VPNIKRNDQ LIGIODOGLS
eIF5A1	101	LLQDSGEVPE DLRLPGDG KTEEQKYOCG EELLTLLSA MTEEAIAIK
eIF5A2	101	LLTETGEVRE DLKLPEGEGK KTEGKRYNAG EDVQYSYMC A MEEYAVAIK
eIF5A1	151	amak
eIF5A2	151	pck.

FIG. 73B

【図 7 4】



【図 7 5】



【図 7 6】

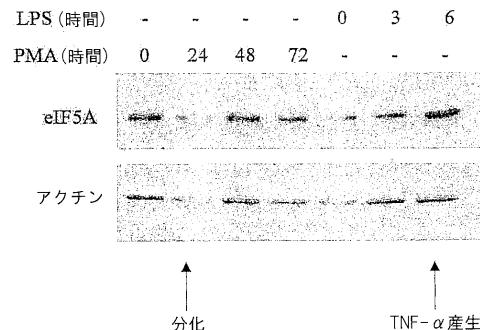


Figure 76 U-937分化実験のタイムコース

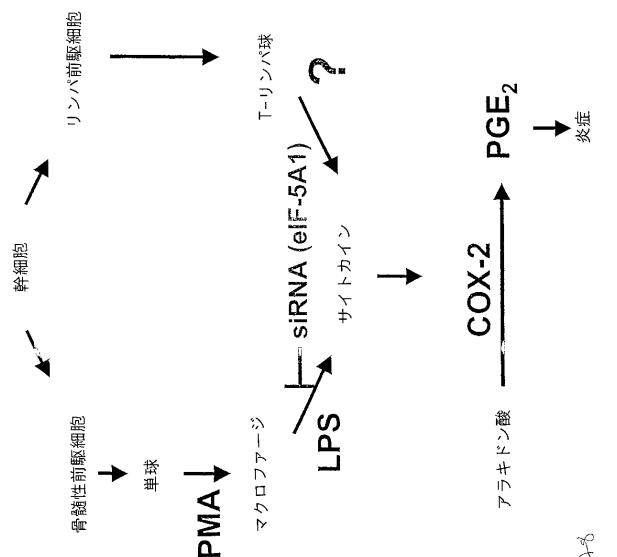
【図 7 7】

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

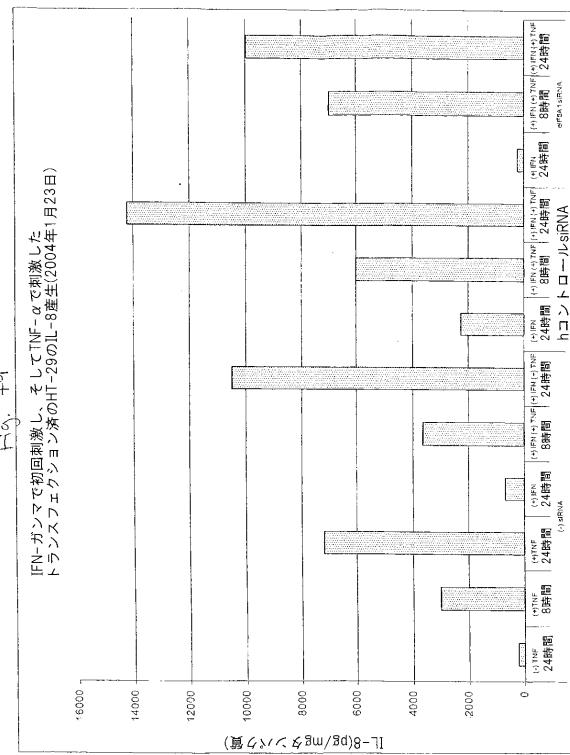
ウェスタンプロット



【図 78】

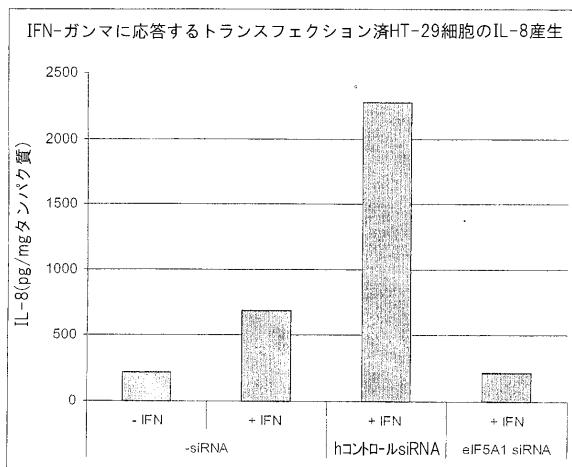


