

(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2007-506425

(P2007-506425A)

(43) 公表日 平成19年3月22日(2007.3.22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 3
G O 1 N 33/68 (2006.01)	G O 1 N 33/68	4 C O 8 4
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2006-527769 (P2006-527769)
 (86) (22) 出願日 平成16年9月14日 (2004.9.14)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年3月17日 (2006.3.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2004/013722
 (87) 国際公開番号 W02005/028675
 (87) 国際公開日 平成17年3月31日 (2005.3.31)
 (31) 優先権主張番号 60/505,632
 (32) 優先日 平成15年9月24日 (2003.9.24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

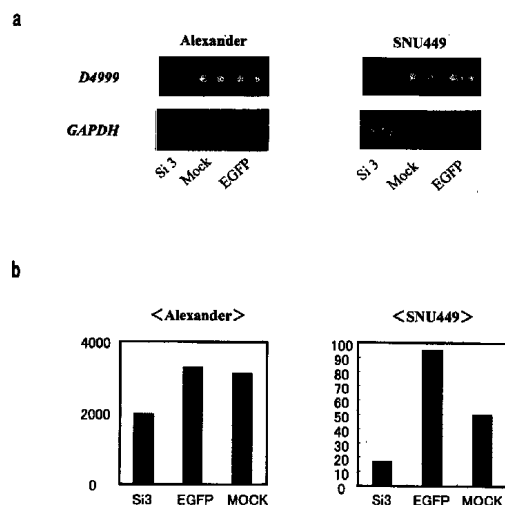
(71) 出願人 504445356
 オンコセラピー・サイエンス株式会社
 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (72) 発明者 中村 祐輔
 神奈川県横浜市青葉区あざみ野1丁目17
 番33号
 (72) 発明者 古川 洋一
 神奈川県川崎市宮前区宮崎3丁目10番4
 0

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝細胞癌を診断する方法

(57) 【要約】

肝細胞癌 (HCC) を検出、診断、治療、および予防する客観的な方法を本明細書において記述する。特に、本発明は、正常細胞と比較してHCC細胞においてアップレギュレートされている、本明細書においてMGC47816およびHES6と呼ばれる二つの遺伝子に関する。一つの態様において、診断方法は、肝細胞癌細胞と正常細胞との間で異なるMGC47816またはHES6の発現レベルを決定する段階を含む。本発明はさらに、HCCの治療において有用である治療物質のスクリーニング方法、HCCを治療する方法、およびHCCに対して対象をワクチン接種する方法を提供する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

患者由来の生体試料においてMGC47816またはHES6の発現レベルを決定する段階を含む、対象におけるHCCを診断する、またはHCCを発症する素因を診断する方法であって、該試料における発現レベルが該遺伝子の正常対照レベルと比較して増加すれば、該対象がHCCを有する、または発症のリスクを有することが示される、方法。

【請求項 2】

試料の発現レベルが正常対照レベルより少なくとも10%より大きい、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

発現レベルが以下からなる群より選択される任意の一つの方法によって決定される、請求項1記載の方法：

(a) MGC47816またはHES6のmRNAを検出する段階；

(b) MGC47816またはHES6によってコードされるタンパク質を検出する段階；および

(c) MGC47816またはHES6によってコードされるタンパク質の生物活性を検出する段階。

【請求項 4】

検出がDNAアレイにおいて行われる、請求項3記載の方法。

【請求項 5】

患者由来の生体試料が上皮細胞を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

患者由来の生体試料が肝細胞癌細胞を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 7】

患者由来の生体試料が肝細胞癌由来の上皮細胞を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

以下の段階を含む、HCCを治療または予防する化合物をスクリーニングする方法：

a) MGC47816またはHES6によってコードされるポリペプチドに試験化合物を接触させる段階；

b) ポリペプチドと試験化合物との結合活性を検出する段階；および

c) ポリペプチドに結合する試験化合物を選択する段階。

【請求項 9】

以下の段階を含む、HCCを治療または予防する化合物をスクリーニングする方法：

a) MGC47816またはHES6を発現する細胞に候補化合物を接触させる段階；および

b) MGC47816またはHES6の発現レベルを減少させる候補化合物を選択する段階。

【請求項 10】

細胞が肝細胞癌細胞を含む、請求項9記載の方法。

【請求項 11】

以下の段階を含む、HCCを治療または予防する化合物をスクリーニングする方法：

a) MGC47816またはHES6によってコードされるポリペプチドに試験化合物を接触させる段階；

b) 段階(a)のポリペプチドの生物活性を検出する段階；および

c) 試験化合物の非存在下で検出された生物活性と比較してポリペプチドの生物活性を抑制する試験化合物を選択する段階。

【請求項 12】

ポリペプチドの生物活性が細胞増殖活性である、請求項11記載の方法。

【請求項 13】

以下の段階を含む、HCCを治療または予防する化合物をスクリーニングする方法：

a) MGC47816またはHES6の転写調節領域、および転写調節領域の制御下で発現されるレポーター遺伝子を含むベクターが導入されている細胞に候補化合物を接触させる段階；

b) 該レポーター遺伝子の発現または活性を測定する段階；および

c) 候補化合物の非存在下で検出される該レポーター遺伝子の発現または活性と比較して

10

20

30

40

50

、該レポーター遺伝子の発現または活性を減少させる候補化合物を選択する段階。

【請求項 1 4】

(a) MGC47816もしくはHES6の核酸配列、または(b)それによってコードされるポリペプチド、に結合する検出試薬を含むキット。

【請求項 1 5】

MGC47816またはHES6のコード配列と相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス組成物を対象に投与する段階を含む、対象におけるHCCを治療または予防する方法。

【請求項 1 6】

MGC47816またはHES6の発現を減少させるsiRNA組成物を対象に投与する段階を含む、対象におけるHCCを治療または予防する方法。

10

【請求項 1 7】

siRNAが、標的配列として配列番号：19および26からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むセンス鎖を含む、請求項16記載の方法。

【請求項 1 8】

MGC47816またはHES6によってコードされるタンパク質に結合する抗体またはその断片の薬学的有効量を対象に投与する段階を含む、対象におけるHCCを治療または予防する方法。

【請求項 1 9】

(a) MGC47816またはHES6によってコードされるポリペプチド、(b)該ポリペプチドの免疫学的活性断片、または(c)該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含むワクチンを対象に投与する段階を含む、対象におけるHCCを治療または予防する方法。

20

【請求項 2 0】

請求項8～13のいずれか一項に記載の方法によって得られる化合物を投与する段階を含む、対象におけるHCCを治療または予防する方法。

【請求項 2 1】

活性成分として、MGC47816またはHES6に対するアンチセンスポリヌクレオチドまたは低分子干渉RNA (siRNA) の薬学的有効量、および薬学的に許容される担体を含む、HCCを治療または予防するための組成物。

【請求項 2 2】

siRNAが標的配列として配列番号：19および26からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むセンス鎖を含む、請求項21記載の組成物。

30

【請求項 2 3】

活性成分としてMGC47816またはHES6によってコードされるタンパク質に結合する抗体または抗体断片の薬学的有効量、および薬学的に許容される担体を含む、HCCを治療または予防するための組成物。

【請求項 2 4】

活性成分として、請求項8～13のいずれか一項記載の方法によって選択される化合物の薬学的有効量、および薬学的に許容される担体を含む、HCCを治療または予防するための組成物。

【請求項 2 5】

40

そのセンス鎖が、標的配列として配列番号：19および26からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、低分子干渉RNA。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は、肝細胞癌を検出および診断する方法と共に、これを治療および予防する方法に関する。

【0 0 0 2】

本出願は、その全内容が参照により本明細書に組み入れられる、2003年9月24日に提出

50

された米国特許仮出願第60/505,632号の恩典を主張する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

肝細胞癌は、全世界の癌による死亡の主な原因の一つである。診断および治療戦略における最近の進歩にもかかわらず、進行癌を有する患者の予後は依然として非常に不良である。分子的研究から、腫瘍抑制遺伝子および/または腫瘍遺伝子の変化が発癌に関与していることが明らかとなったが、正確なメカニズムはなお不明である。ゲノム全体の観点から腫瘍進行の基礎となるメカニズムを理解し、診断のための標的分子を発見し、および新規治療薬を開発することを目的にして、本発明者らは、遺伝子23,040個を提示している cDNAマイクロアレイによって遺伝子発現プロファイルを分析している (Okabeら、Cancer Res 61: 2129~37 (2001); Kitaharaら、Cancer Res 61: 3544~9(2001); Linら、Oncogene 21: 4120~8(2002); Hasegawaら、Cancer Res 62: 7012~7(2002))。これらの研究の過程で、対応する非癌性細胞と比較して癌組織において高頻度にアップレギュレートされていると考えられる、ESTを含む多くの遺伝子が同定されている。発癌は、腫瘍遺伝子の活性化および/または腫瘍抑制遺伝子の不活化を伴うことから、これらのアップレギュレートされた遺伝子の少なくともいくつかの発現の増強は、発癌特性を反映する可能性がある。

【0004】

cDNAマイクロアレイ技術により、正常および悪性細胞における遺伝子発現の総合的なプロファイルを得て比較することができるようになった (Okabeら、Cancer Res 61: 2129~37(2001); Kitaharaら、Cancer Res 61: 3544~9(2001); Linら、Oncogene 21: 4120~8(2002); Hasegawaら、Cancer Res 62: 7012~7(2002))。この情報は、癌細胞の複雑な特性および発癌メカニズムを理解するために役立つ。腫瘍において調節解除されている遺伝子が同定されれば、個々の癌のより正確かつ厳密な診断ができるようになり、新規治療標的を開発することができるようになる (Bienz and Clevers、Cell 103: 311~20(2000))。

【0005】

発癌の機構を明らかにするように計画された研究から、特定の抗腫瘍物質に関する分子標的の同定が既に促進されている。例えば、ファルネシルトランスフェラーゼ (FTI) の阻害剤は、当初、その活性化が翻訳後のファルネシル化に依存するRasに関連する増殖-シグナル伝達経路を阻害するために開発されたが、動物モデルにおいてRas依存的腫瘍を治療するために有効であることが示されている (Sun Jら、Oncogene 16: 1467~73(1998))。同様に、癌原遺伝子受容体HER2/neuに拮抗する目的で、抗癌剤と抗HER2モノクローナル抗体であるトラスツズマブを併用した、ヒトにおける臨床試験では、乳癌患者の臨床反応および全体的な生存の改善が得られた (Molina MAら、Cancer Res 16: 4744~9(2001))。最後に、bcr-ablチロシンキナーゼの構成的活性化が白血球の形質転換において重要な役割を果たしている慢性骨髄性白血病を治療するために、bcr-abl融合タンパク質を選択的に不活化するチロシンキナーゼ阻害剤、STI-571が開発されている。これらの種類の物質は、特異的遺伝子産物の発癌活性を抑制するように設計されている (O'Dwyer MEら、Curr Opin Oncol 12: 594~7(2000))。したがって、癌性細胞において一般的にアップレギュレートされている遺伝子産物は、新規抗癌物質を開発するための有力な分子標的として役立つ可能性がある。

【0006】

CD8+細胞障害性Tリンパ球 (CTL) は、MHCクラスI分子上に存在する腫瘍関連抗原 (TAA) に由来するエピトープペプチドを認識して、腫瘍細胞を溶解することがさらに証明されている。TAAの最初の例としてのMAGEファミリーの発見以来、他の多くのTAAが免疫学的アプローチを用いて発見されている (Boon、Int J Cancer 54: 177~80(1993); Boon and van der Bruggen、J Exp Med 183: 725~9(1996); van der Bruggenら、Science 254: 1643~7(1991); Brichardら、J Exp Med 178: 489~95(1993); Kawakamiら、J Exp Med 180: 347~52(1994))。新たに発見されたTAAのいくつかは、免疫療法の標的として臨床開発が

10

20

30

40

50

現在進行中である。これまで発見されたTAAには、MAGE (van der Bruggenら、Science 254: 1643~7(1991))、gp100 (Kawakamiら、J Exp Med 180: 347~52(1994))、SART (Shichijoら、J Exp Med 187: 277~88(1998))、およびNY-ESO-1 (Chenら、Proc Natl Acad Sci USA 94: 1914~8(1997))が含まれる。一方、腫瘍細胞において特異的に過剰発現されていることが証明されている遺伝子産物は、細胞性免疫応答を誘導する標的として認識されることが示されている。そのような遺伝子産物には、p53 (Umamoら、Brit J Cancer 84: 1052~7(2001))、HER2/neu (Tanakaら、Brit J Cancer 84: 94~9(2001))、CEA (Nukayaら、Int J Cancer 80: 92~7(1999))等が含まれる。

【0007】

TAAに関する基礎研究および臨床研究における有意な進歩にもかかわらず (Rosenbergら、Nature Med 4: 321~7(1998); Mukherjiら、Proc Natl Acad Sci USA 92: 8078~82(1995); Huら、Cancer Res 56: 2479~83(1996))、肝細胞癌を含む腺癌の治療のために現在利用できる候補TAAはごく限られた数に過ぎない。癌細胞において豊富に発現されるが、その発現が癌細胞に限定されるTAAは、免疫療法の標的として有望な候補物質となり得る。さらに、強力かつ特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導する新規TAAが同定されれば、様々な型の癌に対するペプチドワクチン療法の臨床的使用を促進すると期待される (Boonおよびvan der Bruggen、J Exp Med 183: 725~9 (1996); van der Bruggenら、Science 254: 1643~7 (1991); Brichardら、J Exp Med 178: 489~95 (1993); Kawakamiら、J Exp Med 180: 347~52 (1994); Shichijoら、J Exp Med 187: 277~88 (1998); Chenら、Proc Natl Acad Sci USA 94: 1914~8 (1997); Harris、J Natl Cancer Inst 88: 1442~5 (1996); Butterfieldら、Cancer Res 59: 3134~42 (1999); Vissersら、Cancer Res 59: 5554~9 (1999); van der Burgら、J Immunol 156: 3308~14 (1996); Tanakaら、Cancer Res 57: 4465~8 (1997); Fujieら、Int J Cancer 80: 169~72 (1999); Kikuchiら、Int J Cancer 81: 459~66 (1999); Oisoら、Int J Cancer 81: 387~94 (1999))。

