

(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2007-525203**(P2007-525203A)**

(43) 公表日 平成19年9月6日(2007.9.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48 Z	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 C O 8 4
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 A	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 53 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-523887 (P2006-523887)	(71) 出願人	502240113
(86) (22) 出願日	平成17年2月18日 (2005.2.18)		オンコセラピー・サイエンス株式会社
(85) 翻訳文提出日	平成18年7月27日 (2006.7.27)		神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1
(86) 国際出願番号	PCT/JP2005/003081	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開番号	W02005/083086		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成17年9月9日 (2005.9.9)	(74) 代理人	100128048
(31) 優先権主張番号	60/548, 335		弁理士 新見 浩一
(32) 優先日	平成16年2月27日 (2004.2.27)	(72) 発明者	中村 祐輔
(33) 優先権主張国	米国 (US)		神奈川県横浜市青葉区あざみ野1丁目17番33号
(31) 優先権主張番号	60/555, 809	(72) 発明者	中川 英刀
(32) 優先日	平成16年3月24日 (2004.3.24)		東京都品川区上大崎3丁目36-11-103
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 PRCおよびPDACaの治療標的としてのEphA4

(57) 【要約】

本明細書には前立腺癌 (PRC) を発症する素因を診断するための客観的な方法が記載されている。1つの態様において、本診断方法はEphA4の発現レベルを決定する段階を含む。本発明はさらに、PRCの治療に有用な治療薬のスクリーニング方法、PRCの治療方法を提供する。本発明はまた、細胞を、EPHA4のsiRNAの組成物と接触させることにより、癌細胞の増殖を阻害するための方法も特徴とする。癌の治療方法も本発明の範囲に含まれる。本発明はまた、提供された方法において有用な核酸配列およびベクターを含む産物、ならびにそれらを含む組成物も特徴とする。本発明はまた、腫瘍細胞、例えば膵癌細胞、特に膵管腺癌 (PDACa) を抑制するための方法も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象におけるPRCまたはPRCを発症する素因を診断する方法であって、患者由来の生物試料におけるEphA4の発現レベルを決定する段階を含み、該レベルが該遺伝子の正常対照レベルと比較して上昇していることにより、対象がPRCに罹患しているか、またはそれを発症するリスクを有することが示唆される、方法。

【請求項 2】

上昇が正常対照レベルを少なくとも10%上回る、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

発現レベルが、以下の段階からなる群より選択されるいずれか1つの方法によって決定される、請求項1記載の方法：

- (a) EphA4のmRNAを検出する段階；
- (b) EphA4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) EphA4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】

EphA4プローブと、患者由来の生物試料の遺伝子転写産物とのハイブリダイゼーションを検出する段階によって発現のレベルが決定される、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

ハイブリダイゼーション段階がDNAアレイ上で行われる、請求項4記載の方法。

【請求項 6】

生物試料が上皮細胞を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 7】

生物試料がPRC細胞を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

生物試料がPRC由来の上皮細胞を含む、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

以下の段階を含む、PRCの治療または予防のための化合物のスクリーニング方法：

- a) 被験化合物を、EphA4によってコードされるポリペプチドと接触させる段階；
- b) ポリペプチドおよび被験化合物との間の結合活性を検出する段階；および
- c) ポリペプチドと結合する化合物を選択する段階。

【請求項 10】

以下の段階を含む、PRCの治療または予防のための化合物のスクリーニング方法：

- a) 候補化合物を、EphA4を発現する細胞と接触させる段階；および
- b) EphA4の発現レベルを低下させる化合物を選択する段階。

【請求項 11】

細胞が前立腺癌細胞を含む、請求項10記載の方法。

【請求項 12】

以下の段階を含む、PRCの治療または予防のための化合物のスクリーニング方法：

- a) 被験化合物を、EphA4によってコードされるポリペプチドと接触させる段階；
- 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) ポリペプチドの生物活性を、被験化合物の非存在下で検出される生物活性と比較して抑制する化合物を選択する段階。

【請求項 13】

生物活性がチロシンキナーゼ活性である、請求項12記載の方法。

【請求項 14】

以下の段階を含む、PRCの治療または予防のための化合物のスクリーニング方法：

- a) 被験化合物を、EphA4遺伝子の転写調節領域、およびその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た細胞と接触させる段階；
- b) レポーター遺伝子の発現または活性を測定する段階；ならびに
- c) レポーター遺伝子の発現または活性のレベルを、被験化合物の非存在下におけるレ

10

20

30

40

50

ベルと比較して低下させる化合物を選択する段階。

【請求項 15】

対象におけるPRCの治療または予防の方法であって、該対象にアンチセンス組成物を投与する段階を含み、該組成物がEphA4のコード配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含む、方法。

【請求項 16】

対象におけるPRCの治療または予防の方法であって、該対象にsiRNA組成物を投与する段階を含み、該組成物がEphA4の発現を低下させる、方法。

【請求項 17】

siRNAがEphA4のセンス核酸およびアンチセンス核酸を含む、請求項16記載の方法。

10

【請求項 18】

siRNAが、SEQ ID NO: 10からなる配列に対応するリボヌクレオチド配列を標的配列として含む、請求項17記載の方法。

【請求項 19】

siRNAが、一般式5'-[A]-[B]-[A']-3'を有し、

式中、[A]が、SEQ ID NO: 10のヌクレオチドからなる配列に対応するリボヌクレオチド配列であり、

[B]が、約3～約23ヌクレオチドからなるリボヌクレオチド配列であり、かつ

[A']が、[A]の相補配列からなるリボヌクレオチド配列である、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

組成物がトランスフェクション促進物質を含む、請求項16記載の方法。

20

【請求項 21】

対象におけるPRCの治療または予防の方法であって、EphA4によってコードされるタンパク質と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、方法。

【請求項 22】

対象におけるPRCの治療または予防の方法であって、EphA4によってコードされるポリペプチドもしくは該ポリペプチドの免疫活性断片、またはその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、方法。

【請求項 23】

対象におけるPRCの治療または予防の方法であって、請求項9～14のいずれか一項記載の方法によって得られた化合物を投与する段階を含む、方法。

30

【請求項 24】

PRCの治療または予防のための組成物であって、有効成分として、EphA4に対するアンチセンスポリヌクレオチドまたは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、組成物。

【請求項 25】

siRNAが、SEQ ID NO: 10からなるヌクレオチド配列を標的配列として含む、請求項24記載の組成物。

【請求項 26】

PRCの治療または予防のための組成物であって、有効成分として、EphA4によってコードされるタンパク質と結合する抗体またはその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、組成物。

40

【請求項 27】

PRCの治療または予防のための組成物であって、有効成分として、請求項9～14のいずれか一項記載の方法によって選択された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、組成物。

【請求項 28】

対象における膵癌の治療または予防のための方法であって、EphA4のsiRNAを含む組成物を対象に投与する段階を含む方法。

50

【請求項 29】

siRNAがEphA4のセンス核酸およびアンチセンス核酸を含む、請求項28記載の方法。

【請求項 30】

膵癌が膵管腺癌（PDACa）である、請求項28記載の方法。

【請求項 31】

siRNAが、SEQ ID NO：10からなる配列に対応するリボヌクレオチド配列を標的配列として含む、請求項29記載の方法。

【請求項 32】

siRNAが、一般式5'-[A]-[B]-[A']-3'を有し、

式中、[A]が、SEQ ID NO：10のヌクレオチドからなる配列に対応するリボヌクレオチド配列であり、

[B]が、約3～約23ヌクレオチドからなるリボヌクレオチド配列であり、かつ

[A']が、[A]からなる相補配列からなるリボヌクレオチド配列である、請求項31記載の方法。

【請求項 33】

組成物がトランスフェクション促進物質を含む、請求項28記載の方法。

【請求項 34】

センス鎖およびアンチセンス鎖を含む二本鎖分子であって、センス鎖がSEQ ID NO：10からなる標的配列に対応するリボヌクレオチド配列を含み、アンチセンス鎖が該センス鎖に対して相補的なリボヌクレオチド配列を含み、該センス鎖および該アンチセンス鎖が互いにハイブリダイズして二本鎖分子を形成し、EphA4遺伝子を発現する細胞に導入された場合に該遺伝子の発現を阻害するような、二本鎖分子。

【請求項 35】

標的配列が、SEQ ID NO：1からなるヌクレオチド配列由来の少なくとも約10個の連続したヌクレオチドを含む、請求項34記載の二本鎖分子。

【請求項 36】

標的配列が、SEQ ID NO：1からなるヌクレオチド配列由来の約19～約25個の連続したヌクレオチドを含む、請求項35記載の二本鎖分子。

【請求項 37】

一本鎖リボヌクレオチド配列を介して結びついているセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む単一のリボヌクレオチド転写産物である、請求項36記載の二本鎖分子。

【請求項 38】

約100ヌクレオチド長未満のオリゴヌクレオチドである、請求項35記載の二本鎖分子。

【請求項 39】

約75ヌクレオチド長未満のオリゴヌクレオチドである、請求項38記載の二本鎖分子。

【請求項 40】

約50ヌクレオチド長未満のオリゴヌクレオチドである、請求項39記載の二本鎖分子。

【請求項 41】

約25ヌクレオチド長未満のオリゴヌクレオチドである、請求項40記載の二本鎖分子。

【請求項 42】

二本鎖分子が約19と約25の間のヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドである、請求項41記載の二本鎖ポリヌクレオチド。

【請求項 43】

請求項35記載の二本鎖分子をコードするベクター。

【請求項 44】

二次構造を有する転写産物をコードし、センス鎖およびアンチセンス鎖を含む、請求項43記載のベクター。

【請求項 45】

転写産物がセンス鎖およびアンチセンス鎖を結びつける一本鎖リボヌクレオチド配列をさらに含む、請求項44記載のベクター。

【請求項 46】

センス鎖核酸およびアンチセンス鎖核酸の組み合わせを含むポリヌクレオチドを含むベクターであって、センス鎖核酸がSEQ ID NO: 10からなるヌクレオチド配列を含み、アンチセンス鎖核酸がセンス鎖に対して相補的な配列からなる、ベクター。

【請求項 47】

ポリヌクレオチドが、一般式5' - [A] - [B] - [A'] - 3'を有し、
式中、[A]が、SEQ ID NO: 10からなるヌクレオチド配列であり、
[B]が、約3～約23ヌクレオチドからなるヌクレオチド配列であり、かつ
[A']が、[A]に相補的なヌクレオチド配列である、請求項46記載のベクター。

【請求項 48】

膀胱癌の治療または予防のための薬学的組成物であって、有効成分として、EphA4の低分子干渉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、薬学的組成物。

【請求項 49】

siRNAが、SEQ ID NO: 10からなるヌクレオチド配列を標的配列として含む、請求項48記載の薬学的組成物。

【請求項 50】

siRNAが、一般式5' - [A] - [B] - [A'] - 3'を有し、
式中、[A]が、SEQ ID NO: 10のヌクレオチド配列に対応するリボヌクレオチド配列であり、
[B]が、3～23ヌクレオチドからなるリボヌクレオチド配列であり、かつ
[A']が、[A]の相補的なリボヌクレオチド配列である、請求項49記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

本発明は、前立腺癌 (PRC) および膵管腺癌 (PDACa) を発症する素因の検出および診断の方法に関する。本発明はまた、前立腺癌および膵管腺癌 (PDACa) の治療および予防の方法にも関する。特に、本発明はEphA4に関する。

【0002】

本出願は、2004年2月27日に提出された米国仮特許出願第60/548,335号、および2004年3月24日に提出された米国仮特許出願第60/555,809号の恩典を主張し、それらの内容はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0003】

背景技術

前立腺癌 (PRC) は、男性において最も頻度の高い悪性腫瘍の一つであり、米国および欧州では癌関連死の2番目の原因である (Gronberg et al., 2003)。血清中の前立腺特異抗原 (PSA) の検査によって初期のPRCを検出することができ、これは現在、高リスク集団におけるPRCのスクリーニングのための判断基準となっている。

【0004】

先進国における前立腺癌の発生率は、欧米風の食事の普及および高齢者人口の増加に応じて、着々と増加している。前立腺特異抗原 (PSA) に関する血清検査による早期診断は、有効のある手術の機会を提供し、前立腺癌の予後を著しく改善しているが、前立腺全摘出術による治療を受けた患者の30%までもが、癌が再発している (Han et al., 2001)。前立腺癌の増殖は初めのうちアンドロゲン依存性であるため、ほとんどの再発癌または進行癌はアンドロゲン除去療法に反応する。しかしながら、それらは最終的にはアンドロゲン非依存的な疾患に進行し、その時点ではそれらはもはやアンドロゲン除去療法には反応しない。前立腺癌の最も深刻な臨床的問題は、アンドロゲン非依存的な前立腺癌が他のいかなる治療法にも反応しないことであり (Gronberg, 2003)、前立腺癌に対するアンドロゲ

10

20

30

40

50

ン除去療法以外の新たな治療法を確立することは、前立腺癌の対応のための緊急課題となっている。

【0005】

高度前立腺上皮内腫瘍 (PIN) は、浸潤性PRCに進行する可能性のある、腺房の基底膜の浸潤を伴わない主な前癌病変として広く受け入れられている (McNeal and Bostwick et al. 1986、DeMarzo et al. 2003、Abate-Shen et al. 2000、Montironi et al. 2002)。PINは血清中PSA濃度を有意に上昇させず、かつ超音波で検出され得ない。

【0006】

高度PINはPRCのマーカーとして高い的中率を有し、その同定は、同時併発的または後発性の浸潤性PRCについての反復的な生検の根拠となる。この微細な病変を確認し得るのは前立腺針生検のみであり、その同定は、同時併発性または後発性の浸潤性PRCについて調べるために反復的な生検を行う理由となる (Bostwick 2000)。任意の共存する前立腺癌を除外するため飽和前立腺生検を実施し、その後3~6カ月毎に反復的な前立腺生検を行うことが、高度PINを有することが見いだされた患者を管理するための現時点での唯一の方法である。しかしながら、この診断の信頼性は、前立腺針生検の手技、組織学的処理、および、検査を行う病理医の経験に大きく依存する (van der Kwast et al. 2003)。彼らはPRC由来のPRC病変を完全に識別することはできず、またPINを有する高リスクの人々の中から浸潤性PRCを有する患者を特定することもできない。

【0007】

このため、PINおよびPRCの正確な同定、ならびにPINを介する前立腺発癌現象の理解が、浸潤性PRCの診断および患者管理における誤りを回避するために重要である (Steiner 2001)。しかしながら、PINの自然歴およびPINからPRCへの推定的移行の分子機構は不明なままであり、PRCを伴わないこれらのPIN病変を治療すべきか否かについても未だに議論がある。

【0008】

または、膵管腺癌 (PDACa) は、西洋社会において癌による死亡の5番目に多い原因であり、5年生存率のみの場合、すべての悪性腫瘍の中で死亡率が最も高いものの一つである。米国では毎年、推定30,700人の患者が膵癌と診断され、30,000人近くがこれらの疾患のために死亡している。患者の大半は疾患が現在の治療法には反応しない進行期で診断され、患者は数カ月しか生きることができない。外科的切除のみが治癒の可能性を提供し得るが、可能性のある治療的切除術を受けられるのはPDACa患者の10~20%に過ぎず、治療的手術を受けた後も患者の80~90%は再発し、この疾患のために死亡する。ゲムシタピンを含む化学療法および/または放射線療法を受けた患者でも、手術結果または生活の質にある程度の改善がみられるが、PDACaの任意の治療に対する強い抵抗性のため、長期間の生存に対する影響はわずかである。現時点では、ほとんどの患者の管理は一時的緩和に焦点を合わせている。

【0009】

このため、PDACaの新たな分子治療法の確立およびPDACaの新たな治療的分子標的の同定は、現在の膵癌治療にとって緊急課題となっている。

【0010】

cDNAマイクロアレイ技術によって、正常および悪性細胞における包括的遺伝子発現プロファイル、ならびに悪性細胞および対応する正常細胞における遺伝子発現の比較が可能となった (Okabe et al., Cancer Res. 61: 2129-37 (2001); Kitahara et al., Cancer Res. 61: 3544-9 (2001); Lin et al., Oncogene 21: 4120-8 (2002); Hasegawa et al., Cancer Res. 62: 7012-7 (2002))。このアプローチにより、癌細胞の複雑な特性の理解が可能となり、これは発癌現象の機構を理解するために役立つ。腫瘍において脱制御される遺伝子を同定することによって、個々の癌のより精密で正確な診断を得ることができ、新規治療標的を開発することができる (Bienz and Clevers, Cell 103: 311-20 (2000))。ゲノム全体での観点から腫瘍形成機構を明らかにするため、かつ新規治療薬開発および診断のための標的分子を発見するために、本発明者らは、遺伝子23,040個のcDNAマイ

10

20

30

40

50

クロアレイを用いて腫瘍細胞の発現プロファイルを解析している (Okabe et al., Cancer Res. 61: 2129-37 (2001) ; Kitahara et al., Cancer Res. 61: 3544-9 (2001) ; Lin et al., Oncogene 21: 4120-8 (2002) ; Hasegawa et al., Cancer Res. 62: 7012-7 (2002))。

【 0 0 1 1 】

発癌現象の機構を解明することを目的とした研究によって、抗腫瘍薬剤の分子標的の同定が既に促進されている。例えば、Rasに関連する増殖-シグナル伝達経路を阻害するように当初開発されたファルネシルトランスフェラーゼ阻害因子 (FTI) (この活性は翻訳後のファルネシル化に依存する) は、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 (He et al., Cell 99: 335-45 (1999))。抗癌剤と、原癌遺伝子受容体HER2/neuに拮抗するための抗HER-2モノクローナル抗体であるトラスツズマブとの併用によるヒトに対する臨床試験が実施されており、乳癌患者の臨床応答および総生存率の改善が得られている (Lin et al., Cancer Res. 61: 6345-9 (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因子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している、慢性骨髄性白血病を治療するために開発されている。これらの種類の薬剤は、特定の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 (Fujita et al., Cancer Res. 61: 7722-6 (2001))。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、新規抗癌剤を開発するための有用な標的として役立つ可能性がある。

【 0 0 1 2 】

CD8+細胞障害性Tリンパ球 (CTL) は、MHCクラスI分子上に提示された腫瘍関連抗原 (TAA) 由来の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証明されている。TAAの最初の例としてMAGEファミリーが発見されて以来、免疫学的アプローチを用いて他にも多くのTAAが発見されている (Boon, Int. J. Cancer 54: 177-80 (1993) ; Boon and van der Bruggen, J. Exp. Med. 183: 725-9 (1996) ; van der Bruggen et al., Science 254: 1643-7 (1991) ; Brichard et al., J. Exp. Med. 178: 489-95 (1993) ; Kawakami et al., J. Exp. Med. 180: 347-52 (1994))。発見されたTAAのいくつかは、現在免疫治療の標的として臨床開発段階にある。これまで発見されたTAAには、MAGE (van der Bruggen et al., Science 254: 1643-7 (1991))、gp100 (Kawakami et al., J. Exp. Med. 180: 347-52 (1994))、SART (Shichijo et al., J. Exp. Med. 187: 277-88 (1998))、およびNY-ESO-1 (Chen et al., 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に過剰発現されることが示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 (Umano et al., Brit. J. Cancer 84: 1052-7 (2001))、HER2/neu (Tanaka et al., Brit. J. Cancer 84: 94-9 (2001))、CEA (Nukaya et al., Int. J. Cancer 80: 92-7 (1999)) 等が含まれる。