【図 79】



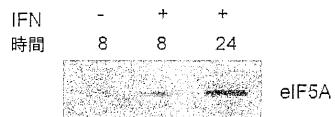
【図 80】

Fig. 80



【図 81】

Fig. 81

C) IFN- γ で8又は24時間処理されたHT-29細胞のウェスタンプロット

【図 8 2】

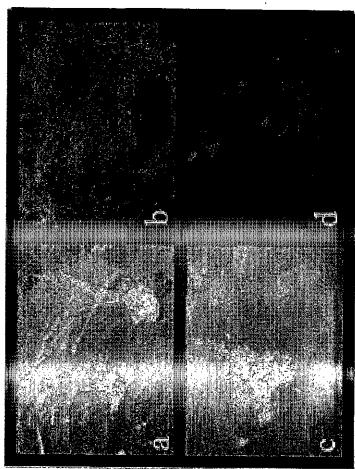
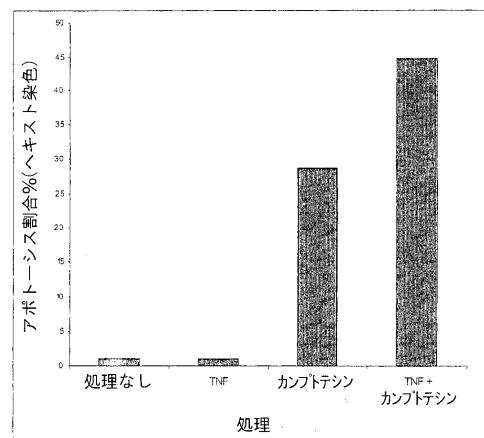


Figure 82

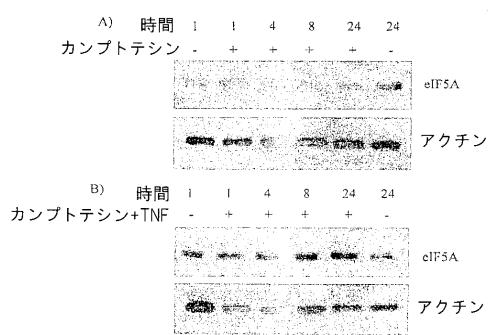
【図 8 3】

Figure 83



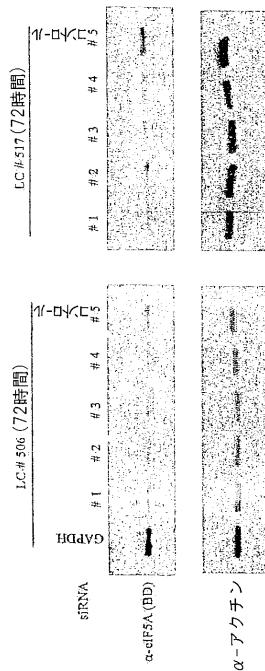
【図 8 4】

Figure 84



【図 8 5】

Figure 85



【 図 8 6 】

【 図 8 7 】

Figure 86

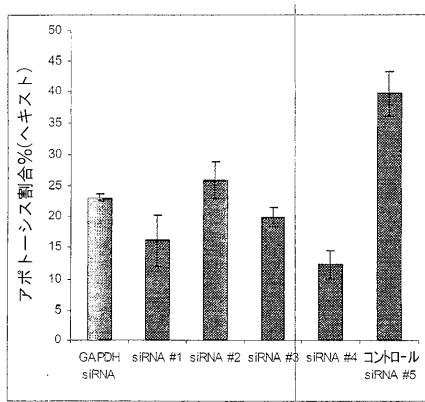
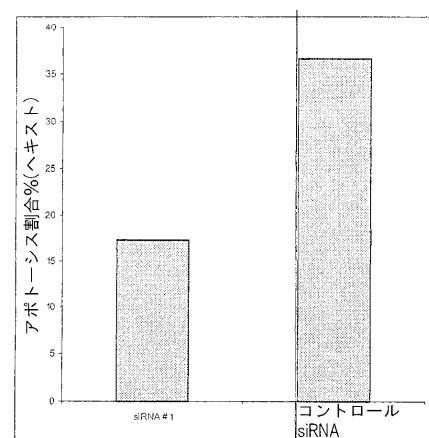