【0008】

ペプチド刺激された特定の健康なドナー由来の末梢血単核球 (PBMC) は、ペプチドに反応して有意なレベルのIFN- γ を産生するが、 ^{51}Cr -放出アッセイにおいて腫瘍細胞に対してHLA-A24または-A0201に拘束される細胞障害性を発揮することはほとんどないことが繰り返し報告されている (Kawanoら、Cancer Res 60: 3550~8(2000); Nishizakaら、Cancer Res 60: 4830~7 (2000); Tamuraら、Jpn J Cancer Res 92: 762~7 (2001))。しかしながら、HLA-A24およびHLA-A0201はいずれも、白人集団と共に日本人において一般的なHLA対立遺伝子である (Dateら、Tissue Antigens 47: 93~101 (1996); Kondoら、J Immunol 155: 4307~12 (1995); Kuboら、J Immunol 152: 3913~24 (1994); Imanishiら、Proceeding of the eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference Oxford University Press, Oxford, 1065 (1992); Williamsら、Tissue Antigen 49: 129 (1997))。このように、これらのHLAによって示される癌の抗原性ペプチドは、日本人および白人における癌の治療にとって特に有用である可能性がある。さらに、高濃度でペプチドを用いて、CTLを有効に活性化する高レベルの特異的ペプチド/MHC複合体を抗原提示細胞 (APC) 上に形成することにより低親和性CTLのインビトロでの誘導が起こることが知られている (Alexander-Millerら、Proc Natl Acad Sci USA 93: 4102~7 (1996))。

【0009】

したがって、肝細胞癌形成のメカニズムを解明するため、および肝細胞癌 (HCC) に関する新規診断マーカーおよび抗癌剤の分子標的を同定するために、遺伝子23,040個を含む全ゲノムcDNAマイクロアレイを用いて、HCC 20例の発現プロファイルを分析した。腫瘍において発現が変化した遺伝子の中で、対応する正常組織と比較して癌において高頻度にアップレギュレートされている二つのヒト遺伝子、MGC47816およびHES6を選択した。一方の遺伝子、MGC47816は、カルバモイル-ホスフェートシンターゼL鎖およびATP結合ドメインを含む推定391アミノ酸のタンパク質をコードし、染色体バンド1q34.1に割り当てられた。他方の遺伝子、HES6は、ヘリックス-ループ-ヘリックスドメインおよびオレンジドメインを含む推定224アミノ酸のタンパク質をコードし、染色体バンド2q37に割り当てられた。

低分子干渉RNA (siRNA) のトランスフェクションによってMGC47816またはHES6の発現を抑制すると、肝細胞癌細胞の増殖が阻害された。これらの結果は、肝細胞癌形成に対する新しい洞察を提供し、この癌の診断および治療にとって新しい戦略の開発に貢献する可能性がある。

【発明の開示】

【0010】

発明の概要

したがって、本発明は、肝細胞癌 (HCC) と関連するMGC47816およびHES6の遺伝子発現パターンの発見に基づく。

【0011】

したがって、本発明は、組織試料のような患者由来の生物試料におけるMGC47816またはHES6の発現レベルを決定すること、およびそれを対照発現レベルと比較することによって、対象におけるHCCに対する素因を検出、診断および/または決定する方法を提供する。遺伝子の正常な対照レベルと比較してMGC47816またはHES6の発現レベルが増加すれば、対象がHCCを有するか、または発症のリスクがあることが示される。

【0012】

本発明の状況において、「対照レベル」という句は、対照試料において検出された発現レベルを指し、正常な対照レベルおよびHCC対照レベルの双方が含まれる。本発明の状況において、対照レベルは、単一の参照集団に由来する単一の発現パターンまたは複数の発現パターンを含んでもよい。例えば、対照レベルは、既に試験された細胞からの発現パターンのデータベースとなり得る。「正常対照レベル」は、正常な個体またはHCCを有しないことがわかっている個体の集団において検出された遺伝子発現レベルを指す。正常な個体はHCCの臨床症状を有しない個体である。正常細胞は、好ましくは肝細胞組織から得る。一方、「HCC対照レベル」は、HCCを有することがわかっている個体または個体集団において検出された遺伝子発現レベルを指す。

【0013】

正常対照レベルと比較して試験試料において検出されたMGC47816またはHES6の発現レベルが増加すれば、対象 (そこから試料が得られた) は、HCCを有する、または発症のリスクがあることが示される。

【0014】

本発明に従って、対照レベルと比較して遺伝子発現が少なくとも10%、少なくとも25%、もしくは少なくとも50%またはそれ以上増加している場合に、発現レベルは「増加した」と考えられる。または、発現レベルは、対照レベルと比較して、少なくとも0.1、少なくとも0.2、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも5、もしくは少なくとも10倍またはそれ以上増加している場合に、「増加した」と考えられる。発現は、ハイブリダイゼーションを検出すること、例えば患者由来の組織試料から単離した遺伝子転写物に対するMGC47816またはHES6遺伝子プローブの結合によって決定することができる。

【0015】

本発明の状況において、患者由来の組織試料は、試験対象、例えばHCCを有することが分かっているか、または疑われる患者から採取した任意の組織であってよい。例えば、組織は肝癌細胞を含んでもよい。より詳細には、組織は肝臓由来の細胞であってもよい。

【0016】

本発明はさらに、MGC47816またはHES6を発現する試験細胞に試験物質を接触させること、およびMGC47816もしくはHES6の遺伝子もしくは遺伝子産物の発現レベルまたは活性をそれぞれ決定することによって、MGC47816またはHES6の発現またはそれらの遺伝子産物の活性を阻害する物質を同定する方法を提供する。試験細胞は、好ましくは肝細胞癌からの肝細胞のような肝細胞である。遺伝子の試験物質の非存在下の発現レベルと比較してMGC47816またはHES6の発現レベルが減少すれば、試験物質がMGC47816またはHES6の阻害剤であり、したがってHCCの症状を減少させることが示される。

【0017】

10

20

30

40

50

本発明はまた、MGC47816またはHES6の核酸配列またはそれによってコードされる遺伝子産物に結合する検出試薬を含むキットも提供する。

【0018】

本発明の治療方法には、対象にアンチセンス組成物を投与する段階を含む、対象におけるHCCを治療または予防する方法が含まれる。本発明の状況において、アンチセンス組成物は、特異的標的遺伝子、例えばMGC47816またはHES6の発現を減少させる。例えば、アンチセンス組成物は、MGC47816またはHES6の核酸配列と相補的であるヌクレオチドを含んでもよい。または、本発明の方法は、低分子干渉RNA (siRNA) 組成物を対象に投与する段階を含んでもよい。本発明の状況において、siRNA組成物は、MGC47816またはHES6の発現を減少させる。

10

【0019】

なおもう一つの態様において、本発明は、リボザイム組成物を対象に投与する段階を含む、対象におけるHCCを治療または予防する方法を提供する。核酸特異的リボザイム組成物は、MGC47816またはHES6の発現を減少させる。対象遺伝子のインビボ発現に適した手段は、当技術分野で公知である。

【0020】

本発明はまた、ワクチンおよびワクチン接種法を提供する。例えば、対象におけるHCCを治療または予防する方法は、MGC47816またはHES6によってコードされるポリペプチド、またはそのようなポリペプチドの免疫学的活性断片を含むワクチンを対象に投与する段階を含み得る。本発明の状況において、免疫学的活性断片は、完全長のタンパク質によって誘導される応答と類似の免疫応答を誘導する、天然に存在する完全長のタンパク質より長さが短いポリペプチドである。例えば、免疫学的活性断片は、長さが少なくとも8残基で、T細胞またはB細胞のような免疫細胞を刺激することができなければならない。免疫細胞の刺激は、細胞の増殖、サイトカイン (例えば、IL-2) の生産、または抗体産生を検出することによって測定することができる。

20

【0021】

特に明記していなければ、本明細書において用いられる全ての科学技術用語は、本発明が属する当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記述の内容と類似または同等の方法および材料を、本発明の実践または試験において用いることができるが、適した方法および材料を以下に記述する。本明細書において言及した全ての刊行物、特許出願、特許およびその他の引用文献はその全内容物が参照により本明細書に組み入れられる。矛盾する場合は、定義を含めて本明細書が優先する。さらに、材料、方法、および実施例は説明するために限られ、制限的に解釈されない。

30

【0022】

本明細書に記載の方法の一つの利点は、明白な臨床症状の検出前に疾患が同定される点である。本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および添付の請求の範囲から明らかであろう。

【0023】

発明の詳細な説明

本明細書において用いられる「一つの(a)」、「一つの(an)」、および「その(the)」という用語は、特に明記していなければ「少なくとも一つ」を意味する。

40

【0024】

本発明は、部分的に、HCCを有する患者の肝細胞においてMGC47816およびHES6の発現が上昇していることを発見したことに基づく。この遺伝子発現の上昇は、包括的cDNAマイクロアレイ系を用いて同定された。

【0025】

遺伝子23,040個を含むcDNAマイクロアレイを用いて、患者20人の包括的遺伝子発現プロフィールを既に構築した。MGC47816およびHES6は、HCC患者において高レベルで発現される。患者の血清において癌関連タンパク質の検出能を有する候補分子マーカーを選択して、ヒト肝細胞癌におけるシグナル抑制戦略を開発するためにいくつかの有望な標的を発見

50

した。特に、MGC47816およびHES6は、本明細書において診断的有用性を有するHCCのマーカーとして、およびその発現を変化させることによりHCCの症状を治療または緩和することのできる遺伝子標的として同定される。

【0026】

特に明記していなければ、「HCC」は、肝細胞癌を指し、およびHCC関連遺伝子またはタンパク質は、本明細書に開示の任意の核酸またはアミノ酸配列（例えば、MGC47816またはHES6）を指す。

【0027】

細胞試料中のMGC47816またはHES6の発現を測定することによって、HCCを診断することができる。同様に、様々な物質に反応したMGC47816またはHES6の発現レベルを測定することによって、HCCを治療する物質を同定することができる。

10

【0028】

本発明は、MGC47816またはHES6の発現を決定する段階（例えば、測定する段階）を含む。MGC47816およびHES6ヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列に関してGenBank（商標）データベース登録によって提供される配列情報をそれぞれ用いて、MGC47816またはHES6を、当業者に周知の技術を用いて検出および測定することができる。例えば、MGC47816またはHES6に対応する配列データベース登録内の配列は、例えばノザンプロットハイブリダイゼーション分析を用いたMGC47816またはHES6 RNA配列を検出するためのプローブを構築するために用いることができる。もう一つの例として、公表された配列を用いて、例えば逆転写に基づくポリメラーゼ連鎖反応のような、増幅に基づく検出方法を用いてMGC47816

20

【0029】

次に、試験細胞集団、例えば患者由来の組織試料におけるMGC47816またはHES6の発現レベルを、参照集団におけるMGC47816またはHES6の発現レベルと比較する。参照細胞集団には、比較されるパラメータが公知である一つまたは複数の細胞、すなわちHCC細胞または非HCC細胞が含まれる。

【0030】

参照細胞集団と比較した試験細胞集団における遺伝子発現パターンがHCCまたはそれに対する素因を示すか否かは、参照細胞集団の組成物に依存する。例えば、参照細胞集団が非HCC細胞で構成される場合、試験細胞集団と参照細胞集団との間の遺伝子発現パターンの類似は、試験細胞集団が非HCCであることを示す。逆に、参照細胞集団がHCC細胞で構成される場合、試験細胞集団と参照細胞集団の間の遺伝子発現プロファイルの類似は、試験細胞集団にHCC細胞が含まれることを示す。

30

【0031】

試験細胞集団におけるHCCマーカー遺伝子の発現レベルは、それが参照細胞集団に関連した発現レベルから1.2倍より大きく、1.5倍より大きく、2.0倍より大きく、5.0倍より大きく、または10.0倍より大きく変化すれば、「変化した」と見なされる。

【0032】

試験細胞集団と参照細胞集団の間の異なる遺伝子発現は、対照核酸、例えばハウスキーピング遺伝子に対して標準化することができる。本発明の状況において、対照核酸は、その発現が細胞の癌性および非癌性状態の間で変化しないことが分かっている核酸である。試験細胞集団および参照細胞集団における対照核酸の発現レベルを用いて、比較される集団におけるシグナルレベルを標準化することができる。対照遺伝子の例には、 α -アクチン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、およびリボソームタンパク質P1が含まれるがこれらに限定されない。

40

【0033】

試験細胞集団を、多数の参照細胞集団と比較してもよい。多数の参照集団はそれぞれは、公知のパラメータが異なってもよい。このように、試験細胞集団を、例えばHCC細胞を含むことが分かっている第一の参照細胞集団と共に、例えば非HCC細胞（正常細胞）を含むことが分かっている第二の参照集団と比較してもよい。試験細胞は、HCC細胞を含

50

むまたは含むことが疑われる対象から採取した組織または細胞試料から単離される。

【0034】

試験細胞は、体組織または体液、例えば生体液（血液または尿のような）から得られる。例えば、試験細胞は、組織から精製することができる。好ましくは、試験細胞集団は上皮細胞を含む。より好ましくは、上皮細胞は、HCCであることが分かっているかまたは疑われる組織に由来する。

【0035】

参照細胞集団における細胞は、試験細胞と類似である組織に由来しなければならない。選択的に、参照細胞集団は、細胞株、例えばHCC細胞株（陽性対照）または正常な非HCC細胞株（陰性対照）である。または、対照細胞集団は、それらに関してアッセイされるパラメータまたは条件が公知である細胞に由来する分子情報データベースに由来し得る。

10

【0036】

対象は、好ましくは哺乳動物である。哺乳動物は、例えばヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシであり得る。

【0037】

MGC47816またはHES6の発現は、当技術分野で公知の方法を用いてタンパク質または核酸レベルで決定することができる。例えば、MGC47816またはHES6に関連するRNA配列を特異的に認識するプローブを用いるノザンハイブリダイゼーション分析を用いて、遺伝子発現を決定することができる。または、遺伝子発現は、逆転写に基づくPCRアッセイを用いて、例えばMGC47816またはHES6に対して特異的なプライマーを用いて測定することができる。発現はまた、タンパク質レベルで、すなわち本明細書に記載のHCCマーカー遺伝子によってコードされるポリペプチドレベルまたはその生物活性を測定することによって決定することができる。そのような方法は当技術分野で周知であり、例えばMGC47816またはHES6によってコードされるタンパク質に対する抗体に基づくイムノアッセイが含まれるがこれらに限定されない。それぞれの遺伝子によってコードされるタンパク質の生物活性も同様に周知である。例えば、最近の研究から、ヒトHES6がHES1のタンパク質分解を阻害および促進し、MASH1活性を支持し、かつ細胞、特に筋原細胞および神経細胞の分化を促進することが示唆されている（Bae S,ら、Development. 2000 Jul;127(13):2933~43; Gao Xら、J Cell Biol. 2001 Sep 17;154(6):1161~71）。

20

【0038】

HCCの診断

本発明の状況において、HCCは、試験細胞集団（すなわち、患者由来の生体試料）におけるMGC47816またはHES6の発現レベルを測定することによって診断される。好ましくは、試験細胞集団は、上皮細胞、例えば肝組織から得た細胞を含む。遺伝子発現はまた、血液または尿のような他の体液からも測定することができる。他の生体試料を用いてタンパク質レベルを決定することができる。例えば、診断される対象に由来する血液または血清中のタンパク質レベルを、イムノアッセイまたは他の従来の生物学的アッセイによって測定することができる。