【 0 0 1 3 】

TAAに関する基礎および臨床研究における著しい進歩にも関わらず (Rosenberg et al., Nature Med. 3: 321-7 (1998) ; Mukherji et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8078-82 (1995) ; Hu et al., Cancer Res. 56: 2479-83 (1996))、腺癌の治療に利用できるのは、ごく限られた数の候補TAAに過ぎない。癌細胞において豊富に発現されると共に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薬剤となるであろう。さらに、強力で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、様々なタイプの癌におけるペプチドワクチン法の臨床利用を促進することが期待される (Boon and van der Bruggen, J. Exp. Med. 183: 725-9 (1996) ; van der Bruggen et al., Science 254: 1643-7 (1991) ; Brichard et al., J. Exp. Med. 178: 489-95 (1993) ; Kawakami et al., J. Exp. Med. 180: 347-52 (1994) ; Shichijo et al., J. Exp. Med. 187: 277-88 (1998) ; Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1914-8 (1997) ; Harris, J. Natl. Cancer Inst. 88: 1442-5 (1996) ; Butterfield et al., Cancer Res. 59: 3134-42 (1999) ; Vissers et al., Cancer Res. 59: 5554-9 (1999) ; van der

Burg et al., J. Immunol. 156 : 3308-14 (1996) ; Tanaka et al., Cancer Res. 57 : 4465-8 (1997) ; Fujie et al., Int. J. Cancer 80 : 169-72 (1999) ; Kikuchi et al., Int. J. Cancer 81 : 459-466 (1999) ; Oiso et al., Int. J. Cancer 81 : 387-94 (1999)))。

【 0 0 1 4 】

特定の健康なドナー由来のペプチド刺激された末梢血単核細胞 (PBMC) は、ペプチドに
応答して著しいレベルの IFN- γ を産生するが、 ^{51}Cr -放出アッセイ法において HLA-A24 また
は -A0201 制限的に腫瘍細胞に対して細胞障害性を発揮することはまれであることは、繰り
返し報告されている (Kawano et al., Cancer Res. 60 : 3550-8 (2000) ; Nishizaka et
al., Cancer Res. 60 : 4830-7 (2000) ; Tamura et al., 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、白色人種のみならず
、日本人において最も一般的な HLA 対立遺伝子の一つである (Date et al., Tissue Antigens
47 : 93-101 (1996) ; Kondo et al., J. Immunol. 155 : 4307-12 (1995) ; Kubo et
al., J. Immunol. 152 : 3913-24 (1994) ; Imanishi et al., 「Proceeding of the eleventh
International Histocompatibility Workshop and Conference」、オックスフォード
大学出版、オックスフォード、1065 (1992) ; Williams et al., Tissue Antigens 49
: 129-33 (1997))。このように、これらの HLA によって提示される癌の抗原性ペプチド
は、日本人および白色人種における癌の治療において特に有用となる可能性がある。さら
に、インビトロでの低親和性 CTL の誘導は、通常、高濃度のペプチドの使用によって、高
レベルの特異的なペプチド/MHC 複合体を、CTL を効果的に活性化する抗原提示細胞 (APC)
上に生成する結果であろうことは公知である (Alexander-Miller et al., Proc. Natl. A
cad. Sci. USA 93 : 4102-7 (1996))。

10

20

【 発明の開示 】

【 0 0 1 5 】

発明の概要

本発明は、一部には、EphA4 をコードする遺伝子が、非癌組織と比較して、前立腺癌ま
たは膵管腺癌 (PDACa) において過剰発現されているという発見に基づく。EphA4 の cDNA は
3468 ヌクレオチド長である。EphA4 の核酸配列およびポリペプチド配列はそれぞれ SEQ ID
NO : 1 および 2 に示されている。配列データを以下のアクセッション番号から入手すること
もできる：

30

EphA4 : L36645、NM_004438。

【 0 0 1 6 】

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 EphA4 の発現
レベルを決定することによって、対象における PRC に対する素因の診断または判定を行う
方法の特徴とする。EphA4 の発現レベルが正常対照レベルと比較して変化している、例え
ば上昇していることにより、対象が PRC に罹患しているか、またはそれを発症するリスク
を有することが示唆される。

【 0 0 1 7 】

本発明の文脈において、「対照レベル」という語句は、対照試料において検出されるタン
パク質または遺伝子の発現レベルを指し、これには正常対照レベルが含まれる。対照レ
ベルは、単一の参照集団に由来するか、または複数の発現パターンに由来する単一の発現
パターンであり得る。例えば、対照レベルが、以前に検査した細胞由来の発現パターンの
データベースであってもよい。「正常対照レベル」とは、正常で健康な個体において、も
しくは PRC に罹患していないことが判明している個体の集団において検出される遺伝子ま
たはタンパク質の発現レベルを指す。正常個体とは、PRC および PIN の臨床症状を伴わない
個体である。

40

【 0 0 1 8 】

被験試料中に検出される EphA4 の発現レベルが正常対照レベルと比較して上昇している
ことにより、(取得した試料が由来する) 対象が PRC に罹患しているか、それを発症する
リスクを有することが示唆される。

50

【0019】

本発明によれば、遺伝子発現レベルは、正常対照レベルと比較して10%、25%、50%上昇または低下した場合に「変化している」と考えられる。または、遺伝子発現を、正常対照レベルと比較して1倍、2倍、5倍もしくはそれ以上上昇または低下した場合に、変化していると考えられる。発現は、例えばアレイ上で、EphA4プローブと患者由来の組織試料の遺伝子転写産物との選択的ハイブリダイゼーションを検出することによって決定される。

【0020】

本発明の文脈において、患者由来の組織試料は、被験対象、例えば、PRCを有することが判明しているか、またはその疑いがある患者から得られる任意の組織である。例えば、組織には上皮細胞が含まれていてもよい。より詳細には、組織は前立腺組織由来の上皮細胞であってもよい。

10

【0021】

本発明はさらに、EphA4遺伝子を発現する被験細胞を被験作用因子と接触させ、およびEphA4遺伝子の発現レベルまたはその遺伝子産物の活性を決定することによって、EphA4遺伝子の発現もしくはその遺伝子産物の活性を阻害、または増強する作用因子を同定する方法を提供する。被験細胞は、前立腺および膵臓の組織から得られた上皮細胞などの上皮細胞であってもよい。EphA4遺伝子の発現レベルまたはその遺伝子産物の生物活性が、PRCにおけるEphA4遺伝子または遺伝子産物のそれと比較して低下していることにより、被験作用因子がEphA4遺伝子の発現または機能の阻害因子であり、かつPRCの症状を軽減するために用いられ得ることが示唆される。

20

【0022】

本発明において、EphA4を好ましくは、アップレギュレートされたマーカー遺伝子として用いることができる。さらに、作用因子の存在下における発現レベルまたは生物活性が被験作用因子の非存在下におけるそれと比較して低下していることにより、その作用因子がEphA4遺伝子の阻害因子であってPRCの阻害に有用であることが示唆される。

【0023】

本発明はまた、EphA4ポリヌクレオチドまたはEphA4ポリペプチドと結合する検出用試薬を含むキットも提供する。

【0024】

EphA4遺伝子はまた、PRCのトランスフォーメーションに対する新規な化学予防薬を同定するための情報を提供し得、かつこれらの化学予防薬は、選択されたPRCの高リスク集団、すなわち高度PINを有する集団に対して、PRCの治療または予防を目的として投与することができる。

30

【0025】

本発明の治療方法には、対象におけるPRCの治療または予防の方法であって、阻害性核酸（例えば、アンチセンスsiRNAまたはリボザイム）組成物を対象に投与する段階を含む方法が含まれる。本発明の文脈において、アンチセンス組成物は標的遺伝子の発現を特異的に低下させる。例えば、アンチセンス組成物はEphA4遺伝子配列に対して相補的なヌクレオチドを含み得る。または、本方法が、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。本発明の文脈において、siRNA組成物は、EphA4核酸の発現を低下させる。さらにもう1つの方法において、対象におけるPRCの治療または予防を、リボザイム組成物を対象に投与することによって実施することもできる。本発明の文脈において、核酸特異的なリボザイム組成物は、EphA4核酸の発現を低下させる。

40

【0026】

本発明は、細胞増殖を阻害するための方法を提供する。提供される方法の中には、細胞を、EphA4の低分子干渉RNA（siRNA）を含む組成物と接触させる段階が含まれる。本発明はまた、対象における腫瘍細胞の増殖を阻害するための方法も提供する。このような方法には、EphA4の低分子干渉RNA（siRNA）を含む組成物を対象に投与する段階が含まれる。本発明のもう1つの局面は、生物試料の細胞におけるEphA4遺伝子の発現を阻害するための

50

方法を提供する。遺伝子の発現は、二本鎖リボ核酸（RNA）分子を、EphA4遺伝子の発現を阻害するのに十分な量で細胞に導入することによって阻害し得る。本発明のもう1つの局面は、例えば提供される方法において有用な、核酸配列およびベクターを含む産物、ならびにそれらを含む組成物に関する。提供される産物には、EphA4遺伝子を発現する細胞に導入された場合、その遺伝子の発現を阻害する性質を有するsiRNA分子がある。このような分子には、センス鎖がEphA4標的配列に対応するリボヌクレオチド配列を含み、アンチセンス鎖が前記センス鎖に対して相補的なリボヌクレオチド配列を含む、センス鎖およびアンチセンス鎖が含まれる。分子のセンス鎖およびアンチセンス鎖は、互いにハイブリダイズして二本鎖分子を形成する。

【0027】

本発明はまた、ワクチンおよびワクチン接種方法も含む。例えば、対象におけるPRCを治療または予防する方法が、EphA4の核酸によってコードされるポリペプチドまたはこのようなポリペプチドの免疫活性断片を含むワクチンを対象に投与する段階を含んでもよい。いくつかの態様において、EphA4ポリペプチドまたはその断片をコードする核酸分子を、患者に投与する。本発明の文脈において、免疫活性断片とは、完全長の天然タンパク質よりも長さは短いものの、完全長タンパク質によって誘導されるものに類似した免疫応答を誘導するポリペプチドである。例えば、免疫活性断片は、少なくとも8残基長であり、かつT細胞またはB細胞などの免疫細胞を刺激し得るものであるべきである。免疫細胞の刺激は、細胞増殖、サイトカイン（例えば、IL-2）の合成または抗体の産生を検出することによって測定可能である。

【0028】

特に定義していなければ、本明細書において用いた科学技術用語は全て、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。本明細書に記述の方法および材料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下記に記述する。本明細書において言及した全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。矛盾する場合、定義を含めて本明細書が優先する。さらに、材料、方法、および例は、説明するためのみであり、制限することを意図しない。

【0029】

本明細書に記述の方法の一つの長所は、明白な臨床症状を検出する前に疾患が同定されることである。本発明のその他の特徴および長所は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかであろう。

【0030】

発明の開示

本明細書で用いる場合、「1つの（a）、（an）」および「その（the）」という単語は、別に特記しない限り、「少なくとも1つの」を意味する。

【0031】

本明細書で用いる場合、「生物体」という用語は、少なくとも1つの細胞を含む、任意の生命存在を指す。生命のある生物体は、例えば単一の真核細胞のように単純でもよく、またはヒトを含む哺乳動物のように複雑でもよい。

【0032】

本明細書で用いる場合、「生物試料」という用語は、生物体全体、またはその組織、細胞もしくは構成成分の一部（例えば、血液、粘液、リンパ液、滑液、脳脊髄液、唾液、羊水、臍帯血、尿、膿液および精液を含むが、これらに限定されない、体液）のサブセットを指す。「生物試料」はさらに、生物体全体、またはその細胞、組織、もしくは構成成分の一部のサブセット、またはその画分もしくは一部分から調製された、ホモジネート、溶解物、抽出物、細胞培養物、または組織培養物を指す。最後に、「生物試料」は、その中で生物体を増殖させた、タンパク質もしくは核酸分子などの細胞成分を含む、普通ブイヨンまたはゲルなどの培地も指す。

【0033】

10

20

30

40

50

本発明は、一部には、EphA4をコードする遺伝子が、非癌組織と比較して膵管腺癌（PDA Ca）および前立腺癌（PRC）において過剰発現されているという発見に基づく。EphA4のcDNAは3468ヌクレオチド長である。EphA4の核酸配列およびポリペプチド配列はそれぞれSEQ ID NO：1および2に示されている。配列データを以下のアクセッション番号から入手することもできる：

EphA4：L36645、NM_004438。

【0034】

EphA4はチロシンキナーゼ活性を有する受容体のファミリーの一つである。それらのエフリンリガンドを伴う機能は神経系において詳細に研究されており、そこでEph受容体およびエフリン分子は、発生過程にある後脳のパターン形成、軸索の経路誘導、および神経堤細胞の遊走の誘導に関与する（Dodelet VC, and Pasquale EB. 「Eph receptors and ephrin ligands: embryogenesis to tumorigenesis.」 *Oncogene*, 19: 5614-5619, 2000）。これらの分子は胚の血管新生も調節し、Eph/エフリンと腫瘍血管新生との関連性に関する報告もいくつかある（Dodelet VC and Pasquale EB. 「Eph receptors and ephrin ligands: embryogenesis to tumorigenesis.」 *Oncogene*, 19: 5614-5619, 2000）。Eph受容体ファミリーは13種のメンバーからなり、それらのリガンドであるエフリンは、Aサブクラス（A1～A5）およびBサブクラス（B1～B3）の2つのサブクラスに分けられる。受容体は、配列類似性およびリガンド親和性に基づいて、Aサブクラス（EphA41～A8）およびBサブクラス（EphB1～B4、B6）に分けられる。A型受容体は典型的にほとんどまたはすべてのA型リガンドと結合し、B型受容体はほとんどまたはすべてのB型リガンドと結合するが、例外的にEphA4はA型リガンドおよびほとんどのB型リガンドの両方と結合し得る（Dodelet VC, and Pasquale EB. 「Eph receptors and ephrin ligands: embryogenesis to tumorigenesis.」 *Oncogene*, 19: 5614-5619, 2000）。

【0035】

本明細書で同定された、差次的に発現される遺伝子は、PRCを発症する素因のマーカーとして、およびPRCの症状の治療または緩和のためにその発現を変化させる遺伝子標的として、診断目的で用いられる。本明細書で用いる「素因」という用語は、PRCを発症する潜在的可能性を示す。

【0036】

細胞の試料におけるEphA4遺伝子の発現を測定することにより、PRCを診断することができる。同様に、種々の作用因子に対して反応したEphA4遺伝子の発現を測定することにより、PRCを治療するための作用因子を同定することができる。

【0037】

本発明は、EphA4遺伝子の発現を決定（例えば、測定）する段階を含む。公知の配列に関するGenBank（商標）データベースの登録によって提供される配列情報を用いることで、当業者に周知の技術を用いて、EphA4遺伝子の検出および測定を行うことができる。例えば、EphA4遺伝子に対応する配列データベース登録中の配列を、例えばノーザンブロットハイブリダイゼーション分析において、EphA4遺伝子に対応する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。プローブは典型的に、参照配列の少なくとも10、少なくとも20、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも200のヌクレオチドを含む。もう一つの例としては、配列を、例えば逆転写に基づくポリメラーゼ連鎖反応などの増幅に基づく検出方法において、EphA4核酸を特異的に増幅するプライマーを構築するために用いることができる。

【0038】

EphA4 mRNA配列を検出するために用いるプローブは典型的に、標的mRNAと選択的にハイブリダイズするように設計される。「選択的ハイブリダイゼーション」および関連した用語は、プローブおよびその標的がストリンジェントな条件下でハイブリダイズする能力を指す。例えば、30分間またはそれ以上にわたる68℃でのプレハイブリダイゼーションを「Rapid-hybバッファ」(Amersham LIFE SCIENCE)を用いて行い、標識したプローブを添加し、さらに1時間またはそれ以上にわたって68℃に加温することによって、ハイブリダ

10

20

30

40

50

イゼーションを行ってもよい。それに続く洗浄段階は、例えば、低ストリンジェント条件下で行い得る。低ストリンジェント条件とは、例えば、42℃、2×SSC、0.1% SDS、または好ましくは50℃、2×SSC、0.1% SDSである。より好ましくは、高ストリンジェント条件が用いられる。高ストリンジェント条件とは、例えば、室温で2×SSC、0.01% SDS中で20分間の洗浄を3回行い、次いで37℃で1×SSC、0.1% SDS中で20分間の洗浄を3回行い、かつ50℃で1×SSC、0.1% SDS中で20分間の洗浄を2回行うことである。しかしながら、温度および塩濃度などのいくつかの要因はハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を及ぼし得、かつ当業者は必要なストリンジェンシーを達成するためにこれらの要因を適切に選択することができる。

【0039】

10

次いで、被験細胞集団、例えば患者由来の組織試料における、EphA4遺伝子の発現レベルを、参照集団における同じ遺伝子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ーが公知である1つまたは複数の細胞が含まれる。被験細胞集団および参照細胞集団由来の標本におけるEphA4遺伝子の発現レベルを同時に決定してもよい。または、参照細胞集団におけるEphA4遺伝子の発現レベルは、以前に採取した前立腺管癌腫細胞（例えば、PRC細胞）または正常前立腺管上皮細胞（例えば、非PRC細胞）の標本における遺伝子の発現レベルを分析することによって得た結果に基づいて統計学的方法によって決定され得る。

【0040】

いずれにせよ、参照細胞集団と比較した、被験細胞集団における遺伝子発現のレベルは、PRCを発症する素因を示唆する。被験細胞集団における遺伝子の発現レベルが参照細胞集団の範囲に収まらない場合、対象はPRCを発症するリスクが高いと判断される。

20

【0041】

さらに、参照細胞集団がPRC細胞から構成される場合、被験細胞集団および参照細胞集団の間の遺伝子発現プロファイルに類似性があることにより、被験細胞集団がPRC細胞を含むことが示唆される。

【0042】

被験細胞集団におけるEphA4遺伝子の発現レベルは、それと参照細胞集団における対応するEphA4遺伝子の発現レベルとの相違が1.1倍を上回る、1.5倍を上回る、2.0倍を上回る、5.0倍を上回る、10.0倍、またはそれ以上に変動する場合、「変化している」とみなされる。