Figure 87

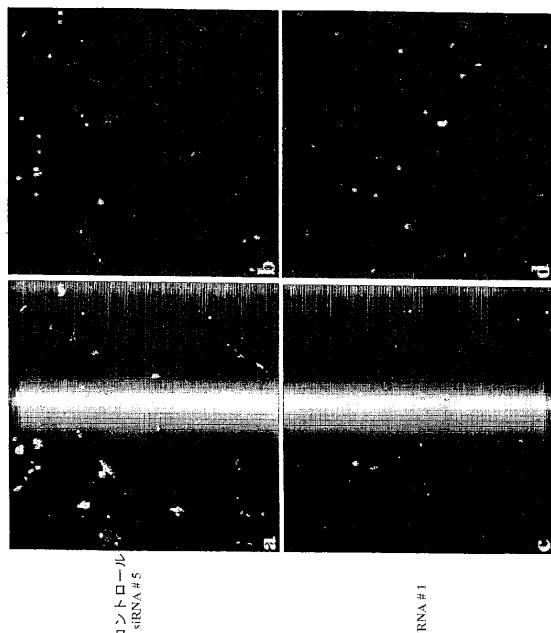


【図 8 8】

【 図 8 9 A 】

Figure 88

B
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

siRNA #1 標的
siRNA #2 標的
siRNA #3 標的

【図 8 9 B】

siRNA標的の位置及び配列、並びにBLAST結果siRNA#₁ 標的位置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' AAAGGAAUGACUUCAGCUGAdTdT 3'
3' dTdTUUCUUACUGAAGGUCGACU 5'siRNA#₂ 標的位置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' AAGAUCGUUCGAGAUUGCUACUdTdT 3'
3' dTdTUUCUAGCACUCAAGAUGA 5'siRNA#₃ 標的位置284～304(開始点に対し163～183bp)%G/C=43.4

BLAST=eIF5Aそのもの

標的 5' AA(GGTCCATCTGGTTGGTATT) 3'

siRNA 5' AAGGUCCAUCUGGUUUGGUAUUdTdT 3'
3' dTdTUUCAGGUAGACCAACCAUAA 5'siRNA#₄ 標的位置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(GCTGGACTCCCTCACACA) 3'

siRNA

5' AAGCUGGACUCCUCCUACACAdTdT 3'
3' dTdTUUCGACCUGAGGGAGGAUGUGU 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(AGTCGACCTTCAGTAAGGA) 3'

siRNA----- 5' AAAGUCGACCUUCAGUAAGGAdTdT 3' -----
3' dTdTUUCAGCUGGAAGUCAUUCU 5'Fig 89
continued

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Application No 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		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/010286 A (SENESCO 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		
Date of the actual completion of the international search 16 August 2004		Date of mailing of the International search report 31/08/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 16 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Andres, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

I 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	<p>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</p>	1,5,19, 21
A	<p>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</p>	
A	<p>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>	
P,X	<p>US 2003/225022 A1 (HEIKKILA ELIZABETH MARGARET ET AL) 4 December 2003 (2003-12-04) cited in the application</p> <p>paragraph '0118! - paragraph '0123! paragraph '0136! - paragraph '0147! paragraph '0275! - paragraph '0280! paragraph '0286!</p>	1-4,6,7, 10,16, 17,26, 27,31, 32,35,36
P,X	<p>WO 03/095613 A (SENESCO TECHNOLOGIES INC) 20 November 2003 (2003-11-20) cited in the application</p> <p>page 9, line 18 - line 23 page 22 - page 24 page 27</p>	12,13, 16,17, 31,32, 35,36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2004/006598

Box No. I 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 PCT/US2004/006598	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03010286	A 06-02-2003	US 2003064952 A1 CA 2454822 A1 WO 03010286 A2 US 2003016710 A1 US 2003050272 A1 US 2003144238 A1 US 2003225022 A1 WO 03095613 A2	03-04-2003 06-02-2003 06-02-2003 23-01-2003 13-03-2003 31-07-2003 04-12-2003 20-11-2003
US 2003225022	A1 04-12-2003	US 2003144238 A1 US 2003050272 A1 US 2003064952 A1 WO 2004037984 A2 WO 03095613 A2 CA 2454822 A1 WO 03010286 A2 US 2003016710 A1	31-07-2003 13-03-2003 03-04-2003 06-05-2004 20-11-2003 06-02-2003 06-02-2003 23-01-2003
WO 03095613	A 20-11-2003	US 2003064952 A1 US 2003050272 A1 CA 2454822 A1 WO 03010286 A2 WO 03095613 A2 US 2003016710 A1 US 2003144238 A1 US 2003225022 A1	03-04-2003 13-03-2003 06-02-2003 06-02-2003 20-11-2003 23-01-2003 31-07-2003 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,M,D,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 22
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 76132 , フォート ワース , ゴールデン ゲート ドライブ 7
033

(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 24エヌ , ワーテルロー , チャンセリー レーン 546

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