30

【0039】

MGC47816またはHES6の発現を、試験細胞または生体試料において決定し、正常な対照試料に関連した発現レベルと比較する。正常対照レベルは、HCCを有しないことが分かっている集団において典型的に認められるMGC47816またはHES6の発現プロフィールである。したがって、患者由来の組織試料におけるMGC47816またはHES6の発現レベルが増加すれば、対象がHCCを有するか、または発症のリスクがあることが示される。

40

【0040】

言い換えれば、MGC47816またはHES6の発現レベルが、正常対照と比較して試験集団において変化している場合、これは、試験対象がHCCを有するか、または発症のリスクがあることを示している。

【0041】

MGC47816またはHES6の発現または活性を阻害する物質を同定する

50

MGC47816もしくはHES6の発現またはそれらに関連した遺伝子産物の活性を阻害する物質は、MGC47816もしくはHES6を発現する試験細胞集団に試験物質を接触させ、MGC47816またはHES6の発現レベルまたはそれらに関連した遺伝子産物の活性を決定することによって同定することができる。試験物質の非存在下でのレベルと比較して物質の存在下で発現または活性が減少すれば、物質は、MGC47816またはHES6の阻害剤であり、したがってHCCを阻害するために有用である可能性があることが示される。

【0042】

試験細胞集団は、MGC47816またはHES6を発現する任意の細胞であり得る。例えば、試験細胞集団は、肝臓から単離されたか、または肝臓に由来する細胞のような上皮細胞を含んでもよい。特に、試験細胞は、肝細胞癌に由来する不死化細胞株であってもよい。または、試験細胞は、MGC47816もしくはHES6をトランスフェクトした細胞であってもよく、またはレポーター遺伝子に機能的に結合したMGC47816もしくはHES6からの調節配列（例えば、プロモーター配列）をトランスフェクトした細胞であってもよい。

10

【0043】

対象におけるHCC治療の有効性の評価

本明細書において同定されたMGC47816またはHES6の異なる発現によって、HCCの治療経過をモニターすることができる。この方法において、試験細胞集団は、HCCの治療を受けている対象から提供される。望ましいならば、試験細胞集団は、治療前、治療中、および/または治療後の様々な時点で対象から得ることができる。次に、細胞集団におけるMGC47816またはHES6の発現を決定し、HCC状態が公知である細胞を含む参照細胞集団と比較する。本発明の状況において、参照細胞は、関心対象の治療に曝露されてはならない。

20

【0044】

参照細胞集団がHCC細胞を含まない場合、試験細胞集団と正常対照参照細胞集団との間のMGC47816またはHES6の発現の類似は、治療が有効であることを示す。しかしながら、試験細胞集団と正常対照参照細胞集団の間のMGC47816またはHES6の発現の差は、臨床転帰または予後があまり好ましくないことを示す。逆に、参照細胞集団がHCC細胞を含む場合、試験細胞集団と参照細胞集団との間のHCC関連遺伝子（例えば、MGC47816またはHES6）の発現の差は、関心対象の治療が有効であることを示すが、試験細胞集団と参照細胞集団におけるMGC47816またはHES6の発現の類似は、臨床転帰または予後があまり好ましくないことを示す。

30

【0045】

さらに、治療後に得られた対象に由来する生体試料において決定された一つまたは複数のHCC関連遺伝子（例えば、MGC47816またはHES6）の発現レベル（すなわち、治療後レベル）を、治療開始前に得られた対象由来の生体試料において決定された一つまたは複数のHCC関連遺伝子の発現レベル（すなわち治療前レベル）と比較することができる。治療後の試料におけるMGC47816および/またはHES6の発現が減少すれば、関心対象の治療が有効であることが示されるが、治療後の試料において発現が増加または維持されれば、臨床転帰または予後があまり好ましくないことが示される。本発明の状況において、「有効」という用語は、治療によって、病的にアップレギュレートされた遺伝子の発現の減少が引き起こされること、または対象における肝細胞腫瘍の大きさ、発生率、または転移能が減少することを示している。関心対象の治療が予防的に適用される場合、「有効」という用語は、治療がHCCの形成を遅らせるもしくは予防すること、またはHCCの臨床症状を遅らせる、予防する、もしくは緩和することを意味する。肝細胞腫瘍の評価は、標準的な臨床プロトコルを用いて行うことができる。

40

【0046】

さらに、有効性は、HCCを診断または治療する任意の公知の方法によって決定することができる。例えば、HCCは症候性の異常を同定することによって診断することができる。

【0047】

特定の個体にとって適切であるHCCを治療するための治療物質の選択

個体の遺伝的構成の差によって、様々な薬剤の相対的代謝能の差が起こり得る。対象に

50

において代謝されて抗HCC物質として作用する薬剤は、対象の細胞における遺伝子発現パターンを、HCC状態の特徴である遺伝子発現パターンから非HCC状態の特徴である遺伝子発現パターンへと変化するように誘導することによって効果を示すことができる。したがって、本明細書に開示のMGC47816またはHES6遺伝子の発現の差によって、選択された対象からの試験細胞集団においてHCCの推定の治療薬またはHCCの予防的阻害剤を試験して、物質が対象におけるHCCの適した阻害剤であるか否かを決定することができる。

【0048】

特定の対象に対して適切なHCCの阻害剤を同定するために、対象からの試験細胞集団を治療物質に曝露して、MGC47816またはHES6の発現を決定する。

【0049】

本発明の状況において、試験細胞集団は、MGC47816またはHES6を発現するHCC細胞を含む。好ましくは試験細胞は上皮細胞である。例えば、試験細胞集団を、候補物質の存在下でインキュベートしてもよい。次に、試験試料における遺伝子発現パターンを測定して、一つまたは複数の参照プロフィール、例えばHCC参照発現プロフィールまたは非HCC参照発現プロフィールと比較する。

【0050】

HCCを含む参照細胞集団と比較して、試験細胞集団におけるMGC47816またはHES6の発現の減少は、物質が治療効果があることを示す。

【0051】

試験物質は任意の化合物または組成物となり得る。本発明において用いるために適した例示的な試験物質には、免疫調節物質が含まれるがこれらに限定されない。

【0052】

治療物質を同定するためのスクリーニングアッセイ

本明細書において開示されるMGC47816またはHES6を用いて、HCCを治療するための候補治療物質を同定することも可能である。本発明の方法は、それがHCC状態の特徴であるMGC47816またはHES6の発現プロフィールを非HCC状態を示すパターンに変換するか否かを決定することにより、候補治療物質をスクリーニングする段階を含む。

【0053】

本発明の方法において、細胞を単数または複数の試験物質に（連続的または併用して）曝露し、細胞におけるMGC47816またはHES6の発現を測定する。次に、試験集団におけるMGC47816またはHES6の発現レベルを、試験物質に曝露されていない参照細胞集団におけるMGC47816またはHES6の発現レベルと比較する。

【0054】

HCCにおいて過剰発現されている遺伝子（例えば、MGC47816またはHES6）の発現を抑制することができる物質は、有望な臨床有用性を有する。そのような化合物は、HCCの増殖阻止能に関してさらに試験することができる。

【0055】

さらなる態様において、本発明は、HCCの治療における有望な標的である候補物質をスクリーニングする方法を提供する。上記で詳細に説明したように、マーカー遺伝子の発現レベルまたはその遺伝子産物の活性を制御することによって、HCCの発症および進行を制御することができる。このように、HCCの治療における有望な標的である候補物質は、癌性または非癌性状態の指標として、そのような発現レベルおよび活性を用いるスクリーニング方法を通して同定することができる。

【0056】

したがって、本発明の状況において、そのようなスクリーニングは、例えば以下の段階を含んでもよい：

- a) MGC47816またはHES6によってコードされるポリペプチドに試験化合物を接触させる段階；
- b) ポリペプチドと試験化合物との間の結合活性を検出する段階；および
- c) ポリペプチドに結合する試験化合物を選択する段階。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 7 】

または、本発明のスクリーニング方法は、以下の段階を含んでもよい：

- a) MGC47816またはHES6を発現する細胞に候補化合物を接触させる段階；および
- b) MGC47816またはHES6の発現レベルを減少させる候補化合物を選択する段階。

【 0 0 5 8 】

マーカー遺伝子を発現する細胞には、例えば、HCCから樹立された細胞株が含まれる；そのような細胞は本発明の上記のスクリーニングのために用いることができる。

【 0 0 5 9 】

または、本発明のスクリーニング方法は以下の段階を含んでもよい：

- a) MGC47816またはHES6によってコードされるポリペプチドを試験化合物に接触させる段階；
- b) 段階（a）のポリペプチドの生物活性を検出する段階；および
- c) 試験化合物の非存在下で検出される該ポリペプチドの生物活性と比較してMGC47816またはHES6によってコードされるポリペプチドの生物活性を抑制する試験化合物を選択する段階。

10

【 0 0 6 0 】

本発明のスクリーニング方法において用いられるタンパク質は、マーカー遺伝子のヌクレオチド配列を用いて組換え型蛋白質として得ることができる。マーカー遺伝子および/またはそのコードされるタンパク質に関する情報に基づいて、当業者は、スクリーニングのための指標としてタンパク質の任意の生物活性、および選択された生物活性に関してアッセイするための任意の適した測定方法を選択することができる。好ましくは、MGC47816またはHES6の細胞増殖活性は、生物活性として選択される。細胞増殖活性は、NIH3T3またはCOS7のような細胞株の増殖によってルーチン的に検出することができる。

20

【 0 0 6 1 】

または、本発明のスクリーニング方法は以下の段階を含んでもよい：

- a) MGC47816またはHES6の転写調節領域、および転写調節領域の制御下で発現されるレポーター遺伝子を含むベクターが導入されている細胞に、候補化合物を接触させる段階；
- b) 該レポーター遺伝子の発現または活性を測定する段階；および
- c) 候補化合物の非存在下で検出される該レポーター遺伝子の発現または活性と比較して該レポーター遺伝子の発現または活性を減少させる候補化合物を選択する段階。

30

【 0 0 6 2 】

適したレポーター遺伝子および宿主細胞は当技術分野において周知である。本発明のスクリーニング方法において用いられるレポーター構築物は、HCC関連マーカー遺伝子（例えば、MGC47816またはHES6）の転写調節領域を用いて調製することができる。マーカー遺伝子の転写調節領域が当業者に公知である場合、レポーター構築物は、以前の配列情報を用いて調製することができる。マーカー遺伝子の転写調節領域がまだ同定されていない場合、転写調節領域を含むヌクレオチドセグメントを、マーカー遺伝子のヌクレオチド配列情報に基づくゲノムライブラリーから単離することができる。

【 0 0 6 3 】

スクリーニングによって単離された化合物は、マーカー遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を阻害する薬物を開発するための候補物質として作用することができ、HCCの治療または予防に適用することができる。

40

【 0 0 6 4 】

その上、マーカー遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を阻害する化合物の構造の一部が、付加、欠失、および/または置換によって変換されている化合物も同様に、本発明のスクリーニング方法によって得ることができる化合物として含まれる。

【 0 0 6 5 】

本発明の方法によって単離される化合物を、ヒト、ならびにマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、ヒヒ、およびチンパンジーのような他の哺乳動物に対する薬剤として投与する場合、単離された化合物は直接投与すること

50

ができるか、または公知の薬学的調製法を用いて投与剤形に製剤化することができる。例えば、必要に応じて、薬剤は、糖衣錠、カプセル剤、エリキシル剤およびマイクロカプセルとして経口投与することができ、または水もしくは任意の他の薬学的に許容される液体による滅菌溶液または懸濁液の注射剤の剤形で非経口投与することができる。例えば、化合物を、薬学的に許容される担体または媒体、特に、滅菌水、生理食塩液、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定化剤、着色料、賦形剤、溶媒、保存剤、結合剤等と、一般的に許容される薬物の実施に必要な単位投与剤形として混合することができる。そのような製剤に含まれる活性成分の量によって、表記された範囲内で適した投与量を得ることができる。

【0066】

10

錠剤およびカプセル剤に混合することができる添加剤の例には、ゼラチン、コーンスターチ、トラガカントゴムおよびアラビアゴムのような結合剤；結晶セルロースのような賦形剤；コーンスターチ、ゼラチンおよびアルギン酸のような膨張剤；ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤；ショ糖、乳糖、またはサッカリンのような甘味料；ならびにペパーミント、冬緑油（*Gaultheria adenothrix* oil）、およびサクラランのような着色料が含まれるがこれらに限定されない。単位投与剤形がカプセル剤である場合、油のような液体担体も同様に上記の成分にさらに含まれ得る。注射用滅菌組成物は、注射に適した蒸留水のような溶媒を用いる通常の薬物の実施に従って製剤化することができる。

【0067】

生理食塩液、グルコース、ならびにD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、および塩化ナトリウムのような補助剤を含む他の等張液は、注射用水溶液として用いることができる。これらは、アルコール、例えばエタノール；プロピレングリコールおよびポリエチレングリコールのような多価アルコール；ならびにPolysorbate 80（商標）およびHC0-50のような非イオン性界面活性剤のような適した溶解剤と共に用いることができる。

20

【0068】

ゴマ油または大豆油は、油性液体として用いることができ、溶解剤として安息香酸ベンジルまたはベンジルアルコールと共に用いてもよく、リン酸緩衝液および酢酸ナトリウム緩衝液のような緩衝液；塩酸プロカインのような鎮痛剤；ベンジルアルコールおよびフェノールのような安定化剤；ならびに/または抗酸化剤と共に製剤化してもよい。調製された注射剤は、適したアンプルに充填してもよい。

30

【0069】

当業者に周知の方法を用いて、例えば、動脈内、静脈内、もしくは経皮注射剤として、または鼻腔内、気管支内、筋肉内、もしくは経口投与として患者に本発明の薬学的組成物を投与してもよい。投与用量および方法は、患者の体重および年齢ならびに投与方法に従って変化する；しかしながら、当業者は適した投与方法をルーチン的に選択することができる。化合物がDNAによってコードされる場合、遺伝子治療のためのベクターにDNAを挿入し、そのベクターを患者に投与し治療を行うことができる。投与量および投与方法は、患者の体重、年齢、および症状に応じて変化する；しかしながら、当業者はそれらを適切に選択することができる。

【0070】

40

例えば、本発明のタンパク質に結合して、その活性を調節する化合物の用量は症状に依存するが、用量は一般的に、健康なヒト成人（体重60 kg）に経口投与する場合、約0.1 mg～約100 mg/日、好ましくは約1.0 mg～約50 mg/日、およびより好ましくは約1.0 mg～約20 mg/日である。

【0071】

健康なヒト成人（体重60 kg）に注射剤として非経口投与する場合、患者、標的臓器、症状および投与方法によっていくらか差はあるものの、約0.01 mg～約30 mg/日、好ましくは約0.1～約20 mg/日、およびより好ましくは約0.1～約10 mg/日の用量で静脈内注射することが簡便である。同様に、他の動物の場合、体重60 kgに変換することによって適切な用量をルーチン的に計算してもよい。