30

【0043】

被験細胞集団および参照細胞集団との間で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。例えば、対照核酸は、細胞の癌状態または非癌状態に依存して異ならないことが判明している核酸である。被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は、被験集団および参照集団におけるシグナルレベルの標準化に用いることができる。例示的な対照遺伝子には、例えば、 α -アクトニン、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。

【0044】

40

被験細胞集団は多数の参照細胞集団と比較することができる。多数の参照集団のそれぞれは公知のパラメーターに関して異なってもよい。したがって、被験細胞集団を、例えばPRC細胞を含むことが判明している第1の参照細胞集団、および例えば非PRC細胞（正常細胞）を含むことが判明している第2の参照集団と比較してもよい。被験細胞は、PRC細胞を含むことが判明しているか、またはそれが疑われる対象由来の組織型もしくは細胞試料中に含まれてもよい。

【0045】

被験細胞は、体組織または体液、例えば、生体液（例えば、血液または痰など）から得られる。例えば、被験細胞は前立腺組織から精製してもよい。好ましくは、被験細胞集団は上皮細胞を含む。上皮細胞は、好ましくは、癌性であることが判明しているか、または

50

それが疑われる組織由来のものである。参照細胞集団中の細胞は、被験細胞と類似した組織型に由来すべきである。任意で、参照細胞集団は細胞株、例えば、PRC細胞株（すなわち、陽性対照）または正常非PRC細胞株（すなわち、陰性対照）である。または、対照細胞集団が、アッセイされるパラメーターまたは条件が公知である細胞由来の分子情報のデータベースに由来してもよい。

【 0 0 4 6 】

対象は好ましくは、哺乳動物である。例示的な哺乳動物には、例えば、ヒト、非ヒト霊長動物、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシが含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 4 7 】

本明細書に開示した遺伝子の発現は、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のレベルで決定され得る。例えば、本発明の核酸配列を特異的に認識する（すなわち、選択的にハイブリダイズする）プローブを用いるノーザンハイブリダイゼーション分析を、遺伝子発現の決定に用いることができる。または、遺伝子発現を、例えば、EphA4遺伝子配列に対して特異的なプライマーを用いる、逆転写に基づくPCRアッセイ法を用いて測定することもできる。または、発現をタンパク質レベルで、すなわちEphA4遺伝子によってコードされるポリペプチドの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もできる。そのような方法は当技術分野で周知であり、例えば、遺伝子によってコードされるタンパク質に対する抗体を利用するイムノアッセイ法が含まれるが、これに限定されない。遺伝子によってコードされるタンパク質の生物活性は一般に周知である。

10

20

【 0 0 4 8 】

PRCの診断

本発明の文脈において、PRCは、細胞の被験集団（すなわち、患者由来の生物試料）由来のEphA4ポリヌクレオチドの発現レベルを測定することによって診断される。被験細胞集団は、好ましくは上皮細胞、例えば、前立腺組織から得られた細胞を含む。遺伝子発現を、血液または尿などの他の体液から測定することもできる。他の生物試料はタンパク質レベルの測定に用いられ得る。例えば、診断しようとする対象由来の血液または血清中のタンパク質レベルを、イムノアッセイ法または他の従来の生物アッセイ法によって測定することができる。

30

【 0 0 4 9 】

EphA4遺伝子の発現を被験細胞または生物試料において決定し、アッセイしたEphA4遺伝子に関わる正常対照発現レベルと比較する。正常対照レベルとは、PRCに罹患していないことが判明している集団において典型的に認められるEphA4遺伝子の発現プロファイルである。患者由来の組織試料におけるEphA4遺伝子の発現レベルの変化（例えば、上昇または低下）により、対象がPRCに罹患しているかそれを発症するリスクを有することが示唆される。例えば、被験集団におけるEphA4遺伝子の発現が正常対照レベルと比較して上昇していることにより、その対象がPRCに罹患しているかそれを発症するリスクを有することが示唆される。

【 0 0 5 0 】

正常対照レベルと比較して、被験集団におけるEphA4遺伝子に変化があることにより、対象がPRCに罹患しているかそれを発症するリスクを有することが示唆される。例えば、EphA4遺伝子に少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも80%、少なくとも90%、またはそれ以上の変化があることにより、対象がPRCに罹患しているかそれを発症するリスクを有することが示唆される。

40

【 0 0 5 1 】

個々の標本におけるEphA4の発現レベルは、EphA4遺伝子に対応するmRNA、またはEphA4遺伝子によってコードされるタンパク質を定量することによって評価され得る。mRNAの定量方法は当業者に公知である。例えば、EphA4に対応するmRNAのレベルはノーザンブロット法またはRT-PCRによって評価され得る。EphA4のヌクレオチド配列はすでに報告されて

50

いる。当業者は皆、EphA4遺伝子を定量するためのプローブまたはプライマーのヌクレオチド配列を設計することができる。

【0052】

また、EphA4の発現レベルを、その遺伝子によってコードされるタンパク質の活性または量に基づいて分析することもできる。EphA4タンパク質の量を決定するための方法は以下に示されている。例えば、イムノアッセイ法は、生物材料中のタンパク質の測定のために有用である。タンパク質またはその活性の測定のためには任意の生物材料を用いることができる。例えば、血清マーカーによってコードされるタンパク質の評価のために血液試料を分析する。一方、EphA4によってコードされるタンパク質の活性の測定のために適した方法を選択することができる。

10

【0053】

本発明では、PRCを発症する素因を診断するための診断薬も提供される。本発明の診断薬は、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドと結合する化合物を含む。好ましくは、EphA4のポリヌクレオチドとハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、またはEphA4のポリペプチドと結合する抗体がこのような化合物として用いられ得る。

【0054】

EphA4遺伝子の発現を阻害または増強する作用因子の同定

EphA4遺伝子の発現またはその遺伝子産物の活性を阻害する作用因子は、EphA4遺伝子を発現する被験細胞集団を被験作用因子と接触させること、およびEphA4遺伝子の発現レベルを決定することによって同定することができる。作用因子の存在下におけるEphA4遺伝子の発現レベルまたはその遺伝子産物の活性レベルが、正常対照レベルと比較して（または被験作用因子の非存在下における発現もしくは活性と比較して）低下していることにより、その作用因子がEphA4遺伝子の阻害因子であり、かつPRCの阻害に有用であることが示唆される。

20

【0055】

被験細胞集団は、EphA4遺伝子を発現する任意の細胞であってよい。例えば、被験細胞集団は、前立腺組織由来の細胞などの上皮細胞が含まれ得る。さらに、被験細胞はPRC細胞由来の不活化細胞株であってもよい。または、被験細胞は、EphA4遺伝子がトランスフェクトされた細胞、またはレポーター遺伝子と機能的に結合されたEphA4遺伝子由来の調節配列（例えば、プロモーター配列）がトランスフェクトされた細胞であってもよい。

30

【0056】

対象におけるPRCの治療の有効性の評価

本明細書で同定された、差次的に発現されるEphA4遺伝子は、PRCの治療の経過をモニターすることも可能にする。この方法において、PRCに対する治療を受けている対象から被験細胞集団が提供される。望ましい場合、治療の前、最中、および/または後のさまざまな時点で、被験細胞集団を対象から入手する。次いで、細胞集団におけるEphA4遺伝子の発現を決定し、かつPRCの状態が判明している細胞を含む参照細胞集団と比較する。本発明の文脈において、参照細胞は、目的の治療を受けているべきではない。

【0057】

参照細胞集団がPRC細胞を含まない場合、被験細胞集団および参照細胞集団におけるEphA4遺伝子の発現の類似性は、目的の治療が有効であることを示唆する。しかしながら、被験細胞集団および正常対照細胞集団におけるEphA4遺伝子の発現の相違は、臨床的な結果または予後があまり良好ではないことを示唆する。同様に、参照細胞集団がPRC細胞を含む場合、被験細胞集団および参照細胞集団におけるEphA4遺伝子の発現の相違は、目的の治療が有効であることを示唆する一方、被験細胞集団および正常対照参照細胞集団におけるEphA4遺伝子の発現に類似性があることは、臨床的な結果または予後があまり良好ではないことを示唆する。

40

【0058】

さらに、治療後に得られた対象由来の生物試料において測定されたEphA4遺伝子の発現レベル（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物試料におい

50

て測定されたEphA4遺伝子の発現レベル（すなわち、治療前レベル）と比較することでもできる。EphA4遺伝子はアップレギュレートされた遺伝子であることから、治療後試料における発現レベルの低下によって目的の治療が有効であることが示唆される一方、治療後試料における発現レベルが上昇または維持されていることは、臨床的な結果または予後があまり良好ではないことを示唆する。

【0059】

本明細書で用いる場合、「有効な」という用語は、治療が、対象における、病的にアップレギュレートされる遺伝子の発現低下、PRCのサイズ、罹患率もしくは転移能の低下をもたらすことを示している。目的の治療が予防的に適用される場合、「有効な」という用語は、治療がPRCの形成を遅延もしくは防止すること、または臨床的なPRCの症状を遅延、

10

【0060】

さらに、有効性を、PRCの診断または治療のための任意の公知の方法に関連して判定することもできる。PRCは、例えば異常兆候、例えば、体重減少、腹痛、背痛、食欲不振、悪心、嘔吐、および全身性倦怠感、脱力、ならびに黄疸を特定することによって診断され得る。

【0061】

特定の個体に適したPRCを治療するための治療薬の選択

個体の遺伝的構成の相違は、それらが種々の薬剤を代謝する相対的能力の相違をもたらす可能性がある。対象において代謝されて抗PRC薬剤として作用する作用因子は、対象の細胞において癌状態に特徴的な遺伝子発現パターンから非癌状態に特徴的な遺伝子発現パターンへの変化を誘導することによって顕在化する。このため、本明細書に開示した、差次的に発現されるEphA4遺伝子は、推定されるPRCの治療的または予防的な阻害因子を、その作用因子が対象におけるPRCの適した阻害因子であるか否かを判定するため、選択した対象由来の被験細胞集団において試験することを可能にする。

20

【0062】

特定の対象に適した、PRCの阻害因子を同定するために、その対象由来の被験細胞集団を治療薬に曝露し、EphA4遺伝子の発現を測定する。

【0063】

本発明の方法の文脈において、被験細胞集団は、EphA4遺伝子を発現するPRC細胞を含む。好ましくは、被験細胞は上皮細胞である。例えば、被験細胞集団を候補作用因子の存在下でインキュベートしてもよく、被験試料の遺伝子発現パターンを測定し、かつ1つまたは複数の参照プロファイル、例えば、PRC参照発現プロファイル、または非PRC参照発現プロファイルと比較してもよい。

30

【0064】

PRCを含む参照細胞集団と比較した被験細胞集団におけるEphA4の発現の低下は、その作用因子が治療的可能性を有することを示唆する。

【0065】

本発明の文脈において、被験作用因子は任意の化合物または組成物であり得る。例示的に被験作用因子は、免疫調節薬剤を含むが、これに限定されない。

40

【0066】

治療薬を同定するためのスクリーニングアッセイ法

本明細書に開示した、差次的に発現されるEphA4遺伝子は、PRCを治療するための候補治療薬を同定するために用いることもできる。本発明の方法は、候補治療薬が、EphA4遺伝子のPRC状態に特徴的な発現プロファイルを、非PRC状態に特徴的な遺伝子発現パターンへと変換させ得るか否かを判定するための候補治療薬をスクリーニングする段階を含む。

【0067】

本発明において、EphA4はPRCの治療および予防のための治療薬のスクリーニングに有用である。

50

【 0 0 6 8 】

本方法において、細胞を1つまたは複数の被験作用因子（連続的または同時）に曝露し、細胞におけるEphA4の発現を測定する。被験集団においてアッセイしたEphA4遺伝子の発現プロファイルを、被験作用因子に曝露されていない参照細胞集団における同じEphA4遺伝子の発現レベルと比較する。

【 0 0 6 9 】

EphA4遺伝子の発現を抑制し得る作用因子は、臨床的に有益な可能性を有する。このような作用因子はさらに、動物または被験対象においてPRCを防止する能力に関して試験され得る。

【 0 0 7 0 】

さらなる態様において、本発明は、PRCの治療において有望標的である候補作用因子をスクリーニングする方法を提供する。上記で詳述したように、EphA4遺伝子の発現レベルまたはそれらの遺伝子産物の活性を制御することにより、PRCの発生および進行を制御することができる。したがって、PRCの治療において有望標的である候補作用因子を、このような発現レベルおよび活性を癌状態または非癌状態の指標として用いるスクリーニング方法によって同定することができる。本発明の文脈において、このようなスクリーニングは、例えば、以下の段階を含み得る：

- a) 被験化合物を、EphA4のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと接触させる段階；
- b) ポリペプチドと被験化合物の間の結合活性を検出する段階；および
- c) ポリペプチドと結合する被験化合物を選択する段階。

【 0 0 7 1 】

または、本発明のスクリーニング方法は、以下の段階を含み得る：

- a) 候補化合物をEphA4遺伝子を発現する細胞と接触させる段階；および
- b) EphA4の発現レベルを低下させる候補化合物を選択する段階。

EphA4遺伝子を発現する細胞には、例えば、PRCから樹立された細胞株が含まれる；こ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 7 2 】

または、本発明のスクリーニング方法は、以下の段階を含み得る：

- a) 被験化合物を、EphA4のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと接触させる段階；
- 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) EphA4のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの生物活性を、被験化合物の非存在下で検出される生物活性と比較して抑制する化合物を選択する段階。

【 0 0 7 3 】

本発明のスクリーニング方法に用いるためのタンパク質は、EphA4遺伝子のヌクレオチド配列を用いて組換えタンパク質として得ることができる。EphA4遺伝子およびそのコードされるタンパク質に関する情報に基づき、当業者は、タンパク質の任意の生物活性をスクリーニングのための指標として選択し、選択した生物活性に関するアッセイ法のために適した任意の測定方法を選択することができる。

【 0 0 7 4 】

本発明においてEphA4の生物活性は、好ましくはチロシンキナーゼ活性である。当業者はチロシンキナーゼ活性を評価することができる。例えば、EphA4を発現する細胞を、[$-^{32}\text{P}$]-ATPの存在下で被験化合物と接触させる。次いで、EphA4のチロシンキナーゼ活性によってリン酸化されたタンパク質を測定する。リン酸化タンパク質の検出のために、SDS-PAGEまたは免疫沈降法を用いることができる。さらに、リン酸化チロシン残基を認識する抗体をリン酸化タンパク質レベルに関して用いることもできる。

【 0 0 7 5 】

または、本発明のスクリーニング方法は、以下の段階を含み得る：

- a) 候補化合物を、EphA4遺伝子の転写調節領域およびその転写調節領域の制御下で発現

10

20

30

40

50

されるレポーター遺伝子を含むベクターが導入された細胞と接触させる段階；

b) 前記レポーター遺伝子の発現または活性を測定する段階；ならびに

c) 前記レポーター遺伝子の発現または活性のレベルを被験化合物の非存在下におけるレベルと比較して低下させる候補化合物を選択する段階。

【0076】

適したレポーター遺伝子および宿主細胞は当技術分野で周知である。本発明のスクリーニング方法に適したレポーター構築物は、EphA4遺伝子の転写調節領域を用いることによって調製され得る。

【0077】

本発明のスクリーニング方法では、EphA4を好ましいアップレギュレートされたマーカー遺伝子として用いることができる。さらに、本発明者らは本明細書において、レーザーマイクロビームマイクロダイセクション法とゲノムワイドcDNAマイクロアレイを併用することにより、チロシンキナーゼ受容体EphA4を、非浸潤性前駆体であるPIN（前立腺上皮内新生物）においてではなく、浸潤性前立腺癌において特異的に過剰発現される遺伝子として同定した。cDNAマイクロアレイおよび免疫組織化学法により、EphA4がPINではなく浸潤性前立腺癌細胞において特異的に過剰発現されることが示され、かつノーザンブロット分析により、成人精巣におけるその制限的発現が示された。EphA4に対して特異的なsiRNAによるノックダウン効果は、前立腺癌細胞増殖の劇的な抑制をもたらした。これらの所見は、EphA4が浸潤性前立腺癌細胞の増殖および運動性と関連していること、ならびにこのチロシンキナーゼ受容体EphA4が、著しい副作用を伴わない新規な前立腺癌療法のための分子標的として適宜用いられ得ることを示している。したがって、EphA4のチロシンキナーゼ活性を阻害する作用因子は、PRCを治療または予防するための治療薬に有用である。

10

20

【0078】

上記のスクリーニング方法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または増強する薬剤の開発のための候補として役立ち、かつPRCの治療または予防に応用することができる。

【0079】

その上、マーカー遺伝子にコードされるタンパク質の活性を阻害または増強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法によって得ることができる化合物に含まれる。

30

【0080】

本発明の方法によって単離された化合物をヒト、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類のための薬剤として投与する場合、単離された化合物を直接投与してもよく、または既知の薬学的調製法を用いて投与剤形に調製してもよい。例えば、必要に応じて、薬物は、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摂取されるか、または水もしくは他の任意の薬学的に許容される液体との滅菌溶液もしくは懸濁液の注射剤形で非経口摂取され得る。例えば、化合物は、薬学的に許容される担体または媒体、具体的には滅菌水、生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定化剤、着色料、賦形剤、溶剤、保存剤、結合剤などと共に、一般的に許容される投薬実施に必要な単位投与剤形で混合することができる。そのような調製物に含まれる活性成分の量によって、指示範囲内の適した用量を得ることができる。

40

【0081】

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、アカモノ油、およびチェリー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は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剤を用いて通常の投

50

薬実施に従って調製することができる。

【0082】

生理食塩水、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、ならびにポリソルベート80（商標）およびHCO-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。

【0083】

ゴマ油または大豆油を油脂性液体として用いることができ、安息香酸ベンジルまたはベンジルアルコールを溶解剤として共に用いてもよく、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調製してもよい。調製された注射剤は適したアンプルに充填してもよい。

【0084】

当業者に周知の方法を用いて、本発明の薬学的組成物を患者に、例えば動脈内、静脈内、もしくは経皮注射として投与してもよく、または、鼻腔内、気管支内、筋肉内、もしくは経口投与としても投与してもよい。投与の用量および方法は、患者の体重および年齢ならびに投与法に応じて変化する；しかしながら、当業者は、適した投与法を日常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得る場合、DNAを遺伝子治療のベクターに挿入して、治療を行うためにベクターを患者に投与することができる。投与の用量および方法は、患者の体重、年齢、および症状に応じて変化するが、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。

【0085】

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、一般的に、正常な成人（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、より好ましくは約1.0 mg～約20 mg/日である。

【0086】

正常な成人（体重60 kg）に注射剤形で化合物を非経口投与する場合、患者、標的臓器、症状および投与法によって多少の差があるが、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/日を静脈内注射することが都合がよい。他の動物の場合、適した投与量は、体重60 kgに変換してルーチン的に算出され得る。

