(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4986816号
(P4986816)

(45)発行日　平成24年7月25日(2012.7.25)　(24)登録日　平成24年5月11日(2012.5.11)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 48/00	(2006.01)	A61K	48/00	ZNA
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00	
A61K 31/7088	(2006.01)	A61K	31/7088	
C12N 15/113	(2010.01)	C12N	15/00	G

請求項の数 4　(全 16 頁)

(21)出願番号　特願2007-292474 (P2007-292474)
(22)出願日　平成19年11月9日 (2007.11.9)
(62)分割の表示　特願平9-191635の分割
　原出願日　平成9年7月16日 (1997.7.16)
(65)公開番号　特開2008-120809 (P2008-120809A)
(43)公開日　平成20年5月29日 (2008.5.29)
　審査請求日　平成19年11月9日 (2007.11.9)

前置審査

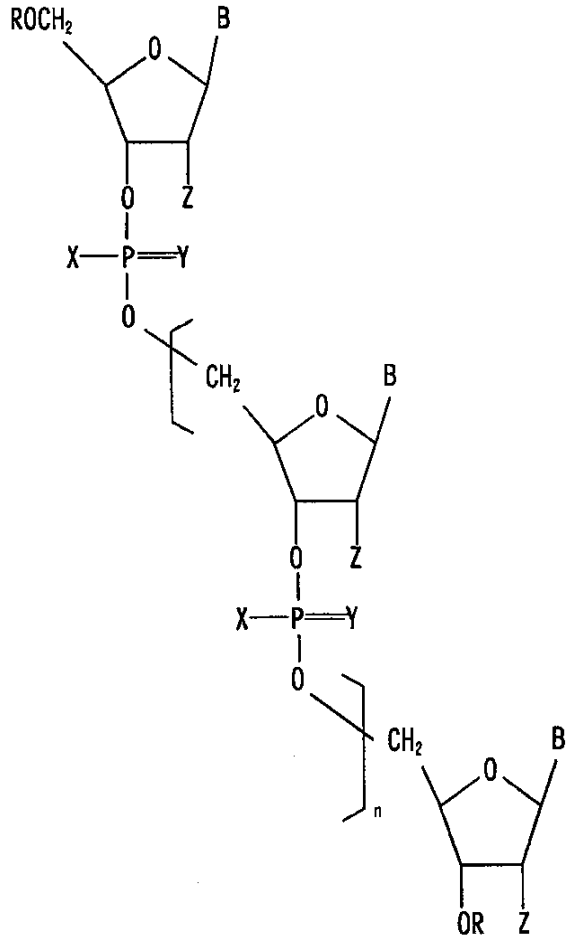
(73)特許権者　595090392
杉山　治夫
大阪府箕面市船場西２－１９－３０
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100087871
弁理士　福本　積
(74)代理人　100087413
弁理士　古賀　哲次
(74)代理人　100108903
弁理士　中村　和広
(74)代理人　100117019
弁理士　渡辺　陽一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ウイルムス腫瘍遺伝子（ＷＴ１）に対する発現阻害物質を含んで成る固形腫瘍治療剤

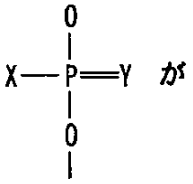
(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
下記一般式：

【化１】

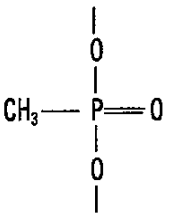


［式中、
Ｘは、独立して酸素（Ｏ）、イオウ（Ｓ）、メチル基又はエチル基あるいは一級アミンまたは二級アミンであり；
Ｙは、独立して酸素（Ｏ）またはイオウ（Ｓ）であり；
Ｚは、水素または水酸基であり；
Ｂの配列は、
Ｚが水素のとき、５′-AGGGTCGAATGCGGTGGG-３′（配列番号：２）又は５′-GTCGGAGCCCATTTGCTG-３′（配列番号：６）であり、
Ｚが水酸基のとき、前記配列番号：２又は配列番号：６において、Ｔ（チミン）がＵ（ウラシルにより置き換えられており；
Ｒは、独立して水素またはジメトキシトリチル基あるいはメチル基又はエチル基であり；そして
ｎは16である］
により表わされる、ウイルムス腫瘍遺伝子（WT1）に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を含んで成る、胃癌、肺癌又は卵巣癌の治療剤。
【請求項２】