50

【 0 0 7 2 】

HCCを有する対象の予後の評価

本発明はまた、試験細胞集団におけるMGC47816またはHES6の発現を、全病期にわたる患者に由来する参照細胞集団における遺伝子発現と比較する段階を含む、HCCを有する対象の予後を評価する方法も提供する。試験細胞集団および参照細胞集団におけるMGC47816もしくはHES6の遺伝子発現を比較することによって、または対象に由来する試験細胞における遺伝子発現パターンを経時的に比較することによって、対象の予後を評価することができる。

【 0 0 7 3 】

例えば、正常対照と比較して試験細胞におけるMGC47816またはHES6の発現の増加は、予後があまり好ましくないことを示す。逆に、試験細胞と正常対照とのMGC47816またはHES6の発現の類似は、対象の予後がより好ましいことを示す。

【 0 0 7 4 】

キット

本発明はまた、HCC検出試薬、例えば、MGC47816もしくはHES6核酸の一部と相補的であるオリゴヌクレオチド配列のような、MGC47816もしくはHES6核酸に特異的に結合するもしくはこれを同定する核酸、またはMGC47816もしくはHES6核酸によってコードされるタンパク質に結合する抗体が含まれる。試薬は、キットの形状で共に包装されてもよい。例えば、試薬は異なる容器に包装されてもよく、例えば核酸または抗体（固相マトリックスに結合するか、またはそれをマトリックスに結合させるための試薬とは個別に包装して）を一つの容器に入れ、対照試薬（陽性および/または陰性）を第二の容器に入れ、および/または検出可能な標識を第三の容器に入れてもよい。アッセイを行うための説明書（書面、テープ、CD-ROM等）も同様にキットに含めてもよい。キットのアッセイフォーマットは、ノザンハイブリダイゼーションまたはサンドイッチELISAであってもよく、その双方が当技術分野において公知である。

【 0 0 7 5 】

例えば、HCC検出試薬は、少なくとも一つのHCC検出部位を形成するために多孔性細片のような固相マトリックス上に固定してもよい。多孔性細片の測定または検出領域には、それぞれが核酸を含む複数の部位が含まれてもよい。試験細片はまた、陰性および/または陽性対照のための部位を含んでもよい。または、対照部位は試験細片とは分離した細片に存在してもよい。選択的に、異なる検出部位は、異なる量の固定された核酸を含んでもよく、すなわち第一の検出部位はより多量を含み、その後の部位にはより少量を含んでもよい。試験試料を加えると、検出可能なシグナルを示す部位の数は、試料に存在するHCCの量の定量的指標を提供する。検出部位は、任意の適した検出可能な形状に形成してもよく、典型的に、試験細片の幅に及ぶバーまたはドットの形状である。

【 0 0 7 6 】

HCCを阻害する方法

本発明はさらに、HCC関連遺伝子（例えば、MGC47816またはHES6）の発現、またはそれらの遺伝子産物の一つの活性を減少させることによって、対象におけるHCCの症状を治療または緩和する方法を提供する。HCCを有するまたは発症のリスクがある（または感受性がある）対象に対して、適した治療化合物を予防的または治療的に投与することができる。投与は全身性または局所的であり得る。そのような対象は、標準的な臨床法を用いて、またはMGC47816もしくはHES6の異常な発現レベル、もしくはそれらの遺伝子産物の一つの活性を検出することによって同定することができる。例示的な治療物質には、細胞増殖の阻害剤が含まれるがこれらに限定されない。

【 0 0 7 7 】

本発明の治療法には、MGC47816もしくはHES6の発現を減少させる段階、それらの遺伝子産物の一つの機能を減少させる段階、またはその双方が含まれる。発現は、当技術分野で公知のいくつかの任意の方法において阻害されてもよい。例えば、発現は、過剰発現された遺伝子の発現を阻害または拮抗する核酸、例えば過剰発現された遺伝子の発現を妨害す

10

20

30

40

50

るアンチセンスオリゴヌクレオチド、または低分子干渉RNAを対象に投与することによって阻害することができる。

【0078】

アンチセンス核酸

先に記述したように、MGC47816またはHES6のヌクレオチド配列に対応するアンチセンス核酸を用いて、MGC47816またはHES6の発現レベルを減少させることができる。HCCにおいてアップレギュレートされる遺伝子（例えば、MGC47816またはHES6）のヌクレオチド配列に対応するアンチセンス核酸は、HCCの治療において有用である。具体的に、MGC47816もしくはHES6のヌクレオチド配列、またはそれに対応するmRNAに結合することによって、本発明のアンチセンス核酸は作用し得り、それにより遺伝子の転写もしくは翻訳を阻害し、mRNAの分解を促進し、および/またはMGC47816もしくはHES6によってコードされるタンパク質の発現を阻害して、最終的にそのようなタンパク質の機能を阻害する。「アンチセンス核酸」という用語は、本明細書において、標的配列と完全に相補的であるヌクレオチドと、アンチセンス核酸が標的配列に特異的にハイブリダイズできる程度のヌクレオチドミスマッチを有するヌクレオチドの双方を含む。例えば、本発明のアンチセンス核酸には、参照配列に対して少なくとも15連続ヌクレオチドにわたって、少なくとも70%またはそれより高い、好ましくは少なくとも80%またはそれより高い、より好ましくは90%またはそれより高い、さらにより好ましくは少なくとも95%またはそれより高い相同性を有するポリヌクレオチドが含まれる。当技術分野で公知のアルゴリズムを用いて相同性を決定することができる。

10

20

【0079】

タンパク質をコードするDNAまたはmRNAに結合する、転写または翻訳を阻害する、mRNAの分解を促進する、および/またはタンパク質の発現を阻害することによって、本発明のアンチセンス核酸は、HCC関連マーカー遺伝子によってコードされるタンパク質を産生する細胞に作用し、それによってタンパク質機能を阻害する。

【0080】

本発明のアンチセンス核酸は、核酸に対して不活性である適した基剤とこれを混合することによって、リニメントまたは湿布のような外用剤に調製することができる。

【0081】

同様に、必要であれば、賦形剤、等張剤、溶解剤、安定化剤、保存剤、鎮痛剤等を加えることによって、アンチセンス核酸を錠剤、粉剤、顆粒剤、カプセル剤、リボソームカプセル、注射剤、溶液、点鼻液、凍結乾燥剤等に調製することができる。これらは公知の方法によって調製することができる。

30

【0082】

例えば、本発明のアンチセンス核酸は、疾患部位に直接適用することによって、またはそれが疾患部位に達するように血管に注射することによって、患者に投与することができる。持続性および膜透過性を増大させるために、アンチセンス封入媒体も同様に用いることができる。例には、リボソーム、ポリ-L-リジン、脂質、コレステロール、リポフェクチン、またはこれらの誘導体が含まれるがこれらに限定されない。

【0083】

本発明のアンチセンス核酸の用量は、患者の状態に従って適切に調節され、望ましい量で用いることができる。例えば、0.1~100 mg/kg、好ましくは0.1~50 mg/kgの用量範囲を投与することができる。

40

【0084】

本発明のアンチセンス核酸は、本発明のタンパク質の発現を阻害して、それによってタンパク質の生物活性を抑制するために有用である。さらに、本発明のアンチセンス核酸を含む発現阻害剤は、それらが本発明のタンパク質の生物活性を阻害できるという点において有用である。

【0085】

本発明のアンチセンス核酸には、改変オリゴヌクレオチドが含まれる。例えば、チオ化

50

ヌクレオチドを用いてオリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ抵抗性を付与してもよい。

【0086】

同様に、マーカー遺伝子に対するsiRNAを用いて、マーカー遺伝子の発現レベルを減少させることができる。「siRNA」という用語は、標的mRNAの翻訳を防止する二本鎖RNA分子を意味する。DNAが、そこからsiRNAが転写される鋳型となる技術を含む、siRNAを細胞に導入する標準的な技術が用いられる。本発明の状況において、siRNAは、MGC47816またはHES6のようなアップレギュレートされたマーカー遺伝子に対するセンス核酸配列およびアンチセンス核酸配列を含む。本発明のアンチセンスおよびsiRNA法を用いて、例えば細胞の悪性形質転換に起因するアップレギュレーションのような、アップレギュレートされたHCC遺伝子の細胞における発現を変化させることができる。標的細胞におけるMGC47816またはHES6に対応する転写物に対するsiRNAの結合によって、細胞によるタンパク質産生が減少する。オリゴヌクレオチドの長さは少なくとも10ヌクレオチドであり、天然に存在する転写物と同じ長さであってもよい。好ましくは、オリゴヌクレオチドの長さは、75ヌクレオチド未満、50ヌクレオチド未満、または25ヌクレオチド未満である。最も好ましくは、オリゴヌクレオチドの長さは約19~25ヌクレオチドである。AlexanderおよびSNU449細胞における発現を阻害するMGC47816 siRNAオリゴヌクレオチドの例には、配列番号：19を含む標的配列が含まれる。AlexanderおよびHepG2細胞において発現を阻害するHES6 siRNAオリゴヌクレオチドの例には、配列番号：26を含む標的配列が含まれる。

10

【0087】

siRNAは、単一の転写物が、標的遺伝子からのセンスおよび相補的アンチセンス配列の双方を有するように、すなわちヘアピンのように構築することができる。

20

【0088】

HCC関連遺伝子（例えば、MGC47816またはHES6）のsiRNAは標的mRNAとハイブリダイズして、それによって正常な一本鎖mRNA転写物と会合して、MGC47816またはHES6ポリペプチドの産生を減少または阻害し、それによって翻訳を干渉してタンパク質の発現を干渉する。siRNAの阻害活性を増強するために、ヌクレオチド「u」を標的配列のアンチセンス鎖の3'末端に付加することができる。付加される「u」の数は少なくとも2個、一般的に2~10個、好ましくは2~5個である。付加された「u」は、siRNAのアンチセンス鎖の3'末端で一本鎖を形成する。

【0089】

MGC47816またはHES6のsiRNAはmRNA転写物に結合することができる形状で細胞に直接導入することができる。または、siRNAをコードするDNAをベクター内に保持させてもよい。

30

【0090】

ベクターは、例えばHCC関連遺伝子標的配列を、両方の鎖の発現を（DNA分子の転写によって）可能にする様式で、配列に隣接して機能的に結合した調節配列を有する発現ベクターにクローニングすることによって作製してもよい（Lee, N.S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M.-J., Ehsani, A., Salvaterra, P., および Rossi, J. (2002) 「Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells。」 Nature Biotechnology 20 : 500~505）。HCC関連遺伝子（例えば、MGC47816またはHES6）のmRNAに対してアンチセンスであるRNA分子を、第一のプロモーター（例えば、クローニングされたDNAの3'のプロモーター配列）によって転写し、HCC関連遺伝子のmRNAに関してセンス鎖であるRNA分子は、第二のプロモーター（例えば、クローニングされたDNAの5'のプロモーター配列）によって転写される。センスおよびアンチセンス鎖はインビボでハイブリダイズして、HCC関連遺伝子を抑制するsiRNA構築物を作製する。または、二つの構築物は、siRNA構築物のセンスおよびアンチセンス鎖を作製するために利用することができる。クローニングされたHCC関連遺伝子（例えば、MGC47816またはHES6）は、単一の転写物が標的遺伝子からのセンスおよび相補的アンチセンス配列の双方を有する二次構造、例えばヘアピン、を有する構築物をコードすることができる。

40

【0091】

ヘアピンループ構造を形成するために、センスおよびアンチセンス配列の間に任意のヌ

50

クレオチド配列からなるループ配列を配置することができる。このように、本発明は、一般式5'-[A]-[B]-[A']-3'を有するsiRNAも同様に提供し、式中[A]は配列番号：19、26のヌクレオチドからなる群より選択される配列に対応するリボヌクレオチド配列であり、[B]は、ヌクレオチド3～23個からなるリボヌクレオチド配列であり、[A']は、[A]の相補的配列からなるリボヌクレオチド配列である。領域[A]は[A']とハイブリダイズして、領域[B]からなるループが形成される。ループ配列は好ましくは長さが2～23ヌクレオチドであり得る。例えばループ配列は、以下の配列からなる群より選択することができる (http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_506.html)。さらに、23ヌクレオチドからなるループ配列も同様に、活性なsiRNAを提供する (Jacque, J.-M., Triques, K., and Stevenson, M. (2002) 「Modulation of HIV-1 replication by RNA interference.」 *Nature* 418 : 435 ~ 438)。

10

【0092】

CCC, CCACC または CCACACC: Jacque, J. M, Triques, K., and Stevenson, M (2002) 「Modulation of HIV-1 replication by RNA interference.」 *Nature*, Vol. 418: 435 ~ 438。

【0093】

UUCG: Lee, N.S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M.-J., Ehsani, A., Salvaterra, P., および Rossi, J. (2002) 「Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells.」 *Nature Biotechnology* 20 : 500 ~ 505. Fruscoloni, P., Zamboni, M., and Tocchini-Valentini, G. P. (2003) 「Exonucleaseolytic degradation of double-stranded RNA by an activity in *Xenopus laevis* germinal vesicles.」 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(4): 1639 ~ 1644。

20

【0094】

UUCAAGAGA: Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D., および Sharp, P. A. (2002) 「Killing the messenger: Short RNAs that silence gene expression.」 *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4: 457 ~ 467。

【0095】

例えば、本発明のヘアピンループ構造を有する好ましいsiRNAを下記に示す。以下の構造において、ループ構造は、CCC、UUCG、CCACC、CCACACC、および UUCAAGAGAからなる群より選択することができる。好ましいループ配列は、UUCAAGAGA (DNAにおける「ttcaagaga」) である。本発明の状況において用いるために適している例示的なヘアピンsiRNAには、以下が含まれる：

30

MGC47816-siRNAに関して：

guguccgcugacagaacaa-[b]-uuguucugucagcgacac (配列番号：19の標的配列に関して)

HES6-siRNAに関して：

acuuuuagggaccucgag-[b]-cugcaggguccuaaaagu (配列番号：26の標的配列に関して)。

【0096】

適したsiRNAのヌクレオチド配列は、Ambion社のウェブサイト (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) から入手可能なsiRNAデザインコンピュータープログラムを用いて設計することができる。コンピュータープログラムは、以下のプロトコールに基づいてsiRNA合成のためのヌクレオチド配列を選択する。

40

【0097】

siRNA標的部位の選択

1. 目標転写物のAUG開始コドンから始めて、AAジヌクレオチド配列に関して下流にスキャンする。潜在的siRNA標的部位として、各AAの出現およびその3'隣接19ヌクレオチドを記録する。Tuschlらは、5'および3'非翻訳領域 (UTR) ならびに開始コドン近傍の領域 (75塩基以内) は調節タンパク質結合部位に富む可能性があることから、これらに対するsiRNAを設計しないことを推奨した。UTR結合タンパク質および/または翻訳開始複合体は、siRNAエンドヌクレアーゼ複合体の結合を妨害する可能性がある。

2. 潜在的標的部位をヒトゲノムデータベースと比較して、他のコード配列と有意な相同

50

性を有するいかなる標的配列も検討から除外する。相同性検索は、NCBIサーバー：www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/で認められ得る、BLASTを用いて行うことができる。

3. 合成のために適格な標的配列を選択する。Ambion社では、評価のための遺伝子の長さに沿って、好ましいいくつかの標的配列を選択することができる。

【0098】

MGC47816またはHES6遺伝子に隣接する調節配列は、その発現を独立して、または時間的もしくは空間的様式で調節することができるように、同一または異なり得る。siRNAは、例えば核内低分子RNA (snRNA) U6またはヒトH1 RNAプロモーターからのRNA pol III転写単位を含むベクターにMGC47816またはHES6遺伝子鑄型をクローニングすることによって細胞内で転写される。ベクターを細胞に導入するために、トランスフェクション増強物質を用いることができる。FuGENE (Roche Diagnostics)、リポフェクトアミン2000 (Invitrogen)、オリゴフェクトアミン (Invitrogen)、およびヌクレオフェクター (Wako Pure Chemical) は、トランスフェクション増強物質として有用である。

10

【0099】

本発明のsiRNAは、本発明のポリペプチドの発現を阻害して、それによって、本発明のポリペプチドの生物活性を抑制するために有用である。同様に、本発明のsiRNAを含む発現阻害剤は、それらが本発明のポリペプチドの生物活性を阻害できるという点において有用である。したがって、siRNAのような本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物は、HCCを治療するために有用である。

【0100】

20

抗体

または、HCCにおいて過剰発現された遺伝子 (例えば、MGC47816またはHES6) の遺伝子産物の機能は、遺伝子産物に結合する、またはそうでなければその機能を阻害する化合物を投与することによって阻害することができる。例えば、化合物は過剰発現された遺伝子産物に結合する抗体であってもよい。

【0101】

本発明は、抗体、特にアップレギュレートされたマーカー遺伝子によってコードされるタンパク質に対する抗体、またはそのような抗体の断片を用いることに言及する。本明細書において用いられるように、「抗体」という用語は、抗体を合成するために用いられる抗原 (すなわち、アップレギュレートされたマーカー遺伝子産物) またはそれに密接に関連した抗原に限って相互作用する (すなわち結合する) 特異的構造を有する免疫グロブリン分子を指す。本発明の状況において、抗体は、それがHCC関連マーカー遺伝子によってコードされるタンパク質に結合する限り、抗体の断片、または改変抗体であってもよい。例えば、抗体断片は、Fab、F(ab')₂、Fv、またはHおよびL鎖からのFv断片が適切なリンカーによってライゲーションされている一本鎖Fv (scFv) であってもよい (Huston J. S.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879~5883 (1988))。より具体的には、抗体断片は、パパインまたはペプシンのような酵素で抗体を処理することによって作製してもよい。または、抗体断片をコードする遺伝子を構築して、発現ベクターに挿入し、適切な宿主細胞において発現させてもよい (例えば、Co M. S.ら、J. Immunol. 152:2968~2976 (1994); Better M. およびHorwitz A. H. Methods Enzymol. 178:476~496 (1989); Pluckthun A. およびSkerra A. Methods Enzymol. 178:497~515 (1989); Lamoyi E. Methods Enzymol. 121:652~663 (1986); Rousseaux J.ら、Methods Enzymol. 121:663~669 (1986); Bird R. E. and Walker B. W. Trends Biotechnol. 9:132~137 (1991)を参照されたい)。

30

40

【0102】

抗体は、ポリエチレングリコール (PEG) のような多様な分子との結合によって改変してもよい。本発明は、そのような改変抗体を提供する。改変抗体は、抗体を化学的に改変することによって得ることができる。そのような改変方法は当技術分野において通常である。

【0103】

50

または、抗体は、非ヒト抗体に由来する可変領域、ならびにヒト抗体に由来する定常領域を有するキメラ抗体、または非ヒト抗体に由来する相補性決定領域（CDR）、ヒト抗体に由来するフレームワーク領域（FR）および定常領域を有するヒト化抗体を含んでもよい。そのような抗体は、公知の技術を用いて調製することができる。

【0104】

癌細胞において起こる特異的分子変化に向けられる癌治療は、進行乳癌の治療のためのトラスツズマブ（ハーセプチン）、慢性骨髄性白血病のためのイマチニブメチレート（グリベック）、肺の非小細胞癌（NSCLC）のためのゲフィチニブ（イレッサ）、ならびにB細胞リンパ腫およびマントル細胞リンパ腫のためのリツキシマブ（抗CD20 mAb）のような抗癌剤の臨床開発および規制当局の承認を通して確認されている（Ciardiello F, Tortora G. 「A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor.」 Clin Cancer Res. 2001 Oct;7(10):2958~70. 論評; Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. 「Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2.」 N Engl J Med. 2001 Mar 15;344(11):783~92.; Rehwald U, Schulz H, Reiser M, Sieber M, Staak JO, Morschhauser F, Driessen C, Rudiger T, Muller-Hermelink K, Diehl V, Engert A. 「Treatment of relapsed CD20+ Hodgkin lymphoma with the monoclonal antibody rituximab is effective and well tolerated: results of a phase 2 trial of the German Hodgkin Lymphoma Study Group.」 Blood. 2003 Jan 15;101(2):420~424.; Fang G, Kim CN, Perkins CL, Ramadevi N, Winton E, Wittmann S および Bhalla KN. (2000). Blood, 96, 2246~2253)。これらの薬剤は、形質転換細胞のみを標的とすることから、臨床的に有効であり、従来の抗癌剤より良好に認容されている。したがって、そのような薬剤は、癌患者の生存および生活の質を改善するのみならず、分子標的化癌治療の考え方を有効であるとした。さらに、標的化薬剤は標準的な化学療法と併用して用いる場合、その有効性を増強することができる（Gianni L. (2002). Oncology, 63 Suppl 1, 47~56.; Klejman A, Rushen L, Morrione A, Slupianek A および Skorski T. (2002). Oncogene, 21, 5868~5876)。したがって、さらなる癌治療はおそらく、従来の薬剤を、血管新生および浸潤のような腫瘍細胞の異なる特徴に向けられる標的特異的物質と併用する段階を含むであろう。

10

20

30

【0105】

これらの調節法は、エキスビボもしくはインビトロで（例えば細胞を物質と共に培養することによって）、またはインビボで（例えば物質を対象に投与することによって）行うことができる。方法は、差次的に発現された遺伝子の異常な発現、もしくはそれらの遺伝子産物の異常な活性を中和するための治療として、タンパク質もしくはタンパク質の組み合わせ、または核酸分子もしくは核酸分子の組み合わせを投与することを含む。

【0106】

遺伝子または遺伝子産物の発現レベルまたは生物活性の増加（疾患または障害を有しない対象と比較して）を特徴とする疾患および障害は、過剰発現された遺伝子または複数の遺伝子の活性に拮抗する（すなわち減少または阻害する）治療物質によって治療してもよい。活性に拮抗する治療物質は、治療的または予防的に投与することができる。

40

【0107】

したがって、本発明の状況において利用してもよい治療物質には、例えば（i）MGC47816またはHES6タンパク質に対する抗体；（ii）「機能障害性」のアンチセンス核酸または核酸（すなわちMGC47816またはHES6遺伝子配列のコード配列内での異種挿入による）；（iii）低分子干渉RNA（siRNA）；または（iv）調節物質（すなわち、MGC47816またはHES6ポリペプチドおよびその結合パートナーの間の相互作用を変化させる阻害剤または拮抗剤）が含まれる。機能障害性のアンチセンス分子は、相同的組換えによってポリペプチドの内因性の機能を「ロックアウト」するために利用される（例えば、Capecchi、Science 244: 1288~1292、1989を参照されたい）。

50

【0108】

レベルの増加は、ペプチドおよび/またはRNAを定量することによって、患者の組織試料（例えば、生検組織から）を得て、これをインビトロでRNAまたはペプチドレベル、発現されたペプチド（またはその発現が変化している遺伝子のmRNA）の構造および/または活性に関してアッセイすることによって、容易に検出することができる。当技術分野において周知である方法には、イムノアッセイ（例えば、ウェスタンブロット分析、免疫沈降に続くドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル電気泳動、免疫組織化学等）および/またはmRNAの発現を検出するためのハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、ノザンアッセイ、ドットブロット、インサイチュハイブリダイゼーション等）が含まれるがこれらに限定されない。

10

【0109】

予防的投与は、疾患または障害が予防される、またはその進行が遅れるように、疾患の明白な臨床症状の発現前に行われる。

【0110】

本発明の治療法は、HCCにおいて差次的に発現された遺伝子（例えば、MGC47816またはHES6）の遺伝子産物の活性の一つまたは複数を調節する物質を細胞に接触させる段階を含んでもよい。タンパク質活性を調節する物質の例には、核酸、タンパク質、そのようなタンパク質の天然に存在する同源のリガンド、ペプチド、ペプチド模倣体、および他の低分子が含まれるがこれらに限定されない。

20

【0111】

HCCに対するワクチン接種

本発明はまた、MGC47816またはHES6によってコードされるポリペプチド、該ポリペプチドの免疫学的活性断片、またはポリペプチドもしくはその断片をコードするポリヌクレオチドを含むワクチンを対象に投与する段階を含む、対象におけるHCCを治療または予防する方法にも関する。ポリペプチドの投与は、対象において抗腫瘍免疫を誘導しなければならない。抗腫瘍免疫を誘導するために、MGC47816もしくはHES6によってコードされるポリペプチド、該ポリペプチドの免疫学的活性断片、またはそのようなポリペプチドもしくはその断片をコードするポリヌクレオチドを、それを必要とする対象に投与する。ポリペプチドまたはその免疫学的活性断片は、HCCに対するワクチンとして有用である。場合によっては、タンパク質またはその断片を、T細胞受容体（TCR）に結合させた形状で投与してもよく、またはマクロファージ、樹状細胞（DC）、もしくはB細胞のような抗原提示細胞（APC）によって提示させてもよい。DCの強い抗原提示能のために、APCの中でもDCを用いることが最も好ましい。

30

【0112】

本発明の状況において、HCCに対するワクチンは、動物に接種した場合に抗腫瘍免疫の誘導能を有する物質を指す。本発明に従って、MGC47816またはHES6によってコードされるポリペプチドまたはその断片は、MGC47816またはHES6を発現するHCC細胞に対して強力かつ特異的免疫応答を誘導する可能性があるHLA-A24またはHLA-A*0201拘束エピトープペプチドであると示唆された。このように、本発明はまた、そのようなポリペプチドを用いる抗腫瘍免疫を誘導する方法を含む。一般的に、抗腫瘍免疫には、以下のような免疫応答が含まれる：

40

- 腫瘍に対する細胞障害性リンパ球の誘導
- 腫瘍を認識する抗体の誘導、および
- 抗腫瘍サイトカイン産生の誘導。

【0113】

したがって、特定のタンパク質が動物への接種時にこれらの免疫応答のいずれか一つを誘導する場合、タンパク質は、抗腫瘍免疫誘導作用を有すると決定される。タンパク質による抗腫瘍免疫の誘導は、タンパク質に対する宿主における免疫系の反応をインビボまたはインビトロで観察することによって検出することができる。

【0114】

50

例えば、細胞障害性Tリンパ球の誘導を検出する方法は周知である。具体的には、生体に入る外来物質は、抗原提示細胞（APC）の作用によってT細胞およびB細胞に提示される。APCによって提示される抗原に対して抗原特異的様式で応答するT細胞は、抗原による刺激により細胞障害性T細胞（または細胞障害性Tリンパ球：CTL）へと分化し、次いで増殖する（T細胞の活性化と呼ばれる）。したがって、特定のペプチドによるCTLの誘導は、APCによるT細胞に対するペプチドの提示の後に、CTLの誘導を検出することによって評価することができる。さらに、APCは、CD4+ T細胞、CD8+ T細胞、マクロファージ、好酸球、およびNK細胞を活性化する作用を有する。CD4+ T細胞およびCD8+ T細胞はまた、抗腫瘍免疫においても重要であることから、ペプチドの抗腫瘍免疫誘導作用は、指標としてこれらの細胞の活性化作用を用いて評価することができる。

10

【0115】

APCとして樹状細胞（DC）を用いてCTLの誘導作用を評価する方法は、当技術分野で周知である。DCは、APCの中でも最も強いCTL誘導作用を有する代表的なAPCである。この方法において、試験ポリペプチドを最初にDCに接触させ、その後このDCにT細胞を接触させる。DCとの接触後に、関心対象の細胞に対して細胞障害性を有するT細胞が検出されれば、試験ポリペプチドが細胞障害性T細胞を誘導する活性を有することを示す。腫瘍に対するCTLの活性は、例えば、指標として⁵¹Cr-標識腫瘍細胞の溶解を用いて検出することができる。または、指標として³H-チミジン取り込み活性、またはLDH（乳酸デヒドロゲナーゼ）放出を用いて腫瘍細胞損傷の程度を評価する方法も同様に周知である。

【0116】

20

DCを別として、末梢血単核球（PBMC）も同様にAPCとして用いてもよい。CTLの誘導は、GM-CSFおよびIL-4の存在下でPBMCを培養することによって増強されることが報告されている。同様に、CTLはキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）およびIL-7の存在下でPBMCを培養することによって誘導されることが示されている。

【0117】

これらの方法によってCTL誘導活性を有することが確認された試験ポリペプチドは、DC活性化作用およびその後のCTL誘導活性を有するポリペプチドであると考えられる。したがって、腫瘍細胞に対してCTLを誘導するポリペプチドは腫瘍に対するワクチンとして有用である。さらに、ポリペプチドとの接触を通して腫瘍に対するCTLの誘導能を獲得したAPCもまた、腫瘍に対するワクチンとして有用である。APCおよびCTLによる抗腫瘍免疫を用いる腫瘍に対するそのような治療法は、細胞性免疫療法と呼ばれる。

30

【0118】

一般的に、細胞性免疫治療のためにポリペプチドを用いる場合、CTL誘導の有効性は、異なる構造を有する複数のポリペプチドを混合し、かつそれらをDCに接触させることによって増加することが知られている。したがって、タンパク質断片によってDCを刺激する場合、多数の型の断片の混合物を用いることが有利である。

【0119】

または、ポリペプチドによる抗腫瘍免疫の誘導は腫瘍に対する抗体産生の誘導を観察することによって確認することができる。例えば、ポリペプチドに対する抗体を、ポリペプチドによって免疫した実験動物において誘導する場合、および腫瘍細胞の増殖がそれらの抗体によって抑制される場合、ポリペプチドは、抗腫瘍免疫の誘導能を有すると考えられる。