【0087】

PRCを有する対象の予後の評価

本発明はまた、PRCを有する対象の予後を評価する方法であって、被験細胞集団におけるEphA4遺伝子の発現を、ある範囲の疾患病期にわたる患者由来の参照細胞集団における、同じEphA4遺伝子の発現と比較する段階を含む方法も提供する。被験細胞集団および参照細胞集団におけるEphA4遺伝子の遺伝子発現を比較することにより、または対象由来の被験細胞集団の経時的な遺伝子発現のパターンを比較することにより、対象の予後を評価することができる。

【0088】

例えば、EphA4遺伝子の発現が正常対照と比較して上昇していることは、予後があまり良好ではないことを示唆する。EphA4の発現が低下していることは、その対象の予後がより良好であることを示唆する。発現プロファイルを比較するために分類スコア（CS）を用いることもできる。

【0089】

キット

本発明はまた、PRC検出用試薬、例えば、EphA4核酸と特異的に結合するか、またはそれらを識別する核酸（EphA4核酸の一部に対して相補的なオリゴヌクレオチド配列など）

10

20

30

40

50

またはEphA4核酸によってコードされるEphA4タンパク質と結合する抗体も含む。検出用試薬はキットの形態で合わせてパッケージ化してもよい。試薬、例えば、核酸または抗体（固体マトリックスと結合した状態、またはそれらをマトリックスに結合させるための試薬と別々にパッケージ化された状態で）、対照試薬（陽性および/または陰性）および/または検出可能な標識は、別々の容器内にパッケージ化される。アッセイ法を実施するための指示（例えば、文書、テープ、VCR、CD-ROM等）がキットに含まれ得る。キットのアッセイ形式はノーザンハイブリダイゼーションまたはサンドイッチELISAであってよく、どちらも当技術分野で公知である。

【0090】

例えば、PRC検出用試薬を多孔性ストリップなどの固体マトリックス上に固定化し、少なくとも1つのPRC検出部位を形成させ得る。多孔性ストリップの測定領域または検出領域は、それぞれが1つの核酸を含む複数の部位を含んでもよい。検査ストリップが陰性および/または陽性対照に対する部位を含んでもよい。または、対照部位を検査ストリップとは別のストリップ上に配置してもよい。任意で、異なる検出部位が異なる量の固定化核酸を含んでもよく、すなわち、第1の検出部位でより多く、以後の部位でより少なく含んでもよい。被験試料を添加すると、検出可能なシグナルを呈している部位の数により、試料中に存在するPRC量の定量的指標が得られる。検出部位は任意の適した検出可能な形態として構成することができ、典型的に検査ストリップの幅全体にわたる棒状またはドット状の形態にある。

【0091】

PRCを阻害する方法

本発明はさらに、EphA4の発現もしくは活性（もしくはその遺伝子産物の活性）を低下させることにより、対象におけるPRCの症状を治療または緩和するための方法も提供する。適した治療用化合物を、PRCを有するか、または発症するリスク（またはそれに対する感受性）を有する対象に対して、予防的または治療的に投与することができる。そのような対象は、標準的な臨床的方法を用いて、またはEphA4の異常な発現レベルもしくはその遺伝子産物の異常な活性を検出することにより、同定することができる。本発明の文脈において、適した治療薬には、例えば、細胞増殖およびプロテインキナーゼ活性の阻害因子が含まれる。

【0092】

または、本発明の治療方法が、前立腺細胞において発現が異常に上昇している遺伝子（「アップレギュレートされる」または「過剰発現される」遺伝子）の遺伝子産物の発現、機能、またはその両方を低下させる段階を含んでもよい。発現は、当技術分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって阻害することができる。例えば、過剰発現される遺伝子の発現を阻害または拮抗する核酸、例えば、過剰発現される遺伝子の発現を妨害す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り、発現を阻害することができる。

【0093】

アンチセンス核酸

上記のように、EphA4のヌクレオチド配列に対応するアンチセンス核酸を、EphA4の発現レベルを低下させるために用いることができる。PRCにおいてアップレギュレートされるEphA4に対応するアンチセンス核酸は、PRCの治療のために有用である。具体的には、本発明のアンチセンス核酸は、EphA4もしくはそれらに対応するmRNAと結合することによって作用し得、それによって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EphA4の核酸によってコードされるタンパク質の発現を阻害し、最終的にタンパク質の機能を阻害する。本明細書で用いる「アンチセンス核酸」という用語には、標的配列に対して完全に相補的なヌクレオチド、およびアンチセンス核酸が標的配列と特異的にハイブリダイズし得る限り、1つまたは複数のヌクレオチドのミスマッチを有するヌクレオチドの両方が含まれる。例えば、本発明のアンチセンス核酸には、少なくとも15個の連続したヌクレオチドの範囲にわたって、少なくとも70%またはそれ以上、好ましくは少な

くとも80%またはそれ以上、より好ましくは少なくとも90%またはそれ以上、さらにより好ましくは少なくとも95%またはそれ以上の相同性を有するポリヌクレオチドが含まれる。相同性の決定には当技術分野で公知のアルゴリズムが用いられ得る。

【0094】

相同率（一致率とも呼ばれる）は典型的に、最適に整列した2つの配列間で行われる。比較のための配列（ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）のアライメントの方法は当技術分野で周知である。配列の最適なアライメント、および比較は、例えば、「Wilbur and Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 80: 726-30 (1983)」におけるアルゴリズムを用いて行うことができる。本明細書で用いる場合、「実質的に同一な」「実質的に相同な」という用語、および類似の用語は、上記のような標準的な配列比較アルゴリズムを用いて、少なくとも約80%、通常は約85%、約90%、約95%、約97%、または約99%が相同な、2つの配列（ポリペプチドまたはポリヌクレオチド）を記述するために用いられる。

10

【0095】

本発明のアンチセンス核酸誘導体は、EphA4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対して、そのタンパク質をコードするDNAまたはmRNAと結合することによって作用し、それらの転写または翻訳を阻害し、mRNAの分解を促進し、かつタンパク質の発現を阻害し、その結果タンパク質の機能を阻害する。

【0096】

本発明のアンチセンス核酸誘導体は、核酸に対して不活性な適した基材と混合することにより、リニメント剤または湿布剤などの外用製剤の形にすることができる。

20

【0097】

また、必要に応じて、本発明のアンチセンス核酸を、添加剤、等張剤、可溶化剤、安定剤、保存料、鎮痛薬などを添加することにより、錠剤、粉剤、顆粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻薬および凍結乾燥製剤として製剤化することもできる。これらは公知の方法に従って調製され得る。

【0098】

本発明のアンチセンス核酸誘導体は、罹患部位に対して直接適用することにより、またはそれが罹患部位に到達するように血管内に注入することにより、患者に投与される。持続性および膜透過性を高めるためにアンチセンス-マウント培地を用いることもできる。例として、リポソーム、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。さらに、本発明において、アンチセンスヌクレオチドの誘導体および修飾産物もまた使用され得る。そのような修飾産物の例としては、ホスホン酸メチル型またはホスホン酸エチル型などの低級アルキルのホスホン酸塩修飾、ホスホロチオエート修飾、およびホスホラミダイト修飾が含まれる。

30

【0099】

本発明のアンチセンス核酸誘導体の投与量は、患者の状態に従って適切に調整され得、望ましい量で用いられ得る。例えば、0.1~100mg/kg、好ましくは0.1~50mg/kgの範囲の用量を投与することができる。

【0100】

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するため、本発明の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物質も、本発明のタンパク質の生物活性を阻害し得るため、有用である。

40

【0101】

本発明の方法は、細胞におけるEphA4遺伝子の発現を変化させるために用いることができる。標的細胞におけるアンチセンス核酸と、EphA4に対応する転写産物との結合は、細胞によるタンパク質産生の低下をもたらす。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、天然の転写産物ほどの長さであってもよい。好ましくは、オリゴヌクレオチドは約19~約25ヌクレオチド長である。最も好ましくは、オリゴヌクレオチドは約75、約50、または約25ヌクレオチド長未満である。

【0102】

50

本発明のアンチセンス核酸には、修飾オリゴヌクレオチドが含まれる。例えば、オリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ抵抗性を付与するためにチオアート化オリゴヌクレオチドを用いることもできる。

【0103】

siRNA

また、EphA4遺伝子に対するsiRNAを、EphA4遺伝子の発現レベルを低下させるために用いることもできる。

【0104】

本発明は、細胞増殖を阻害する方法を特徴とする。細胞増殖は、細胞を、EphA4の低分子干渉RNA (siRNA) の組成物と接触させることによって阻害される。細胞をさらにトランスフェクション促進物質と接触させる。細胞はインピトロ、インピボ、またはエキスピボにて提供される。対象は哺乳動物、例えば、ヒト、非ヒト霊長動物、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシである。細胞は腓管細胞である。または、細胞は、癌腫細胞または腺癌細胞などの腫瘍細胞（すなわち、癌細胞）である。例えば、細胞は腓管腺癌細胞である。細胞増殖を阻害するとは、処理された細胞が非処理細胞よりも低い速度で増殖すること、または生存度が低いことを意味する。細胞増殖は当技術分野で公知の増殖アッセイ法によって測定される。

【0105】

本明細書において「siRNA」という用語は、標的mRNAの翻訳を妨げる二本鎖RNA分子を指す。DNAがRNAの転写のためのテンプレートであるものを含め、siRNAを細胞に導入するための標準的な技術を用いることができる。本発明の文脈において、siRNAは、EphA4のようなアップレギュレートされた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。siRNAは、例えばヘアピンのように、単一の転写産物が標的遺伝子由来のセンス配列および相補的アンチセンス配列の両方を有するように構築される。

【0106】

EphA4のsiRNAは標的mRNAとハイブリダイズし、正常な一本鎖mRNA転写産物と会合することによって翻訳を妨げ、したがってタンパク質の発現を妨げることにより、遺伝子によってコードされるEphA4ポリペプチドの産生を低下または阻害する。本発明の文脈において、siRNAは好ましくは、500、200、100、50または25ヌクレオチド長未満である。より好ましくは、siRNAは19~25ヌクレオチド長である。siRNAの阻害活性を増強するため、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。付加する「u」の数は、少なくとも2個、一般的には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'末端に一本鎖を形成する。

【0107】

適したsiRNAのヌクレオチド配列は、Ambionのウェブサイト (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) から入手できるsiRNA設計コンピュータプログラムを用いて設計され得る。コンピュータプログラムは、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。

【0108】

siRNA標的部位の選択

1. 対象となる転写産物のAUG開始コドンから始めて、AAジヌクレオチド配列を求めて下流にスキャンする。有望なsiRNA標的部位として、各AAおよび3'隣接ヌクレオチド19個の出現を記録する。Tuschl, et al. は、5'および3'非翻訳領域 (UTR) および開始コドン近傍 (75塩基以内) の領域が、調節タンパク質結合部位により富んでいる可能性があることから、これらに対してsiRNAを設計することを推奨していない。 (「Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro.」 Genes Dev 13 (24) : 3191-7 (1999)) 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し得る。

2. 有望な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.nc

10

20

30

40

50

bi.nlm.nih.gov/BLAST/において認められ得る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では、好ましくは、評価すべき遺伝子の長さに沿っていくつかの標的配列を選択することができる。

【0109】

本発明にはまた、標的配列、例えばSEQ ID NO: 10のヌクレオチドまたはSEQ ID NO: 10の核酸配列に対して相補的な核酸分子などの核酸配列を含む、単離された核酸分子も含まれる。本明細書で用いる場合、「単離された核酸」とは、その本来の環境（例えば、天然に存在するならば天然の環境）から移され、よってその天然の状態から人工的に変化させられている核酸である。本発明において、単離された核酸には、DNA、RNA、およびそれらの誘導体が含まれる。単離された核酸がRNAまたはその誘導体である場合、ヌクレオチド配列中の塩基「t」は「u」に置き換えられるべきである。本明細書で用いる場合、「相補的な」という用語は、核酸分子のヌクレオチド単位間のワトソン-クリックまたはフーグスティーンの塩基対合を指し、「結合」という用語は、2つの核酸もしくは化合物または関連する核酸もしくは化合物またはそれらの組み合わせの間の、物理的または化学的な相互作用を意味する。相補的な核酸配列は適切な条件下でハイブリダイズし、わずかにミスマッチを含むか、または全く含まない安定な二重鎖を形成する。さらに、本発明の単離されたヌクレオチドのセンス鎖およびアンチセンス鎖は、ハイブリダイゼーションによって二本鎖ヌクレオチドまたはヘアピンループ構造を形成することができる。好ましい態様において、このような二重鎖は10マッチ毎に含むミスマッチが1個を上回らない。二重鎖の鎖が完全に相補的である、特に好ましい態様において、このような二重鎖はミスマッチを含まない。EphA4に関して、核酸分子は3468ヌクレオチド長未満である。例えば、核酸分子は約500、約200、または約75ヌクレオチド長未満である。本発明にはまた、本明細書に記載の核酸の1つまたは複数を含むベクター、およびベクターを含む細胞も含まれる。本発明の単離された核酸は、EphA4に対するsiRNAのため、またはsiRNAをコードするDNAのために有用である。核酸をsiRNAまたはそれをコードするDNAのために用いる場合、センス鎖は、好ましくは約19ヌクレオチドよりも長く、さらに好ましくは約21ヌクレオチドよりも長い。

【0110】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAは、本発明のポリペプチドの発現を阻害するので、本発明のポリペプチドの生物学的活性を抑制するのに有用である。同様に、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAを含む発現阻害因子は、それらが本発明のポリペプチドの生物学的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、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAを含む組成物は、PRCの治療または予防に有用である。

【0111】

細胞増殖の阻害方法

本発明は、EphA4の発現を阻害することにより、細胞増殖、すなわち癌細胞の増殖を阻害することに関する。EphA4の発現は、EphA4遺伝子の特異的に標的とする低分子干渉RNA (siRNA) によって阻害される。EphA4標的には、例えば、SEQ ID NO: 10のヌクレオチドが含まれる。

【0112】

非哺乳動物細胞において、二本鎖RNA (dsRNA) は、遺伝子発現に対して強力かつ特異的なサイレンシング作用を発揮することが示されており、これはRNA干渉 (RNAi) と呼ばれている (Sharp PA. 「RNAi and double-strand RNA.」 Genes Dev. 1999 Jan 15;13(2):139-41)。dsRNAは、RNアーゼIIIモチーフを含む酵素によってプロセッシングを受け、低分子干渉RNA (siRNA) と呼ばれる20~23ヌクレオチドのdsRNAとなる。siRNAは多成分ヌクレアーゼ複合体を伴って相補的mRNAの特異的に標的とする (Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. 「An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells.」 Nature. 2000 Mar 16;404(6775):293-6., Hannon GJ. 「RNA interference.」 Nature. 2002 Jul 11;418(6894):244-51)。哺乳動物細胞では、19個

の相補的ヌクレオチドおよび3'末端にチミジンまたはウリジンの非相補的二量体を有する20または21塩基長のdsRNAから構成されるsiRNAが、遺伝子発現の全体的な変化を誘導せずに、遺伝子特異的なノックダウン作用を及ぼすことが示されている(Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T.「Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.」Nature. 2001 May 24;411(6836):494-8)。さらに、核内低分子RNA(snRNA)U6またはポリメラーゼIII H1-RNAプロモーターを含むプラスミドは、III型クラスのRNAポリメラーゼIIIを動員する、そのような短いRNAを効果的に産生し、かつしたがってその標的mRNAを構成的に抑制し得る(Miyagishi M, Taira K.「U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells.」Nat Biotechnol. 2002 May;20(5):497-500, Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R.「A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells.」Science. 296(5567):550-553, April 19, 2002.)。

10

【0113】

細胞の増殖は、細胞を、EphA4のsiRNAを含む組成物と接触させることによって阻害される。細胞をさらにトランスフェクション作用因子と接触させる。適したトランスフェクション作用因子は当技術分野で公知である。細胞増殖の阻害とは、細胞が、組成物に曝露されていない細胞と比較して低い速度で増殖すること、または生存度が低いことを意味する。細胞増殖は、MTT細胞増殖アッセイ法のような当技術分野で公知の方法によって測定される。

20

【0114】

EphA4のsiRNAは、EphA4遺伝子配列の単一の標的に対して向けられる。または、siRNAは、EphA4遺伝子配列の複数の標的に対して向けられる。例えば、組成物は、EphA4の2つ、3つ、4つ、5つまたはそれ以上の標的配列に向けられたEphA4のsiRNAを含む。EphA4標的配列とは、EphA4遺伝子の一部分と同一なヌクレオチド配列を意味する。標的配列には、ヒトEphA4遺伝子の5'非翻訳(UT)領域、オープンリーディングフレーム(ORF)または3'非翻訳領域が含まれ得る。または、siRNAは、EphA4遺伝子発現の上流または下流モジュレーターに対して相補的な核酸配列である。上流および下流モジュレーターの例には、EphA4遺伝子プロモーターと結合する転写因子、EphA4ポリペプチドと相互作用するキナーゼまたはホスファターゼ、EphA4プロモーターまたはエンハンサーが含まれる。

30

【0115】

標的mRNAと選択的にハイブリダイズするEphA4のsiRNAは、正常な一本鎖mRNA転写産物と会合し、それによって翻訳を妨げ、したがってタンパク質の発現を妨げることにより、EphA4遺伝子によってコードされるEphA4ポリペプチド産物の産生を低下させるか、または阻害する。siRNAは約500、約200、約100、約50、または約25ヌクレオチド長未満である。好ましくは、siRNAは19~25ヌクレオチド長である。例示的なEphA4 siRNAの作製のための核酸配列には、SEQ ID NO:10のヌクレオチドの配列がそれぞれ標的配列として含まれる。さらに、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。付加する「u」の数は少なくとも2個、一般的には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'末端に一本鎖を形成する。

40

【0116】

細胞は、EphA4を発現または過剰発現する任意の細胞である。細胞は、膵管細胞などの上皮細胞である。または、細胞は、癌腫、腺癌、芽腫、白血病、骨髄腫、または肉腫などの腫瘍細胞である。細胞は膵管腺癌である。

【0117】

EphA4のsiRNAは、mRNA転写産物と結合可能な形態で、細胞内に直接導入される。または、EphA4のsiRNAをコードするDNAは、ベクター中にある。

【0118】

ベクターは、例えば、EphA4標的配列を、EphA4配列に隣接する機能的に結合した調節配

50

列を有するように発現ベクター中に、両方の鎖の発現を（DNA分子の転写によって）可能にする様式でクローニングすることによって作製された（Lee, N.S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M.-J., Ehsani, A., Salvaterra, P., and Rossi, J. (2002) 「Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells.」 *Nature Biotechnology* 20: 500-505）。EphA4 mRNAのアンチセンスであるRNA分子を第1のプロモーター（例えば、クローニングされたDNAの3'側にあるプロモーター配列）によって転写させ、かつEphA4 mRNAのセンス鎖であるRNA分子を第2のプロモーター（例えば、クローニングされたDNAの5'側にあるプロモーター配列）によって転写する。センス鎖およびアンチセンス鎖をインピボでハイブリダイズさせ、EphA4遺伝子のサイレンシングのためのsiRNA構築物を生成させる。または、2つの構築物は、siRNA構築物のセンス鎖およびアンチセンス鎖を作製するために利用される。クローニングされたEphA4は、単一の転写産物が標的遺伝子のセンス配列および相補的アンチセンス配列の両方を有し、例えばヘアピンなどの二次構造を有する構築物をコードし得る。

10

【0119】

ヘアピンループ構造を形成させるために、任意のヌクレオチド配列からなるループ配列をセンス配列とアンチセンス配列との間に配置することができる。したがって、本発明は、一般式5'-[A]-[B]-[A']-3'を有するsiRNAも提供し、式中、[A]は、SEQ ID NO: 10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、約3～約23ヌクレオチドからなるリボヌクレオチド配列であり、かつ[A']は、[A]の相補配列からなるリボヌクレオチド配列である。

20

【0120】

領域[A]は[A']とハイブリダイズし、次いで領域[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3～23ヌクレオチド長であり得る。ループ配列は例えば、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また、活性のあるsiRNAを提供する（Jacque, J.-M., Triques, K. and Stevenson M. (2002) 「Modulation of HIV-1 replication by RNA interference.」 *Nature* 18:35-438）。

【0121】

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.18:35-438。

30

【0122】

UUCG: Lee, N.S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M.-J., Ehsani, A., Salvaterra, P., and 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) 「Exonucleolytic degradation of double-stranded RNA by an activity in *Xenopus laevis* germinal vesicles.」 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(4):1639-1644.