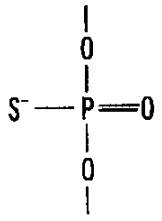
【化２】



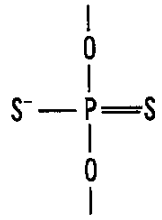
が



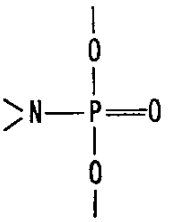
メチルホスホネート



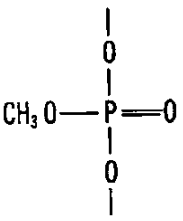
ホスホロチオエート



ホスホロジチオエート



ホスホロアミデート



リン酸トリエステル

のいずれかである、請求項１に記載の治療剤。

【請求項３】

前記Ｂの配列が、５′-AGGGTCGAATGCGGTGGG-３′（配列番号：２）から成る、請求項１又は２に記載の治療剤。

【請求項４】

前記Ｂの配列が、５′-GTCGGAGCCCATTTGCTG-３′（配列番号：６）から成る、請求項１又は２に記載の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】
【０００１】
本発明はウイルムス腫瘍遺伝子（WT1）に対する発現阻害物質を含んで成る、固形腫瘍治療剤に関する。
【背景技術】
【０００２】
ウイルムス(Wilms) 腫瘍は、染色体11p13に位置するウイルムス腫瘍遺伝子（WT1）の両対立遺伝子の不活性化により生ずる小児腎腫瘍である(Call KM et al., Cell 60：509, 1990)。ＷＴ１の非コード上流配列 (C.E.Camphellら、Oncogene 9：583-595, 1994)及びイントロンを含むコード領域(D.A.Haberら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 88：9618-9622, (1991))はすでに報告されており、腫瘍等の増殖及び分化に関与することが予想される(D.A.Haberら、前掲）。
【０００３】
また、本発明者らは、WT1が白血病細胞の増殖に関与している（K. Inoue, et al., Blood, 84 (9) 3071-3079 (1994)）ことから、ＷＴ１に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体が白血病細胞の増殖を抑制・阻害することを見い出した（PCT特許公開WO96/38176）。しかしながら、WT1の発現阻害物質が固形腫瘍の増殖を抑制・阻害することは知られていない。
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００４】
従って本発明は、ウイルムス(Wilms) 腫瘍遺伝子（WT1）に対する発現阻害物質を含んで成る固形腫瘍の治療剤を提供するものである。
【課題を解決するための手段】
【０００５】
本発明は、WT1に対する発現阻害物質を含んで成る固形腫瘍治療剤を提供する。ここで、固形腫瘍とは、例えば胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等である。本発明で使用するWT1に対する発現阻害物質は、WT1の発現を阻害するものであれば何でもよく、たとえば、WT1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体、WT1に対して dominant negativeに働くWT1変異遺伝子および変異タンパク質、デコイ DNAなどの低分子阻害物質またはWT1に特異的に結合し転写活性を阻害するペプチドなどの低分子阻害物質など挙げられる。本発明で使用するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、例えば、WT1の転写キャッピング部位に対するもの、翻訳開始領域に対するもの、エクソンに対するものまたはイントロンに対するものなどのWT1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体である。
【０００６】
例えばWT1の転写キャッピング部位を含む領域のセンスDNA鎖の塩基配列は配列番号：９で表わされ、またWT1のコード領域のエクソン１～10のセンスDNA鎖の塩基配列は配列番号：10～19で表わされるが、本発明はこのようなWT1のセンスDNA鎖の塩基配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を用いる。このアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、通常WT1のアンチセンスDNA鎖またはRNA鎖の連続した５～50個、好ましくは、９～30個の塩基またはWT1のDNA鎖またはRNA鎖に結合することができるものであれば、断続的または部分的に相補的な５～70個、好ましくは、９～50個の塩基から成るアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体である。
【０００７】
転写キャッピング部位に対するものとしては、例えば次の塩基配列：５′-AGGGTCGAATGCGGTGGG -3′（配列番号：２）及び５′-TCAAATAAGAGGGGCCGG-３′（配列番号：４）などのものが挙げられる。また、翻訳開始領域に対するものとしては、翻訳開始コドンATG並びにその上流及び／又は下流を含む領域に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体が挙げられ、例えば次の塩基配列：５′-GTCGGAGCCCATTTGCTG-３′（配列番号：６）など

が挙げられる。

【０００８】

また、WT1のコード領域には10個のエクソンが含まれており、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、これらのエクソンのいずれかに含まれる配列に対するもの、又はスプライシング後に連続するいずれか２個のエクソンにわたる配列に対するものあるいは、連続するイントロンとエクソンにわたる配列に対するもの、全てのイントロン及び３′，５′側非コード領域の配列に対するものである。１例として、第６エクソンに対するものであり、次の塩基配列：５′-CGTTGTGTGGTTATCGCT-３′（配列番号：８）に対するものが挙げられる。