40

【0120】

抗腫瘍免疫は、本発明のワクチンを投与することによって誘導され、抗腫瘍免疫の誘導によって、HCCの治療および予防が可能となる。癌に対する治療または癌の発症の予防には、癌性細胞の増殖の阻害、癌の退縮、および癌の発生の抑制のような、任意の段階が含まれる。癌を有する個体の死亡率または罹患率の減少、血液中の腫瘍マーカーレベルの減少、癌に伴う検出可能な症状の緩和等も同様に、癌の治療または予防に含まれる。そのような治療および予防作用は、好ましくは、細胞増殖疾患に対するワクチンの治療または予防作用を、ワクチン投与を行わない対照と比較した場合に、例えば5%またはそれ未満の

50

有意水準で観測上統計学的に有意である。例えば、スチューデントt-検定、マンホイットニーU検定、またはANOVAを統計学的分析のために用いてもよい。

【0121】

免疫活性を有する上記のタンパク質またはタンパク質をコードするベクターを、アジュバントと組み合わせてもよい。アジュバントは、免疫学的活性を有するタンパク質と共に（または連続的に）投与した場合、タンパク質に対する免疫応答を増強する化合物を指す。例示的アジュバントには、コレラ毒素、サルモネラ毒素、ミョウバン等が含まれるがこれらに限定されない。さらに、本発明のワクチンは、薬学的に許容される担体と適切に併用してもよい。そのような担体の例には、滅菌水、生理食塩液、リン酸緩衝液、培養液等がある。さらに、ワクチンは必要に応じて、安定化剤、懸濁剤、保存剤、界面活性剤等を含んでもよい。ワクチンは、全身性または局所的に投与することができる。ワクチン投与は、1回投与によって実施され得り、または多数回投与によって追加免疫することができる。

10

【0122】

本発明のワクチンとしてAPCまたはCTLを用いる場合、腫瘍は、例えばエキスピボ法によって治療または予防することができる。より具体的には、治療または予防を受ける対象のPBMCを回収して、エキスピボで細胞にポリペプチドを接触させて、APCまたはCTLの誘導後、細胞を対象に投与してもよい。APCはまた、ポリペプチドをコードするベクターをエキスピボでPBMCに導入することによって誘導することができる。インビトロで誘導されたAPCまたはCTLは、投与前にクローニングすることができる。標的細胞を損傷する高い活性を有する細胞をクローニングおよび増殖させることによって、細胞性免疫治療をより有効に実施することができる。さらに、このようにして単離されたAPCおよびCTLは、細胞が由来する個体に対してだけでなく、他の個体からの類似の型の腫瘍に対しても、細胞性免疫治療のために用いられ得る。

20

【0123】

さらに、本発明のポリペプチドの薬学的有効量を含む癌のような細胞増殖疾患を治療または予防するための薬学的組成物が提供される。薬学的組成物は、抗腫瘍免疫を上昇させるために用いてもよい。

【0124】

HCCを阻害する薬学的組成物

30

本発明の状況において、適した薬学的製剤には、経口、直腸内、鼻腔内、局所（口腔内および舌下を含む）、腔内、もしくは非経口（筋肉内、皮下、および静脈内）投与に適した製剤、または吸入もしくは吹入による投与に適した製剤が含まれる。好ましくは、投与は静脈内である。製剤は選択的に用量単位で個別に包装される。

【0125】

経口投与に適した薬学的製剤には、それぞれが既定量の活性成分を含むカプセル剤、カシェ剤、または錠剤が含まれる。適した製剤にはまた、粉剤、顆粒剤、または溶液、懸濁液、および乳液が含まれるがこれらに限定されない。活性成分は選択的に、ボーラス舐剤またはペースト剤として投与される。経口投与のための錠剤およびカプセル剤は、結合剤、増量剤、潤滑剤、崩壊剤および/または湿潤剤のような従来の賦形剤を含んでもよい。錠剤は、選択的に一つまたは複数の製剤成分と共に圧縮または成型によって形成してもよい。圧縮錠は、適した装置によって、活性成分を粉剤または顆粒剤のような自由流動形状で、選択的に結合剤、潤滑剤、不活性希釈剤、潤滑剤、界面活性剤および/または分散剤と混合して圧縮することによって調製してもよい。成型錠は適した装置において不活性な液体希釈剤によって湿らせた粉末化合物の混合物を成型することによって形成してもよい。錠剤は、当技術分野で周知の方法に従ってコーティングしてもよい。経口液体調製物は、例えば水性または油性懸濁液、溶液、乳剤、シロップ剤、またはエリキシル剤の剤形であってもよく、または使用前に水もしくは他の適した溶媒と構成される乾燥製剤として提供されてもよい。そのような液体調製物は、懸濁剤、乳化剤、非水性溶媒（食用油を含んでもよい）および/または保存剤のような従来の添加剤を含んでもよい。錠剤は選択的に

40

50

、本明細書に記載の活性成分の遅延放出または徐放を提供するように製剤化してもよい。
錠剤の容器はそれぞれの口によって摂取される1錠を含んでもよい。

【0126】

非経口投与に適した製剤には、選択的に抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および意図されるレシピエントの血液と等張な製剤を与える溶質を含む、水性または非水性滅菌注射溶液；同様に、選択的に懸濁剤および/または濃化剤を含む水性および非水性滅菌懸濁液が含まれる。製剤は、例えば密封アンプルおよびバイアルのような単位用量または多用量容器の形状であってもよく、使用直前に滅菌液体担体、例えば生理食塩液、注射用水を加える必要があるのみであるフリーズドライ（凍結乾燥）状態で保存してもよい。または、製剤は、連続注入のための剤形であってもよい。即時調合注射溶液および懸濁液は、既に記述されている種類の滅菌粉末、顆粒剤、および錠剤から調製してもよい。

10

【0127】

適した直腸投与のための製剤には、ココアバターまたはポリエチレングリコールのような標準的な担体を伴う坐剤が含まれる。適した口腔内局所投与、例えば口腔内または舌下投与のための製剤には、ショ糖およびアカシアまたはトラガカントのような芳香基剤において活性成分を含むトローチ剤、ならびにゼラチンおよびグリセリンまたはショ糖およびアカシアのような基剤において活性成分を含む香錠が含まれる。鼻腔内投与の場合、本発明の化合物は、液体スプレー、分散粉末として、または滴剤の形状で用いてもよい。滴剤は、一つまたは複数の分散剤、溶解剤および/または懸濁剤を含む水性または非水性基剤によって製剤化してもよい。

20

【0128】

吸入投与の場合、化合物は、吹入剤、ネブライザー、加圧パック、またはエアロゾルスプレーを送達する他の従来の手段によって都合よく送達することができる。加圧パックは、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、または他の適したガスのような適した噴射剤を含んでもよい。加圧エアロゾルの場合、用量単位は、一定量を送達するための弁を提供することによって決定してもよい。

【0129】

または、吸入または吹入による投与に関して、化合物は乾燥粉末組成物の形状、例えば化合物と乳糖またはデンプンのような適した粉末基剤との粉末混合物の形状を取り得る。粉末組成物は、単位投与剤形、例えば吸入装置または吹入装置を利用して粉末を投与され得るカプセル剤、カートリッジ、ゼラチンまたはプリスターパックの形状で提供されてもよい。

30

【0130】

他の製剤には、治療的物質を放出する移植可能装置および粘着性パッチが含まれる。

【0131】

望ましいならば、活性成分を持続的に放出するように適合させた上記の製剤を用いてもよい。薬学的組成物はまた、抗菌剤、免疫抑制剤および/または保存剤のような他の活性成分を含んでもよい。

【0132】

特に上記した成分に加えて、本発明の製剤には、問題の製剤の型に関して当技術分野において従来の他の物質が含まれてもよい。例えば、経口投与に適した製剤には、着香料が含まれてもよい。

40

【0133】

好ましい単位投与剤形は、下記に引用するような活性成分の有効量、またはその適切な分画を含む。

【0134】

上記の条件のそれぞれに関して、組成物、例えばポリペプチドおよび有機化合物は、約0.1~約250 mg/kg/日の範囲の用量で経口または注射によって投与することができる。ヒト成人の用量範囲は一般的に、約5 mg~約17.5 g/日、好ましくは約5 mg~約10 g/日、お

50

よび最も好ましくは約100 mg～約3 g/日である。個別単位で提供される錠剤または提示の他の単位用量剤形は、簡便に、そのような用量で有効である量、またはそのような用量の複合、例えば約5 mg～約500 mg、通常約100 mg～約500 mgを含む単位を含んでもよい。

【0135】

用いられる用量は、対象の年齢および性別、治療される正確な障害、およびその重症度を含む多くの要因に依存するであろう。同様に、投与経路は病態およびその重症度に応じて変化する可能性がある。いずれにせよ、適切かつ最適な用量は、上記の要因を検討することによって当業者によってルーチンの計算され得る。

【0136】

本発明の局面は以下の実施例においてさらに記述される。これらの実施例は、説明する目的に限られ、特許請求の範囲に記述される本発明の範囲を制限することは意図されない。

【0137】

実施例1. 材料および一般的な方法

患者および組織標本

肝細胞癌組織および対応する非癌性組織は全て、インフォームドコンセントにより、手術を受けた患者の外科標本から得た。

【0138】

全ゲノムcDNAマイクロアレイ

本研究において、遺伝子23,040個を有する全ゲノムcDNAマイクロアレイを用いた。顕微解剖組織から抽出した総RNAをDNアーゼIによって処理し、Ampliscribe T7 Transcription キット (Epicentre Technologies) によって増幅した後、逆転写の際にCy-色素 (Amersham) によって標識した；非癌性組織由来のRNAをCy5によって標識し、腫瘍由来のRNAをCy3によって標識した。ハイブリダイゼーション、洗浄、および検出は以前に記述されているとおりに行い (Ono, K., *Cancer Res.*, 60: 5007-5011 (2000))、それぞれの標的スポットに関するCy5およびCy3の蛍光強度はArrayVisionソフトウェア (Amersham Pharmacia) によって生成された。バックグラウンドシグナルを差し引いた後、各スポットに関して2つの値を平均した。次に、各スライドガラスに関してハウスキーピング遺伝子52個のCy5およびCy3強度の平均値を一致させるように、スライドガラス上の全ての蛍光強度を標準化した。Cy3およびCy5の双方の強度が25,000蛍光単位未満である場合、遺伝子をさらなる試験から除外し、残りのうちCy3/Cy5シグナル比 > 2.0である遺伝子をさらなる評価のために選択した。

【0139】

細胞株

ヒト肝腫細胞株AlexanderおよびHepG2、ならびにサル線維芽細胞株COS7をAmerican Type Culture Collection (ATCC) から得た。もう一つのヒト肝腫細胞株Huh7は、Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) から得たが、SNU423、SNU449、およびSNU475はKorea cell-line bankから得た。細胞株は全て適切な培地において単層で増殖させた：Alexander、Huh7、HepG2、およびCOS7に関してはダルベッコ改変イーグル培地；SNU423、SNU449、およびSNU475に関してはRPMI1640を培地とし、10% ウシ胎児血清および1% 抗生物質 / 抗真菌溶液 (Sigma) をそれぞれに添加した。細胞は全て5% CO₂の湿潤大気中で37 °Cで維持した (Alexander、Huh7、HepG2、SNU423、SNU449、SNU475、およびCOS7)。

【0140】

RNA調製およびRT-PCR

総RNAをQiagen RNeasyキット (Qiagen) またはトリゾル試薬 (Life Technologies, Inc.) によって製造元のプロトコールに従って抽出した。総RNAの分割量10 μgを、ポリdT₁₂₋₁₈プライマー (Amersham Pharmacia Biotech) を用いてSuperscript II逆転写酵素 (Life Technologies) によって一本鎖cDNAに関して逆転写した。各一本鎖cDNA調製物を、PCR緩衝液 (TAKARA) の12 μl容量で行われる標準的なRT-PCR実験によるその後のPCR増幅のために希釈した。増幅は、GeneAmp PCRシステム9700 (Perkin-Elmer, Foster City, CA)

10

20

30

40

50

において、94 で4分間の変性後、94 で30秒、60 で30秒、および72 で60秒を21 (GAPDHに関して)、35 (MGC47816に関して) サイクル進行させ、94 で30秒、60 で40秒、および72 で60秒を35 (HES6に関して) サイクル進行させた。プライマー配列は以下の通りであった：

GAPDHに関して：フォワード、5'-ACAACAGCCTCAAGATCATCAG-3' (配列番号：3) およびリバーズ、5'-GGTCCACCACTGACACGTTG-3' (配列番号：4) ；

MGC47816に関して：フォワード、5'-CAAATAGGCAGACTGGAAAGATG-3' (配列番号：5) およびリバーズ、5'-CTAGGGAAGCAGTAGGATTTGGT-3' (配列番号：6) ；

HES6に関して：フォワード、5'-GAGCTCCTGAACCATCTGCTC-3' (配列番号：20) およびリバーズ、5'-CAAGATGTACAGAGCATCACAGC-3' (配列番号：21) 。

10

【 0 1 4 1 】

ノザンプロット分析

ヒト多組織プロット (Clontech、Palo Alto、CA) を、MGC47816およびHES6の 32 P標識PCR産物とハイブリダイズさせた。プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、および洗浄は、供給元の推奨に従って実施した。プロットは、-80 で72時間、増感紙とともにオートラジオグラフを行った。

【 0 1 4 2 】

発現ベクターの構築

MGC47816の全コード領域を、以下の遺伝子特異的プライマーセットを用いてRT-PCRによって増幅した：5'-ATTGTCGACGCTCGCCCTACTGAGCGAGCG-3' (配列番号：7)、および5'-AATCTC GAGAGCAGGAATTCACCTTAAGTTTAACTC-3' (配列番号：8)。

20

【 0 1 4 3 】

HES6の全コード領域を、以下の遺伝子特異的プライマーセットを用いてRT-PCRによって増幅した：5'-ATTGAATTCGCATGGCGCCACCCGCGGCG-3' (配列番号：22)、および5'-AATGGTACCT CACCAAGGCCTCCAGACACTCC-3' (配列番号：23)。PCR産物をpCMV-HAベクター (CLONTECH) の適切なクローニング部位にクローニングした。

【 0 1 4 4 】

イムノプロットティング

pCMV-HA-MGC47816およびpCMV-HA-HES6をトランスフェクトした細胞をPBSによって2回洗浄して、溶解緩衝液 (150 mM NaCl、1% Triton X-100、50 mM Tris-HCl、pH 7.4、1 mM DTT、および1×完全プロテアーゼ阻害剤カクテル (Boehringer)) において回収した。細胞をホモジナイズして10,000×gで30分間遠心した後、上清をBradfordアッセイ (Bio-Rad) によってタンパク質濃度に関して標準化した。タンパク質を10% SDS-PAGEによって分離し、ラット抗HA (Roche) 抗体によるイムノプロットを行った。HRP-結合ヤギ抗ラットIgG (Santa Cruz) をECL検出系 (Amersham) の二次抗体とした。

30

【 0 1 4 5 】

免疫組織化学染色

pCMV-HA-MGC47816およびpCMV-HA-HES6をトランスフェクトした細胞を、4% パラホルムアルデヒドを含むPBSによって15分間固定した後、0.1% Triton X-100を含むPBSによって室温で2.5分間透過性にした。その後、細胞をPBS内で2% BSAによって4 で12時間覆い、非特異的ハイブリダイゼーションを防止した。1：1000倍希釈したラット抗-HA (ROCHE) 抗体を一次抗体として用い、ローダミン結合抗ラット二次抗体 (Leinco and ICN) と共にインキュベートした後、反応を可視化した。核を4',6'-ジアミジン-2'-フェニルインドール二塩酸塩 (DAPI) によって対比染色した。蛍光画像は、ECLIPSE E800顕微鏡下で得た。

40

【 0 1 4 6 】

MGC47816-siRNAおよびHES6-siRNAを発現するプラスミドの構築および作用

低分子干渉RNA (siRNA) を発現するプラスミドベクターを調製するために、そのプロモーター領域を含むH1RNA遺伝子のゲノム断片を、H1RNAに関して以下のプライマーセット、および鋳型としてヒト胎盤DNAを用いてPCRによって増幅した：5'-TGGTAGCCAAGTGCAGGTTAT A-3' (配列番号：9) および5'-CCAAAGGGTTTCTGCAGTTTCA-3' (配列番号：10)。産物を精製

50

し、TAクローニングキットを用いて供給元 (Invitrogen) のプロトコルに従ってpCR2.0プラスミドベクターにクローニングした。H1RNAを含むBamHIおよびXhoI断片を、pcDNA3.1 (+)プラスミドのヌクレオチド1257~56断片にクローニングし、これを5'-TGCGGATCCAGAGCAGATTGTACTGAGAGT-3' (配列番号: 11)および5'-CTCTATCTCGAGTGAGGCGGAAAGAACCA-3' (配列番号: 12)を用いてPCRによって増幅した。ライゲーションしたDNAは、H1RNAに関する以下のプライマーによってPCR増幅の鋳型となった: 5'-TTTAAGCTTGAAGACATTTTGGAAAAAAC-3' (配列番号: 13)および5'-TTTAAGCTTGAAGACATGGGAAAGAGTGGTCTCA-3' (配列番号: 14)。産物をHind IIIによって消化した後、自己ライゲーションさせて、psiH1BX3.0ベクタープラスミドを産生した。対照プラスミド、psiH1BX-EGFPは、二本鎖オリゴヌクレオチド5'-CACCGAAGCAGCAGCAGCTTCTTCTTCAAGAGAGAAGAAGTCGTGCTGCTTC-3' (配列番号: 15)および5'-AAAAGAAGCAGCAGCAGCTTCTTCTTCTTGAAGAAGAAGTCGTGCTGCTTC-3' (配列番号: 16)をpsiH1BX3.0ベクターのBbsI部位にクローニングすることによって調製した。MGC47816-siRNAおよびHES6-siRNAを発現するプラスミドは、二本鎖オリゴヌクレオチドをpsiH1BX3.0ベクターにクローニングすることによって調製した。MGC47816-siRNAに関して用いたオリゴヌクレオチドは、5'-TCCCGTGTCCGCTGACAGAACAATTCAAGAGATTGTTCTGTGTCAGCGGACAC-3' (配列番号: 17)および5'-AAAAGTGTCCGCTGACAGAACAATCTCTTGAATTGTTCTGTGTCAGCGGACAC-3' (配列番号: 18) (psiH1BX-MGC47816-3)であった。HES6-siRNAに関して用いたオリゴヌクレオチドは、5'-TCCCACTTTTAGGGACCCTGCAGTTCAAGAGACTGCAGGGTCCCTAAAAGT-3' (配列番号: 24)および5'-AAAACTTTTAGGGACCCTGCAGTCTTGAAGTGCAGGGTCCCTAAAAGT-3' (配列番号: 25) (psiH1BX-HES6-2)であった。

10

20

【0147】

FuGENE6試薬 (Roche) またはNucleofector試薬 (Alexa) を用いて供給元の推奨に従って、プラスミドpsiH1BX-MGC47816-3をAlexanderおよびSNU449細胞にトランスフェクトし、psiH1BX-HES6-2をAlexanderおよびHepG2細胞にトランスフェクトした。総RNAをトランスフェクションの48時間後に細胞から抽出した。細胞を400~800 μ g/mlゲネチシン (G418) の存在下で14日間培養して、他所で記述されているようにギムザ染色 (MERCK、ドイツ) によって染色した。

【0148】

MTTアッセイ

10 cm培養皿上で細胞 (1×10^6 個) に、FuGene6 (Roche) を用いて供給元のプロトコルに従ってsiRNA発現ベクターまたは対照ベクターをトランスフェクトした。細胞生存率はトランスフェクションの7日後にMTTアッセイによって評価した。細胞計数キット-8 (DO JINDO) を各培養皿に1/10容量の濃度で加えて、プレートに37℃でさらに2時間インキュベートした; その後、マイクロプレートリーダー550 (Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA) によって吸光度を490 nmおよび参照として630 nmで測定した。

30

【0149】

統計分析

データに分散分析 (ANOVA) およびシェフェのF検定を行った。

【0150】

実施例2. 結果

40

その発現がヒトHCCにおいて高頻度にアップレギュレートされているD4999の同定

HCC 20例の発現プロフィールを、遺伝子23,040個を含むcDNAマイクロアレイを用いてその対応する非癌性肝組織と比較した。HCCにおいて一般的にアップレギュレートされた遺伝子において、UniGeneクラスター (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>) のHs.420244におけるEST (MGC47816) に対応する施設内アクセッション番号D4999を有する遺伝子が、対応する非癌性肝組織と比較してHCC 11例中7例において過剰発現された (図1)。マイクロアレイの結果を明確にするために、半定量的RT-PCRを行って、D4999の発現が対応する非癌性肝組織と比較してさらにHCC 8例中7例において増加していることが判明した (図2)。

【0151】

50

MGC47816の同定、発現、および構造

国立バイオテクノロジー情報センターのBLASTプログラムを用いる公共のデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) におけるD4999の配列との相同性検索から、MGC 47816 (GenBankアクセッション番号NM_173642) を含むEST、および染色体バンド1q34.1に割付されるGenBankアクセッション番号AA971400のゲノム配列が同定された。MGC47816とゲノム配列との比較により、この遺伝子が5つのエキソンからなることが判明した。推定の完全長のcDNAはヌクレオチド1528個からなり、オープンリーディングフレームはアミノ酸391個のタンパク質 (配列番号: 2) をコードするヌクレオチド1176個 (配列番号: 1) であった。予想されるMGC47816のアミノ酸配列はマウスの仮説上のタンパク質B930030J24と88%同一性を示した。Simple Modular Architecture Research Tool (SMART、<http://smart.embl-heidelberg.de>) によるタンパク質モチーフの検索により、予想タンパク質はカルバモイル-ホスフェートシンターゼL鎖およびATP結合ドメイン (コドン71~253位) を含むことが明らかになった (図3)。

10

【0152】

HAタグMGC47816タンパク質の細胞下局在

MGC47816タンパク質の細胞下局在を調べるため、HAタグを発現するプラスミド (pCMV-HA-MGC47816) をCOS7細胞に一過性にトランスフェクトした。細胞からの抽出物および抗HA抗体を用いるウェスタンブロット分析から、標識したタンパク質に対応する50-kDのバンドが明らかとなった (図4a)。これらの抗体によるその後の細胞の免疫組織化学染色により、タンパク質が主に細胞質に局在することが示された (図4b)。

20

【0153】

HCC細胞の増殖に及ぼすMGC47816-siRNAを発現するプラスミドの影響

癌細胞におけるMGC47816タンパク質の機能を調べるため、MGC47816-siRNAを発現するプラスミドを構築し、MGC47816の発現に及ぼすそれらの作用を調べた。AlexanderおよびSNU 449細胞への、psiH1BX-MGC47816-3 (Si-3)、psiH1BX-EGFP (EGFP)、またはpsiH1BX-mock (Mock) のトランスフェクションにより、psiH1BX-MGC47816-3 (Si-3) が、psiH1BX-EGFP (EGFP) またはpsiH1BX-mock (Mock) と比較して、細胞におけるMGC47816の発現を有意に抑制することが明らかとなった (図5a)。MGC47816の抑制によって肝細胞癌細胞の増殖抑制が起こるか否かを試験するため、AlexanderおよびSNU449細胞に、psiH1BX-MGC47816-3 (Si-3)、psiH1BX-EGFP (EGFP)、またはpsiH1BX-mock (Mock) をトランスフェクトした。psiH1BX-MGC47816-3をトランスフェクトした生存細胞は、psiH1BX-EGFP (EGFP)、またはpsiH1BX-mock (Mock) をトランスフェクトした細胞と比較して顕著に減少し、MGC47816の発現の減少が肝細胞癌細胞の増殖を抑制することを示唆した (図5b)。

30

【0154】

その発現がHCCにおいて高頻度に上昇しているC2298の同定

HCC 20例の発現プロフィールを、遺伝子23,040個を含むcDNAマイクロアレイを用いて、対応する非癌性肝組織について分析した。HCCにおいて一般的にアップレギュレートされた遺伝子において、HES6 (UniGeneクラスター (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>) のHs.42949) に対応する施設内アクセッション番号C2298の遺伝子が、対応する非癌性肝組織と比較してHCC 12例中11例において過剰発現された (図6a)。マイクロアレイの結果を明確にするために、半定量的RT-PCRを実施し、HES6の発現が対応する非癌性肝組織と比較してさらにHCC 8例中7例において増加していることを明らかにした (図6b)。

40

【0155】

HES6の同定、発現、および構造

国立バイオテクノロジー情報センターのBLASTプログラムを用いる公共のデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) におけるC2298の配列との相同性検索によって、HES6に対応するGenBankアクセッション番号BC007939を含むcDNA配列、および染色体バンド2q37に割付されるGenBankアクセッション番号AA357675のゲノム配列が同定された。HES6 cDNA配列は、推定224アミノ酸タンパク質 (配列番号: 28) (Genbankアクセッション番号BC007939) をコードするヌクレオチド675個 (配列番号: 27) のオープンリーディング

50

グフレームを含むヌクレオチド1375個からなった。最初のATGは、真核細胞における翻訳の開始のためのコンセンサス配列と一致する配列 (GGCATGG) に隣接する。HES6 cDNAとゲノム配列との比較から、この遺伝子が4つのエキソンからなることが判明した。さらに、プローブとしてHES6のPCR産物を用いる多組織ノザンブロット分析を実施し、精巣、脊髄、および骨格筋において発現される1.4 kbの転写物が検出された (図7)。Simple Modular Architecture Research Tool (SMART、<http://smart.embl-heidelberg.de>) によるタンパク質モチーフの検索により、予想タンパク質は、ヘリックス-ループ-ヘリックスドメインおよびオレンジドメイン (コドン31~80、94~135) を含むことが明らかとなった (図8)。

【0156】

HAタグを有するHES6タンパク質の細胞下局在

HES6タンパク質の細胞下局在を調べるために、HAタグを発現するプラスミド (pCMV-HA-HES6) を、COS7細胞に一過性にトランスフェクトした。細胞からの抽出物および抗HA抗体を用いるウェスタンブロット分析により、標識したタンパク質に対応する30-kDaのバンドが認められた (図9a)。これらの抗体による細胞のその後の免疫組織化学染色から、タンパク質が主に核に局在することが示された (図9b)。

【0157】

肝細胞癌細胞の増殖に及ぼすHES6-siRNAを発現するプラスミドの影響

癌細胞におけるHES6の機能を調べるために、HES6-siRNAを発現するプラスミドを構築して、HES6発現に及ぼすその作用を調べた。AlexanderおよびHepG2細胞へのpsiH1BX-HES6-2、psiH1BX-EGFP、またはpsiH1BX-mockのトランスフェクションにより、psiH1BX-HES6-2が、psiH1BX-EGFP、またはpsiH1BX-mockと比較して細胞におけるHES6の発現を有意に抑制することが判明した (図10a)。HES6の抑制によってHCC細胞の増殖抑制が起こるか否かを調べるために、AlexanderおよびHepG2細胞に、psiH1BX-HES6-2、psiH1BX-EGFP、またはpsiH1BX-mockをトランスフェクトした。psiH1BX-HES6-2をトランスフェクトした生存細胞は、psiH1BX-EGFP、またはpsiH1BX-mockをトランスフェクトした細胞と比較して顕著に減少し、これはHES6発現の減少によって肝細胞癌細胞の増殖が抑制されたことを示唆している (図10b)。

【0158】

実施例3. 考察

cDNAマイクロアレイ技術によって、様々なヒト新生物における遺伝子発現の包括的プロフィールの発見が可能となった。このアプローチは、癌細胞の複雑な特性を明らかにして、発現機構のより深い理解を可能にする。さらに、このアプローチによって、その発現レベルが腫瘍において脱調節されている遺伝子の同定が促進され、それによって腫瘍のより正確な診断、および新規治療戦略の開発につながる。

【0159】

発癌のメカニズムを解明するために計画された研究によって、抗腫瘍物質のためのいくつかの分子標的が同定された。例えば、ファルネシルトランスフェラーゼ (FTI) の阻害剤は、当初、その活性化が翻訳後のファルネシル化に依存するRasに関連する増殖シグナル伝達経路を阻害するために開発され、動物モデルにおいてRas依存的腫瘍を治療するために有効である (Sun J.ら、Oncogene 16: 1467~73 (1998))。ヒトにおいて、抗癌剤と、癌原遺伝子受容体HER2/neuに拮抗するための抗HER2モノクローナル抗体トラスツズマブを併用した臨床試験では、乳癌患者のサブセットの臨床反応および全体的な生存が改善された (Molina MA,ら、Cancer Res 61: 4744~9 (2001))。bcr-abl融合タンパク質を選択的に不活化するチロシンキナーゼ阻害剤STI-571は、bcr-ablチロシンキナーゼの構成的活性化が白血球の形質転換において重要な役割を果たす慢性骨髄性白血病を治療するために開発されている。この種の物質は、特異的遺伝子産物の発癌活性を抑制するように設計される (O'Dwyer ME,ら、Curr Opin Oncol 12: 594~7 (2000))。薬理遺伝学的観点から、発癌シグナルの抑制は腫瘍抑制作用を活性化するより実際に容易である。従って、MGC47816およびHES6タンパク質のような一般的にアップレギュレートされた遺伝子産物は、新規

10

20

30

40

50

抗癌剤を設計するための有望な潜在的標的となる。

【0160】

本明細書において示されるように、低分子干渉RNA (siRNA) を用いるMGC47816およびHES6の発現の抑制によって、癌細胞の増殖は顕著に減少した。低分子干渉RNA (siRNA) が増殖を抑制できる正確な分子メカニズムを解明する必要があるが、本明細書に示したデータは、これらの遺伝子がHCCの診断マーカーとして良好な候補物質であり、この難治性腫瘍を治療するために有効な薬剤を開発するための分子標的となり得ることを示している。

【0161】

工業的応用性

全ゲノムcDNAマイクロアレイに関するこれまでの遺伝子発現分析から、MGC47816およびHES6は特異的にアップレギュレートされた遺伝子であると同定された。本発明は、MGC47816およびHES6がまた、癌の予防および治療の標的として役立つことを明らかにする。MGC47816および/またはHES6の発現に基づいて、本発明は、HCCを同定または検出するための分子診断マーカーを提供する。

10

【0162】

本明細書に記述の方法はまた、HCCの予防、診断、および治療のためのさらなる分子標的を同定するためにも有用である。本明細書において報告したデータは、HCCの総合的な理解を高め、新規診断戦略の開発を促進し、治療薬および予防薬の分子標的の同定に役立つ。そのような情報は、肝細胞腫瘍の形成に関するより深い理解に貢献し、HCCを診断、治療、および最終的に予防するための新規戦略を開発するための指標を提供する。

20

【0163】

本明細書において引用した全ての特許、特許出願、および刊行物は、その全内容物が参照により本明細書に組み入れられる。さらに、本発明はその特定の態様に関連して詳細に説明してきたが、前述の説明は、例示的でありかつ本質的に説明的であり、本発明およびその好ましい態様を説明することを意図すると理解される。通常の実験を通して、本発明の精神および範囲を逸脱せず、様々な変更および改変を本発明に行うことができることを当業者は容易に認識するであろう。このように、本発明は、上記の説明によって定義されるのではなく、特許請求の範囲およびそれらの同等物によって定義されることが意図される。

【図面の簡単な説明】

30

【0164】

【図1】 cDNAマイクロアレイによって調べた原発性HCC 20例におけるD4999の相対的発現比 (癌 / 非癌) を示す。カットオフフィルターを通過した (Cy3およびCy5シグナルがいずれも25,000より大きい) HCC 11例中7例において、発現のアップレギュレーション (Cy3 : Cy5の強度比、> 2.0) を認めた。

【図2】さらなるHCC組織を用いて半定量的RT-PCRによって分析したD4999の発現を示す。Tは腫瘍組織を指す ; Nは正常組織を指す。GAPDHの発現を内部対照とした。

【図3】 MGC47816のゲノム構造およびMGC47816タンパク質の予想構造を示す。エキソンを四角の枠内に示し、MGC47816 cDNAのヌクレオチド番号を上のパネルに示す。

【図4】 HAタグMGC47816タンパク質の細胞下局在を示す。HAタグMGC47816タンパク質のイムノプロットングを図4(a)に示す。COS7細胞におけるタグ標識化タンパク質の免疫組織化学染色を図4(b)に示す。タンパク質をラット抗HAモノクローナル抗体によって染色して、ローダミン結合抗ラットIgG二次抗体によって可視化した。核をDAPIによって対比染色した。

40

【図5】 MGC47816の発現に及ぼすMGC47816-siRNAの影響 [図5(a)] ならびにAlexanderおよびSNU449細胞の生存率に及ぼすMGC47816-siRNAの影響 [図5(b)] を示す。

【図6】 図6(a)は、cDNAマイクロアレイによって調べた原発性HCC 20例におけるC2298の相対的発現比 (癌 / 非癌) を示す。カットオフフィルターを通過した (Cy3およびCy5シグナルがいずれも25,000より大きい) HCC 12例中11例において、発現のアップレギュレーション (Cy3 : Cy5強度比、> 2.0) を認めた。図6(b)は、さらなるHCC 8例 (T) およびそれ

50

らの対応する非癌性肝組織 (N) における半定量的 RT-PCR によって分析した C2298 の発現を示す。GAPDH の発現を内部対照とした。

【図 7】 HES6 の多組織ノザンブロット分析の結果を示す。HES6 の転写物の大きさは約 1.4 kb である。

【図 8】 HES6 のゲノム構造および HES6 タンパク質の予想構造を示す。エキソンを四角の枠で示し、HES6 cDNA のヌクレオチド番号を上のパネルに示す。

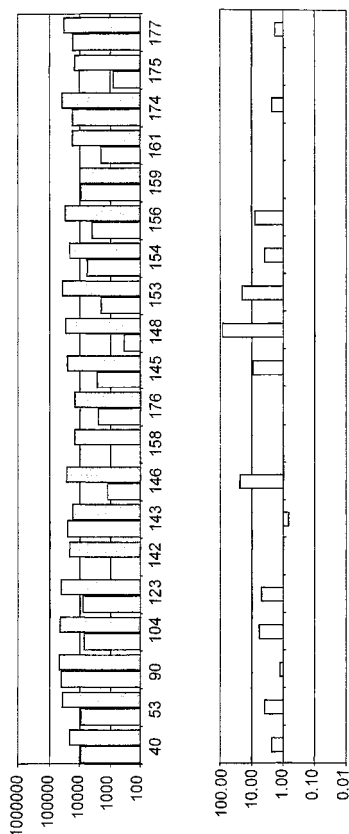
【図 9】 タグをつけた HES6 タンパク質の細胞下局在を示す。図 9(a) は、HA タグ標識化 HES6 タンパク質のイムノブロッティングの結果を示す。図 9(b) は、COS7 細胞におけるタグを付けたタンパク質の免疫組織化学染色の結果を示す。HA タグをつけた HES6 タンパク質を、ラット抗 HA モノクローナル抗体によって染色し、ローダミン結合抗ラット IgG 二次抗体によ

10

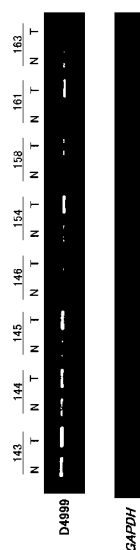
って可視化した。核を DAPI によって対比染色した。

【図 10】 HES6 の発現に及ぼす HES6-siRNA の影響 [図 10(a)] ならびに Alexander および HepG2 細胞の生存率に及ぼす HES6-siRNA の影響 (b) を示す。

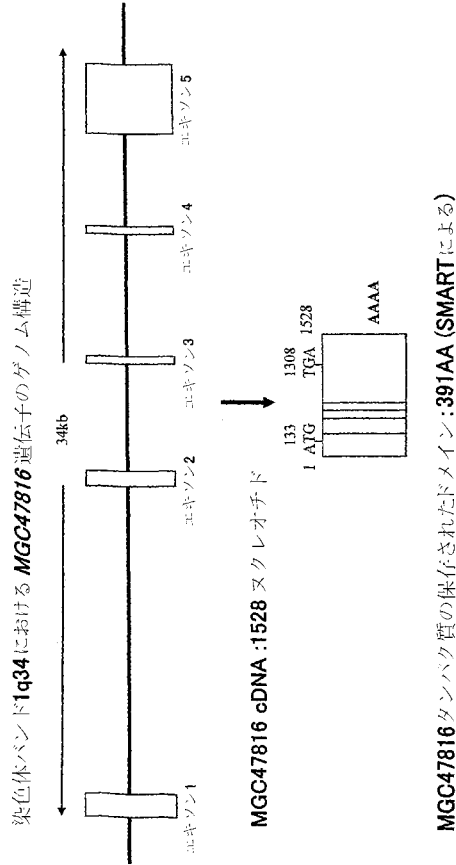
【図 1】



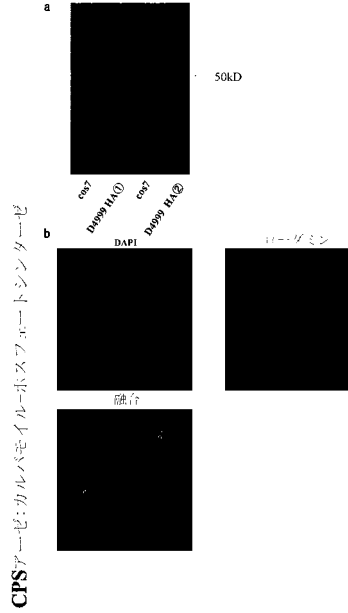
【図 2】



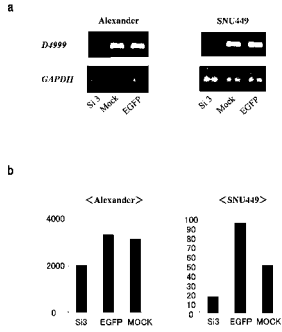
【図 3】



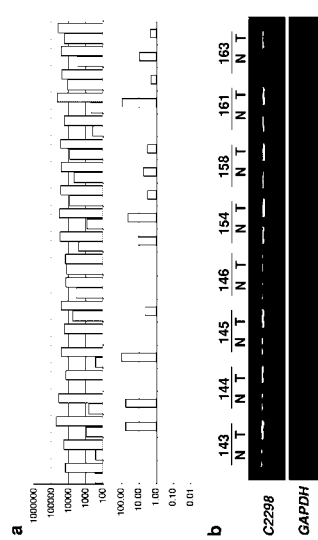
【図 4】



【図 5】



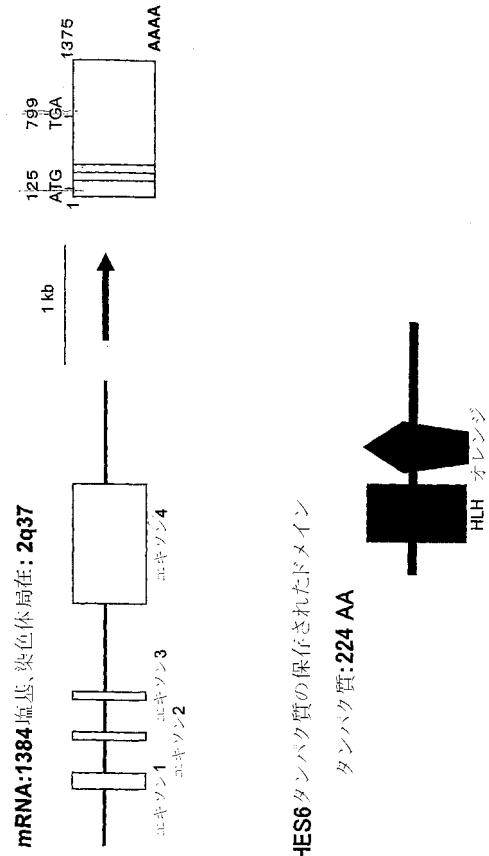
【図 6】



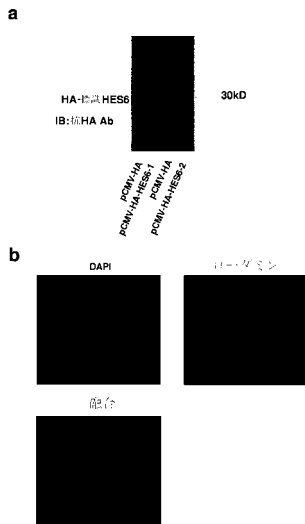
【図 7】



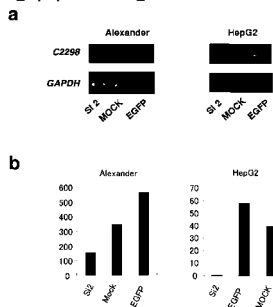
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【配列表】

2007506425000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP2004/013722

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/574

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 C12Q G01N

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, EMBASE, Sequence Search, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OKABE H ET AL: "Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: Identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 61, no. 5, 1 March 2001 (2001-03-01), pages 2129-2137, XP002235524 ISSN: 0008-5472 cited in the application	1-7
Y	Hs.42949 corresponds to HES6 abstract page 2129, column 2, paragraph 2 - page 2131, column 1, paragraph 2 page 2133, column 2, paragraph 2 page 2137, column 2, paragraph 3; table 1 ----- -/--	8-13, 15-19,23



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 March 2005

Date of mailing of the international search report

07/04/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tilkorn, A-C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/JP2004/013722

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/008578 A (BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS; PRIMIANO, THOMAS; CHA) 30 January 2003 (2003-01-30)	14,21, 22,25
Y	SEQ ID NO: 99 abstract page 8, line 15 - page 9, line 8 page 10, line 22 - line 31 page 13, line 32 - page 15, line 28 page 24, line 1 - line 23 page 38, line 23 - line 28 tables 1,3,4	8-13, 15-19,23
A	THOMPSON J D: "Applications of antisense and siRNAs during preclinical drug development" DRUG DISCOVERY TODAY, ELSEVIER SCIENCE LTD, GB, vol. 7, no. 17, 1 September 2002 (2002-09-01), pages 912-917, XP002236964 ISSN: 1359-6446 the whole document	16,17, 21,22,25
A	WO 03/027143 A (JAPAN AS REPRESENTED BY THE PRESIDENT OF THE UNIVERSITY OF TOKYO; ONCO) 3 April 2003 (2003-04-03) the whole document	1-19, 21-23,25
A	WO 03/025228 A (PROTEOLOGICS, INC; REISS, YUVAL; ALROY, IRIS) 27 March 2003 (2003-03-27) the whole document	1-19, 21-23,25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/013722

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.: 15-19 (with respect to IA)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 15-19 are directed to a method 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.: 20, 24
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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 Application No. PCT/JP2004 /013722

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 15-19 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 20,24

Claims 20 and 24 lack clarity (Art 6 PCT) because they do not allow the definition of any structural feature of the compounds to be used in the method or incorporated in the composition respectively. However, such a feature is essential to understand the scope of the claims. Since the description provides no examples of any such compounds, no search at all was possible with respect to claims 20 and 24.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 information on patent family members

 International Application No
PCT/JP2004/013722

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03008578	A	30-01-2003	CA 2454423 A1	30-01-2003
			EP 1427855 A2	16-06-2004
			WO 03008578 A2	30-01-2003
			WO 03007884 A2	30-01-2003
			US 2003180739 A1	25-09-2003
WO 03027143	A	03-04-2003	EP 1434879 A2	07-07-2004
			EP 1430152 A2	23-06-2004
			WO 03027322 A2	03-04-2003
			WO 03027143 A2	03-04-2003
			JP 2005503176 T	03-02-2005
			US 2005019768 A1	27-01-2005
			US 2004235018 A1	25-11-2004
WO 03025228	A	27-03-2003	WO 03025228 A1	27-03-2003
			US 2005004017 A1	06-01-2005

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z 4 C 0 8 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	Z
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

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

F ターム(参考) 2G045 AA26 AA40 BA14 BB10 BB14 BB24 BB50 BB51 CB02 DA36
 FA11 FB03 FB05 FB12 GC15
 4B024 AA01 AA12 BA36 CA04 CA05 CA09 DA02 DA03 HA14
 4B063 QA06 QA13 QA18 QA19 QQ08 QQ53 QQ58 QQ79 QR36 QR38
 QR48 QR55 QR62 QR77 QS25 QS33 QS34 QX02
 4C084 AA02 AA13 BA01 BA02 BA08 BA22 NA14 ZB26
 4C085 AA03 BB07 CC22 EE01
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26