【0123】

UUCAAGAGA: Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. and Sharp, P.A. (2002) 「Killing the messenger: Short RNAs that silence gene expression.」 *Nature Reviews Molecular Cell Biology*:57-467。

40

【0124】

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は以下に示されている。以下の構造において、ループ配列は、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では「ttcaagaga」）である。

GCAGCACCAUCAUCAUUG-[B]-CAAUGGAUGAUGGUGCUGC（SEQ ID NO: 10の標的配列に対して）

【0125】

EphA4配列に隣接する調節配列は同一であるか、またはそれらの発現を独立して、または時間的もしくは空間的に調節し得るように異なっている。siRNAは、EphA4遺伝子テンプレ

50

レート、例えば核内低分子RNA (snRNA) U6由来のRNAポリメラーゼ III転写単位、またはヒトH1 RNAプロモーターを含むベクター中にクローニングすることにより、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促進物質を用いることができる。FuGENE (Rochediagnostics)、Lipofectamine 2000 (Invitrogen)、Oligofectamine (Invitrogen)、およびNucleofector (和光純薬) は、トランスフェクション促進物質として有用である。

【0126】

オリゴヌクレオチド、およびEphA4 mRNAのさまざまな部分に対して相補的なオリゴヌクレオチドを、腫瘍細胞におけるEphA4の産生を低下させる能力に関して、(例えば、膵管腺癌 (PDACa) 細胞株などの膵臓細胞株を用いて) 標準的な方法に従ってインビトロで試験した。候補組成物の非存在下で培養した細胞と比較して、候補siRNA組成物と接触させた細胞におけるEphA4遺伝子産物の減少を、EphA4の特異抗体またはその他の検出方法を用いて検出する。インビトロでの細胞に基づくアッセイ法または無細胞アッセイ法においてEphA4の産生を低下させる配列を、細胞増殖におけるそこでの抑制効果に関して試験する。インビトロでの細胞に基づくアッセイ法において細胞増殖を阻害する配列を、悪性新生物を有する動物におけるEphA4産生低下および腫瘍細胞増殖低下について確認するために、ラットまたはマウスにおいてインビボで試験する。

10

【0127】

悪性腫瘍の治療方法

EphA4を過剰発現していることが特徴づけられた腫瘍を有する患者は、EphA4のsiRNAを投与することによって治療される。siRNA療法は、例えばPRCまたは膵管腺癌 (PDACa) に罹患しているかそれを発症するリスクを有する患者におけるEphA4の発現を阻害するために用いられる。このような患者は、個々の腫瘍の種類に対する標準的な方法によって同定される。PRCまたは膵管腺癌 (PDACa) は、例えば、CT、MRI、ERCP、MRCP、コンピュータ断層撮影法、または超音波によって診断される。治療は、その治療が、対象におけるEphA4の発現の低下、または腫瘍のサイズ、罹患率、もしくは転移能の低下といった臨床的利益をもたらす場合、有効である。治療が予防的に適用される場合、「有効な」とは、治療が腫瘍の形成を遅延もしくは防止すること、または腫瘍の臨床症状を防止もしくは緩和することを意味する。有効性は、個々の腫瘍の種類の診断または治療のための任意の公知の方法に関連して決定される。

20

30

【0128】

siRNA療法は、インビボでの分解を防ぐために修飾されたsiRNA分子の投与を含む、標準的なベクターおよび/または遺伝子送達システムにより、siRNAを患者に投与することによって行われる。適した遺伝子送達システムには、リポソーム、受容体を介した送達システム、または、特にヘルペスウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターが含まれ得る。治療用核酸組成物は、薬学的に許容される担体中で製剤化される。治療用組成物には、上記の遺伝子送達システムも含まれ得る。薬学的に許容される担体は、動物に対する投与に適した生体適合性の媒体、例えば、生理的食塩水である。化合物の治療的有効量は、処置された動物における、EphA4遺伝子産物の産生低下、細胞成長 (例えば、増殖) の低下、または腫瘍増殖の低下のような、医学的に望ましい結果を生じさせ得る量である。

40

【0129】

EphA4のsiRNA組成物を送達するために、静脈内、皮下、筋肉内、および腹腔内送達経路などの非経口的投与が用いられ得る。膵臓腫瘍の処置のためには、腹腔動脈、脾動脈、または総肝動脈への直接注入が有用である。

【0130】

個々の患者に対する投与量は、患者のサイズ、体表面積、年齢、投与しようとする個別の核酸、性別、投与の時間および経路、全身健康状態、ならびに同時投与される他の薬剤を含む、多くの要因に依存する。核酸の静脈内投与のための投与量は、核酸分子の約 $10^6 \sim 10^{22}$ コピー由来である。

50

【0131】

ポリヌクレオチドは、筋肉もしくは皮膚などの組織の間質空間への注射、循環流動中もしくは体腔への導入、または吸入もしくは吹送といった標準的な方法によって投与される。ポリヌクレオチドは、薬学的に許容される液体担体、例えば、水性または部分的に水性である液体担体とともに、動物に対して注射されるか、別の様式で送達される。ポリヌクレオチドはリポソーム（例えば、陽イオン性または陰イオン性リポソーム）と一体化される。ポリヌクレオチドは、標的細胞による発現のために必要な、例えばプロモーターのような遺伝情報を含む。

【0132】

抗体

10

または、PRCにおいて過剰発現される遺伝子の遺伝子産物の機能を、遺伝子産物と結合するか、またはそうでなければ、遺伝子産物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もできる。例えば、化合物は、過剰発現される1つまたは複数の遺伝子産物と結合する抗体である。また、EphA4タンパク質を特異的に認識するような結合物質は、例えば、タンパク質に対して特異的なリガンド、またはタンパク質と特異的に結合する合成ポリペプチドでもあり得る（例えば、W02004044011号を参照されたい）。

【0133】

本発明は、抗体、特にEphA4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、またはそれに近縁の抗原のみと相互作用する（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。さらに抗体は、それがEphA4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、抗体断片または修飾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断片が適当なリンカーによって連結されている一本鎖Fv（scFv）であってもよい（Huston, J.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 5879-5883 (1988)）。より具体的には、抗体断片は、抗体をパepsinまたはpepsinのような酵素によって処理することによって産生してもよい。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、適当な宿主細胞において発現させてもよい（例えば、Co M.S. et al., J. Immunol. 152: 2968-2976 (1994); Better M. and Horwitz A.H., Methods Enzymol. 178: 476-496 (1989); Pluckthun A. and Skerra A., Methods Enzymol. 178: 497-515 (1989); Lamoyi E., Methods Enzymol. 121: 652-663 (1986); Rousseau x J. et al., 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）。

20

30

【0134】

抗体は、ポリエチレングリコール（PEG）のような多様な分子に結合させることによって修飾してもよい。本発明は、そのような修飾抗体を提供する。修飾抗体は、抗体を化学修飾することによって得ることができる。このような修飾方法は、当技術分野で慣例的である。または、抗体は、非ヒト抗体由来の可変領域およびヒト抗体由来の定常領域を有するキメラ抗体、または非ヒト抗体由来の相補性決定領域（CDR）、ヒト抗体由来のフレームワーク領域（FR）、および定常領域を含むヒト化抗体を含み得る。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。ヒト化は、ヒト抗体の対応する配列の代わりに、齧歯類のCDRまたはCDR配列を用いることによって行われ得る（例えば、Verhoeyen et al., Science 239: 1534-1536 (1988)を参照されたい）。したがって、このようなヒト化抗体は、実質的にヒト可変ドメインの全長より短い領域が、非ヒト種由来の対応する配列によって置き換えられたキメラ抗体である。

40

【0135】

ヒトフレームワーク領域および定常領域に加えてヒト可変領域をも含む完全ヒト抗体を用いることもできる。このような抗体は、当技術分野で公知のさまざまな技術を用いて作製することができる。例えば、インビトロ法は、バクテリオファージ上に提示されたヒト抗体断片の組換えライブラリーの使用を含む（例えば、Hoogenboom & Winter, J. Mol. B

50

iol. 227: 381 (1991))。同様に、ヒト免疫グロブリン座位を、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されたトランスジェニック動物、例えばマウスに導入することによってヒト抗体を作製することもできる。このアプローチは例えば、米国特許第6,150,584号、第5,545,807号；第5,545,806号；第5,569,825号；第5,625,126号；第5,633,425号；第5,661,016号に記載されている。

【0136】

癌細胞において起こる特異的な分子変化に対する癌治療は、進行乳癌を治療する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）、非小細胞肺癌（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認可によって確認されている（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. Review.; 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, Stank J0, 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 and Bhalla KN. (2000). Blood, 96, 2246-2253)。これらの薬剤は、形質転換した細胞のみを標的とすることから、臨床的に有効であり、従来の抗癌剤より許容性がある。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、分子標的癌治療の考え方が正当であることを証明している。さらに、標的特異的薬剤は、標準的な化学療法と併用して用いた場合、その有効性を増強することができる（Gianni, L. (2002)、Oncology 63 suppl 1、7-56; Klejman A., Rushen L., Morriore A., Slupianek A and Skorski T. (2002)、Oncogene 21: 5868-5876)。したがって、将来の癌治療はおそらく、従来の薬剤を血管新生および浸潤性のような腫瘍細胞の特異的な特徴をねらった標的特異的薬剤と併用することを含むであろう。

【0137】

これらの調節法は、エクスピボまたはインビトロで（例えば、細胞を薬剤と共に培養することによって）、またはインビボで（例えば被験者に薬剤を投与することによって）行われ得る。これらの方法は、差次的に発現する遺伝子の異常な発現、またはそれら遺伝子産物の異常な活性を相殺する治療として、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段階を含む。

【0138】

遺伝子および遺伝子産物の発現レベルまたは生物活性が上昇していること（疾患または障害に罹患していない対象と比較して）によって特徴づけられる疾患および障害は、過剰発現される1つまたは複数の遺伝子の活性に拮抗する（すなわち、低下または阻害する）治療薬によって処置され得る。活性に拮抗する治療薬は、治療的または予防的に投与することができる。

【0139】

したがって、本発明の文脈において利用され得る治療薬には、例えば以下が含まれる：（i）過剰発現または過小発現される1つまたは複数の遺伝子のポリペプチド、またはそれらの類似体、誘導体、断片もしくは相同体；（ii）過剰発現される遺伝子または遺伝子産物に対する抗体；（iii）過小発現される1つまたは複数の遺伝子をコードする核酸；（iv）アンチセンス核酸、または「機能障害性」である核酸（すなわち、1つまたは複数の過剰発現される遺伝子の核酸内部への非相同的挿入のため）；（v）低分子干渉RNA（siRNA

); または (vi) 調節物質 (すなわち、阻害物質、過剰/過小発現されるポリペプチドとその結合パートナーとの間の相互作用を変化させる拮抗薬)。機能障害性アンチセンス分子は、相同組換えによってポリペプチドの内因性機能を「ロックアウト」するために用いられる (例えば、Capecchi, Science 244: 1288-1292 1989を参照されたい)。

【0140】

レベルの上昇は、ペプチドおよび/またはRNAを定量することによって、患者の組織試料を (例えば、生検組織から) 得、これをRNAまたはペプチドレベル、発現されたペプチドの構造および/もしくは活性 (またはその発現が変化している遺伝子のmRNA) に関してインビトロで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の方法には、イムノアッセイ法 (例えば、ウェスタンブロット解析、免疫沈降後の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、免疫細胞化学等)、および/またはmRNAの発現を検出するハイブリダイゼーションアッセイ法 (例えば、ノーザンアッセイ法、ドットブロット、インサイチュー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

【0141】

予防的投与は、疾患もしくは障害が予防されるように、またはその進行が遅れるように、疾患の明白な臨床症状が発現する前に行われる。

【0142】

本発明の治療方法は、細胞を、差次的に発現される遺伝子の遺伝子産物の活性のうち1つまたは複数を調節する作用因子と接触させる段階を含み得る。タンパク質活性を調節する作用因子の例には、核酸、タンパク質、このようなタンパク質の天然同族リガンド、ペプチド、ペプチド模倣物、およびその他の小分子が含まれるがこれらに限定されない。例えば、適した作用因子は、差次的に過小発現される1つまたは複数の遺伝子の1つまたは複数のタンパク質活性を刺激し得る。

20

【0143】

前立腺癌に対するワクチン接種

本発明はまた、対象におけるPRCの治療または予防の方法にも関連し、EphA4の核酸によってコードされるポリペプチド、またはポリペプチドの免疫活性断片、またはこ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含むワクチンを、対象に対して投与する段階を含む。ワクチンは、核酸組成物として投与することもでき、ここでEphA4ポリペプチドもしくはその断片をコードするDNAまたはRNAが患者に投与される。例えば、Wolff et al. (1990) Science 247: 1465-1468; 米国特許第5,580,859号; 第5,589,466号; 第5,804,566号; 第5,739,118号; 第5,736,524号; 第5,679,647号; およびWO 98/04720号を参照されたい。DNAに基づく送達技術の例には、「裸のDNA」、促進型 (ブピビカイン (bupivacaine)、ポリマー、ペプチド媒介) 送達、陽イオン脂質複合体、および粒子媒介 (「遺伝子銃」) 送達、または圧力媒介送達 (例えば、米国特許第5,922,687号を参照されたい) が含まれる。

30

【0144】

本発明のポリペプチドを、ウイルスベクターまたは細菌ベクターによって発現させることもできる。発現ベクターの例には、ワクシニアまたは鶏痘といった弱毒化ウイルス宿主が含まれる。このアプローチは、ワクシニアウイルスを、例えば、EphA4ポリペプチドまたはポリペプチド断片をコードするヌクレオチド配列を発現させるためのベクターとして用いることを含む。宿主内に導入されると、組換えワクシニアウイルスは免疫原性ペプチドを発現し、それによって免疫応答を誘発する。免疫処置プロトコールに有用なワクシニアベクターおよび方法は、例えば、米国特許第4,722,848号に記載されている。もう1つのベクターにはBCG (カルメット・ゲラン杆菌 (Bacille Calmette Guerin)) がある。BCGベクターは、Stover, et al. (1991) Nature 351: 456-460に記載されている。治療的投与または免疫処置のために有用なさまざまな種類の他のベクター、例えば、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、チフス菌ベクター、無毒化炭疽毒素ベクターなども明らかであろう。例えば、Shata, et al. (2000) Mol. Med.

40

50

Today 6: 66-71; Shedlock, et al. (2000) J. Leukoc. Biol. 68: 793-806; and Hipp, et al. (2000) In Vivo 14: 571-85を参照されたい。

【0145】

ポリペプチドまたは核酸の投与は、対象における抗腫瘍免疫を誘導する。抗腫瘍免疫を誘導するために、EphA4の核酸によってコードされるポリペプチドまたは前記ポリペプチドの免疫活性断片、またはこのようなポリペプチドの断片をコードするポリヌクレオチドを、それを必要としている対象に投与する。このポリペプチドまたはその免疫活性断片はPRC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)と結合した形態、またはマクロファージ、樹状細胞(DC)もしくはB細胞などの抗原提示細胞(APC)によって提示された形態で投与することもできる。DCの強力な抗原提示能力のため、APCの中ではDCの使用が最も好ましい。

10

【0146】

本発明において、PRCに対するワクチンとは、動物に接種した時に抗腫瘍免疫を誘導する能力を有する物質を指す。本発明に従い、EphA4の核酸によってコードされるポリペプチドまたはその断片は、EphA4を発現するPRC細胞に対して強力かつ特異的な免疫応答を誘導し得るHLA-A24またはHLA-A*0201拘束性エピトープペプチドであることが示唆された。したがって、本発明は、これらのポリペプチドを用いて抗腫瘍免疫を誘導する方法も含む。一般に、抗腫瘍免疫には以下のような免疫応答が含まれる：

- 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。

20

【0147】

したがって、あるタンパク質が、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、そのタンパク質は、抗腫瘍免疫誘導効果を有すると判定される。タンパク質による抗腫瘍免疫の誘導は、宿主におけるタンパク質に対す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。

【0148】

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。特に、生体内に入る外来物質は、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。このAPCによって提示された抗原に対して抗原特異的に応答するT細胞は、抗原による刺激によって細胞障害性T細胞(または細胞障害性Tリンパ球; CTL)に分化した後、増殖する(これはT細胞の活性化と呼ばれる)。したがって、あるペプチドによるCTL誘導は、APCを介したT細胞へのペプチドの提示および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細胞を活性化する効果を有する。CD4+ T細胞およびCD8+ T細胞も同様に抗腫瘍免疫において重要であることから、ペプチドの抗腫瘍免疫誘導作用は、これらの細胞の活性化効果を指標として用いて評価することができる。

30

【0149】

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の中でも最も強力なCTL誘導作用を有する代表的なAPCである。この方法では、被験ポリペプチドをまずDCに接触させて、このDCをT細胞に接触させる。DCに接触させた後に、対象細胞に対して細胞障害作用を有するT細胞が検出されれば、被験ポリペプチドが細胞障害性T細胞の誘導活性を有することが示される。腫瘍に対するCTLの活性は、例えば⁵¹Cr標識腫瘍細胞の溶解を指標として用いて検出することができる。または、³H-チミジン取り込み活性またはLDH(乳糖デヒドロゲナーゼ)放出を指標として用いて腫瘍細胞の損傷の程度を評価する方法も同様に周知である。

40

【0150】

DCとは別に、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、キーホールリンベットヘモシアニン(KLH)およびIL-7の存在下でPBMC