【０００９】

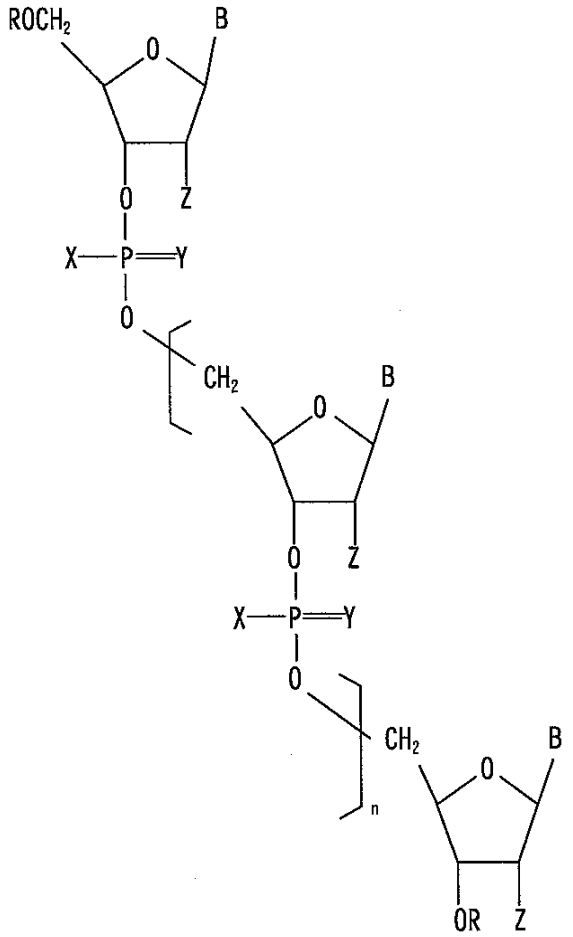
さらに、WT1のDNA鎖またはRNA鎖と断続的または部分的に相補的な塩基配列を有する本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は対応する領域については特に問わないが、これらの中には、WT1のDNA鎖またはRNA鎖を切断する機能を有するリボザイムのようなものも含まれる。

【００１０】

本発明において使用されるアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の構造は、化１に示したとおりであるが、Ｘは独立して酸素（Ｏ）、イオウ（Ｓ）、低級アルキル基あるいは一級アミンまたは二級アミンのいずれでもよい。Ｙは独立して酸素（Ｏ）あるいはイオウ（Ｓ）のいずれでもよい。Ｚは水素または水酸基である。ＢはＺが水素のときアデニン、グアニン、チミン、あるいはシトシンのいずれかから選ばれ、Ｚが水酸基のときアデニン、グアニン、ウラシルあるいはシトシンのいずれかから選ばれ、主としてWT1をコードするDNA又はmRNAの相補的オリゴヌクレオチドである。Ｒは独立して水素またはジメトキシトリチル基あるいは低級アルキル基である。ｎは７－28である。

【００１１】

【化１】

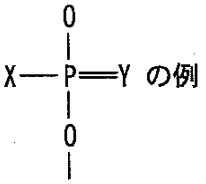


【００１２】

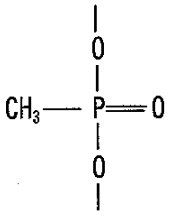
好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体としては修飾されていないアンチセンスオリゴヌクレオチドだけでなく、修飾されたアンチセンスオリゴヌクレオチドでもよい。この様な修飾体として、例えば前述のメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、その他ホスホロチオエート修飾体あるいはホスホロアミデート修飾体等が挙げられる（化２参照）。

【００１３】

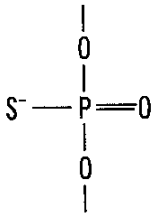
【化２】



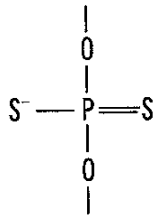
メチルホスホネート



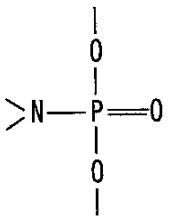
ホスホロチオエート



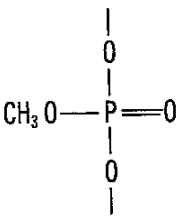
ホスホロジチオエート



ホスホロアミデート



リン酸トリエステル



【００１４】

これらのアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は次のとおり常法によって得ることができる。

化１のＸ及びＹがＯ、Ｚが水素又は水酸基であるアンチセンスオリゴヌクレオチドは市販のＤＮＡ合成装置（例えばApplied Biosystems社製など）によって容易に合成される。

【００１５】

Ｚが水素であるアンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチドの合成法はホスホロアミダイトを用いた固相合成法、ハイドロジェンホスホネートを用いた固相合成法などで得ることができる。

【００１６】

例えば、 T.Atkinson, M.Smith, in Oligonucleotide Synthesis：A Practical Approa

ch, ed.M.J.Gait, IRL Press, 35-81 (1984)； M.H.Caruthers, Science, 230, 281 (1985)； A.Kume, M.Fujii, M.Sekine, M.Hata, J.Org.Chem., 49, 2139 (1984)；B.C.Froehler, M.Matteucci, Tetrahedron Lett., 27, 469 (1986)； P.J.Garegg, I.Lindh, T.Regberg, J.Stawinski, R.Stromberg, C.Henrichson, ibid, 27, 4051 (1986)；B.S.Sproat, M.J.Gait, in Oligonucleotide Synthesis： A Practical Approach, ed.M.J.Gait, IRL Press, 83-115 (1984)； S.L.Beaucage and M.H.Caruthers, Tetrahedron Lett., 22, 1859-1862 (1981)；M.D.Matteucci and M.H.Caruthers, Tetrahedron Lett., 21, 719-722 (1980)；M.D.Matteucci and M.H.Caruthers, J.Am.Chem.Soc., 103, 3185-3191 (1981)を参照のこと。

【００１７】

Ｘが低級アルコキシ基であるリン酸トリエステル修飾体は、常法、例えば化学合成で得られたオリゴヌクレオチドをトシルクロリドのDMF／メタノール／2,6－ルチジン溶液で処理することにより得ることができる（Moody H.M., et al., Nucleic Acids Res., 17, 4769-4782 (1989)）。

Ｘがアルキル基であるアルキルホスホネート修飾体は、常法、例えばホスホアミダイトを用いて得ることができる（M.A.Dorman, et.al., Tetrahedron, 40, 95-102 (1984)；K.L.Agarwal and F.Riftina, Nucleic Acids Res., 6, 3009-3024 (1979)）。

【００１８】

ＸがＳであるホスホロチオエート修飾体は、常法、例えばイオウを用いた固相合成法(C.A.Stein, et.al., Nucleic Acids Res., 16, 3209-3221 (1988)) あるいはテトラエチルチウラム　ジスルフィドを用いて、固相合成法により得ることができる（H.Vu and B.L.Hirschbein, Tetrahedron Letters, 32, 3005-3008 (1991)）。

Ｘ，ＹがともにＳであるホスホロジチオエート修飾体は、例えばビスアミダイトをチオアミダイトに変換しイオウを作用させることにより固相合成法により得ることができる（W.K.-D.Brill, et.al., J.Am.Chem.Soc., 111, 2321-2322 (1989))。

【００１９】

Ｘが一級アミンあるいは二級アミンであるホスホロアミデート修飾体は、例えばハイドロジェンホスホネートを一級あるいは二級アミンで処理することにより固相合成法で得ることができる（B.Froehler, et.al. Nucleic Acids Res., 16, 4831-4839 (1988))。あるいは、アミダイトをtert－ブチルハイドロパーオキサイドで酸化しても得ることができる（H.Ozaki, et.al., Tetrahedron Lett., 30, 5899-5902 (1989)）。

【００２０】

Ｚが水酸基であるアンチセンスオリゴリボヌクレオチドの合成法は、アンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチドに比べて、リボース（糖）に２'－水酸基があるためその保護を行わなければならない点できわめて複雑ではあるが、保護基およびリン酸化方法を適宜選択することによって合成することができる（微生物学基礎講座　８巻、遺伝子工学、大塚栄子、三浦一伸共著、安藤忠彦、坂口健二編、1987年10月10日、共立出版株式会社発行参照）。

【００２１】

精製および純度確認は、高速液体クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で行うことができる。分子量の確認は、 Electrospray Ionization Mass Spectrometry 又は Fast Atom Bonbardment-Mass Spectrometryで行うことができる。

本発明のWT1に対する発現阻害物質は、genomic DNA からmatureなmRNAに至るいかなる段階においても作用し、その発現を抑制することによって固形腫瘍細胞の増殖を阻害すると考えられる。従って、本願発明の発現阻害物質は固形腫瘍の治療のために有効であると期待される。

【００２２】

本発明の発現阻害物質は、それらに対して不活性な適当な基剤と混和して塗布剤、パップ剤などの外用剤とすることができる。

また、必要に応じて、賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等

を加えて錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤など、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法に従って調製することができる。

【００２３】

本発明の発現阻害物質は患者の患部に直接適用するか、または血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適応させる。さらに持続性、膜透過性を高めるアンチセンス封入素材を用いることもできる。例えば、リポゾーム、ポリ－Ｌ－リジン、リピッド、コレステロール、リポフェクチン又はこれらの誘導体が挙げられる。

【００２４】

本発明の発現阻害物質の投与量は、患者の状態、年齢、性別、体重などに応じて適宜調整し好ましい量を用いることができる。また、その投与方法は、患者の状態、薬剤形態などに応じ、経口投与、筋肉内投与、腹腔内投与、胸腔内投与、髄腔内投与、腫瘍内投与、皮内投与、皮下投与、静脈内投与、動脈内投与、直腸投与などの種々の投与方法から適宜好ましい方法を用いることができる。

以下本発明を実施例において詳しく説明する。

【実施例】

【００２５】

合成例１.