50

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。

【0151】

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被験ポリペプチドは、DC活性化効果およびその後のCTL誘導活性を有するポリペプチドであると考えられている。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。さらに、APCによるポリペプチド抗原の提示により細胞障害性を獲得したCTLも同様に、腫瘍に対するワクチンとして用いることができる。APCおよびCTLによる抗腫瘍免疫を用いるそのような腫瘍の治療法は、細胞免疫療法と呼ばれる。

10

【0152】

一般的に、細胞免疫療法のためにポリペプチドを用いる場合、CTL誘導効率は、異なる構造を有する複数のポリペプチドを組み合わせ、それらをDCに接触させることによって上昇することが知られている。したがって、DCをタンパク質断片によって刺激する場合、複数のタイプの断片の混合物を用いることが有利である。

【0153】

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が、そのポリペプチドで免疫した実験動物において誘導される場合、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。

20

【0154】

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、PRCを治療および予防することができる。癌の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、および癌の発生抑制のような段階のいずれかが含まれる。死亡率、または癌を有する個体の死亡率の低下、血液中の腫瘍マーカーレベルの低下、癌に伴う検出可能な症状の軽減等も同様に、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効果は好ましくは統計学的に有意である。例えば、細胞増殖疾患に対するワクチンの治療または予防効果を、ワクチン投与を行わない対照と比較する観察において、5%またはそれ未満を有意水準とする。例えば、スチューデントのt-検定、マン-ホイットニーのU検定、またはANOVAを統計解析に用いてもよい。

30

【0155】

免疫学的活性を有する上記のタンパク質またはそのタンパク質をコードするベクターをアジュバントと併用してもよい。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（または連続して）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。例示的なアジュバントには、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組み合わせてもよい。そのような担体の例には、滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液等が含まれる。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、全身または局所投与され得る。ワクチン投与は、1回投与によって行うか、または複数回投与によって追加刺激することができる。

40

【0156】

本発明のワクチンとしてAPCまたはCTLを用いる場合、腫瘍を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被験者のPBMCを採取して、細胞をエキスピボでポリペプチドに接触させて、APCまたはCTLの誘導後、細胞を被験者に投与してもよい。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。インピトロで誘導された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して増殖させることによって、細胞免疫療法をより効率よく行うことができる。さらに、このようにして単離されたAPCおよびCTLを用いて、細胞が由

50

来する個体に対してのみならず、他の個体由来の類似のタイプの腫瘍に対する細胞免疫療法のために用いてもよい。

【0157】

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、抗腫瘍免疫を惹起するために用いてもよい。

【0158】

PRCを阻害するための薬学的組成物

本発明の文脈において、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、および静脈内を含む）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。製剤は任意で用量単位で個別に包装される。

【0159】

経口投与に適した薬学的製剤には、それぞれが活性成分の規定量を含むカプセル剤、カシエ剤、または錠剤が含まれる。適した製剤にはまた、粉剤、顆粒剤、溶液、懸濁液、および乳液が含まれる。活性成分は、任意でペースト剤またはペーストとして投与される。経口投与用の錠剤およびカプセル剤は、結合剤、充填剤、潤滑剤、崩壊剤、および/または湿潤剤のような通常の賦形剤を含んでもよい。錠剤は、任意で一つまたは複数の製剤成分との圧縮または成形によって作製してもよい。圧縮錠は、粉剤または顆粒剤のような流動状の活性成分を、任意で結合剤、潤滑剤、不活性希釈剤、潤滑剤、表面活性剤、および/または分散剤と混合して、適した装置において圧縮することによって調製してもよい。成形錠剤は、不活性液体希釈剤によって湿らせた粉末化合物の混合物に適した機械において成形することによって作製してもよい。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、水性もしくは油性懸濁液、溶液、乳液、シロップ剤、もしくはエリキシル剤の形であってもよく、または使用前に水もしくは他の適した溶剤によって構成するための乾燥製品として提供してもよい。そのような液体調製物は、懸濁剤、乳化剤、非水性溶剤（食用油が含まれてもよい）、および/または保存剤のような通常の添加剤を含んでもよい。錠剤は任意で、活性成分の徐放または制御放出を提供するように調製してもよい。錠剤の包装は、毎月服用される錠剤1錠を含んでもよい。

【0160】

非経口投与に適した製剤には、任意で抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤および意図するレシピエントの血液と製剤を等張にする溶質を含む水性および非水性滅菌注射剤、さらに懸濁剤および/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、単位用量または複数回用量容器、例えば密封アンプルおよびバイアルに入れてもよく、滅菌液体担体、例えば生理食塩水、注射用水を使用直前に加えるだけでよい凍結乾燥状態で保存してもよい。または、製剤は、連続注入用であってもよい。即時調合注射溶液および懸濁液は、既に記述した種類の滅菌粉末、顆粒、および錠剤から調製してもよい。

【0161】

直腸投与に適した製剤には、カカオ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含む坐剤が含まれる。口内、例えば口腔内または舌下への局所投与に適した製剤には、ショ糖およびアカシアまたはトラガカントのような着香基剤に活性成分を含むトローチ剤、ならびにゼラチンとグリセリンまたはショ糖とアカシアのような基剤に活性成分を含む香錠が含まれる。鼻腔内投与の場合、本発明の化合物を液体スプレー、分散性の粉末、または点鼻剤の形態で用いてもよい。点鼻剤は、一つもしくは複数の分散剤、溶解剤、および/または懸濁剤も含む、水性または非水性基剤によって調製してもよい。

【0162】

吸入による投与の場合、吸入器、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ための、他の簡便な手段によって化合物を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

10

20

30

40

50

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。

【0163】

または、吸入または吹入による投与の場合、化合物は、乾燥粉末組成物、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とってもよい。粉末組成物は、例えば、粉末が吸入器または吹入器を利用して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ような単位投与剤形として提供され得る。

【0164】

他の製剤には、治療薬剤を放出する埋め込み可能装置および接着パッチが含まれる。

【0165】

望ましければ、活性成分を持続的に放出するように適合された、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。

【0166】

上記で特に言及した成分の他に、本発明の製剤には、当該製剤のタイプに関して当技術分野において通常の他の薬剤が含まれてもよいことを理解すべきである。例えば経口投与に適した製剤は着香料を含んでもよい。

【0167】

好ましい単位投与製剤は、下記に引用するように、活性成分またはその適当な分画の有効量を含む。

【0168】

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され得る。成人ヒト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、および最も好ましくは約100 mg~約3 g/日である。錠剤または個別の単位で提供される他の単位投与剤形は、便宜上、同一単位量を複数回投与した量で有効性を示すような単位量、例えば約5 mg~約500 mg、通常約100 mg~約500 mgを含み得る。

【0169】

用いられる用量は、被験者の年齢および性別、治療される正確な障害、およびその重症度を含む多数の要因によって左右されると考えられる。同様に、投与経路も、病態およびその重症度に依存して変化してもよい。いかなる場合においても、適切かつ最適な投与量は、上記の要因を考慮して当業者によってルーチンのように算出され得る。

【0170】

本発明の局面は、添付の特許請求の範囲に記述される本発明の範囲の制限を意図しない以下の実施例において説明される。

【0171】

別に定義する場合を除き、本明細書で用いるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する通常の当業者によって一般に理解されているものと同じ意味を持つ。本発明の実施または検定のために本明細書に記載したものと同様または同等の方法および材料を用いることができるが、好ましい方法および材料は以下に説明するものである。

【0172】

発明を実施するための最良の形態

本発明を以下の実施例において詳細に説明するが、これらは特許請求の範囲に記載された本発明の範囲を限定するものではない。

【0173】

実施例1

1. 一般的な方法

患者および組織試料

10

20

30

40

50

組織試料は、前立腺全摘出術を受ける癌患者26例から、インフォームドコンセントにより得た。手術標本はすべて臨床病期T2a～T3aにあり、N1は有するものと有しないものがあり、グリーソンスコアは5～9であった。組織病理学的診断は、LMMの前に一人の病理医が行った。試料はすべて、外科的切除の直後にTissueTek OCT媒体 (Sakura, Tokyo, Japan) 中に包埋し、使用時まで-80℃で保存した。切除した26例の組織のうち、20例の癌および10例の高度PINは、マイクロアレイ分析を行うための十分な量および質のRNAを有していた。

【0174】

レーザーマイクロビームマイクロダイセクションおよびT7に基づくRNA増幅

LMM、およびT7に基づくRNA増幅を、以前に記載されている通りに行った。パルス式紫外光ナロービームフォーカスレーザー (SL Microtest GmbH, Germany) を装着したEZカットシステムを用いて製造元のプロトコルに従い、前立腺腫瘍細胞および正常前立腺管上皮細胞を選択的に単離した。DNアーゼで処理した後、総RNAを2ラウンドのT7に基づく増幅に供し、各試料から50～100μgのaRNAを得た。次いで、PRC細胞またはPIN細胞および正常前立腺管上皮細胞由来のaRNAの2.5μgアリコートを用いて、以前に記載されている通りに (Ono et al., 2000)、Cy5-dCTP (腫瘍細胞) またはCy3-dCTP (正常細胞) (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) を用いる逆転写によって標識した。

10

【0175】

cDNAマイクロアレイ分析およびデータの収集

本発明者らは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のUniGeneデータベース (build #131) から選択した23,040種のcDNAを含むゲノムワイドcDNAマイクロアレイシステムを製造した。構築、ハイブリダイゼーション、洗浄およびスキャニングは以前に記載された方法に従って行った (Ono et al., 2000)。ArrayVisionソフトウェア (Imaging Research, Inc., St. Catharines, Ontario, Canada) を用いて、バックグラウンドを差し引くことにより、23,040個のスポットからのCy3およびCy5のシグナル強度を定量し解析した。次いで、各標的スポットに対するCy5 (腫瘍) およびCy3 (対照) の蛍光強度を、52種のハウスキーピング遺伝子の平均Cy3/Cy5比が1に等しくなるように調整した。シグナル強度の低いものから得られたデータの信頼性は低いため、各スライドに対してカットオフ値を設定し (Ono et al., 2000)、Cy3色素およびCy5色素の両方でカットオフ値よりも低いシグナル強度が得られた場合、その遺伝子を以降の分析から除外した。他の遺

20

30

【0176】

PINからPRCへアップレギュレートまたはダウンレギュレートされた遺伝子の同定

本発明者らは、以下の基準に従って、20例のPRCおよび10例のPINにおいて発現の変化がみられた遺伝子を同定した：(1) 検討した症例の50%超において本発明者らが発現データを入手することができた遺伝子；および(2) 情報的価値のある症例の50%超において、その発現比が前立腺癌では3.0を上回り、かつPINでは0.5～2.0の間であった遺伝子 (アップレギュレートされる遺伝子と定義される)、またはその発現比が癌では0.33未満であり、かつPINでは0.5～2.0の間であった遺伝子 (ダウンレギュレートされる遺伝子と定義される)。

40

【0177】

免疫組織化学

ホルマリン固定およびパラフィン包埋を行った前立腺腫瘍切片を、ウサギ抗EphA4 (EphA4) ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) を用いて、EphA4発現に関して免疫染色した。前立腺癌組織は、PRC細胞、PIN細胞、および正常前立腺上皮を不均一に含んでいた。抗原を回収するために、脱パラフィン処理した組織切片を10mMクエン酸緩衝液、pH 6.0中に配置し、オートクレーブ内で15分間、108℃に加熱した。切片を1：10希釈または1：100希釈したEphA4に対する一次抗体とともに、それぞれ加湿チャンバー内で室温で1時間インキュベートし、ペルオキシダーゼ標識したデキストランポリマー、次いでジアミノベンジジン (DAKO Envision Plus System; DAKO Corporation

50

n, Carpinteria, CA) を用いて現像した。切片はヘマトキシリンを用いて対比染色した。陰性対照については一次抗体を省いた。

【0178】

2. ノーザン-プロット分析

ヒト多組織ノーザンプロット (Clontech, Palo Alto, CA) を、EphA4の[⁻³²P]dCTP標識PCR産物とハイブリダイズさせた。1013bpのPCR産物を、以下のプライマーを用いるRT-PCRによって調製した：

5' -GAAGGCGTGGTCACTAAATGTAA-3' (SEQ ID NO:3) および

5' -TTTAATTTTCAGAGGGCGAAGAC-3' (SEQ ID NO:4)。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。プロットのオートラジオグラフィは増感スクリーンを-80℃で7日間用いて行った。

10

【0179】

3. siRNA発現構築物およびコロニー形成/MTTアッセイ法

本発明者らは、標的遺伝子に対するRNAi作用のためにsiRNA発現ベクター (psiU6BX) を用いた。U6プロモーターを、遺伝子特異的配列 (同じ配列のリバーズ相補鎖由来の短いスパーサーTTCAAGAGA (SEQ ID NO:9) によって隔てられた標的転写産物由来の19nt配列) および終結シグナルとしての5個のチミジンの上流にクローニングし、さらにジェネティシン (Sigma) に対する耐性を付与するためにneoカセットを組み込んだ。EphA4に対する標的配列は

5' -GCAGCACCATCATCCATTG-3' (SEQ ID NO:10) (1313si) であり、

20

5' -GAAGCAGCAGCACTTCTTC-3' (SEQ ID NO:11) (EGFPsi) を陰性対照とした。標的配列はEphA4の完全長配列に対して設計した。EphA4のヌクレオチド配列およびそのヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:2に示した (GenBankアクセッション番号 NM_004438)。PC3前立腺癌細胞株を10cm培養皿 (5×10⁵細胞/枚) にプレーティングし、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を製造元の指示に従って用いて、EGFP標的配列 (EGFPsi) を含むpsiU6BX、および標的配列を含むpsiU6BXをトランスフェクトした。細胞を一週間、500 mg/mlジェネティシンにより選択し、準備段階の細胞をトランスフェクション後8時間で収集し、EphA4に対するノックダウン効果を検証するためにRT-PCRにより分析した。RT-PCRのプライマーは上記のものと同一であった。これらの細胞はまた、コロニー形成および細胞数の評価のために、それぞれギムザ溶液による染色およびMTTアッセイ法にも供した。

30

【0180】

4. PINから前立腺癌への悪性トランスフォーメーションの際にアップレギュレートされるEphA4遺伝子の同定

本発明者らは、非浸潤性前駆体であるPINから悪性癌への移行に関与する可能性の高い遺伝子を検索するために、PINとPRCとの間での差次的な発現パターンに注目した。20例のPRCの発現プロファイルを10例のPINのそれと比較することにより、本発明者らは、アップレギュレートされる1つの遺伝子、EphA4を同定した；変化がみられたこの遺伝子は、浸潤性PRC細胞の細胞接着または運動性に関与しているかもしれない。EphA4はチロシンキナーゼ受容体の一つであり、細胞の形状および運動性を調節することによって神経回路の発生および血管新生に重要な役割を果たしている可能性があり、かつPRCにおけるその過剰発現はPRC細胞の運動性と関連している可能性がある (Kullander et al. 2002)。後者のいくつかは細胞接着およびプロテイナーゼ活性と関連性があり、このことはそれらの発現の変化が、PINからPRCへの移行に際して管構造を破壊することによって浸潤性表現型に寄与する可能性を示唆している。

40

【0181】

5. 免疫組織化学

PINからPRCへの移行における遺伝子発現パターンを検証するために、本発明者らは、本発明者らのデータで、PINからPRCへの移行において差次的に発現された遺伝子の免疫組織化学分析を実施した。一般に前立腺癌組織は、PRC細胞、PIN細胞、および正常前立腺上皮

50

を不均一に含んでおり、本発明者らは、同じ患者由来の同一組織における、前立腺癌発生に関連する、各種の細胞染色パターンを比較した。図1に示されているように、EphA4タンパク質もまた、PRC細胞では強く発現されたが、同じ患者由来のPINおよび正常前立腺上皮においてはEphA4タンパク質の発現は全くないか、またはごく弱いものであった。これらの結果はこの発現プロファイル分析の信頼性が高いことを意味する。

【0182】

本発明者らがEphA4に注目したのは、EphA4がチロシンキナーゼ活性を有する受容体の一つであり、かつ癌に対する薬剤設計および抗体療法のための理想的な分子標的であるためである。現在、EGFR（上皮増殖因子受容体）阻害因子、PDGFR（血小板由来増殖因子受容体）阻害因子、およびVEGF（血管内皮増殖因子）阻害因子を含む、数多くのチロシンキナーゼ阻害因子は、癌治療のための臨床試験中である（Dancey and Sausville et al., 2003, Morgan et al., 2003）。さらに、チロシンキナーゼ受容体ERBB2/Her2（上皮増殖因子受容体2）に対するヒト化モノクローナル抗体であるトラスツズマブ（ハーセプチン）は、HER2が過剰発現される転移性乳癌のサブセットに対して有効である（Dancey and Sausville et al., 2003）。癌に対する薬剤標的としてのこれらのチロシンキナーゼ受容体には、小分子および抗体戦略の両方によるアプローチが可能である。

【0183】

EphA4はチロシンキナーゼ活性を有する受容体のクラスの一つであり、それらのエフリンリガンドとの機能は神経系において詳細に研究されており、ここでEph受容体およびエフリン分子は、発生過程にある後脳のパターン形成、軸索の経路誘導、および神経堤細胞の遊走の先導に関与する（Dodelet et al., 2000, Kurai and Pasquale, 2003）。これらの分子は胚の血管新生も調節し、かつEph/エフリンと腫瘍血管新生との関連性に関する報告もいくつかある（Gale and Yancopoulos, 1999, Dodelet et al., 2000）。Eph受容体ファミリーは13のメンバーからなり、それらのリガンドであるエフリンは、Aサブクラス（A1～A5）およびBサブクラス（B1～B3）の2つのサブクラスに分けられる。受容体は、配列の類似性およびリガンド親和性に基づいて、Aサブクラス（EphA41～A8）およびBサブクラス（EphB1～B4、B6）に分けられる。A型受容体は典型的にほとんどまたはすべてのA型リガンドと結合し、B型受容体はほとんどまたはすべてのB型リガンドと結合するが、例外的にEphA4はA型リガンドおよびほとんどのB型リガンドの両方と結合し得る（Dodelet et al., 2000, Kurai and Pasquale, 2003）。前立腺癌組織においてEphA4のリガンドは不明である。ノーザンブロット分析からは、EphA4が精巣には豊富に存在するが、中枢神経系および他の主要な臓器ではそうでないことが示された（図2）。最近、同じくいくつかの癌において過剰発現される別のEph受容体ファミリーメンバーであるEphA42に対する抗体ターゲティングが、インビトロおよびインビボで乳癌細胞の増殖を阻害することが示されている（Carles-Kinch et al., 2002, Coffman et al., 2003）。しかしながら、EphA42は成人組織において普遍的に発現され、このことは抗体療法による治療が有害である可能性がより高いことを示唆する。そのチロシンキナーゼ活性、膜への局在化、およびその制限的な発現パターンを考慮すれば、EphA4は前立腺癌に対して最も理想的な分子標の一つである。