以下に使用するオリゴデオキシリボヌクレオチド（配列番号：１～８）およびランダム配列（Rand）を、自動合成装置（Applied Biosystems）を用いて合成し、高速液体クロマトグラフィーにより精製し、エタノール沈澱を３回行い、そしてリン酸緩衝液に懸濁した。

合成したオリゴヌクレオチドは次の通りである。なお、ランダム配列（Rand）は、塩基18個の配列で理論上４の１８乗種類の配列の混合物となっている。

【００２６】

配列番号：１　転写キャッピング部位のセンス配列（SE1）
配列番号：２　転写キャッピング部位のアンチセンス配列（AS1）
配列番号：３　転写キャッピング部位のセンス配列
配列番号：４　転写キャッピング部位のアンチセンス配列
配列番号：５　翻訳開始領域のセンス配列（SE2）
配列番号：６　翻訳開始領域のアンチセンス配列（AS2）
配列番号：７　エクソン６のセンス配列
配列番号：８　エクソン６のアンチセンス配列

【００２７】

実施例１.

ＷＴ１発現陽性の胃癌AZ521株の細胞を5×10^4 個／ml、100μl／ウエルの量で、平底96－ウエルプレート内の、ウシ胎児血清（FCS）を含有しないRPMI1640培地に接種した。オリゴヌクレオチドAS1又は対照SE1もしくはrandを、３連のウエルに、最終濃度が100μｇ／mlとなるように添加した。２時間のインキュベーションの後、各ウエルに最終濃度が10％となるようにFCSを添加した。24時間毎に、前記の量の半分のオリゴヌクレオチドを培養物に添加した。

【００２８】

96時間培養した後、色素排除法により生存細胞を計数した。対照培養物として、ヌクレオチドを含有しない同じ体積のＰＢＳを添加し、そしてこの対照培養物の細胞数を100％とした。

この結果を図１に示す。この図から明らかな通り、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドＡＳ１は、対応するセンスオリゴヌクレオチドSE1に比べて強く細胞の増殖を阻害した。

【００２９】

実施例２.

実施例１と同様の実験を行ったが、オリゴヌクレオチドAS1もしくはAS2、又はrandを200μg／ml濃度で添加した。図２から明らかな通り、ランダム配列（rand）は胃癌細胞の増殖をほとんど阻害しなかったが、アンチセンスオリゴヌクレオチドAS1及びAS2は胃癌細胞の増殖を阻害した。

【００３０】

実施例３.

実施例１と同様の実験を行ったが、オリゴヌクレオチドAS1もしくはAS2、又はrandを400μg／mlの濃度で添加した。図３から明らかな通り、ランダム配列（rand）に比べて、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドAS1又はAS2は胃癌細胞の増殖を阻害した。

なお、実施例１～３の結果から明らかなごとく本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの胃癌細胞増殖阻害効果は濃度依存的であった。

【００３１】

実施例４.

実施例１と同様の実験を行ったが、固形腫瘍細胞として肺癌OS3株の細胞を用い、アンチセンスオリゴヌクレオチドAS1もしくはAS2、又は対照ランダム配列（rand）を200μg／mlの量で用いた。図４から明らかな通り、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドAS1及びAS2は対照ランダム配列（rand）に比べて強い肺癌細胞増殖阻害効果を示した。

【００３２】

実施例５.

実施例５と同様の実験を行ったが、アンチセンスオリゴヌクレオチドAS1を400μg／ml、又は対照としてSE1もしくはrandを400μg／ml使用した。図５から明らかな通り、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドAS1はその他の対照オリゴヌクレオチドに比べて、肺癌細胞増殖阻害効果を示した。

なお、実施例４及び５の比較から、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの肺癌細胞増殖阻害効果が濃度依存的であることが明らかである。

【００３３】

実施例６.

実施例１と同様の実験を行ったが、固形腫瘍細胞として、卵巣癌TYKnu株の細胞を用い、アンチセンスオリゴヌクレオチドAS1を400μg／ml、又は対照オリゴヌクレオチドSE1もしくはrandを400μg／ml用いた。図６から明らかな通り、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドAS1は、その他の対照オリゴヌクレオチドに比べて顕著な卵巣癌細胞増殖阻害効果を示した。

【００３４】

参考例１

実施例と同様の実験を行ったが、被験細胞として、WT1発現陰性の肺アデノカルシノーマ細胞系WTAS PC14を用い、アンチセンスオリゴヌクレオチドAS1もしくはAS2を400μg／ml又は対照オリゴヌクレオチドrandを400μg／ml用いた。図７から明らかな通り、WT1発現陰性の細胞に対しては、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは有意な増殖阻害効果を示さなかった。

【００３５】

実施例７.

表２記載の各種の腫瘍細胞株からRNAを抽出し、下記のRT-PCR法を用いてWT1mRNAの発現量を定量した。表２に白血病細胞株K562におけるWT1の発現量を1.0として各種腫瘍細胞株でのWT1の発現量を相対的に示した。

各細胞株より通常の方法〔例えば acid-guanidine-phenol-chloroform method：Anal. Biochem., 162, 156 (1987)〕に従い総RNAを抽出し、ジエチルピロカーボネート処理水に溶解して、吸光度260nmにて光学的に定量化した。

【００３６】

１μgの総RNAを含むジエチルピロカーボネート処理水15.5μlを、65℃で５分間加熱し、600Uの逆転写酵素（Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase ：GIBCO-

BRL ）、500mmol／１の各デオキシヌクレオチドトリフォスフェート（dNTP：Pharmacia)、750ngのオリゴｄＴプライマー及び40UのRNase阻害剤（Boehringer Mannheim ）を含むRT緩衝液（50mmol／１トリスHCl（pH8.3)；70mmol／１ KCl；３mmol／１ $MgCl_2$ ；10mmol／１ジチオスレイトール）の14.5μlと混合した。

【００３７】

混合物を37℃で90分間インキュベートし、70℃で20分間加熱後、使用時まで－20℃にて保存した。

PCRは、DNAサーマルサイクラー（Perkin Elmer-Cetus）にて、94℃、１分の変性、64℃、１分（βアクチン：60℃、１分）のプライマーアニーリング（annealing ）及び、72℃、２分の鎖延長（chain elongation）の条件で繰り返しサイクルを行ない、PCR産物（第１ラウンドPCR）を得た。

該PCR産物のデンシトメーター単位（後記）が500未満の場合には、第１ラウンドPCR産物の2.5μlを含む反応液にて、ネステッド内方プライマーによる第２ラウンドPCRを行なった。

【００３８】

得られたPCR産物を、文献〔J. Immunol., 147, 4307, (1991)〕記載の方法に準じて以下の通り定量した。

即ち、20ngの総RNAからのPCR産物を、0.05μg／mlのエチジュームブロマイドを含む1.3％アガロースゲルに分離し、ポラロイド（登録商標）フィルム（Polaroid 665 film, Polaroid Corp. ）にて撮影した。

ネガフィルムを、25℃、５分間にて現像し、デンシトメーター（CS-9000 ：島津）にて検定して「デンシトメーター単位」として得た。

尚、上記においてRNA不含の場合のPCR産物を用いた結果を陰性コントロールとした。

また、上記において使用したプライマーは表１に示す通りである。

【００３９】

【表１】

表１

第１ラウンドＰＣＲプライマー	塩　基　配　列
外方センスプライマー	5′ -GGCATCTGAGACCAGTGAGAA-3′ （配列番号：２０）
外方アンチセンスプライマー	5′ -GAGAGTCAGACTTGAAAGCAGT-3′ （配列番号：２１）
第２ラウンドＰＣＲプライマー	塩　基　配　列
内方センスプライマー	5′ -GCTGTCCCACTTACAGATGCA-3′ （配列番号：２２）
内方アンチセンスプライマー	5′ -TCAAAGCGCCAGCTGGAGTTT-3′ （配列番号：２３）

【００４０】

尚、内部コントロールとしたβアクチンのプライマーとしては、文献〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82, 6133, (1985)〕に記載のものを使用した。これら各プライマーは全て常法に従い化学合成した。

RT－PCRへのRNA使用量と各サンプルにおけるＲＮＡ分解の相違を標準化するために、WT1遺伝子の結果（デンシトメーター単位）をβアクチンのそれで除し、これをWT1遺伝子発現レベルとした。

結果を表２に示す。

【００４１】

【表２】

表２

由　来	細胞株	ＷＴ発現量
胃癌	ＡＺ　５２１	1.2×10^{0}
大腸癌	ＬＯＶＯ	1.1×10^{-3}
	ＳＷ　４８０	2.3×10^{-1}
	ＳＷ　６２０	1.0×10^{-1}
	ＣＯＬＯ　３２０　ＤＭ	7.3×10^{-3}
肺癌	ＯＳ　１	1.6×10^{-2}
	ＯＳ　２Ｒ	8.3×10^{-3}
	ＯＳ　３	3.1×10^{-2}
	ＬＵ　９９Ｂ	2.9×10^{-2}
	ＬＵ　９９Ｃ	3.4×10^{-2}
	ＶＭＲＣ－ＬＣＰ	4.9×10^{-1}
乳癌	ＭＤＡ　ＭＢ　２３１	3.3×10^{-3}
	ＹＭＢ　１	5.2×10^{-2}
胚細胞癌	ＮＥＣ　８	5.8×10^{-3}
卵巣癌	ＴＹＫ　ＮＵ	4.5×10^{-1}
	ＴＹＫ　ｎｕ．ｃｐＶ	2.5×10^{-1}
白血病（対照）	Ｋ　５６２	1.0×10^{0}