【0184】

6. 前立腺癌細胞株においてsiRNAにより媒介される増殖抑制

前立腺癌の増殖または生存に対するEphA4の影響を調べるために、本発明者らは、哺乳動物ベクターに基づくRNA干渉（RNAi）技術により、それらの内因性の発現を特異的にノックダウンした。EphA4に対して設計したいくつかのsiRNAにおいて、siRNA産生性ベクターのトランスフェクションは、内因性の発現の低下をもたらした（図3A）。EphA4の転写産物に対するsiRNAによるノックダウン効果は、コロニー形成アッセイ法およびMTTアッセイ法において劇的な増殖抑制をもたらした（図3Bおよび3C）。これらの所見は、前立腺癌細胞におけるEphA4の過剰発現が癌細胞増殖と関連していること、およびそれらが前立腺癌療法の有効な分子標的であることを示している。

【0185】

結論として、本発明者らは、非浸潤性前駆体であるPINでなく前立腺癌細胞において過剰発現されるチロシンキナーゼ受容体であるEphA4を同定し、およびそれが癌細胞の増殖と関連性があることから、このチロシンキナーゼ受容体が前立腺癌治療のための小分子または抗体の理想的な分子標的であることが示された。

【0186】

実施例2

1. 一般的な方法

細胞株および組織標本

ヒト膵臓細胞株PK45P、KLM1、およびMIA-PaCa2(ATCC番号:CRL-1420)は、東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターから入手した。これらの細胞はすべて公的に入手可能である。 10

【0187】

cDNAマイクロアレイを用いることによるPDACa細胞における過剰発現遺伝子の単離

cDNAマイクロアレイスライドの作製についてはすでに記載されている(Ono K, Tanaka T, Tsunoda T, Kitahara O, Kihara C, Okamoto A, Ochiai K, Takagi T, and Nakamura Y. Cancer Res., 60: 5007-5011, 2000)。それぞれの発現プロファイルの分析に関しては、実験的な変動を少なくするために、約27000個のDNAスポットを含むcDNAマイクロアレイスライドを2セット用意した。手短に述べると、18の膵癌組織からマイクロダイセクションを行ったPDACa細胞および正常膵管上皮から全RNAを精製した。マイクロアレイ実験に十分なRNAを得るために、T7に基づくRNA増幅を行った。PDACa細胞および正常管上皮に由来する増幅されたRNAのアリコートと、それぞれCy5-dCTPおよびCy3-dCTP(Amersham Biosciences)を用いる逆転写によって標識した。ハイブリダイゼーション、洗浄、および検出は以前に記載の通りに行った(Ono K, Tanaka T, Tsunoda T, Kitahara O, Kihara C, Okamoto A, Ochiai K, Takagi T, and Nakamura Y. Cancer Res., 60: 5007-5011, 2000)。次いで、アップレギュレートされる遺伝子の中から、4つの遺伝子、EphA4に焦点を合わせた。なぜなら、その発現比が情報的価値のある癌の50%以上において5.0を上回ったこと、および29の正常ヒト組織における遺伝子発現に関する本発明者らの以前のデータ(Saito-Hisaminato A, Katagiri T, Kakiuchi S, Nakamura T, Tsunoda T, Nakamura Y. 「Genome-wide profiling of gene expression in 29 normal human tissues with a cDNA microarray.」 DNA Res., 9: 35-45, 2002)によれば、正常な重要主要臓器における発現レベルが比較的低かったためである。 20 30

【0188】

EphA4に関する半定量的RT-PCR

マイクロダイセクションを行ったPDACa細胞および正常膵管上皮細胞由来のRNAを、T7に基づくインビトロ転写(Epicentre Technologies)による2ラウンドの増幅に供し、一本鎖cDNAを合成した。-アクチン(ACTB)および2-MGを定量対照としてモニタリングすることにより、その後のPCR増幅のための各一本鎖cDNAの適切な希釈物を調製した。本発明者らが用いたプライマー配列は以下の通りである：

EphA4に関しては、

5'-GAAGGCGTGGTCACTAAATGTAA-3'(SEQ ID NO:3)および、 40

5'-TTTAATTTTCAGAGGGCGAAGAC-3'(SEQ ID NO:4)

ACTBに関しては、

5'-CATCCACGAAACTACCTTCAACT-3'(SEQ ID NO:5)および、

5'-TCTCCTTAGAGAGAAGTGGGGTG-3'(SEQ ID NO:6)

2-MGに関しては、

5'-CACCCCCACTGAAAAAGAGA-3'(SEQ ID NO:7)および、

5'-TACCTGTGGAGCAAGGTGC-3'(SEQ ID NO:8)。

【0189】

すべての反応は、GeneAmp PCRシステム9700(PE Applied Biosystems)により、94 2分間の初期変性の後、94 30秒間、58 30秒間、および72 1分間を21サイクル(ACTB 50

および 2-MGの場合) または28~32サイクル (EphA4の場合) を含んだ。

【0190】

免疫組織化学

ホルマリン固定およびパラフィン包埋を行ったPDACa切片を、ウサギ抗EphA4 (EphA4) ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いて、EphA4発現に関して免疫染色を行った。抗原を回収するために、脱パラフィン処理した組織切片を10mMクエン酸緩衝液、pH 6.0中に配置し、かつオートクレーブ内で15分間、108℃に加熱した。切片を1:10希釈または1:100希釈したEphA4の一次抗体と共に、それぞれ加湿チャンバー内で室温で1時間インキュベートし、ペルオキシダーゼ標識したデキストランポリマー、次いでジアミノベンジジン (DAKO Envision Plus System; DAKO Corporation, Carpinteria, CA) を用

10

【0191】

ノーザンブロット分析

ヒト多組織ノーザンブロット (Clontech) を、上記のプライマーによって増幅した[32 P]dCTP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。ブロットのオートラジオグラフィーは増感スクリーンを-80℃で5日間用いて行った。

【0192】

psiU6BXプラスミドの構築

20

siRNAをコードするDNA断片を、GAP中のヌクレオチド85~490に、以下のプラスミド配列 (SEQ ID No: 15) に (-) として示されているように挿入した。

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGGAT
CCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTGGGGATCAGCGTTTGAGTAAGA
GCCCCGCTCTGAACCCCTCCGCGCCGCCCGGCCAGTGGAAGACGCGCAGGCAAAACG
CACCACGTGACGGAGCGTGACCGCGCGCCGAGCGCGCGCCAAGGTCTGGGCAGGAAGAGGG
CCTATTTCCCATGATTCCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAAT
TAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTA
ATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAATTTATGTTTTAAATGGACTATCATATGCT
TACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAA
CACC-----TTTTACATCAGGTTGTTTTTCTGTTTGGTTTTTTTTTTTACACCACGTTT
ATACGCCGGTGCACGGTTTACCACTGAAAACACCTTTCATCTACAGGTGATATCTTTTAA
CACAAATAAAATGTAGTAGTCCTAGGAGACGGAATAGAAGGAGGTGGGGCCTAAAGCCGA
ATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGG
GCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGG
TTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCT
TCCCTTCCTTTCCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCC
CTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCCAAAAAATTGATTAGGGTG
ATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGT
CCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGG
TCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGC
TGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGG
AAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGC
AACCAGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAAGCATGCATCT
CAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACCTCCGCCCATCCCGCCCCTAACCTCCGCC
CAGTTCCGCCCATTCCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGA
GGCCGCCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGG
CTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGG
ATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTG
GGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGC
CGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGG
TGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGGCGT
TCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGG
CGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCAT
CATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCA
CCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTTCGATCA
GGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACCTGTTTCGCCAGGCTCAA

10

20

30

40

GGCGCGCATGCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAA
TATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGC
GGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGA
ATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGC
CTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGAC
CAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGATTCGATTCCACCGCCGCCTTCTATGAAAGG
TTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTC
ATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAA
AGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCCTGCTGCTTCTAGTTGTGGT
TTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGC
TTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCA
CACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAA
CTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAG
CTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGCTATTGGGCGCTCTTCC
GCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCT
CACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATG
TGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTC
CATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGA
AACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCT
CCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTG
GCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAG
CTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTAT
CGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAC
AGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAAC
TACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTC
GGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTTTTTTT
GTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTT
TCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGA
TTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTAAATCAATC
TAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCT
ATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATA
ACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCA
CGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGA
AGTGGTCTTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGA
GTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTG
GTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGA
GTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTT
GTCAGAAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCT

10

20

30

40

```

CTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCA
TTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAAT
ACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATTCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGA
AACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCC
AACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGG
CAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTC
CTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTT
GAATGTATTTAGAAAAATAAAACAAATAGGGGTTCGCGCGACATTTCCCCGAAAAGTGCCA
CCTGACGTC

```

10

【 0 1 9 3 】

snRNA U6遺伝子は、RNAポリメラーゼIIIによって転写され、3'末端にウリジンを有する短い転写産物を生じることが報告されている。プロモーター領域を含むsnRNA U6遺伝子のゲノム断片を、プライマーのセット、

5' -GGGGATCAGCGTTTGAGTAA-3' (SEQ ID No : 16) および

5' -TAGGCCCCACCTCCTTCTAT-3' (SEQ ID No : 17)、ならびにテンプレートとしてヒト胎盤DNAを用いるPCRによって増幅した。その産物を精製し、かつTAクローニングキット (Invitrogen) を用いて供給元のプロトコールに従い、pCRプラスミドベクター中にクローニングした。snRNA U6遺伝子を含むBamHI、XhoI断片を精製し、かつpcDNA3.1(+)プラスミドのヌクレオチド1257~56断片中にクローニングし、それをプライマーのセット

20

5' -TGCGGATCCAGAGCAGATTGTACTGAGAGT-3' (SEQ ID No : 18) および

5' -CTCTATCTCGAGTGAGGCGGAAAGAACCA-3' (SEQ ID No : 19) を用いるPCRによって増幅した。連結したDNAを、プライマー、

5' -TTTAAGCTTGAAGACTATTTTTACATCAGGTTGTTTTTCT-3' (SEQ ID No : 20) および

5' -TTTAAGCTTGAAGACACGGTGTTTCGTCCTTTCCACA-3' (SEQ ID No : 21) を用いるPCRのテンプレートとして用いた。この産物をHindIIIで消化し、その後自己連結させてpsiU6BXベクタープラスミドを作製した。対照として、

5' -CACCGAAGCAGCAGACTTCTTCTTCAAGAGAGAAGAAGTCGTGCTGCTTC-3' (SEQ ID No : 22) およ

30

び
5' -AAAAGAAGCAGCAGACTTCTTCTTCTTGAAGAAGAAGTCGTGCTGCTTC -3' (SEQ ID No : 23)の二本鎖オリゴヌクレオチドをpsiU6BXベクターのBbsI部位にクローニングすることにより、psiU6BX-EGFPを調製した。

【 0 1 9 4 】

siRNA発現構築物

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) から利用可能なsiRNA設計コンピュータプログラムを用いて設計した。手短に述べると、siRNA合成のためのヌクレオチド配列は、以下のプロトコールを用いて選択される。

40

【 0 1 9 5 】

siRNA標的部位の選択

1. 各遺伝子転写産物のAUG開始コドンで始めて、下流方向にAAジヌクレオチド配列に関してスキャンする。各AAおよび3'側の隣接19ヌクレオチドの存在を有望なsiRNA標的部位として記録する。調節タンパク質の結合部位がより多い可能性があるため、Tuschlらは、5'および3'非翻訳領域 (UTR)、ならびに開始コドン付近の領域 (75塩基以内) に対するsiRNAは設計しないことを推奨している。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げる可能性がある。

2. 他のコード配列と有意に相同性がある標的配列を除外するため、有望な標的部位を、適切なゲノムデータベース (ヒト、マウス、ラットなど) と比較する。

50

3. 合成のために、適格な標的配列を選択する。遺伝子の全長にわたって、いくつかの標的配列を評価のために選択する。

【0196】

EphA4のsiRNAのために用いたオリゴヌクレオチドを以下に示している。オリゴヌクレオチドは、標的配列のセンスヌクレオチド配列とアンチセンスヌクレオチド配列との組み合わせである。ヘアピンループ構造および標的配列のヌクレオチド配列はそれぞれSEQ ID NO: 14およびSEQ ID NO: 10に示されている（エンドヌクレアーゼ認識部位は、各ヘアピンループ構造配列から除去されている）。

【0197】

EphAのためのsiRNAの挿入配列

1313si:

5' -CACCGCAGCACCATCATCCATTGTTCAAGAGACAATGGATGATGGTGCTGC-3' (SEQ ID NO: 12) および、

5' -AAAAGCAGCACCATCATCCATTGTCTCTTGAACAATGGATGATGGTGCTGC-3' (SEQ ID NO: 13)。

対照のためのsiRNAの挿入配列

EGFPsi: (対照)

5' -CACCGAAGCAGCAGACTTCTTCTTCAAGAGAGAAGAAGTCGTGCTGCTTC -3' (SEQ ID NO: 22) および、

5' -AAAAGAAGCAGCAGACTTCTTCTTCTTGAAGAAGAAGTCGTGCTGCTTC-3' (SEQ ID NO: 23)。

【0198】

各配列の配列 ID NOは表1に列記されている。

遺伝子	siRNA	効果	挿入配列 SEQ ID NO		ヘアピン siRNA	標的 SEQ ID NO	位置
EphA4	1313si	+	12	13	14	10	1357-1375
対照	EGFPsi	-	22	23		11	

【0199】

コロニー形成/MTTアッセイ法

ヒトPDACa細胞株PK45P、KLM1、およびMIA-PaCa2を10cm培養皿（ 5×10^5 個/枚）にプレATINGし、かつLipofectamine 2000（Invitrogen）またはFuGENE6（Roche）を用いて製造元の指示に従い、EGFP標的配列（EGFP）を含むpsiU6BXおよび標的配列を含むpsiU6BXをトランスフェクトした。細胞を一週間、500 mg/mlジェネティシンにより選択し、かつ準備段階の細胞をトランスフェクション後8時間で収集し、EphA4に対するノックダウン効果を検証するためにRT-PCRにより分析した。RT-PCRのプライマーは上記のものと同一であった。これらの細胞はまた、コロニー形成および細胞数の評価のために、それぞれギムザ溶液による染色およびMTTアッセイ法が行われた。

【0200】

2. siRNAによる遺伝子EphA4の発現低下および癌細胞の増殖抑制

以前の研究で、レーザーマイクロディセクション法と27,000種の遺伝子がスポット化されたゲノムワイドcDNAマイクロアレイを併用することにより、PDACaの高精度の発現プロファイルが作成されている。本発明者らは、PDACaの起源であると考えられている正常膵管上皮の発現パターンと比較して、PDACa細胞においてアップレギュレートされている遺伝子として、200を上回る遺伝子を同定した（Nakamura T, Furukawa Y, Nakagawa H, Tsunoda T, Ohigashi H, Murata K, Ishikawa O, Ohgaki, Kashimura N, Miyamoto M, Hirano S, Kondo S, Katoh H, Nakamura Y, and Katagiri T. 「Genome-wide cDNA microarray analysis of gene-expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelium cells selected for purity by laser microdissection.」 *Oncogene*, 2004 Feb 9, Epub ahead of print）。PDACa細胞のこれらの

10

20

30

40

50

発現プロファイルに基づいて、本発明者らは1つの過剰発現遺伝子EphA4を選択し、PDACaにおけるこの過剰発現を免疫組織化学によって確認した(図1B)。それらの産物は、癌に対する薬剤設計および抗体療法のための理想的な分子標的である細胞表面膜タンパク質であると考えられる。臨床試験により、ERBB2 (Her2) に対するヒト化モノクローナル抗体であるトラスツズマブ(ハーセプチン)は、HER2が過剰発現される転移性乳癌のサブセットに対して有効であり、かつ必須な細胞機能のため、および悪性表現型の維持のために必要なシグナル伝達プロセスを媒介する細胞表面分子は、現在、癌療法のための最も有望な標的であることが承認されている(Pegram M and Slamon DJ. 「Biological rationale for Her2/neu as a target for monoclonal antibody therapy.」 Semin.Oncology, 27(suppl 9):13-19, 2000)。これらの膜分子を標的とする薬剤設計には、それらの増殖促進シグナルの阻止、および/またはトラスツズマブと同じ様式でのADCC活性の調節の両方のアプローチが可能である。

10

EphA4 (Genbankアクセッション番号 NM_004438 ; SEQ ID No : 1,2)。

【0201】

本発明者らは、RT-PCRおよび免疫組織化学により、PDACaにおけるEphA4の過剰発現を確認したが(図1B)、膵癌組織におけるEphA4のリガンドは不明である。ノーザンブロット分析(図2)から、EphA4が精巣には豊富に存在するが、中枢神経系および他の主要な臓器ではそうでないことが示された(図2)。最近、同じくいくつかの癌において過剰発現される別のEph受容体ファミリーメンバーであるEphA2に対する抗体ターゲティングが、インビトロおよびインビボで乳癌細胞の増殖を阻害することが報告された(Carles-Kinch K, Kilpatrick KE, Stewart JC, Kinch MS. 「Antibody targeting of the EphA2 tyrosine kinase inhibits malignant cell behavior.」 Cancer Res., 62:2840-2847, 2002)。しかしながら、EphA2は成人組織において遍在的に発現され、このことは抗体療法による治療が有害である可能性がより高いことを意味する。PDACa細胞の増殖または生存に対するEphA4の影響を調べるために、本発明者らは、PDACa細胞株において、siRNAにより、EphA4の内因性の発現を特異的にノックダウンした。EphA4に対して設計したsiRNAの一つである1313siにおいて、siRNA産生ベクターのトランスフェクションは、内因性の発現の低下を明らかに引き起こした(図3A)。EphA4 mRNAに対するsiRNAによるこのノックダウン効果は、コロニー形成アッセイ法(図3B)およびMTTアッセイ法(図3C)において劇的な増殖抑制をもたらした。そのチロシンキナーゼ活性、膜への局在、およびその特異的な発現パターンを考慮すれば、EphA4は膵癌に対して最も理想的な分子標的の一つである。

20

30

【0202】

以上の結論として、本発明者らは、PDACa細胞において過剰発現される4つの膜型分子を同定し、かつそれらはすべて癌細胞の増殖と関連している可能性が高いことから、これらの膜型分子が命にかかわる膵癌の治療のための理想的な分子標的であり、およびこれらの膜分子に対する抗体が有用な治療アプローチであることが示唆された。

【0203】

産業的な利用性

本明細書に記載した方法は、PRCおよびPADCaの予防および治療のためのさらなる分子標的の同定に有用である。本明細書中に報告したデータは、PRCの包括的理解を付加し、新たな診断戦略の開発を促進し、かつ治療薬および予防薬の分子標的を提供する。このような情報は、前立腺癌発生に関するより深い理解に貢献し、PRCの診断、治療、および最終的にはその予防のための新たな戦略を開発するための指標を提供する。

40

【0204】

本発明者らはまた、EphA4遺伝子の特異的に標的とする低分子干渉RNA (siRNA) により、細胞増殖が抑制されることも示した。このため、siRNAは抗癌薬剤の開発に有用である。例えば、EphA4の発現を阻止するか、またはその活性を妨げる作用因子は、抗癌薬、特に前立腺癌、または膵管腺癌 (PDACa) などの膵癌の治療のための抗癌薬として治療的に有用であることが分かった。

【0205】

50

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、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。さらに、特定の態様を参照して本発明を詳細に説明してきたが、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく様々な変更および改変を本発明に加えることができることは、当業者に明らかであると考えられる。

【 0 2 0 6 】

参考文献

- Abate-Shen, C., and Shen, M.M. 「Molecular genetics of prostate cancer.」 *Genes & Dev.*, 14:2410-2434,2000.
- Bostwick, D.G. 「Prostatic intraepithelial neoplasia.」 *Curr. Urol. Rep.*, 1:65-70, 2000. 10
- DeMarzo, A.M., Nelson, W.G., Isaacs, W.B., and Epstein, J.I. 「Pathological and molecular aspects of prostate cancer.」 *Lancet*, 361:955-964,2003.
- Gronberg, H. 「Prostate cancer epidemiology.」 *Lancet*, 361:859-64, 2003.
- Kullander, K., and Klein, R. 「Mechanisms and functions of Eph and ephrin signaling.」 *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 3:75-486,2002.
- McNeal, J.E., and Bostwick, D.G. 「Intraductal dysplasia: a premalignant lesion of the prostate.」 *Hum. Pathol.*, 17:64-71,1986.
- Montironi R, Mazzucchelli R, Scarpelli M. 「Precancerous lesions and conditions of the prostate: from morphological and biological characterization to chemoprevention.」 *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 963:169-184,2002. 20
- Nelson, G.N., and Wilding, G. 「Prostate cancer prevention agent: criteria and pipeline for candidate chemoprevention agents.」 *Urology*, 57,56-63,2001.
- Ono, K., Tanaka, T., Tsunoda, T., Kitahara, O., Kihara, C., Okamoto, A., Ochiai, K., Takagi, T., and Nakamura, Y. 「Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia.」 *Cancer Res.*, 60:5007-5011,2000.
- Steiner, M.S. 「High grade prostatic intraepithelial neoplasia is a disease.」 *Curr. Urol. Rep.*, 2:195-198,2001.
- van der Kwast, T.H., Lopes, C., Santonja, C., Pihl, C.G., Neetens, I., Martikainen, P., Di Lollo, S., Bubendorf, L., Hoedemaeker, R.F.; 「Members of the pathology committee of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer. Guidelines for processing and reporting of prostatic needle biopsies.」 *J Clin. Pathol.*, 56:336-40,2003. 30
- Emmert-Buck, M. R., Bonner, R.F., Smith, P.D., Chuaqui, R.F., Zhuang, Z., Goldstein, S.R., Weiss, R.A., and Liotta, L.A. 「Laser capture microdissection.」 *Science*, 274:998-1001.,1996.
- Carles-Kinch K, Kilpatrick KE, Stewart JC, Kinch MS. 「Antibody targeting of the EphA2 tyrosine kinase inhibits malignant cell behavior.」 *Cancer Res.*, 62:2840-2847,2002.
- Coffman KT, Hu M, Carles-Kinch K, Tice D, Donacki N, Munyon K, Kifle G, Woods R, Langermann S, Kiener PA, Kinch MS. 「Differential EphA2 epitope display on normal versus malignant cells.」 *Cancer Res.* 63:7907-7912,2003. 40
- Dancey J and Sausville EA. 「Issue and progress with protein kinase inhibitor for cancer treatment.」 *Nat. Rev. Drug Discovery* 2:296-313,2003.
- Dodelet VC, Pasquale EB. 「Eph receptors and ephrin ligands: embryogenesis to tumorigenesis.」 *Oncogene*, 19:5614-5619,2000.
- Gale NW and Yancopoulos GD. 「Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development.」 *Gene Dev.*, 13:1055-1066,1999.
- Han M, Partin AW, Piantadosi S, Epstein JI, Walsh PC. *J Urol*, 166:16-419,2001. 50

Kurai KK, Pasquale EB. 「Eph7ective signaling:forward, reverse and crosstalk.」 J. Cell Sci., 116:2823-2832,2003.

Morgan B, Thomas AL, Dreves J, Hennig J, Buchert M, Jivan A, Horsfield MA, Mross K, Ball HA, Lee L, Mietlowski W, Fuxuis S, Unger C, O'Byrne K, Henry A, Cherryman GR, Laurent D, Dugan M, Marme D, Steward WP. 「Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging as a biomarker for the pharmacological response of PTK787/ZK 222584, an inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, in patients with advanced colorectal cancer and liver metastases: results from two phase I studies.」 J. Clin. Oncol., 21:3955-3964,2003.

Sharp PA. 「RNAi and double-strand RNA.」 Genes Dev. 1999 Jan 15;13(2):139-41.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. 「An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells.」 Nature. 2000 Mar 16;404(6775):293-6.

Hannon GJ. 「RNA interference.」 Nature. 2002 Jul 11;418(6894):244-51.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. 「Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.」 Nature. 2001 May 24;411(6836):494-8.

Miyagishi M, Taira K. 「U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells.」 Nat Biotechnol. 2002 May;20(5):497-500

Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. 「A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells.」 Science. 296(5567):550-553, April 19, 2002.

【図面の簡単な説明】

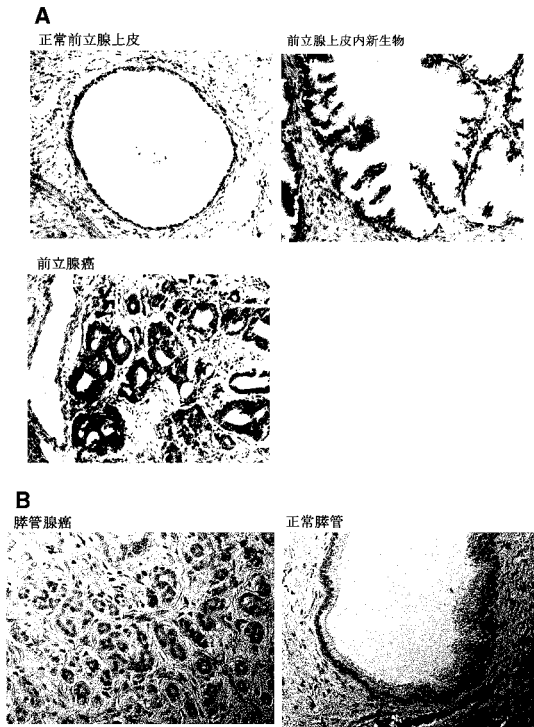
【 0 2 0 7 】

【図 1】図1Aは、PINからPRCへの移行において差次的に発現されることが同定された遺伝子の免疫組織化学分析の結果を示した写真である。EphA4タンパク質もPRC細胞において強く発現されたが、同じ患者由来のPINおよび正常前立腺上皮(N)においてはEphA4タンパク質の発現は全くないか、またはごく弱いものであった。PRC、PIN、および正常前立腺上皮は1つの前立腺癌組織中に含まれていた。倍率200倍。図1Bは、PDACa組織における免疫組織化学の結果を示した写真である。膵管腺癌においてはEphA4タンパク質の過剰発現が観察されたが、正常膵管においては観察されなかった。

【図 2】正常成人組織試料におけるEphA4発現パターンを示したノーザンブロット分析の結果を示している。EphA4は成人精巣のみに豊富に存在し、このことはEphA4に対するターゲティングが人体にもたらす毒性は比較的少ないと予想されることを示唆している。

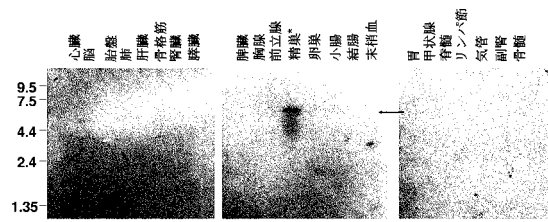
【図 3】前立腺癌細胞株PC3およびPDACa細胞MIA-Paca2における、siRNAによる内因性EphA4のノックダウンの影響を示した写真を示している。図3(A)はRT-PCRの結果を示している。siRNA発現ベクター1313siのトランスフェクションによるEphA4 mRNAのノックダウン効果は確認されたが、EGFPsiによるものは認められなかった。1313siはEphA4 mRNA配列に対して特異的に設計され、EGFPsiはEGFP mRNA配列に対して設計されている。RNAはトランスフェクション後8時間で収集して分析した。2-MGおよびACTBを、投入cDNAの標準化のために用いた。図3(B)は、コロニー形成アッセイ法の結果を示した写真である。これは、EphA4を効果的にノックダウンすることがRT-PCRによって確認された1313siによるトランスフェクション後1週間での細胞におけるコロニー数の劇的な減少を示している。図3(C)は、MTTアッセイ法の結果を示した写真である。これもまた、1313siをトランスフェクトした増殖細胞の数は劇的に減少したが、EGFPsiがトランスフェクトされたものはそうではないことを示している。

【図 1】

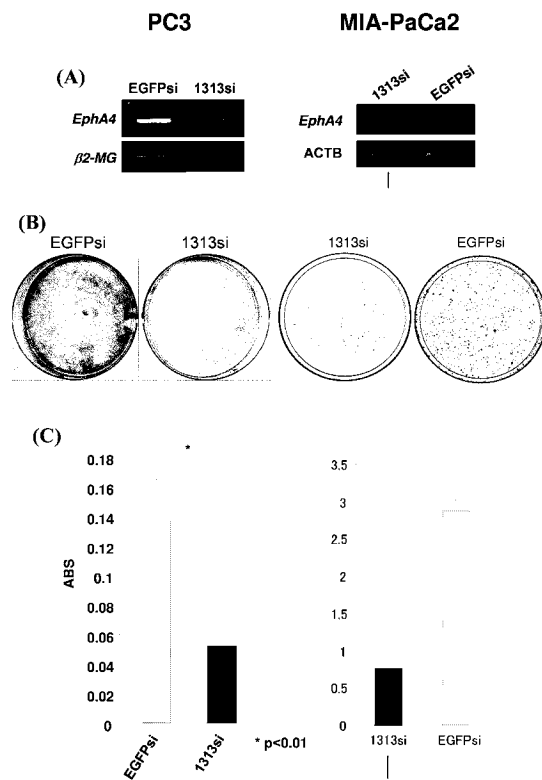


【図 2】

EphA4



【図 3】



【配列表】

2007525203000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/JP2005/003081						
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/11 C12Q1/68 G01N33/68 A61K38/00 A61K39/00								
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 C12Q A61K								
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, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search								
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>P, X</td> <td> WO 2004/031412 A (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC; JAPAN AS REPRESENTED BY THE PRESIDENT OF THE) 15 April 2004 (2004-04-15) page 45, lines 23-27 page 46, lines 1-7 page 67; table 5 ----- -/-- </td> <td>28-50</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	P, X	WO 2004/031412 A (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC; JAPAN AS REPRESENTED BY THE PRESIDENT OF THE) 15 April 2004 (2004-04-15) page 45, lines 23-27 page 46, lines 1-7 page 67; table 5 ----- -/--	28-50
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
P, X	WO 2004/031412 A (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC; JAPAN AS REPRESENTED BY THE PRESIDENT OF THE) 15 April 2004 (2004-04-15) page 45, lines 23-27 page 46, lines 1-7 page 67; table 5 ----- -/--	28-50						
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.								
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "G" document member of the same patent family								
Date of the actual completion of the international search 10 August 2005		Date of mailing of the international search report 22/08/2005						
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 Guarinos Viñals, E						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/JP2005/003081

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	ASHIDA SHINGO ET AL: "Molecular features of the transition from prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) to prostate cancer: Genome-wide gene-expression profiles of prostate cancers and PINs" CANCER RESEARCH, vol. 64, no. 17, 1 September 2004 (2004-09-01), pages 5963-5972, XP002339625 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-27, 34-50
P,X	NAKAMURA TORU ET AL: "Genome-wide cDNA microarray analysis of gene expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelial cells selected for purity by laser microdissection" ONCOGENE, BASINGSTOKE, HANTS, GB, vol. 23, no. 13, 25 March 2004 (2004-03-25), pages 2385-2400, XP002331614 ISSN: 0950-9232 page 2387, left-hand column, last paragraph page 2388; table 1 page 2389; figure 2 page 2399; table 5	28-30, 35-45,48
P,X	YAO V J ET AL: "VASCULAR BIOLOGY, ATHEROSCLEROSIS AND ENDOTHELIUM BIOLOGY TARGETING PANCREATIC ISLETS WITH PHAGE DISPLAY ASSISTED BY LASER PRESSURE CATAPULT MICRODISSECTION" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 166, no. 2, February 2005 (2005-02), pages 625-636, XP009046949 ISSN: 0002-9440 page 629; table 1	28-30, 35-45,48
X	WO 95/28484 A (AMGEN INC) 26 October 1995 (1995-10-26) sequence SEQ ID NO 14 ----- -/--	9,10, 12-14, 24-26, 34-46, 48,49

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/JP2005/003081

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DOTTORI M ET AL: "EphA4 (Sek1) receptor tyrosine kinase is required for the development of the corticospinal tract" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 95, no. 22, 27 October 1998 (1998-10-27), pages 13248-13253, XP002286945 ISSN: 0027-8424 page 13249, right-hand column, paragraph 3</p>	24, 35-44
X	<p>IRVING CAROL ET AL: "Progressive spatial restriction of Sek-1 and Krox-20 gene expression during hindbrain segmentation" DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol. 173, no. 1, 1996, pages 26-38, XP002339626 ISSN: 0012-1606 page 27, right-hand column, paragraph 2 page 30, left-hand column, paragraph 1</p>	26
X	<p>WO 02/30268 A (EOS BIOTECHNOLOGY, INC) 18 April 2002 (2002-04-18) sequence 69</p>	15-17, 20-22
X	<p>WO 03/009814 A (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC; SCHLEGEL, ROBERT; MONAHAN, JOHN, E; E) 6 February 2003 (2003-02-06) sequence 96</p>	15-17, 20-22
X	<p>US 6 506 607 B1 (SHYJAN ANDREW W) 14 January 2003 (2003-01-14) sequence 9</p>	15-17, 20-22
A	<p>US 6 071 697 A (SOSA-PINEDA ET AL) 6 June 2000 (2000-06-06)</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2005/003081

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 claim 10 (as far as an "in vivo" method is concerned) and claims 15-22, 28 are directed to a method of treatment of the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.
2. ☒ Claims Nos.: 23, 27
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.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claim 10 (as far as an "in vivo" method is concerned) and claims 15-22, 28 are directed to a method of treatment of the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 23, 27

Present claims 23 and 27 relate to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely its capacity to be obtained by the screening method of any of claims 9-14. The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides no support within the meaning of Article 6 PCT and no disclosure within the meaning of Article 5 PCT any of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently no search has been carried out for the subject-matter of claims 23 and 27.

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/JP2005/003081

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004031412	A	15-04-2004	AU 2003260966 A1	23-04-2004
			AU 2003263603 A1	23-04-2004
			CA 2500472 A1	15-04-2004
			CA 2500482 A1	15-04-2004
			EP 1556518 A2	27-07-2005
			EP 1549771 A2	06-07-2005
			WO 2004031411 A2	15-04-2004
			WO 2004031412 A2	15-04-2004
WO 9528484	A	26-10-1995	AU 702522 B2	25-02-1999
			AU 2292595 A	10-11-1995
			CA 2189028 A1	26-10-1995
			EP 1464706 A2	06-10-2004
			EP 0756627 A1	05-02-1997
			JP 9512167 T	09-12-1997
			JP 2004135670 A	13-05-2004
			WO 9528484 A1	26-10-1995
			US 5981245 A	09-11-1999
			US 5981246 A	09-11-1999
WO 0230268	A	18-04-2002	US 2002068036 A1	06-06-2002
			AU 1534502 A	22-04-2002
			CA 2425569 A1	18-04-2002
			EP 1474528 A2	10-11-2004
			JP 2005506033 T	03-03-2005
			MX PA03003151 A	19-08-2003
			WO 0230268 A2	18-04-2002
			US 2003087245 A1	08-05-2003
WO 03009814	A	06-02-2003	WO 03009814 A2	06-02-2003
			US 2003108963 A1	12-06-2003
US 6506607	B1	14-01-2003	US 2005100931 A1	12-05-2005
US 6071697	A	06-06-2000	DE 4225569 A1	10-02-1994
			US 6028184 A	22-02-2000
			AT 162721 T	15-02-1998
			CA 2141678 A1	17-02-1994
			DE 59308082 D1	05-03-1998
			DK 655926 T3	21-09-1998
			WO 9403196 A1	17-02-1994
			EP 0655926 A1	07-06-1995
			ES 2114615 T3	01-06-1998
			HK 1002531 A1	28-08-1998
			JP 7509477 T	19-10-1995
			US 5747250 A	05-05-1998
			AT 240406 T	15-05-2003
			AU 6291898 A	31-07-1998
			CA 2276460 A1	09-07-1998
			DE 69722035 D1	18-06-2003
			DE 69722035 T2	06-05-2004
			DK 958382 T3	25-08-2003
			WO 9829565 A2	09-07-1998
			EP 1348768 A2	01-10-2003
			EP 0958382 A2	24-11-1999
			JP 2000509610 T	02-08-2000
			JP 3631764 B2	23-03-2005

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	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	Y	4 C 0 8 6		
G 0 1 N	33/48	(2006.01)	G 0 1 N	33/48	P			
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	M			
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z			
G 0 1 N	37/00	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z			
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	G 0 1 N	37/00	1 0 2			
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00				
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00				
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02				
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/00	H			
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	E			
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T			
A 6 1 P	13/08	(2006.01)	A 6 1 P	35/00				
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088				
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	13/08				
			A 6 1 P	1/18				
			A 6 1 P	43/00	1 1 1			

(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, IS, IT, LT, 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, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 中鶴 修一

埼玉県さいたま市中央区下落合 2 丁目 6 - 2

F ターム(参考) 2G045 AA24 AA26 DA14 DA36 FB02 FB03
 4B024 AA01 AA12 CA01 CA04 CA09 CA12 CA20 DA02 EA04 FA01
 GA11 HA11 HA12
 4B063 QA01 QA07 QQ08 QQ13 QQ27 QQ53 QR07 QR08 QR33 QR42
 QR55 QR57 QR59 QR62 QR77 QR80 QR82 QS05 QS25 QS36
 QX02
 4C084 AA02 AA06 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 CA17 MA01
 NA14 ZB212 ZB262 ZC412
 4C085 AA03 AA13 AA14 CC32 DD88 EE01 GG01
 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB21 ZB26
 ZC41