【００４２】

上記の結果、種々の固形腫瘍由来の培養株においてＷＴ１遺伝子が発現していることが確認された。

以上の通り、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは固形腫瘍細胞の増殖の阻害のために有効であり、従って新規な固形腫瘍治療剤として期待される。

【図面の簡単な説明】

【００４３】

【図１】図１は、胃癌AZ521株の細胞の増殖に対する100μg／mlのオリゴヌクレオチドの阻害効果を示すグラフである。

【図２】図２は、胃癌AZ521株の細胞の増殖に対する200μg／mlのオリゴヌクレオチドの阻害効果を示すグラフである。

【図３】図３は、胃癌AZ521株の細胞の増殖に対する400μg／mlのオリゴヌクレオチドの阻害効果を示すグラフである。

【図４】図４は、肺癌OS3株の細胞の増殖に対する200μg／mlのオリゴヌクレオチドの阻害効果を示すグラフである。

【図５】図５は、肺癌OS3株の細胞の増殖に対する400μg／mlのオリゴヌクレオチドの阻害効果を示すグラフである。

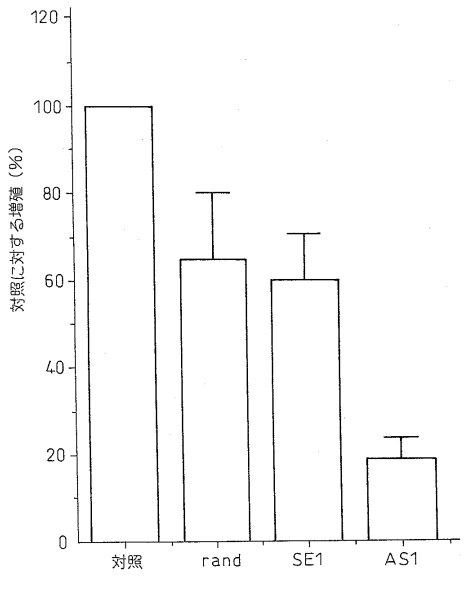
【図６】図６は、卵巣癌TYKnu株の細胞の増殖に対する400μg／mlのオリゴヌクレオチドの阻害効果を示すグラフである。

【図７】図７は、WT1発現陰性の肺アデノカルシノーマ細胞系、WTAS PC14の細胞の増殖に

対する400μg／mlのオリゴヌクレオチドの阻害効果を示すグラフである。

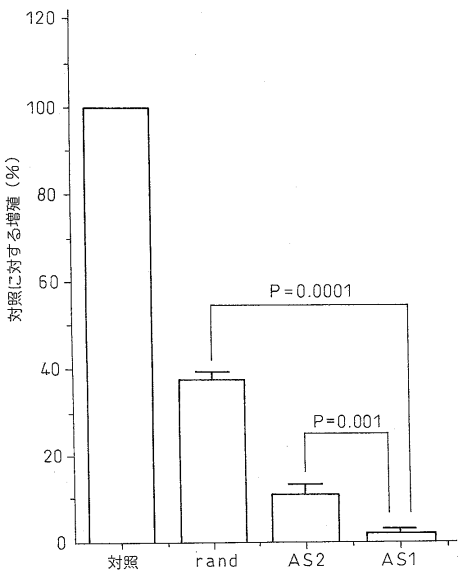
【図１】

図1



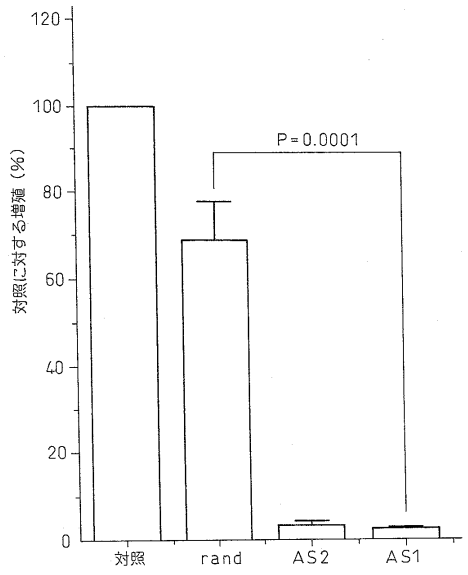
【図２】

図2



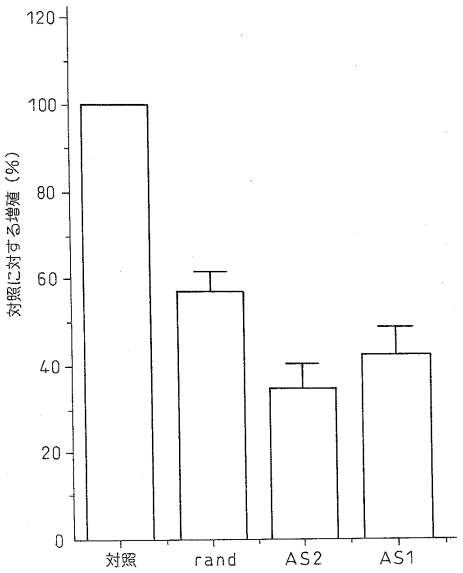
【図３】

図３



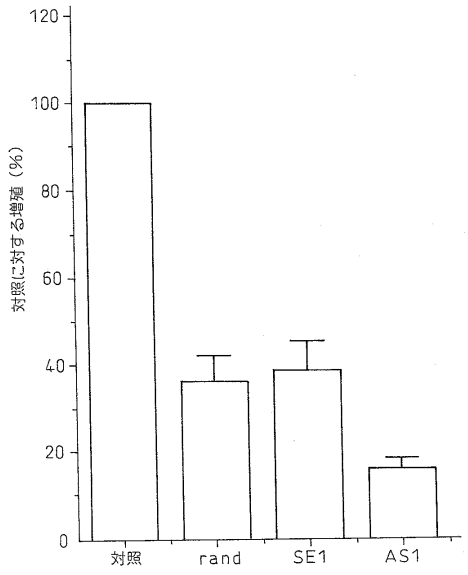
【図４】

図４



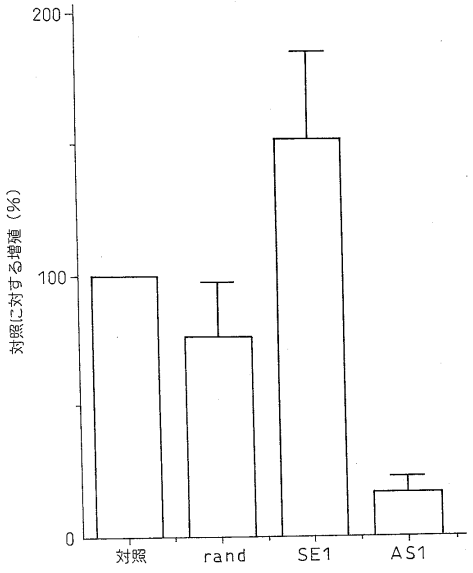
【図５】

図５



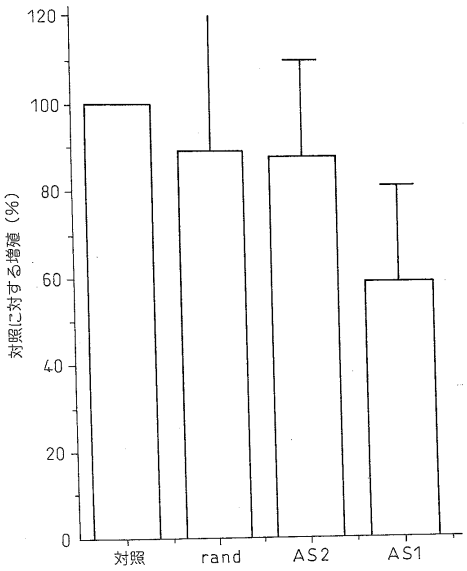
【図６】

図６



【図７】

図7



【配列表】

0004986816000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝
(72)発明者 杉山 治夫
大阪府箕面市船場西２－１９－３０

審査官 小森 潔

(56)参考文献 特開平０９－１０４６２９（ＪＰ，Ａ）
特開平１１－０３５４８４（ＪＰ，Ａ）
Ｂｌｏｏｄ，１９９６年，Ｖｏｌ．８７，Ｎｏ．７，ｐ２８７８－２８８４
Ｏｎｃｏｇｅｎｅ，１９９６年，Ｖｏｌ．１２，Ｎｏ．５，ｐ１００５－１０１４
Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１９９３年，Ｖｏｌ．５３，Ｎｏ．１２，ｐ２７１２－２７１４
Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ，１９９５年，Ｖｏｌ．１４６，Ｎｏ．２，ｐ３４４－３５６
医学のあゆみ，１９９７年 ７月 ５日，Ｖｏｌ．１８２，Ｎｏ．１，ｐ３８－４２
Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ，１９９３年，Ｖｏｌ．１１，Ｎｏ．４，ｐ３９３－３９９
Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ，１９９４年，Ｖｏｌ．５７，Ｎｏ．４，ｐ５１５－５２１

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ４８／００
Ａ６１Ｋ ３１／７０８８
ＣＡ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩ）