

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/12

C07K 14/47 C12Q 1/68

C12P 21/02 A61K 38/17

A61K 31/711 A61K 48/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00816603. X

[43] 公开日 2003 年 3 月 12 日

[11] 公开号 CN 1402784A

[22] 申请日 2000. 8. 30 [21] 申请号 00816603. X

[30] 优先权

[32] 1999. 11. 19 [33] JP [31] 330604/1999

[86] 国际申请 PCT/JP00/05879 2000. 8. 30

[87] 国际公布 WO01/38528 日 2001. 5. 31

[85] 进入国家阶段日期 2002. 6. 3

[71] 申请人 久光制药株式会社

地址 日本佐贺县

[72] 发明人 難波正义 辻俊也

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 杨宏军

权利要求书 2 页 说明书 27 页 序列表 8 页
附图 15 页

[54] 发明名称 细胞增殖抑制蛋白质、多核苷酸、
与多核苷酸对应的反义核苷酸,以及
细胞增殖抑制剂、癌症诊断试剂、
癌症治疗剂和用于基因治疗的组合
物

[57] 摘要

分离在包括癌细胞在内的无限增殖化细胞中表
达减少、消失的基因, 确定其 DNA 序列, 再通过
该基因的表达使细胞增殖抑制蛋白质产生, 上述基
因和蛋白质可以用作癌症等疾病的基因诊断、基因
治疗在内的论断试剂或治疗药。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 由对序列表中序列 1 记载的氨基酸序列进行取代、缺失、或附加一个或多个氨基酸后的氨基酸序列构成的，且具有细胞增殖抑制活性的蛋白质。

2. 由对从序列表中序列 2 记载的 DNA 序列、序列 3 记载的 DNA 序列和序列 4 记载的 DNA 序列构成的 DNA 序列组中选择的 DNA 序列进行取代、缺失、或附加一个或多个 DNA 后的 DNA 序列组合物，且具有细胞增殖抑制活性的多核苷酸。

3. 从由序列表中序列 2 记载的 DNA 序列、序列 3 记载的 DNA 序列和序列 4 记载的 DNA 序列构成的序列组中选择的 DNA 序列编码的 RNA。

4. 含有从由序列表中序列 2 记载的 DNA 序列、序列 3 记载的 DNA 序列和序列 4 记载的 DNA 序列组合物序列组中选择的 DNA 构成的 DNA 的反义 DNA 或其衍生物的反义多核苷酸。

5. 含有权利要求 3 记载的 RNA 的反义 RNA 的反义多核苷酸。

6. 一种细胞增殖抑制剂，其特征是：由含有序列表中序列 1 记载的氨基酸序列的蛋白质组成。

7. 一种细胞增殖抑制剂，其特征是：由含有序列表中序列 2 记载的 DNA 序列的多核苷酸组成。

8. 一种细胞增殖抑制剂，其特征是：由含有序列表中序列 3 记载的 DNA 序列的多核苷酸组成。

9. 一种细胞增殖抑制剂，其特征是：由含有序列表中序列 4 记载的 DNA 序列的多核苷酸组成。

10. 一种癌治疗剂，其特征是：由含有序列表中序列 1 记载的氨基酸序列的蛋白质组成。

11. 一种癌治疗剂，其特征是：它是由含有序列表中序列 2 记载的 DNA 序列的多核苷酸组成。

12. 一种癌治疗剂，其特征是：由含有序列表中序列 3 记载的 DNA 序列的多核苷酸组成。

13. 一种癌治疗剂，其特征是：由含有序列表中序列 4 记载的 DNA 序列的多核苷酸组成。

14. 一种癌诊断试剂，其特征是：将含有序列表中序列 1 记载的氨基酸序列的蛋白质作为标准参照物使用。

15. 一种癌诊断试剂，其特征是：将权利要求 1 记载的蛋白质作为标准参照物使用。

16. 一种癌诊断试剂，其特征是将含有由序列表中序列 2 记载的 DNA 序列、序列 3 记载的 DNA 序列和序列 4 记载的 DNA 序列组合物序列组中选择的 DNA 序列的多核苷酸作为标准参照物使用。

17. 一种基因治疗用组成物，其特征是将含有由序列表中序列 2 记载的 DNA 序列、序列 3 记载的 DNA 序列和序列 4 记载的 DNA 序列组合物序列组中选择的 DNA 序列的多核苷酸作为治疗基因。

18. 权利要求 17 记载的基因治疗用组成物，其特征是：所述治疗基因包含在病毒载体中。

19. 权利要求 18 记载的基因治疗用组成物，其特征是：所述病毒载体是腺病毒载体。

细胞增殖抑制蛋白质、多核苷酸、与多核苷酸对应的反义核苷酸，以及细胞增殖抑制剂、癌症诊断试剂、癌症治疗剂和用于基因治疗的组合物

技术领域

本发明涉及对作为癌症等细胞无限增殖化的原因的疾病的治疗和对诊断有效的基因信息及其使用。更详细地讲，本发明涉及通过在包括癌细胞在内的无限增殖化细胞中表达、抑制该细胞增殖，对癌症等疾病的治疗有用的蛋白质的基因信息及其使用。特别是本发明涉及编码在包括癌细胞在内的无限增殖化细胞中表达少、或正在消失的细胞增殖抑制蛋白质的基因，以及将它们作为诊断试剂或治疗药的使用。

背景技术

人的正常细胞非常难于无限增殖化，逐渐老化。人正常细胞遵循细胞分裂次数计数机制（老化机制），命运注定要老化的。通常从生物体组织采集的原代细胞通过 20~80 次反复传代培养（分裂），逐渐丧失增殖能力，表现出老化状态。如果细胞老化，细胞就会变大、变得扁平，对细胞外基质成分的变化、促进有丝分裂的物质的刺激没有响应，以及表现出象生长调节基因表达的功能减退那样的一些形态学和生物化学的变化，分裂停止，所以细胞老化容易判断。

然而，通过在传代培养中进行致癌剂处理、放射线照射处理等，极少一部分细胞会逃避细胞老化继续增殖，形成集落。通过这样操作获得无限增殖能力（或老化机制破坏了）的细胞有可能连续培养，即使经过一定的细胞世代数也不会灭绝，所以称之为「无限增殖化细胞」。

如果将正常细胞和无限增殖化细胞融合，生成的杂种细胞显示出有限分裂能力。另外即使在无限增殖化细胞之间进行融合，也能得

到显示出有限分裂能力的杂种细胞。人细胞中的无限增殖化相对于老化从遗传学来说是劣性遗传，这表明与细胞分裂次数计数机制有关的某一特定基因（无限增殖化抑制基因）的缺损、或功能的丧失对细胞的无限增殖化是必要的。

另外由人正常细胞直接制作癌细胞并不容易，细胞的无限增殖化和癌化之间存在密切关系。通过在培养条件下使细胞癌化的实验体系已经阐明了人正常细胞逃避对增殖有很强反作用的老化机构，变化到可无限增殖的无限增殖化阶段，然后比较容易地经许多阶段变异到癌化阶段。例如即使使所谓的变异 p53 和变异 Rb 基因等癌基因在人正常细胞中表达，不仅不能癌化，而且也不能无限增殖化，一旦成为无限增殖化细胞通过上述的癌基因容易进行癌化（Namba, M. et al., *Crit. Rev. Oncogen.*, 7: 19 - 31, 1996）。这一现象强烈地暗示出在细胞的癌化过程中，细胞的无限增殖化是重要的阶段，因此无限增殖化阶段的解析对了解人细胞的致癌机理非常重要。

作为癌细胞中的增殖抑制因子有网膜芽细胞瘤的 Rb 基因、大肠癌的 p53 基因、Wilms 肿瘤的 WT 基因等 10 多种。其中特别适用的增殖抑制因子是 p53，已经开始使用 p53 进行基因治疗（Li, H. et al., *Clinical Cancer Res.*, 5, 637-642, 1999），既然细胞的无限增殖化与癌化有关，不仅癌抑制基因，而且无限增殖化抑制基因对细胞增殖抑制也都可能成为癌症的有效治疗方法。

现在已经报道的与细胞老化和无限增殖化有关的基因有 Sd11（Noda, A. et al., *Exp. Cell Res.*, 211:90-98, 1994）、SEN6（Banga, S. S. et al., *Oncogene*, 14:313-321, 1997）、SEN6A（Sandhu, A. K. et al., *Oncogene*, 12:247-252, 1996）、ING1（Garkavtsev, I. and Riabowol, K., *Mol. Cell. Biol.*, 17:2014-2019, 1997）、Hic - 5（Shibanuma, M. et al., *Mol. Cell. Biol.*, 17:1224-1235, 1997）等，这些基因和人细胞的老化、无限增殖化以及癌化之间的关系尚未阐明。

本发明鉴于上述情况,对无限增殖化抑制基因的全长 cDNA 进行鉴定,目的在于提供与该无限增殖化抑制基因有关的信息和它编码的蛋白质的功能的信息。

另外开发上述基因和上述蛋白质诊断试剂和/或治疗药的用途也是本发明的目的。

本发明人为了解决上述课题进行潜心研究,对编码在包括癌细胞在内的细胞中表达低下、或正在消失的蛋白质的无限增殖化抑制基因进行分离,对包括编码有 350 个氨基酸序列的蛋白质(序列 1)的 1050bp 的翻译区(序列 2)相对应的 DNA 序列在内的多个多核苷酸进行了鉴定。另外发现序列表中的序列 1 记载的上述蛋白质具有细胞增殖抑制活性。

另外本发明人发现无限增殖化抑制基因可作为癌症等无限增殖化细胞为原因的疾病诊断中有用的标准参照物,可以表达对癌症等疾病治疗有效的蛋白质的基因信息,直至完成本发明。

即本发明可以提供以下 1~2 记载的蛋白质和多核苷酸。

1. 由在序列表中的序列 1 记载的氨基酸序列中进行取代、缺失或附加一个或数个氨基酸后形成的氨基酸序列构成,而且具有细胞增殖抑制活性的蛋白质。

2. 在从序列表中序列 2 记载的 DNA 序列、序列 3 记载的 DNA 序列和序列 4 记载的 DNA 序列中选择出来的 DNA 序列中取代、缺失或附加一个或数个 DNA 后的 DNA 序列构成的,且具有细胞增殖抑制活性的多核苷酸。

另外本发明也提供与以下 3~5 记载的任一个 DNA 序列相对应的反义 DNA、或含有与 3~5 记载的任一个 DNA 编码的 RNA 相对应的反义 RNA 或其衍生物的反义多核苷酸。

3. 序列表中序列 2 记载的 DNA 序列。

4. 序列表中序列 3 记载的 DNA 序列。

5. 序列表中序列 4 记载的 DNA 序列。

另外本发明也提供由以下 6~9 中记载的蛋白质或多核苷酸构成的细胞增殖抑制剂或癌症治疗剂。

6. 含有序列表中序列 1 记载的氨基酸序列的蛋白质。

7. 含有序列表中序列 2 记载的 DNA 序列的多核苷酸。

8. 含有序列表中序列 3 记载的 DNA 序列的多核苷酸。

9. 含有序列表中序列 4 记载的 DNA 序列的多核苷酸。

另外本发明还提供癌症诊断试剂，其特征是用上述 1 或 6 记载的蛋白质作为标准参照物。

另外本发明还提供癌症诊断试剂，其特征是用上述 7~9 中任一项记载的多核苷酸作为标准参照物。

另外本发明还提供基因治疗用组成物，其特征是用上述 7~9 中任一项记载的多核苷酸作为治疗基因。

上述基因治疗用组成物中，理想的是在病毒载体中含有治疗基因，更理想的是该病毒载体是腺病毒载体。

最后本发明还提供癌细胞的识别方法，其特征是提供针对由序列表中的序列 1 记载的氨基酸序列构成的蛋白质的被荧光标记的抗体，用该抗体对怀疑是癌细胞的细胞进行染色，然后测定有无荧光发色。

附图的简单说明

图 1 表示对本发明使用的 REIC (Reduced Expression in Immortalized Cell) 蛋白质和 hDkk3 和 RIG7-1 蛋白质的同源性进行比较的序列对比图。

图 2 为了比较各种人细胞株中的 REIC 基因的表达而进行的 Northern blotting 结果的放射自显影照片图。

图 3 表示本发明使用的表达质粒 REIC/pTracer 构建的模式图。

图 4 表示 ^3H 胸腺嘧啶脱氧核苷掺入到本发明的无限增殖化 KMST-6 细胞的实验结果。

图 5 表示 ^3H 胸腺嘧啶脱氧核苷掺入到本发明的 Saos2 骨肉瘤细胞的实验结果。

图 6 表示本发明使用的表达质粒 REIC/pGEX-2T 构建的模式图。

图 7 利用免疫荧光法对 KMS-6 进行双重染色结果的照片。

图 8 表示实施例 10 中得到的 553bp 的扩增产物的电泳照片。

图 9 是人 11 号染色体图。该图谱中表示了 11p15 中报告的各种癌组织中的 LOH 频率 (%) 和相应于各个 LOH 的 STS 基因组标准参照物名。与 LOH 频率一起表示的癌组织分别是 B(乳腺癌)、G(食道癌)、H(胃癌)、HN(肝细胞癌)和 P(前列腺癌)。

图 10 对本发明涉及到的 REIC 基因和图 9 表示的标准参照物 D11S288 的同源性进行比较的序列对比图。

图 11A 是表示研究在一群非小细胞肺癌患者的组织中 REIC 基因表达的 Northern blotting 结果的放射自显影照片图。「N」表示非癌组织。「T」表示癌组织。

图 11B 是表示研究在一群肝细胞癌患者的组织中 REIC 基因表达的 Northern blotting 结果的放射自显影照片图。「N」表示非癌组织。「T」表示癌组织。

图 11C 是表示研究在食道癌患者的组织中 REIC 基因表达的 Northern blotting 结果的放射自显影照片图。「N」表示非癌组织。「T」表示癌组织。

图 11D 是表示研究在几个胃癌患者的组织中 REIC 基因表达的 Northern blotting 结果的放射自显影照片图。「N」表示非癌组织。「T」表示癌组织。

图 11E 是表示研究在几个大肠癌患者的组织中 REIC 基因表达的 Northern blotting 结果的放射自显影照片图。「N」表示非癌组织。「T」表示癌组织。

图 12 是表示在来自肝癌的各种细胞株中进行 REIC 基因的 RFLP 解析的 Southern blotting 结果的放射自显影照片图。

图 13A 是表示研究在 KMS-6 的细胞周期中 REIC 基因表达量变化的 Northern blotting 结果的放射自显影照片图。

图 13B 是表示研究在与图 13A 同样的 KMS-6 的细胞周期中 ^3H 胸

腺嘧啶脱氧核苷掺入到 KMS - 6 的实验结果图。

图 14 是表示比较在 TGF - β 存在或不存在下, REIC 基因表达量变化的 Northern blotting 结果的放射自显影照片图。

图 15 表示本发明中使用的质粒 pUC119/REIC 的构建模式图。

图 16 表示本发明中使用的质粒 pAxCAwt 的构建模式图。

图 17 表示本发明中使用的质粒 pAxCAREIC 的构建模式图。

图 18 表示为了制作本发明使用的腺病毒对腺病毒进行处理的模式图。

实施发明的最佳方案

以下就本发明的构成以及优选的实施方式进行详细说明。

在本说明书中按照 IUPAC、IUB 的规定、「包括碱基序列或氨基酸序列在内的说明书制作指导书」, 用各种省略符号表示氨基酸、蛋白质、DNA 序列和核酸等。

另外在本说明书中使用的「多核苷酸」具体化为单链和双链的基因组 DNA、cDNA、mRNA 和 cRNA 等各式各样的形式。

另外在本说明书中, 没有特别指定, DNA (包括 cDNA) 指的是由有义链和反义链两条链构成的 DNA, RNA 指的是单链 RNA, 反义 DNA 或反义 RNA 指的是由一条链构成的 DNA 或 RNA。

还有在本说明书中所谓的「无限增殖化抑制」用语有时与「细胞增殖抑制」的意思相同。另外在本说明书中的「无限增殖化细胞」用语也用于癌细胞。

另外「反义多核苷酸」虽然包括在多核苷酸中, 但在本说明书中特别明确指出该多核苷酸是反义链时表示为反义多核苷酸。

(无限增殖化抑制基因和蛋白质)

在本发明中使用的无限增殖化抑制因子之一是由编码具有细胞增殖抑制活性的序列中序列 1 记载的 350 个氨基酸序列组合物蛋白质的 DNA 序列构成的, 分离且纯化的多核苷酸 (序列 2)。另外本发明有关基因包括由序列 3 或序列 4 记载的 DNA 序列构成的多核苷酸。

本发明有关基因还包括由对序列表中的序列 2、序列 3 和序列 4 中记载的任一 DNA 序列进行取代、缺失或附加一个或多个核苷酸修饰后的 DNA 序列构成的多核苷酸。

当使由序列 1 记载的氨基酸序列组合物蛋白质在体内或体外产生用于本发明时，在通过序列 2、3、或 4 记载的 DNA 序列构成的多核苷酸的表达中并没有限定，可以对与构成上述氨基酸序列的各个氨基酸相对应的任意的密码进行组合，作为本发明有关基因在密码使用频率不同的各种各样的宿主中有效地进行表达。因此除了上述定义的多核苷酸以外随意含有这样的简并密码的基因也包括在本发明有关基因范围内。

本发明上使用的细胞增殖抑制蛋白质（以下也称之为本发明涉及到的蛋白质、或 REIC 蛋白质）不但包括由序列 1 记载的氨基酸序列构成的蛋白质，而且还包括实质上保持与该蛋白质的细胞增殖抑制活性同样活性的，而且具有通过取代、缺失或附加等使序列 1 记载的氨基酸序列中的任一个或多个氨基酸改变的氨基酸序列的该蛋白质的变异体。这些变异体包括典型的天然的等位（allele）变异和异种动物之间的变异，与序列 1 记载的氨基酸序列具有很高的同源性。在本发明中编码上述变异体的所有多核苷酸的 DNA 序列也是相应于这些氨基酸序列改变得到的。所期望的 DNA 序列的改变可以通过位置特异的突变等同行人都知道的方法实施。

由序列 1 记载的氨基酸序列组合物蛋白质是作为与非洲爪蟾（*Xenopus*）的 Dkk1 蛋白质（xDkk1）的人同源 hDkk3 蛋白质报道的（Krupnik, V. E. et al., *Gene* 238, 301 - 313, 1999）。据报道 xDkk1 是在非洲爪蟾的胚胎中具有强烈的头部诱导功能，Superman（シユペーマン）形成体中的分泌型蛋白质，参与胚胎的分化、头部形成，是分泌型信号分子 Wnt 家族（Cadiga, K. M. and Nusse, R., *Genes Dev.* 11, 3286-3305, 1997）的信号传递抑制因子。另外 Krupnik 等人进一步报道在人 Dkk 家族（hDkk1~4）中，hDkk1 和 hDkk4 具有 Wnt 家族信号传递系统的 Wnt 活性的抑制活性，而 hDkk3 没有 Wnt 活性

的抑制活性。已有报道 (Cadigan 上述报道) Wnt 家族蛋白质是与癌症有关的基因。然而 Krupnik 等人的报道没有涉及到 hDkk3 和 Wnt 家族蛋白质之间的关系。因此在本发明以前有关 hDkk3 蛋白质与细胞无限增殖化或癌化的有关的报道一点也没有。

另外作为与由序列 1 家族的氨基酸序列组合物蛋白质和序列 2 家族的 DNA 序列构成的多核苷酸具有同源性的分子报道了在人神经胶质瘤细胞中表达低下的 RIG 蛋白质 (Ligon, A. H., et al., J. NeuroVirology 4, 217-226, 1998)。然而 RIG 蛋白质与由序列 1 家族的氨基酸序列组合物蛋白质之间的同源性低, 与本发明涉及到的后者蛋白质无论是功能还是结构也不同。

(无限增殖化抑制基因在各种细胞株中的表达)

本发明有关基因由于是无限增殖化抑制基因, 所以可以预料在人各种细胞中都可表达。因此为了研究在各种人癌细胞和无限增殖化细胞中的表达, 在从肺癌、肝癌、淋巴瘤、骨肉瘤等各种组织得到的 10 种人癌细胞株中在 9 株人癌细胞和 1 株人无限增殖化细胞株中表达消失, 而在 3 株人无限增殖化细胞株中表达减少。另外对在人无限增殖化细胞中使本发明有关基因强制表达时, 发现该细胞的增殖被有意义地抑制了。因此, 很显然本发明有关基因具有抑制这些细胞增殖的活性。

(染色体上的定位)

对本发明有关基因在染色体上定位时, 该基因被定位于人 11 号染色体的短臂 15 (11p15)。据报道在 11p15 区域内存在 Beckwith-Wiedemann 综合征、多巴受体 D4、血红蛋白的 β 链、镰刀形贫血病、vfk inhiniyot p57kip2、H-ras、IGF-II、胰岛素、QT 延长综合征、肾上腺皮质癌、Wilms 肿瘤 2、横纹肌肉瘤、乳酸脱氢酶、涅-皮病、肾上腺甲状腺激素、阿-蒂综合征等致病基因。另外有报道说在非小细胞肺癌、肝癌、胃癌、食道癌、头颈部癌、前列腺癌、卵巢癌等各种固体癌中 11p15 上染色体不稳定 (Lalande, M., Annu. Rev. Genet., 30, 173, 1997; Feinberg, A. P., Can

cer Res., 59, 1743-1746, 1999)。而据报道向来自肺腺癌、横纹肌肿瘤的细胞株中导入人染色体 DNA 的实验中, 癌抑制基因定位于 11p15 上 (O' Briant, K., et al., Anticancer Res, 17, 3243-3251, 1997; Reid, L. H., et al., Hum. Mol. Genet., 5, 239-247, 1996)。这些报告认为 loss of heterozygosity (LOH)、基因组近交等染色体的不稳定性造成本发明有关基因的表达低下, 这作为一个原因诱导细胞癌化的可能性。另外也清楚地表明该基因不仅是细胞的无限增殖化抑制基因, 也是癌抑制基因。

(无限增殖化抑制基因的获得)

本发明有关基因根据本说明书中公布的 DNA 序列信息运用基因工程技术 (例如, Molecular Cloning 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press:1989) 可以获得。

实际上本发明有关基因就象实施例描述的那样可以利用 Representational Difference Analysis (RDA) 法对在正常细胞中高效表达, 而在无限增殖化细胞中低表达的基因的 cDNA 进行浓缩、选择获得。另外从通过分子量大小分级、oligocapping 法或 Race 法等制备的长链 cDNA 文库中也可以有选择地获取基因的全长 cDNA。具体来说, 按照 RDA 法从老化的正常细胞 KMS-6 细胞和无限增殖化细胞 KMST-6 细胞的 cDNA 中可以获得在无限增殖化细胞中表达低下的至少为 266bp 的新的 cDNA。本发明有关基因所包含的同源性可以以各种无限增殖化细胞和作为其亲本株的正常细胞为材料通过同样的处理得到。同行选择作为材料所必需的细胞株是很容易的。

利用以上述那样得到的基因片段的 DNA 序列为基础制备成任意序列、任意长度的特异探针, 通过菌落杂交、噬斑杂交等对人心脏 cDNA 文库进行筛选, 可以分离出含有无限增殖化抑制基因的 cDNA。另外对通过 oligo capping (オリゴキヤッピング) 法制备的人心脏 cDNA 文库进行同样的筛选, 也可以分离出含有无限增殖抑制基因的 cDNA。

另外从例如市售的各种人 cDNA 文库以及各种培养细胞、组织按照常规方法也可以从制备的 cDNA 文库中分离出所期望的 cDNA 克隆。

另外以上述基因片段的 DNA 序列相对应的氨基酸序列为基础，使用抗该序列的特异抗体，利用免疫学上的筛选方法也可以筛选所期望的 cDNA 克隆。另外以上述基因片段的 DNA 序列为基础，设计适当的特异的 PCR 用引物，按照常规方法进行 PCR 反应，也可以从 cDNA 文库中选择出保有扩增 DNA 片段的所期望的 cDNA 克隆。

(基因表达系统)

在利用本发明有关基因时，至少要将含有序列中序列 2 记载的 DNA 或与之相对应的共有 DNA 序列的多核苷酸整合到适当的表达盒和/或表达载体中，使由序列 1 记载的氨基酸序列组合物蛋白质或其变异性在作为靶细胞的人细胞内表达最理想。

表达盒只要是可以使本发明有关基因在靶细胞中表达，并没有特别限制，可以使用任一种。同行人员很容易选择那样的表达盒。理想的是上述基因可在来自动物的细胞内表达的表达盒，更理想的是上述基因可在来自哺乳动物的细胞内表达的表达盒，最理想的是上述基因可在来自人的细胞内表达的表达盒。

在上述表达盒中除了本发明有关基因外也可以使用为转录基因使用的启动子和增强子、聚 A 信号序列、为了标记导入了基因的细胞的标记和/或为了筛选的标准参照物基因、为了使该基因有效地插入细胞的基因组 DNA 序列内使用的来自病毒的基因序列、为了使作为通过基因病毒产生的药物起作用的物质分泌到细胞外和/或滞留在细胞内的信号序列等任一种序列。

用于表达盒的启动子有诸如以下的一些启动子：如来自以下一些病毒的启动子：腺病毒 (Ad)、巨细胞病毒 (CMV)、人免疫缺陷病毒 (HIV)、腺-伴随病毒 (AAV)、猿病毒 (SV40)、罗斯肉瘤病毒 (RSV)、单纯疱疹病毒 (HSV)、鼠白血病毒 (MoMLV)、舟状花叶病毒 (Sinbis virus)、仙台病毒 (SeV)、A 型肝炎病毒 (HAV)、B 型肝炎病毒 (HBV)、C 型肝炎病毒 (HCV)、人乳头状瘤病毒 (HPV)、牛乳头状瘤病毒 (BPV)、人 T 细胞白血病毒 (HTLV)、水泡性口内炎病毒 (VSV)、流感病毒 (Influenza virus)、日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis

virus)、JC 病毒 (JC virus)、细小病毒 B19 (Parvovirus B19)、脊髓灰质炎病毒 (Poliovirus); 来自以下一些哺乳类动物的启动子: 信号识别颗粒受体的 α -亚单位 (alpha-subunit of the signal recognition particle receptor) (SR- α)、髓磷脂基础蛋白质 (myelin basic protein) (MBP)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (glial-specific glial fibrillary acidic protein) (GFAP)、 β -肌动蛋白 (β -actin)、延伸因子 1- α (elongation factor1-alpha) (EF1- α)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (GAPDH)、广谱抗药基因 (multidrug resistance gene) (Mdr1)、甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein) (AFP)、热休克多巴 (HSP)、低氧诱导蛋白 (HIF) 等来自哺乳类的启动子; 以及由 CMV 初期增强子/chicken β 凝集素启动子/ β 珠蛋白聚 A 构成的嵌合启动子 (CAG)、由 CMV 初期增强子/ α -skeletal actin 启动子构成的嵌合启动子等嵌合型启动子。

另外基因和来自使其表达的逆病毒的启动子的 LTR 例如可以将 LTR 的 U3 区取代为 CAG、CMC、RSV、TK、SV40、SR- α 、MBP、 β -actin、EF1- α 等的启动子后作为嵌合 LTR 使用。

另外可以将含有本发明有关基因的表达盒整合到粘粒、质粒或来自病毒的适合宿主细胞的任意重组载体中。这样的重组病毒载体的种类、分子量、形状等并没有特别限制。具体来说, 可以是 DNA 和/或 RNA 病毒, (+) 链和/或 (-) 链病毒, 并没有特别限制。

上述重组病毒载体可以是 MoMLV 载体、HSV 载体、Ad 载体、AAV 载体、HIV 载体、SeV 载体等任一个病毒载体。另外本发明也可以使用将病毒载体的组成蛋白质群中的一个以上蛋白质取代为异种病毒的组成蛋白质的病毒载体, 或将构成基因信息的核酸序列中的一部分取代为异种病毒的核酸序列的假型病毒载体。另外只要是具有治疗效果的病毒, 即使带有人以外的宿主区的病毒也可以作为重组病毒载体使用。

就象以上详细说明的那样, 例如可以将本发明有关基因整合到作

为宿主细胞的微生物或真核生物的表达载体后，再通过培养被转化的微生物或真核生物，可以很容易、而且很稳定地制造由序列 1 记载的氨基酸序列组合物蛋白质等。从上述列举的载体中选择出的载体可以单独、或与阳离子脂质体、聚赖氨酸、聚赖氨酸丝氨酸等医学上容许的各种各样的载体形成复合体后导入宿主细胞。

（反义多核苷酸）

就构成本发明有关基因的 DNA 的有意义链或该 DNA 编码的 RNA 分别存在着由与该碱基序列互补的碱基序列构成的反义 DNA 或反义 RNA。就是说这样的反义 DNA 具有与由序列 2、3 或 4 记载的 DNA 构成的 DNA 编码的至少一部分 RNA 互补的 DNA 序列。理想的是上述反义 DNA 和反义 RNA 与序列 2 记载的 DNA 序列或与之相对应的 RNA 序列的一部分互补。因此含有上述反义 DNA 或上述反义 RNA 的本发明的反义多核苷酸在由本发明涉及到的具有制造本发明有关的蛋白质的过程中（转录、翻译等），与带有遗传信息的 DNA 或 RNA 杂交，影响遗传信息传递的正常流向，抑制该蛋白质的生物合成。另外本发明包括反义多核苷酸衍生物。例如，该衍生物可以是在反义多核苷酸的 3' 末端、或 5' 末端结合其它物质的产物或至少在碱基、糖、磷酸中的任一部分进行取代、缺失或附加等修饰的产物。特别是在用于生物体时为了防止被核酸酶分解，最好使用硫代磷酸（酯）（磷酸基与硫原子共价结合）的多核苷酸衍生物。本发明的反义多核苷酸或其衍生物的碱基数为 10~2000 最理想。如果处于该范围内的比较少的多核苷酸可以用 DNA 合成仪进行化学合成。另外有时也可以以本发明涉及到的 DNA 的 cDNA 的一部分作为模板利用 PCR 法合成。

（用作治疗药）

本发明涉及到的蛋白质由于抑制包括癌细胞在内的无限增殖化细胞的增殖，所以可以作为治疗药用于癌症等病因为细胞无限增殖化的疾病的治疗。因此编码这些蛋白质的本发明有关基因也可以作为治疗药。另外本发明的反义多核苷酸或其衍生物与本发明有关基因有拮抗作用，刺激细胞增殖，所以适用于各种各样疾病的治疗。

在将本发明涉及到的蛋白质作为细胞增殖抑制剂或癌症治疗剂用于治疗癌症等疾病时，最好是与药学上容许的载体、稀释剂、赋形剂、稳定剂等一起做成片剂、胶囊、注射用悬浮液以及其它制剂后用于患者最好。用于该目的的辅助剂同行人都知道。本发明的细胞增殖抑制剂和癌症治疗剂通过静脉给药、口服给药等制定的理想给药途径，可以预料会获得所期望的治疗效果。

(基因治疗方面的应用)

将本发明有关基因作为细胞增殖抑制剂、或作为癌症治疗剂等用于癌症等疾病的治疗时，最好是将该基因作为治疗基因与为上述治疗用而设计的载体一起制备成基因治疗用组成物，再用于患者。

本发明的基因治疗用组成物可以用于通过先从患者将靶细胞取到体外，导入本发明有关基因后再将该细胞输回到患者体内的自身移植的基因治疗(ex vivo 基因治疗)。另外，也可以将本发明有关基因直接用于患者的基因治疗(in vivo 基因治疗)中。

在将本发明有关基因用于基因治疗时，最好使用腺病毒载体。腺病毒有诸如以下的一些特征：(1)可以向多种细胞导入基因，(2)即使对于增殖终止期的细胞也可有效地导入基因，(3)通过离心可以浓缩，获得高滴度(10~11PFU/ml 以上)的病毒，(4)适于向体内(in vivo)的组织细胞直接导入基因。

作为基因治疗用的腺病毒已经开发出了以下一些：使 E1/E3 区缺失的第 1 代腺病毒载体 (Miyake, S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93, 1320, 1996)、附加 E1/E3 区而使 E2 区或 E4 区缺失的第 2 代腺病毒载体 (Lieber, A., et al., J. Virol., 70, 8944, 1996; Mizuguchi, H. & Kay, M. A., Hum. Gene Ther., 10, 2013, 1999)、几乎完全缺失腺病毒基因组的第 3 代腺病毒载体 (Steinwaerder, D. S., et al., J. Virol, 73, 9303, 1999)，在导入本发明的基因时并没有特别限制，可以使用任一种腺病毒载体。

另外，如果使用具有整合到 AAV 染色体能力的腺病毒 - AAV 杂化载体 (Recchia, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 96, 2615,

1999) 或通过使用转座子的具有具有整合到染色体能力的腺病毒载体等, 也可以应用于长期的基因表达中。

另外通过在腺病毒纤维的 H1 环插入表现出组织特异转移性的肽序列, 有可能赋予腺病毒载体组织特异性(Mizuguchi, H. &Hayakawa. I., Nippon Rinsho, 7, 1544, 2000)。

将本发明的基因治疗用组成物投入到生物体的方法没有特别限制。例如可以不通过口给药, 如最好是通过静脉给药。

(对象疾病)

由本发明有关基因编码的本发明相关蛋白质由于可以诱发感受细胞的老化或静止状态, 所以可以充当癌细胞向非癌化细胞分化的媒介。例如可以用于为了抑制癌或癌原细胞急剧增殖的治疗中。

一般来说, 肿瘤有良性肿瘤和恶性肿瘤, 后者总称为癌。

通过利用本发明有关蛋白质可治疗的肿瘤没有特别限定, 无论是良性肿瘤、还是恶性肿瘤哪一种都可以治疗, 特别是对恶性肿瘤更有效。

按照发生脏器对恶性肿瘤进行分类, 恶性肿瘤可分为脑和神经肿瘤、皮肤癌、胃癌、肺癌、肝癌、淋巴肿瘤和白血病、结肠癌、胰癌、肛门和直肠癌、食道癌、子宫癌、乳腺癌、骨和骨肉瘤、平滑肌瘤、横纹肌瘤和其它的癌。如上所述, 可治疗的肿瘤没有特别限定, 对上述的肿瘤、癌中的任一种都可以治疗, 但对肺癌、肝癌、食道癌、骨和骨肉瘤最有效。

如果从组织学对各脏器癌症进行分类大致可以分为上皮细胞癌 (carcinoma), 非上皮细胞肉瘤 (sarcoma) 以及它们的混合肿瘤。通过使用本发明有关蛋白质可治疗的肿瘤没有特别限定, 虽然可以治疗上皮细胞癌、非上皮细胞肉瘤以及它们的混合肿瘤中的任一种, 但对上皮细胞癌特别有效。

另外很多并不是癌的疾病通过本发明有关基因或蛋白质也可治疗, 其代表性例子如青光眼、干癣等由于细胞过剩生长引起的疾病。

另外, 如逆病毒由于只是在处于细胞增殖期的细胞中增殖, 所以

对 HIV 等逆病毒感染病、疣（包括性交性疣）、口头乳头瘤、进行性多病灶性脑白质病等那样的疾病，预料本发明有关基因也能有效地治疗。因为该基因可以通过抑制感染细胞增殖来抑制病毒的增殖。因此也可以作为抑制流感病毒、肝炎病毒（例如 B 型肝炎或 C 型肝炎）、EBV（Epstein-Barr virus）、乳头状瘤病毒等病毒增殖的抗病毒制剂使用。

本发明的反义多核苷酸或其衍生物由于具有刺激细胞增殖的活性，所以可以用于需要细胞增殖的疾病的治理。例如以治疗创伤、烧伤等为目的皮肤组织细胞的增殖，以治疗心肌梗塞、脑梗塞等为目的的血管内皮细胞的增殖，以治疗肝硬变、肾功能衰竭等为目的的萎缩组织细胞的增殖等，以治疗被放射线照射、艾滋病等引起的淋巴细胞减少为目的的骨髓细胞的增殖。

（作诊断试剂的用途）

如上所述，本发明有关基因由于在包括癌细胞在内的无限增殖化细胞中其表达减少，所以可以作为该无限增殖化细胞的增殖为病因的疾病的范围广泛的诊断用标准参照物。特别是本发明有关基因可作为论断试剂物使用。另外由本发明有关基因表达的本发明相关的蛋白质由于它在包括癌细胞在内的无限增殖化细胞中的表达减少，所以该蛋白质也同样可以作为包括癌症论断试剂在内的上述诊断用标准参照物使用。

在诊断癌症等病症使用本发明相关的蛋白质时，制作针对该蛋白质的特异抗体，在分析时使用。作为抗原可以使用按照上述的基因工程技术大量生产的蛋白质或其一部分，得到的抗体无论是多克隆抗体，还是单克隆抗体都可以。这些抗体可以用于上述蛋白质的纯化、测定和识别等，特别是单克隆抗体用于评价该蛋白质是否存在于细胞、组织或体液中的免疫分析最合适。通过该抗体提供的该蛋白质的检测和/或测定能力作为评价肿瘤存在或病重程度非常有希望。

（基因诊断）

在癌症等的基因诊断中使用本发明有关基因时，根据构成该基因的 DNA 序列，制作包括可与该 DNA 序列杂交的 DNA 或可与该 DNA 序列相对应的 RNA 序列杂交的 RNA 的多核苷酸，在分析中使用。为了达到该目的，可以使用上述的反义多核苷酸的全长或其一部分。这样的多核苷酸的长度理想的是 10~2000 碱基，更理想的是 15~1000 个碱基。这些多核苷酸可以用 ^{32}P 等放射性同位素、碱性磷酸酶等酶、荧光素等荧光化合物、或吖啶鎓酯等化学发光化合物任意标记。得到的标记多核苷酸可以在象 southern 和 northern blotting 那样的以往的分析中作为 DNA 和/或 RNA 探针用于分析中。这些探针在严格条件下可与上述基因杂交最理想。而短的 10~50 个碱基的多核苷酸例如可以在通过 PCR 法的诊断中作为引物使用。

实施例

以下举一些实施例更具体地对本发明进行说明，但本发明并不限于这些实施例。

(实施例 1) 与无限增殖化有关的基因的克隆

1. 原代纤维芽细胞株的培养

从 9 周令的雌性胚胎中制备纤维芽细胞，获得原代纤维芽细胞株 (KMS-6) (Namba, M. et al., Int. J. Cancer, 35:275-280, 1985)。细胞使用含有 10% 胎牛血清 (FBS, 三光纯药公司制造) 的 Eagle 最低需要培养基 (MEM, GIBCO 公司生产), 或 Dalbeco (ダルベッコ) 改变 Eagle 培养基 (DMEM, GIBCO 公司生产), 于 5% CO_2 浓度、37℃ 条件下进行培养。培养 5~7 天后直至细胞在培养板中几乎密集, 然后稀释到 1/4 倍进行传代培养。

2. 通过 ^{60}Co 放射线处理建立无限增殖化细胞株

对在 semiconfluent 中培养的 KMS-6 细胞照射 200-400rads 射线量的 ^{60}Co γ , 共照射 13 次, 用共计 2,800rads 进行放射线处理。然后每次都稀释 1/2 倍后反复进行传代培养, 最终大约进行了 50 次传代培养, 获得了不表现出老化形态具有增殖能力的无限增殖化细胞株 (KMST-6) (Namba 等人, 同前)。

3. 利用 RDA 法进行基因的克隆

利用 Acid-Guanidium-Phenol-Chloroform (AGPC) 法从进行了 45 次传代, 已老化的 KMS-6 细胞提取总 RNA, 使用 Dyna beads (ダイナビーズ) (Dyna1 公司生产) 纯化 mRNA。同样从无限增殖化的 KMST-6 细胞提取、纯化 mRNA。分别以各 2 μ l 的纯化的 mRNA 为模板, 使用 avian myeloblastosis virus 逆转录酶 (AMV-RT) 制备各自的 cDNA。对从 KMS-6 制备的 cDNA 1 μ g 和从 KMST-6 制备的 cDNA 1 μ g 进行 8 小时的扣除反应。以没有被扣除反应除去的 cDNA 作为模板, 用 T4DNA 聚合酶制备双链 DNA。然后将它整合到质粒 pT7Blue (Novagen 公司生产) 后, 导入大肠杆菌 (DH5 α), 得到了由大约 400 个克隆构成的大肠杆菌文库。

(实施例 2) 克隆 REIC

1. 大肠杆菌文库的筛选

为了从上述大肠杆菌文库中除去假阳性克隆, 用别的无限增殖化细胞株 OUMS-24F (Bai, L. et al., Int. J. Cancer, 53:451-456, 1993) 的 mRNA 为基础制作的 ³²P 标记的 cDNA 探针, 进行克隆杂交, 结果得到除去呈阳性的克隆外的大约 30 个抑制无限增殖化基因克隆。

2. DNA 测序

利用 Sanger 法 (Sanger F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467, 1977) 确定筛选得到的克隆的 DNA。被鉴定的克隆带有纤连蛋白、 α 2 型 I 酸溶原胶原 (蛋白) 等细胞外基质蛋白质、胶原酶、WS9-14 等酶蛋白质、p21 等细胞周期调节蛋白质等与老化有关的基因序列。经判断获得了其中与已知基因没有同源性, 被认为是新基因的 REIC (D93)。序列表中序列 5 给出了该 DNA 序列。

(实施例 3) 克隆 REIC (10-1)

从克隆 REIC (D93) 的 DNA 序列预料到该克隆不是全长 cDNA。因此以具有序列 5 记载的 DNA 序列的多核苷酸作为探针从人心脏 cDNA 文库 (BRL 公司生产) 筛选具有更长 DNA 序列的 cDNA 片段的克隆。结果得到预料含有 REIC (D93) 的 5' 区的保持全长 cDNA 片段的克

隆 REIC (10-1)。对该 cDNA 克隆进行 DNA 测序, 确定了其总 DNA 序列。序列表中序列 3 给出了该克隆的 DNA 序列。

(实施例 4) 克隆 REIC (10-2)

使用通过 Oligocapping 法 (Maruyama, K. and Sugano, S., Gene, 138:171-174, 1994) 制备的人心脏 cDNA 文库 (日本基因公司生产), 与实施例 2 一样以具有序列 5 记载的 DNA 序列的多核苷酸作为探针筛选具有更长 DNA 序列的 cDNA 片段的克隆。结果得到预料含有 REIC (D93) 的 5' 区的保持全长 cDNA 片段的克隆 REIC (10-2)。对该 cDNA 克隆进行 DNA 测序, 确定了其总 DNA 序列。序列表中序列 4 给出了该克隆的 DNA 序列。

(实施例 5) 被克隆的 cDNA 的解析

从实施例 3 和 4 的结果可以确认: 本发明有关基因完全含有序列 5 记载的 DNA 序列 (分别相当于序列 3 碱基号的 1848-2113、序列 4 碱基号的 1820-2095), 另外在该序列的 5' 端含有编码具有 350 个氨基酸的蛋白质 (序列 1) 的序列 2 记载的 1050bp 翻译区 (分别相当于序列 3 碱基号的 226-1275、序列 4 碱基号的 198-1247)。该基因由于在无限增殖化细胞中表达低下, 就象上述那样表现为 Reduced Expression in Immortalized Cell (REIC), 以下称之为「REIC 基因」或简单地称为「REIC」。

本发明涉及到的 REIC 基因的同源性的探索从在 NCBI (National Center for Biotechnology) Web 网站上公开的资料库中使用相同的解析程序进行。

从 BLAST 的结果得到了具有与序列 1 的氨基酸序列相同或具有表现出同源性序列的蛋白质 hDkk3 和 RIG7-1。hDkk3 表现出 100% 的同源性, 而 RIG7-1 表现出部分同源性, 总体表现出的同源性只有 43%。图 1 给出了 hDkk3 以及 RIG7-1 的氨基酸序列与 REIC 具有的氨基酸序列 (序列 1) 的同源性比较。

(实施例 6) REIC 在各种细胞株中表达量的解析

对从 Hep3B (肝细胞癌)、HuH6 (肝芽瘤)、HuH7 (肝细胞癌)、HuCCT1

(胆管癌)、A549(肺癌)、HaCat(无限增殖化角化细胞)、HeLa(子宫颈癌)、Saos2(骨肉瘤)、T24(膀胱癌)以及U937(组织细胞性淋巴瘤)等11种癌细胞株和3种正常的纤维芽细胞(OUMS24、KMS-6、HSF412)和相对应的无限增殖化细胞(OUMS24F、KMST-6、SUSM1)制备的总RNA(10 μg)用1%甲醛/琼脂糖凝胶进行电泳,固定于硝酸纤维素膜(HybribondN+, Amersham Pharmacia Biotech公司生产)上。然后使用用(α - 32 P)-dCTP标记的探针,进行REICcDNA片段的Northern杂交(42℃, 12小时)。将膜浸入到含有5×SSC、50%甲酰胺、1×Denhardt水溶液、0.2% SDS、10 硫酸葡聚糖、以及热变性的200 μg/ml的鲑精DNA的缓冲液中,加入用放射性同位素标记的探针DNA,于65℃下进行杂交。然后再于55℃的2×SSC/0.5%SDS缓冲液中洗一次。图2给出了于X光片上自动发射自显影的结果。在正常细胞中可检测出大小约2.6kb的mRNA,表明该转录产物的大小与序列3或序列4记载的REIC cDNA的DNA序列的大小一致。虽然在各个无限增殖化细胞株中也可以看到REIC基因的表达,但与正常细胞株相比其表达量减少了。另外在除去T24之外的各个癌细胞株中可以确认REIC基因的表达正在消失。

(实施例7) 细胞增殖抑制实验

1. 表达质粒的制作

作为基因表达的启动子使用带有EF-1 α 的质粒载体pTracer A(Invitrogen公司生产)。用EcoRI-XbaI切出在EF-1 α 启动子的下游的EcoRI-XbaI部位含有序列3记载的DNA序列的2.6kb的REICcDNA片段,对该片段进行亚克隆,得到表达质粒REIC/pTracer(图3)。

2. 3 H胸腺嘧啶脱氧核苷的掺入(无限增殖化KMST-6细胞)

将无限增殖化KMST-6细胞接种到24孔板中,每孔 2×10^4 细胞。使用转染试剂Lipofectamine(GOBCO公司生产),对5 μg的表达质粒REIC/pTracer进行脂(质)转染。制备甲基- 3 H胸腺嘧啶脱氧核苷(1Ci/mmol),进行细胞掺入实验(使得1 μCi/孔)。12小时后,

用冷却的 PBS (-) 洗获得的细胞。再于 5% 三氯乙酸中进行固定, 用 95% 乙醇洗净。这样获得的细胞用 0.3MNaOH 溶解后, 用 HCl 进行中和, 用液体闪烁计数器测定掺入的 ^3H 胸腺嘧啶脱氧核苷的放射活性。测定结果可以确认 REIC 基因具有抑制细胞增殖效果 (图 4)。作为对照, 只将载体 pTracerA 脂转染到 KMST-6 细胞中。

3. ^3H 胸腺嘧啶脱氧核苷的掺入 (Saos2 骨肉瘤细胞)

将 Saos2 骨肉瘤细胞接种到 24 孔板中, 每孔 5×10^4 细胞。使用磷酸钙法对 $2 \mu\text{g}$ 的表达质粒 REIC/pTracer 进行转染。制备甲基- ^3H 胸腺嘧啶脱氧核苷 ($1\text{Ci}/\text{mmol}$), 进行细胞掺入实验 (使得 $1 \mu\text{Ci}/\text{孔}$)。12 小时后, 用冷却的 PBS (-) 洗细胞。再于 5% 三氯乙酸中进行固定, 用 95% 乙醇洗净。这样获得的细胞用 0.3MNaOH 溶解后, 用 HCl 进行中和, 用液体闪烁计数器测定 ^3H 胸腺嘧啶脱氧核苷的放射活性。测定结果可以确认 REIC 基因具有抑制细胞增殖效果 (图 5)。作为对照, 只将载体 pTracerA 脂转染到 Saos2 细胞中。

(实施例 8) 识别 REIC 蛋白质的抗体的制作

1. REIC 蛋白质的体外翻译

为了使 REIC 蛋白质作为 GST 融合蛋白质表达, 用体外表达体系进行翻译。

以序列 3 记载的 DNA 序列为基础使用引物: $5' -\text{TGGATCCATGCAGCGGCTTGGGGCCAC}-3'$ 和 $5' -\text{TGAATTCAATCTCTTCCCCTCCCAGCAG}-3'$ 通过 PCR 对 REIC 的 ORF 区有选择地进行扩增。扩增的片段经 BamHI、EcoRI 消化, 亚克隆到 GST 融合蛋白质表达载体 pGEX-2T (Amersham Pharmacia Biotech 公司生产) 的 BamHI、EcoRI 位点使 REIC 能够作为融合蛋白质表达, 得到了表达质粒 REIC/pGEX-2T (图 6)。

按照常规方法, 对经 REIC/pGEX-2T 转化的大肠杆菌实施 IPTG 诱导处理, 使融合蛋白质产生。将收集的大肠杆菌悬浮于 PBS 中, 进行超声波处理后, 将离心得到的上清加到谷胱甘肽葡聚糖 4B 柱 (Amersham Pharmacia Biotech 公司生产), 纯化融合蛋白质。吸附

在柱子上的上述融合蛋白质用纤维蛋白酶进行消化，洗脱。然后再用谷胱甘肽柱去除未消化的融合蛋白质，得到含有多个多余氨基酸的 REIC 蛋白质。

2. 抗体

上述 1 得到的纯化的蛋白质用生理盐水稀释，通过每隔 2 周取其中 1mg 注入到兔耳静脉对兔子进行免疫。2 次免疫后，利用 ECL 免疫印迹法检测系统（Amersham Pharmacia Biotech 公司生产）测定抗体效价。结果可以确认稀释 1/2000 后的抗体对上述蛋白质 0.01 μ g 有反应，所以再追加 2 次免疫。将通过采全血得到的血液于 37 $^{\circ}$ C 下温育 30 分钟。除去凝固的血饼后用孔径 0.45 μ m 的膜进行无菌过滤，得到所期望的抗血清。

（实施例 9）利用抗体进行细胞核染色

为了研究 REIC 基因在细胞内的分布，使用实施例 8 制作的抗 REIC 抗血清和作为对照的对染色体进行特异荧光染色的色素 Hoechst33258（Molecular Probe 公司生产）进行细胞的双重染色。首先用 6 孔培养皿对 KMS-6 进行培养。向培养基中添加 Hoechst33258，浓度为 100ng/ml 后，培养 1 小时。用 1% 仲甲醛对经 Hoechst33258 染色的细胞进行固定，用上述抗血清进行处理后，用 FITC 标记的羊抗兔抗体（Sigma 公司生产）染色。用激发波长 360nm 激发 Hoechst33258，FITC 标记的抗体用激发波长 488nm 激发。图 7 给出了通过该免疫荧光法测定的结果。由此可以确认上述抗血清对核特异染色，REIC 蛋白质局限于细胞内的核中。

（实施例 10）REIC 基因的染色体定位

REIC 基因的染色体定位通过利用例子人-仓鼠杂种细胞的化验盘（Standford G3 Human/Hamster RH Panel; Research Genetics 公司生产）对辐射和杂交图（RH 图）进行解析确定的。PCR 用的引物是 5' -GATTTAGATCTGGACCAGGC-3'（序列 4 中的 1244-1263 碱基）和 5' -CTGAGCAACACTGCTGGATG-3'（相当于序列 4 中的 1777-1796 序列的反义链）。PCR 经于 94 $^{\circ}$ C 预加热 3 分钟后，进行 30 个循环反

应, 每一循环为 94℃ 30 秒, 63℃ 30 秒, 72℃ 1 分钟。用 2% 琼脂糖凝胶对反应液进行电泳, 然后用溴乙锭 (EtBr) 进行染色, 结果可以确认 553bp 的扩增产物(图 8)。以 PCR 的结果为基础从 Standford 大学的 RH 数据库可以确认 REIC 位于人 11 号染色体的短臂 15 (11p15)。

另外以该信息为基础对 GeneBank 的 STS 基因组标准参照物和 REIC 基因的碱基序列进行比较时, 确认 REIC 基因的 3' 非翻译区与标准参照物的 D11S2388 (11p15 的基因基因组标准参照物) 一致(图 9、图 10)。这些结果表明 REIC 基因位于 11p15。另外图 9 中给出的 LOH 在各种癌组织中的频率是引自以下文献。乳腺癌 (B): Winqvist, R., et al., *Cancer Res.*, 53, 4486, 1993; 食道癌 (E): Dolan, K., et al., *Br. J. Cancer*, 78, 950, 1998; 胃癌 (G): Baffa, R., et al., *Cancer Res.*, 56, 268, 1996; 肝细胞癌 (H): Sheu, J-C., et al., *Br. J. Cancer*, 80, 468, 1999; 头颈部癌 (HN): El-Naggar, A. K., et al., *Clin. Cancer Res.*, 2, 903, 1996; 和前列腺癌 (P): Dahiya, R., et al., *Int. J. Cancer*, 72, 283, 1997。

(实施例 11) 临床样品中的 REIC 基因的表达

1. 临床样品的获得

各种癌和非癌组织是经同意从在冈山大学医学部接受手术的 34 个患者中获得的。

2. REIC 基因的表达

利用硫代氰酸酯法从上述 1 中得到的癌和非癌组织回收总 RNA。回收的总 RNA (10 μ g) 用 1% 甲醛/琼脂糖凝胶进行电泳, 固定于硝酸纤维素膜 (HybribondN+, Amersham Pharmacia Biotech 公司生产) 上。然后使用用 (α -³²P) - dCTP 标记的探针, 进行 REIC cDNA 片段的 Northern 杂交 (42℃, 12 小时)。将膜浸入到含有 5 × SSC、50% 甲酰胺、1 × Denhardt 水溶液、0.2% SDS、10 硫酸葡聚糖、以及热变性的 100 μ g/ml 的鲑精 DNA 的缓冲液中, 加入用放射性同位素标记的探针 DNA, 于 65℃ 下进行杂交。然后再用 55℃ 的 2 × SSC/0.5% SDS

缓冲液洗膜, 然后再于 $0.1 \times \text{SSC}/0.5\% \text{SDS}$ 缓冲液洗一次。于 X 光片上出现自动发射自显影的结果。结果表明在 11 例非小细胞肺癌患者中的 10 例 (图 11A: 情况 1~6, 8~11)、肝细胞癌患者 13 例中的 4 例 (图 11B: 情况 8, 9, 11, 13)、食道癌患者 2 例中的 1 例 (图 11C: 情况 2) 中 REIC 基因的表达量减少。而在 3 例大肠癌患者中没有发现 REIC 基因的表达量下降 (图 11E)。

(实施例 12) REIC 基因的 RFLP 解析

为了进行 REIC 基因的变异解析, 进行了限制性片段长度多态性 (Restriction fragment length polymorphism; RFLP) 解析。首先按照下述方法从来自肝细胞癌的 JHH-1、HuH6、HepG2、HLE、HuH7、PLC/PRC/5、Hep3B、JHH-7、JHH-2、JHH-6、JHH-4、JHH-5 细胞株回收染色体 DNA。另外作为阳性对照, 从正常纤维芽细胞株 KMS-6 回收染色体 DNA。

1. 染色体的 DNA 回收

通过胰蛋白酶处理从 2 个培养皿回收铺满培养的各个细胞。将回收的细胞悬浮于 $1 \times \text{TEN}$ 缓冲液 (TEN: 50mM Tris-HCl (pH8.0)、 1mM EDTA、 100mM NaCl) 中, 进行匀浆。向匀浆后的悬浮液中加入 $750 \mu\text{l}$ 的 SDS (10%) 和终浓度为 $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的蛋白酶 K (MERCK 公司生产、 $20\text{mg}/\text{ml}$), 缓慢颠倒混合, 于 55°C 下温育 1 小时后, 于 37°C 下温育过夜。进行 2 次酚和氯仿萃取, 从回收的上清再进行 2 次酚和氯仿萃取, 回收上清。向回收的上清中加入预先于 -20°C 制冷的 10.2ml 乙醇后混合, 用巴斯德吸管吸取得到的线状 DNA, 除去多余的乙醇, 使其干燥。向干燥的 DNA 加入适量的 TE 缓冲液 (10mM Tris-HCl (pH8.0)、 1mM EDTA), 于室温下混合 1~2 天, 对 DNA 进行溶解。

2. RELP 解析

上述 1 回收的 DNA 经限制酶 PstI 消化后, 用 1% 甲醛/琼脂糖凝胶进行电泳, 固定于硝酸纤维素膜 (HybribondN+, Amersham Pharmacia Biotech 公司生产) 上。然后用 (α - ^{32}P) - dCTP 对序列

细胞的培养液中，终浓度为 2.5ng/ml。回收 TGF- β 添加前、添加后 3、6、12、24、48 小时的总 RNA 和通常培养条件下的总 RNA。通过 Northern 杂交对回收的 RNA 解析解析时，可以确认 TGF- β 添加后 24 小时 REIC 基因的表达上升（图 14），表明 REIC 基因的表达与细胞增殖抑制有关。

从以上结果可以认为诱导 REIC 基因表达的化合物由于可以预料有抑制细胞增殖效果，所以在癌症治疗用的候补低分子化合物的筛选中使用 REIC 基因的表达是有用的。

（实施例 15）粘粒载体 pAxCAREIC 的制作

设计在 REIC 的起始密码前设计 BamHI 位点的引物（REICS；5' -GGATCCAGAGCGGAAATGCAGCGG-3'（在相当于在序列 4 的 190-206 碱基的序列的 5' 端加上作为 BamHI 位点的 GGATCC 的序列））和在终止密码后设计 EcoRI 位点的引物（REICA；5' -GAATTCTAAATCTCTCCCTCCCAG-3'（在相当于在序列 4 的 1230-1249 碱基的序列的 5' 端加上作为 EcoRI 位点的 GAATTC 的序列））。然后以 pTracer/REIC 作为模板，通过 PCR 扩增 REIC 的编码区。PCR 共进行 30 个循环反应，每一循环的反应条件为 94℃ 30 秒，63℃ 30 秒，72℃ 1 分钟。从凝胶回收约 1.1kb 的扩增产物，EcoRI、BamHI 消化后亚克隆到 pUC119，然后导入 DH5 α ，对从氨苄青霉素抗性的克隆中提取的质粒碱基的序列进行解析。确认在插入序列中没有引入变异（pUC119/REIC、图 15）。用 EcoRI、BamHI 消化 pUC119/REIC 回收约 1.1kb 片段。使用 DNABlunting Kit（Takara（タカラ）公司生产）将回收的 REIC 的末端补平，亚克隆于含有 CAG 启动子的粘粒（pAxCawt、图 16）的 SmaI 位点。用 ClaI 消化得到的粘粒（pAxCAREIC、图 17），确认有无插入序列。另外用 StuI、SpeI 消化，确认插入的方向是 5' -启动子、插入序列、多 A 信号序列。

（实施例 16）REIC 表达重组腺病毒载体的制作

REIC 表达重组腺病毒载体按照 COS-TPC 法（Miyake, S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93, 1320, 1996）制作。

3 的 REIC cDNA 片段的全长进行标记的探针, 进行 Southern 杂交(42℃, 12 小时)。将膜浸入到含有 5 ×SSC、50% 甲酰胺、1 ×Denhardt 水溶液、0.2% SDS、20mM 磷酸钠、以及热变性的 100 μg/ml 的鲑精 DNA 的缓冲液中, 加入用放射性同位素标记的探针 DNA, 于 65℃ 下进行杂交。然后再用 55℃ 的 2 ×SSC/0.5%SDS 缓冲液洗膜, 然后再于 55℃ 的 0.1 ×SSC/0.5%SDS 缓冲液洗一次。于 X 光片上出现自动发射自显影的结果。结果可以确认在 HepG2、Hep3B 和 JHH-4 3 个癌细胞株中等位基因消失。在癌细胞中不仅 REIC 基因的表达低下, 而且有可能在 REIC 基因自身发生 LOH (图 12)。

(实施例 13) REIC 基因与细胞周期的相关性

为了确认 REIC 基因在细胞周期中表达量的变化, 进行了以下的实验。将 KMS-6 细胞接种到 10cm 培养皿中, 使每个培养皿中的细胞数为 2×10^6 个。将接种时的培养基中的血清浓度调整到 0.5%, 培养 72 小时, 使细胞周期处于 G0 期(休止期)。然后加血清使其浓度为 10%, 通过刺激细胞使细胞周期开始。回收于添加后的 0、0.5、1、3、6、12、24、48 小时的总 RNA 和通常培养条件下的总 RNA, 通过 Northern 杂交对 REIC 基因的表达量的变化进行解析。结果可以确认在添加血清后 12 小时 REIC 基因的表达最低, 然后 REIC 基因的表达再上升。作为对照对 GAPDH 基因的表达量的变化进行了解析, 结果可以确认表达量一定, 与细胞周期无关(图 13)。同时根据实施例 7-2 确认 ^3H 胸腺嘧啶脱氧核苷的掺入时, 在添加血清后 24 小时 ^3H 胸腺嘧啶脱氧核苷的掺入增加, 而后 ^3H 胸腺嘧啶脱氧核苷的掺入再减少(图 13B)。

根据以上结果可以认为 REIC 基因通过在细胞周期的 G0 期强烈表达, 而在停止细胞增殖的方向起作用, 另外通过其表达量减少在细胞周期向着 G1 期的方向起作用。

(实施例 14) 通过细胞增殖抑制剂诱导 REIC 基因的表达

将 JHH-1 细胞接种到 10cm 培养皿中, 使每个培养皿中的细胞数为 2×10^6 个。将作为上皮细胞增殖抑制剂的 TGF-β 添加到 JHH-1

使用磷酸钙法用实施例 15 制作的 pAxCAREIC (8 μ g) 和 EcoT22I 处理的 COS-TPC (图 18) (5 μ g) 转染 293 细胞。于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 12 小时后, 将细胞接种到 96 孔板中, 再继续培养 10~15 天。从细胞死亡的孔中回收包括死亡细胞在内的培养液, 冻融 6 次后, 将经 5,000rpm、5min 离心的上清作为一级病毒液保存在 -80 $^{\circ}$ C 下。用一次病毒液感染 293 细胞、HeLa 细胞, 3 天后在 HeLa 细胞没有看到变性, 从 293 细胞完全死亡的克隆的 293 细胞回收包括死亡细胞在内的培养液, 将冻融 6 次后的上清作为 2 级病毒液保存在 -80 $^{\circ}$ C 下。按照实施例 12 记载的方法从制备 2 级病毒液时的细胞制备染色体 DNA。该 DNA 经 XhoI、ClaI 消化后, 进行琼脂糖凝胶电泳, 确认腺病毒基因组以及 REIC 基因的有无。

用通过上述操作选择的克隆的 2 级病毒液感染 293 细胞, 细胞死亡后回收包括死亡细胞在内的培养液, 冻融 6 次后, 将经 3,000rpm、10min 离心的上清作为 3 级病毒液保存在 -80 $^{\circ}$ C 下。通过同样的操作进行扩大, 最终制备 4 级病毒液, 保存在 -80 $^{\circ}$ C 下 (Adeno-REIC)。(实施例 17) 确认有无野生型腺病毒混入

用实施例 16 得到的 4 级病毒液感染 HeLa 细胞, 3 天后按照实施例 12 记载的方法制备染色体 DNA。利用为了能够以制备的 DNA 作为模板扩增从 EIA 基因的起始密码到第 1 外显子的 3' 末端的序列而设计的引物组 (5' -ATGAGACATATTATCTGCCACGGAGGTGTTATTAC-3', 5' -CCTCTTCATCCTCGTCGTCACTGGGTGGAAAGCCA-3'), 进行 25 次 PCR 循环反应。PCR 后进行琼脂糖凝胶电泳, 确认有无 EIA 基因扩增片段 (214bp)。

(实施例 18) Adeno-REIC 的基因导入效率的确认

利用 ECID₅₀ 法 (50% Tissue Culture infectious Dose) 测定 Adeno-REIC 的效价。将实施例 16 制备的 Adeno-REIC 进行阶段稀释, 每次都稀释 10 倍, 制备 10⁴ 倍稀释病毒液。将 10⁴ 倍稀释病毒液加到 96 孔板的 1 列中, 稀释至 11 列, 稀释 3¹¹ 倍, 最终制备了从 10⁴ 稀释到 3¹¹ 的病毒液。12 列作为非感染细胞的对照。加入 293 细胞, 每孔

3×10^4 个细胞，于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下培养 11~13 天，判断有无细胞变性。利用 Karber 公式对进行统计学上的计算，结果可以确认上述 Adeno-REIC 的效价为 6.6×10^9 pfu/ml。

产业上利用的可能性

就象以上说明的那样，本发明有关基因和它编码的本发明相关蛋白质由于在包括癌细胞在内的无限增殖化细胞中表达低下，或者消失，所以成了这些以细胞增殖为起因的疾病诊断有效的标准参照物，所以可以作为癌症论断试剂等论断试剂。

另外本发明相关的蛋白质由于具有细胞增殖抑制活性，所以可用于癌症等细胞异常增殖为起因的疾病的治疗。

另外，本发明有关基因由于在细胞内表达具有细胞增殖抑制活性的上述蛋白质，所以在基因疗法中应用，用于癌症等细胞异常增殖为起因的疾病的治疗。

另外本发明的反义多核苷酸由于刺激细胞增殖，所以可用于需要细胞增殖的疾病的治疗中。

<110> Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc.

<120> **细胞增殖抑制蛋白质、多核苷酸、与多核苷酸对应的反义核苷酸，
以及细胞增殖抑制剂、癌症诊断试剂、癌症治疗剂和用于基因治
疗的组合物**

<130> FP00-0196-00

<150> JP 11-330604

<151> 1999-11-19

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 350

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Arg Leu Gly Ala Thr Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ala Ala Ala

1

5

10

15

Val Pro Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Ala Thr Ser Ala Pro Val

20

25

30

	260		265		270										
Cys	Gln	Pro	His	Ser	His	Ser	Leu	Val	Tyr	Val	Cys	Lys	Pro	Thr	Phe
	275		280		285										
Val	Gly	Ser	Arg	Asp	Gln	Asp	Gly	Glu	Ile	Leu	Leu	Pro	Arg	Glu	Val
	290		295		300										
Pro	Asp	Glu	Tyr	Glu	Val	Gly	Ser	Phe	Met	Glu	Glu	Val	Arg	Gln	Glu
	305		310		315										
Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Arg	Ser	Leu	Thr	Glu	Glu	Met	Ala	Leu	Gly	Glu
			325		330										335
Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Leu	Gly	Gly	Glu	Glu	Ile		
			340		345										350

<210> 2

<211> 1050

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

atgcagcggc ttggggccac cctgctgtgc ctgctgctgg cggcggcggt ccccacggcc 60
cccgcgcccg ctccgaaggc gacctcggct ccagtcaagc cggccccggc tctcagctac 120
ccgcaggagg aggccaccct caatgagatg ttccgcgagg ttgaggaact gatggaggac 180
acgcagcaca aattgcgcag cgcggtggaa gagatggagg cagaagaagc tgctgctaaa 240
gcatcatcag aagtgaacct ggcaaactta cctcccagct atcacaatga gaccaacaca 300
gacacgaagg ttggaataa taccatccat gtgcaccgag aaattcaca gataaccaac 360
aaccagactg gacaaatggt cttttcagag acagttatca catctgtggg agacgaagaa 420
ggcagaagga gccacgagtg catcatcgac gaggactgtg ggcccagcat gtactgccag 480
tttgccagct tccagtacac ctgccagcca tgccggggcc agaggatgct ctgcacccgg 540
gacagtgagt gctgtggaga ccagctgtgt gtctggggtc actgcaccaa aatggccacc 600

```

```

aggggcagca atgggacat ctgtgacaac cagagggact gccagccggg gctgtgctgt 660
gccttccaga gaggcctgct gttccctgtg tgcacacccc tgcccgtgga gggcgagctt 720
tgccatgacc ccgccagccg gcttctggac ctcatcacct gggagctaga gcctgatgga 780
gccttggacc gatgcccttg tgccagtggc ctctctgcc agccccacag ccacagcctg 840
gtgtatgtgt gcaagccgac cttcgtgggg agccgtgacc aagatgggga gatcctgctg 900
cccagagagg tccccgatga gtatgaagtt ggcagcttca tggaggaggt gcgccaggag 960
ctggaggacc tggagaggag cctgactgaa gagatggcgc tgggggagcc tgcggctgcc 1020
gccgctgcac tgctgggagg ggaagagatt                                     1050

```

<210> 3

<211> 2660

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

ggcggagagg gagcctgggtg ggccggcggg gcgcgtcttg cgggctcct cgggtaccgg 60
cgctgccgca ccccgccgcg ctcccgcacc cgcggcccgc ccaccgcgc gctcccgcac 120
ctgcaccgcg agcccggcgg cctcccggcg ggagcgagca gatccagtcc ggcccgcagc 180
gcaactcgggt ccagtcggggg cggcggtgc gggcgagag cggagatgca gcggcttggg 240
gccaccctgc tgtgcctgct gctggcggcg gcggtcccca cggccccgc gcccgctccg 300
acggcgacct cggctccagt caagcccgc ccggctctca gctaccgcga ggaggaggcc 360
accctcaatg agatgttccg cgaggttgag gaactgatgg aggacacgca gcacaaattg 420
cgcagcgcgg tggaagagat ggaggcagaa gaagctgctg ctaaagcatc atcagaagtg 480
aacctggcaa acttacctcc cagctatcac aatgagacca acacagacac gaaggttgga 540
aataatacca tccatgtgca ccgagaaatt cacaagataa ccaacaacca gactggacaa 600
atggtctttt cagagacagt tatecatct gtgggagacg aagaaggcag aaggagccac 660
gagtgcacatc tcgacgagga ctgtgggccc agcatgtact gccagtttgc cagcttccag 720
tacacctgcc agccatgccg gggccagagg atgctctgca cccgggacag tgagtgtgtg 780

```

ggagaccagc tgtgtgtctg gggtcactgc accaaaatgg ccaccagggg cagcaatggg 840
 accatctgtg acaaccagag ggactgccag ccggggctgt gctgtgcctt ccagagaggc 900
 ctgctgttcc ctgtgtgcac acccctgccc gtggagggcg agctttgcca tgaccccgcc 960
 agecggcttc tggacctcat cacctgggag ctagagcctg atggagcctt ggaccgatgc 1020
 ccttgtgcca gtggcctcct ctgccagccc cacagccaca gcctgggtga tgtgtgcaag 1080
 ccgaccttcg tggggagccg tgaccaagat ggggagatcc tgctgccag agaggtcccc 1140
 gatgagtatg aagttggcag cttcatggag gaggtgcgc aggagctgga ggacctggag 1200
 aggagcctga ctgaagagat ggcgctgggg gagcctgcgg ctgccgccgc tgactgctg 1260
 ggaggggaag agatttagat ctggaccagg ctgtgggtag atgtgcaata gaaatagcta 1320
 atttatttcc ccaggtgtgt gctttaggcg tgggctgacc aggcttcttc ctacatcttc 1380
 ttcccagtaa gtttccctc tggcttgaca gcatgaggtg ttgtgcattt gttcagctcc 1440
 cccaggtgtg tctccaggt tcacagtctg gtgcttggga gagtccaggca gggttaaact 1500
 gcaggagcag tttgccacc ctgtccagat tattggctgc tttgcctcta ccagttggca 1560
 gacagccgtt tgttctacat ggctttgata attgtttgag gggaggagat ggaacaatg 1620
 tggagtctcc ctctgattg ttttggggaa atgtggagaa gagtgccttg ctttgcaaac 1680
 atcaacctgg caaaaatgca acaaatgaat tttccacgca gttctttcca tgggcatagg 1740
 taagctgtgc cttcagctgt tgcagatgaa atgttctgtt caccctgeat tacatgtgtt 1800
 tattcatcca gcagtgttc tcagctccta cctctgtgcc agggcagcat tttcatatcc 1860
 aagatcaatt ccctctctca gcacagcctg gggaggggggt cattgttctc ctctccatc 1920
 aggatctca gaggtcaga gactgcaagc tgcttgccca agtcacacag ctagtgaaga 1980
 ccagagcagt ttcactgtgt tgtgactcta agctcagtg cctctccact accccacacc 2040
 agccttgggtg ccaccaaag tgctcccaa aaggaaggag aatgggattt ttcttttgag 2100
 gcatgcatat ctggaattaa ggtcaaaacta attctcatat cctctataaa gtaaactact 2160
 gttaggaaca gcagtgttct cacagtgtgg ggcagccgct cttctaatga agacaatgat 2220
 attgacctg tccctcttg gcagttgcat tagtaacttt gaaaggtata tgactgagcg 2280
 tagcatacag gttaacctgc agaaacagta cttaggtaat tgtagggcga ggattataaa 2340
 tgaatttgc aaaatcactt agcagcaact gaagacaatt atcaaccacg tggagaaaat 2400
 caaacgagc agggctgtgt gaaacatggt tgtaatatgc gactgcgaac actgaactct 2460
 acgccactcc acaaatgatg ttttcaggtg tcatggactg ttgccaccat gtattcatcc 2520

```

atggggagat cctgctgccc agagaggtcc ccgatgagta tgaagttggc agcttcatgg 1140
aggaggtgcg ccaggagctg gaggacctgg agaggagcct gactgaagag atggcgctgg 1200
gggagcctgc ggctgcccgc gctgcactgc tgggagggga agagatttag atctggacca 1260
ggctgtgggt agatgtgcaa tagaaatagc taatttattt ccccaggtgt gtgcttttagg 1320
cgtgggctga ccaggcttct tectacatct tcttcccagt aagtttcccc tctggcttga 1380
cagcatgagg tgttgtgcat ttgttcagct ccccaggct gttctccagg cttcacagtc 1440
tggtgcttgg gagagtcagg cagggttaa ctgcaggagc agtttgccac ccctgtccag 1500
attattggct gctttgcctc taccagttgg cagacagccg tttgttctac atggctttga 1560
taattgtttg aggggaggag atggaaacaa tgtggagtct ccctctgatt ggttttgggg 1620
aaatgtggag aagagtgcc ccagctttgcaa acatcaacct ggcaaaaatg caacaaatga 1680
atthttccacg cagttctttc catgggcata ggtaagctgt gccttcagct gttgcagatg 1740
aaatgttctg ttcaccctgc attacatgtg tttattcatc cagcagtggt gctcagctcc 1800
tacctctgtg ccagggcagc atthttcatat ccaagatcaa ttccctctct cagcacagcc 1860
tggggagggg gtcattgttc tctctgtcca tcagggatct cagaggctca gagactgcaa 1920
gctgcttgcc caagtcacac agctagttaa gaccagagca gtttcatctg gttgtgactc 1980
taagctcagt gctctctcca ctaccccaca ccagccttgg tgccaccaa agtgctcccc 2040
aaaaggaagg agaatgggat ttttcttttg aggcattgac atctggaatt aaggtcaaac 2100
taattctcac atccctctaa aagtaacta ctgttaggaa cagcagtggt ctcacagtggt 2160
ggggcagccg tccttctaata gaagacaatg atattgacac tgtccctctt tggcagttgc 2220
attagtaact ttgaaaggta tatgactgag cgtagcatac aggttaacct gcagaaacag 2280
tacttaggta attgttagggc gaggattata aatgaaattt gcaaaatcac ttagcagcaa 2340
ctgaagacaa ttatcaacca cgtggagaaa atcaaaccga gcagggtgt gtgaaacatg 2400
gttgtaatat gcgactgcga aactgaact ctacgccact ccacaaatga tgttttcagg 2460
tgtcatggac tgttgccacc atgtattcat ccagagttct taaagtttaa agttgcacat 2520
gattgtataa gcatgctttc tttgagtttt aaattatgta taaacataag ttgcatttag 2580
aaatcaagca taaatcactt caactgctaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2632

```

<210> 5

<211> 266

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

```
cattttcata tccaagatca attccctctc tcagcacagc ctggggaggg ggtcattggt 60
ctcctcgtcc atcagggatc tcagaggctc agagactgca agctgcttgc ccaagtcaca 120
cagctagtga agaccagagc agtttcatct ggttgtgact ctaagctcag tgctctctcc 180
actaccccaac accagccttg gtgccaccaa aagtgctccc caaaaggaag gagaatggga 240
tttttctttt gaggcattgca catctg                                     266
```

agagttetta aagtttaaag ttgcacatga ttgtataagc atgctttctt tgagttttaa 2580
 attatgtata aacataagtt gcatttagaa atcaagcata aatcacttca actgctaaaa 2640
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2660

<210> 4

<211> 2632

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gaggtagggg ctgagagagg cttgaggtgg aagtgggggt cgggcactct gacctggtcg 60
 aggaggggct agggtttgaa ccggggacag agtctagggt agctggggct gggagctatt 120
 agcgtagagg atccgggttc ggttgctctg gcgagggtc cagcatcaca ggcggcggct 180
 gcgggcgcag agcggagatg cagcggcttg gggccaccct gctgtgcctg ctgctggcgg 240
 cggcgggtccc cacggccccc gcgcccgtc cgacggcgac ctcggtcca gtcaagcccg 300
 gcccggtctc cagctaccgg caggaggagg ccaccctcaa tgagatgttc cgcgaggttg 360
 aggaactgat ggaggacacg cagcacaat tgcgcagcgc ggtggaagag atggaggcag 420
 aagaagctgc tgctaaagca tcatcagaag tgaacctggc aaacttacct cccagctatc 480
 acaatgagac caacacagac acgaaggttg gaaataatac catccatgtg caccgagaaa 540
 ttcacaagat aaccaacaac cagactggac aatgggtctt ttcagagaca gttatcacat 600
 ctgtgggaga cgaagaaggc agaaggagcc acgagtgcac catcgacgag gactgtgggc 660
 ccagcatgta ctgccagttt gccagcttcc agtacacctg ccagccatgc cggggccaga 720
 ggatgctctg caccggggac agtgagtgtc gtggagacca gctgtgtgtc tggggtcact 780
 gcacaaaaat ggccaccagg ggcagcaatg ggaccatctg tgacaaccag aggactgcc 840
 agccggggct gtgctgtgcc ttccagagag gcctgctgtt ccctgtgtgc acaccctgc 900
 ccgtggaggg cgagctttgc catgaccccg ccagccggtt tctggacctc atcacctggg 960
 agctagagcc tgatggagcc ttggaccgat gcccttgtgc cagtggctc ctctgccagc 1020
 cccacagcca cagcctggtg tatgtgtgca agccgacctt cgtggggagc cgtgaccaag 1080

图 1

REIC	1	MQRLGATLLC	LLLAAAVPTA	PAPAPTATSA	PVKPGPALS	PQEEATLNEM
hDkk3	1	-----	-----	-----	-----	-----
RIG7-1						
REIC	51	FREVEELMED	TQHKLRSAVE	EMEAEAAAK	ASSEVNLANL	PPSYHNETNT
hDkk3	51	-----	-----	-----	-----	-----
RIG7-1						
REIC	101	DTKVGNNTIH	VHREIHKITN	NQTGQMVFSE	TVITSVGDEE	GRRSHECIID
hDkk3	101	-----	-----	-----	-----	-----
RIG7-1						
REIC	151	EDCGPSMYCQ	FASFQYTCQP	CRGQRMCLTR	DSECCGDQLC	VWGHCTKMAT
hDkk3	151	-----	-----	-----	-----	-----
RIG7-1	1	-----	-----	-----	-----	-----
REIC	201	RGSNGTICDN	QRDCQPGLCC	AFQRGLLFPV	CTPLPVEGEL	CHDPASRLLD
hDkk3	201	-----	-----	-----	-----	-----
RIG7-1	45	-----	-----	-----	-----	-----
REIC	251	LITWELEPDG	ALDRPCASG	LLCQPHSHSL	VYVCKPTFVG	SRDQDGEILL
hDkk3	251	-----	-----	-----	-----	-----
RIG7-1	95	-----	-----	-----	-----	-----
REIC	301	PREVPDEYEV	GSPMEEVRQE	LEDLERSLTE	EMALGEPAAA	AAALLGGEI
hDkk3	301	-----	-----	-----	-----	-----
RIG7-1	145	-----KL	AASWRRCAR	SWRTWRGA		

图 2

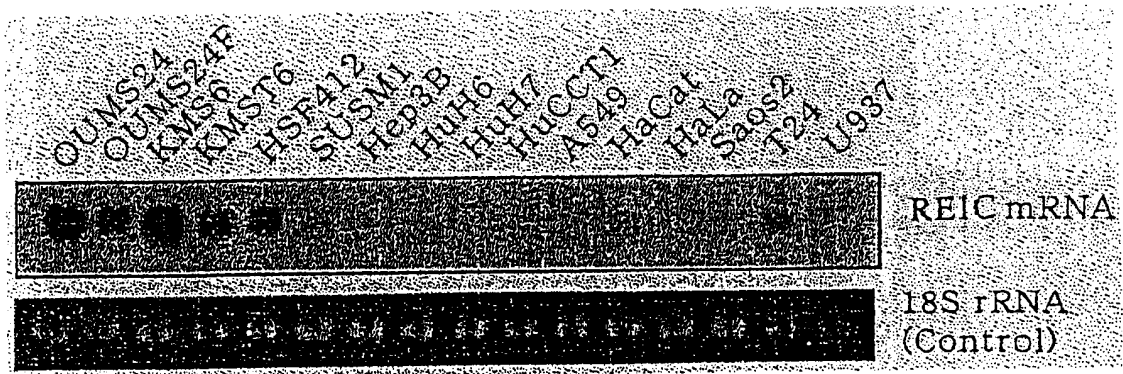


图 3

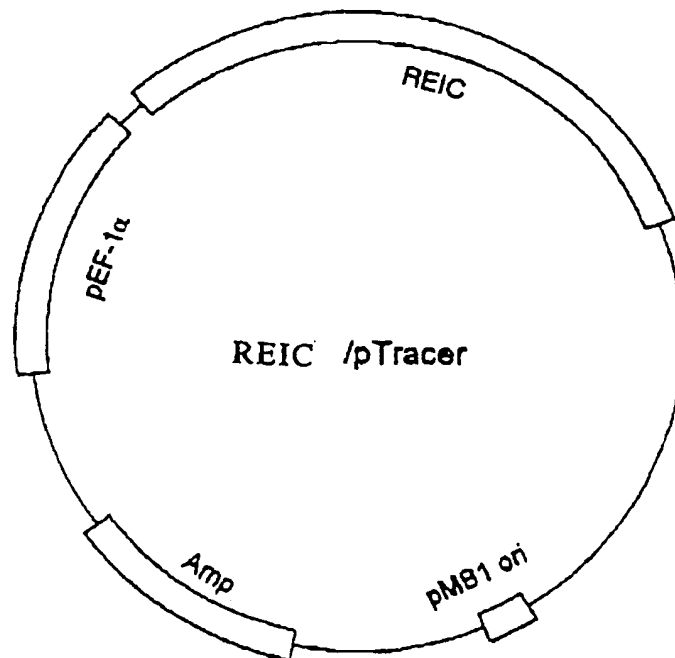


图 4

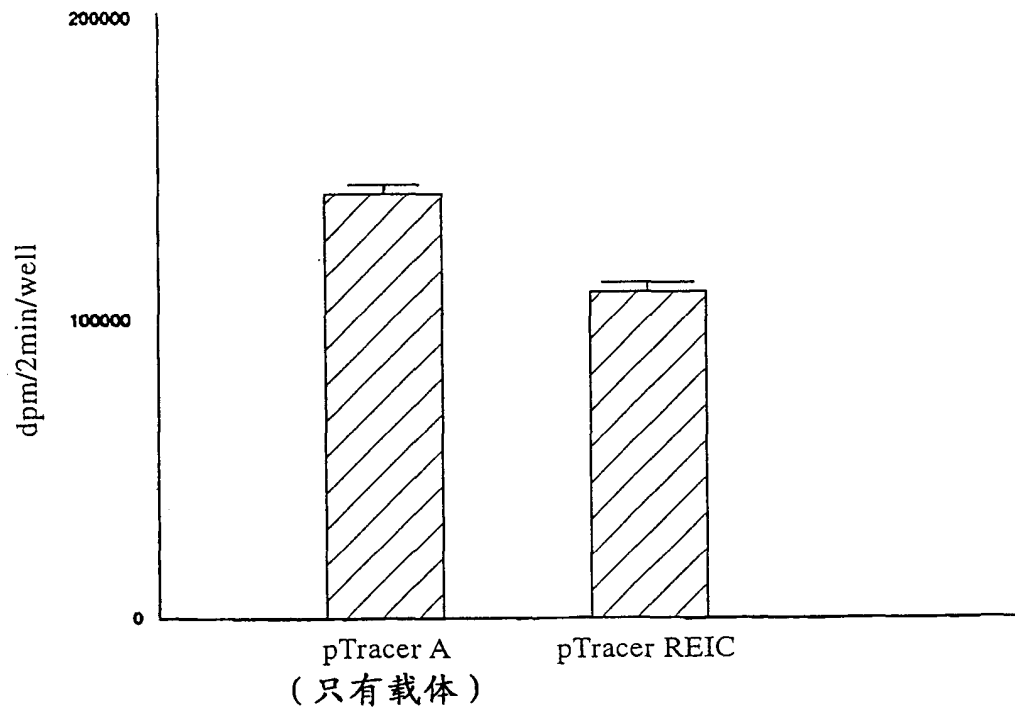


图 5

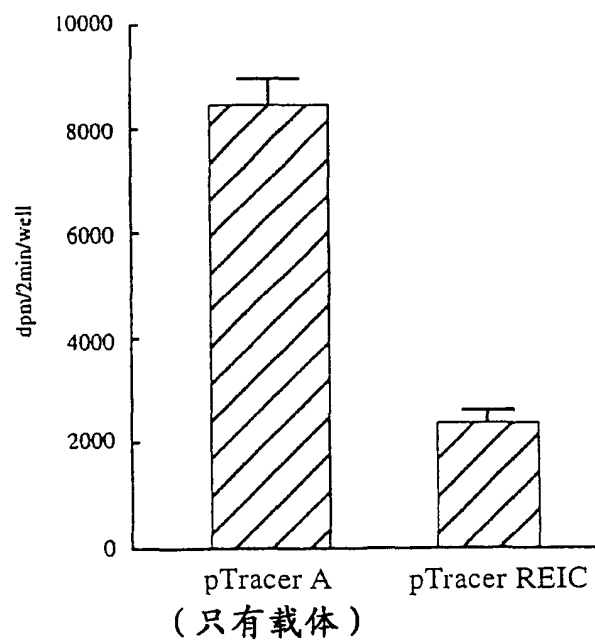


图 6

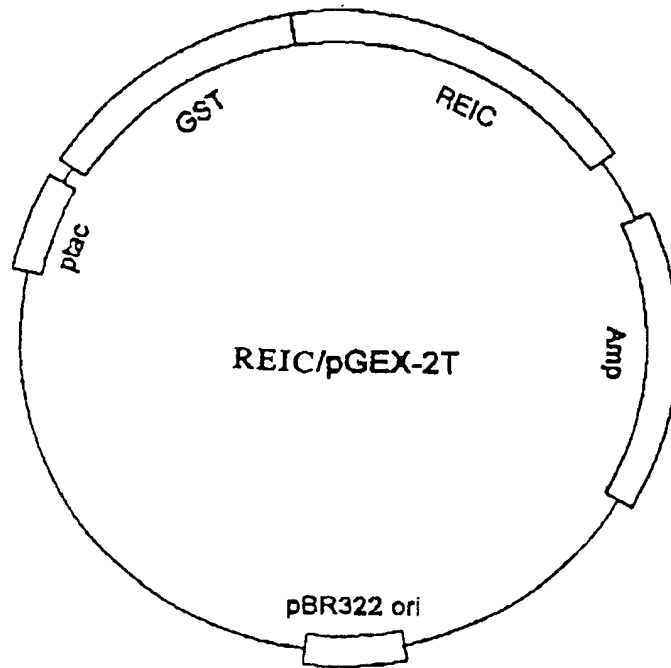


图 7

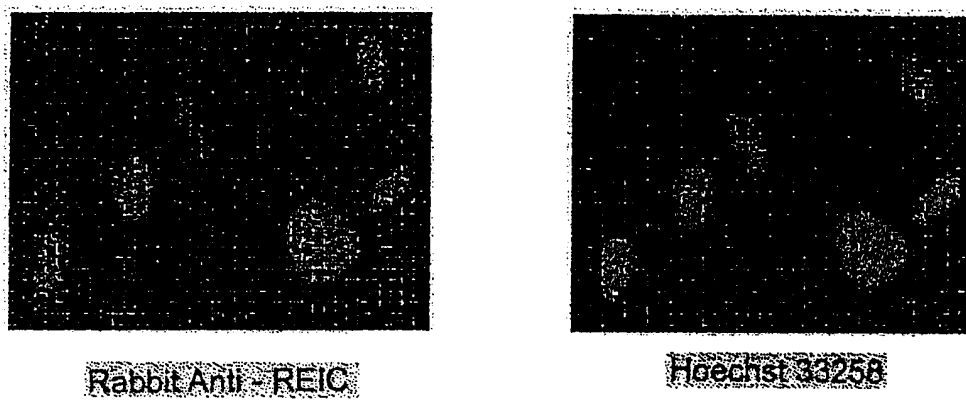


图 9

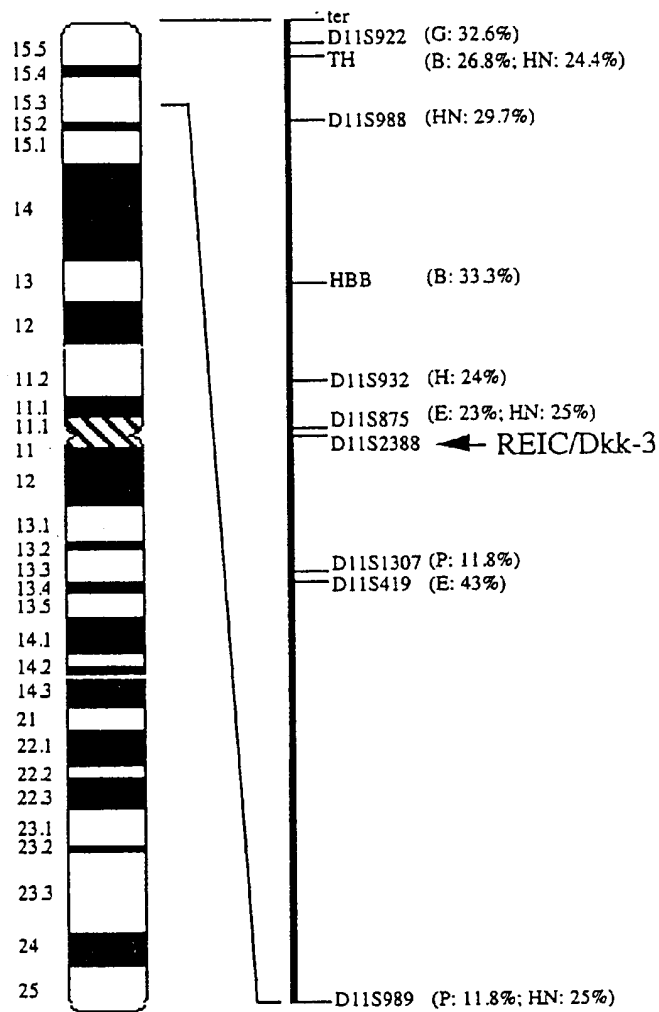


图 8

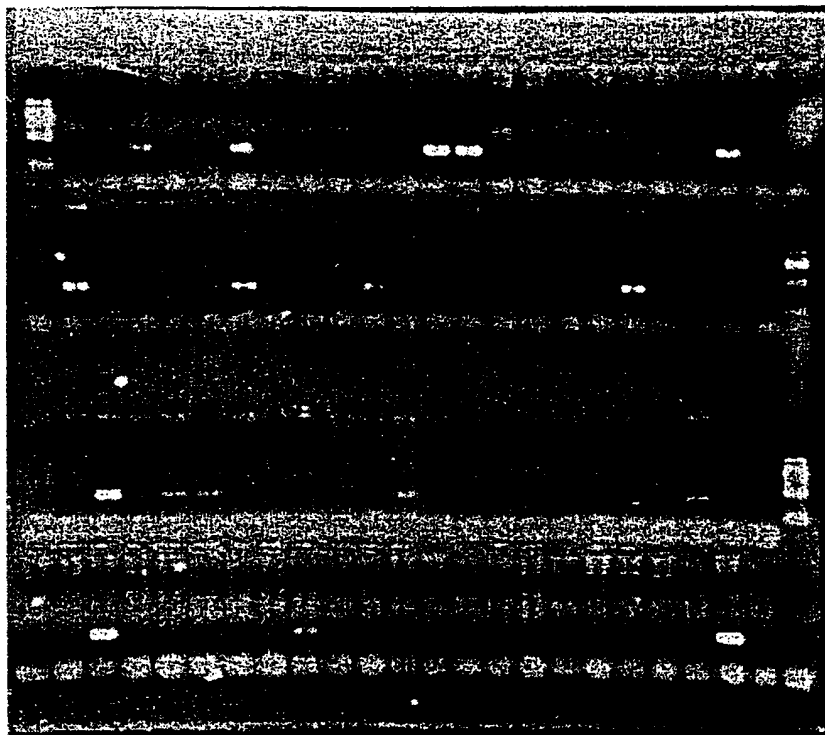


图 10

```

REIC cDNA : 2406  aatatgcgactgcgaacactgaactctacgccactccacaaaatgatgttttcagggtgtca 2465
D11S2388 : 203  aatatgcgactgcgaacactgaactctacgccactccacaaaatgatgttttcagggtgtca 144

REIC cDNA : 2466  tggactgttggcaccatgtattcatccagagttcttaaaagtttaaaagttgcacatgattg 2525
D11S2388 : 143  tggactgttggcaccatgtattcatccagagttcttaaaagtttaaaagttgcacatgattg 84

REIC cDNA : 2526  tataagcatgctttctttgagttttaaattatgtataaaacataaagttgcatttagaaatc 2585
D11S2388 : 83  tataagcatgctttctttgagttttaaattatgtataaaacataaagttgcatttagaaatc 24

REIC cDNA : 2586  aagcataaaatcacttcaactgct 2608
D11S2388 : 23  aagcataaaatcacttcaactgct 1

```

图 11A

非小细胞肺癌

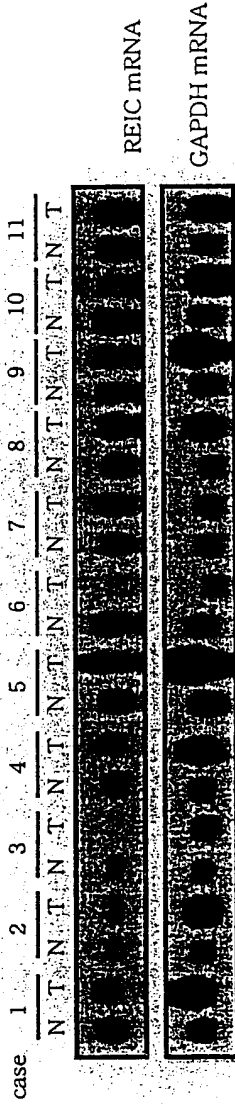


图 11B

肝细胞癌

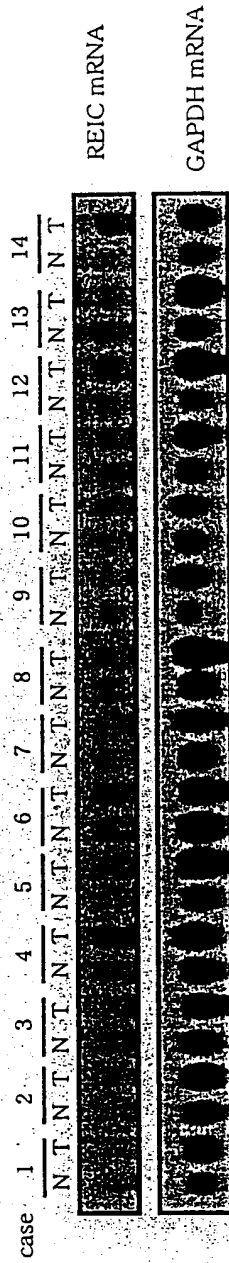


图 11C

食管癌

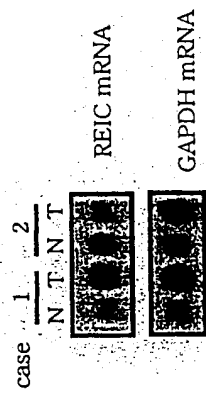


图 11D

胃癌

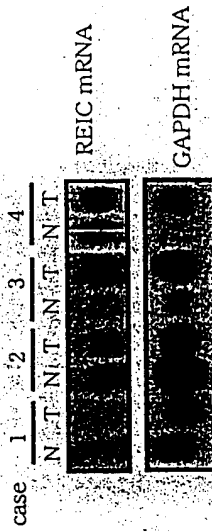


图 11E

结肠癌

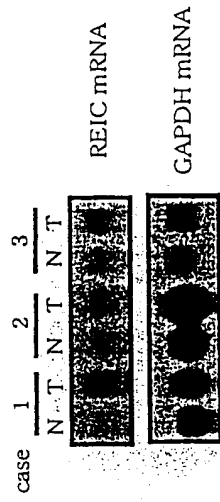


图 12

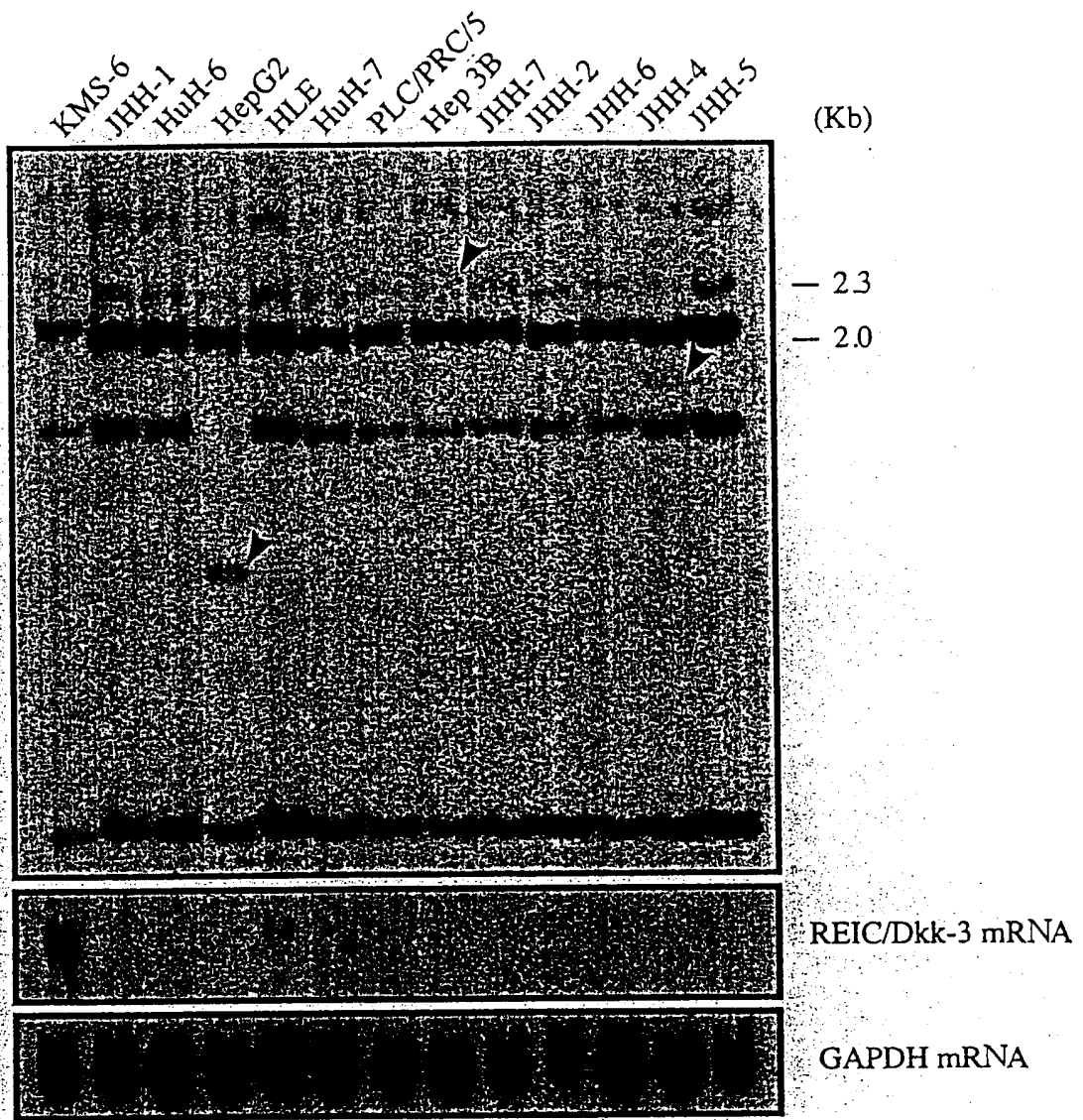


图 13A

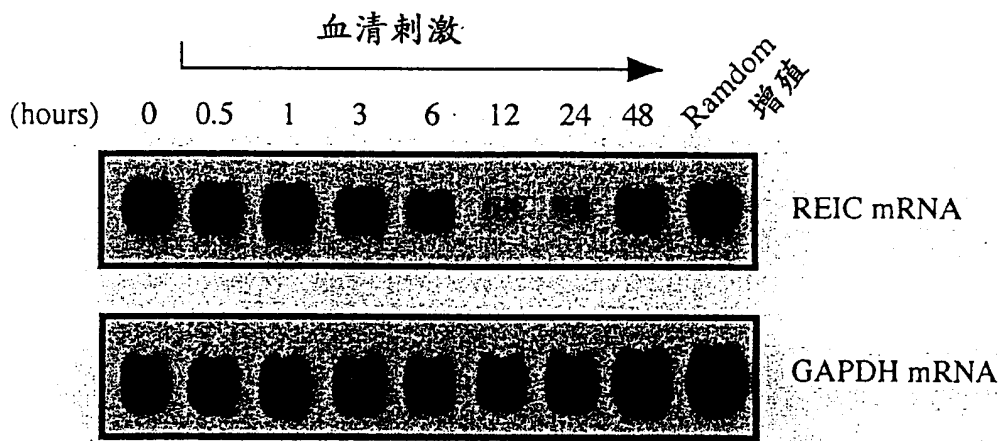


图 13B

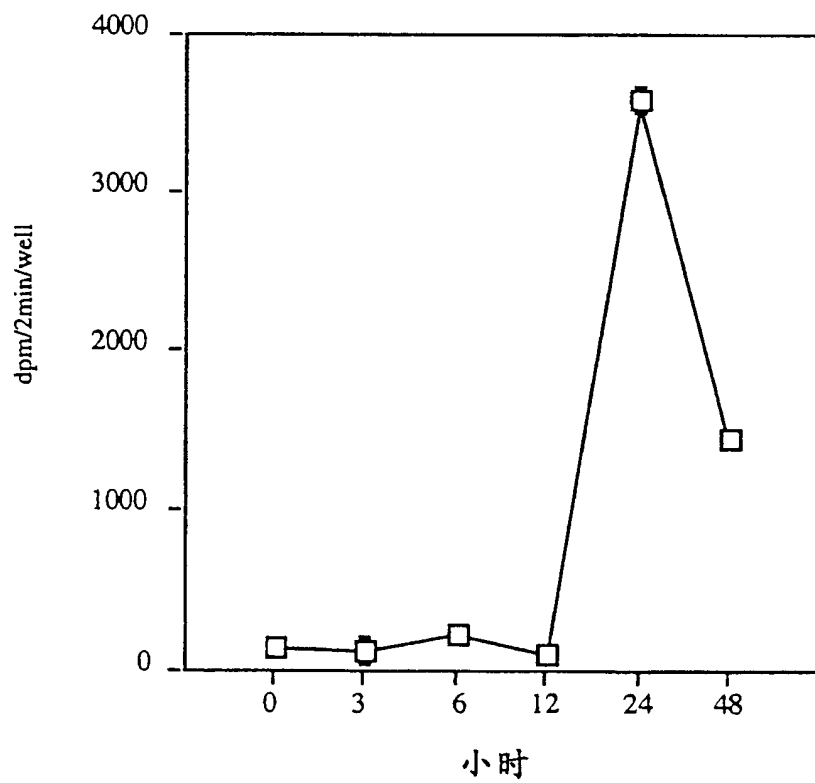


图 14

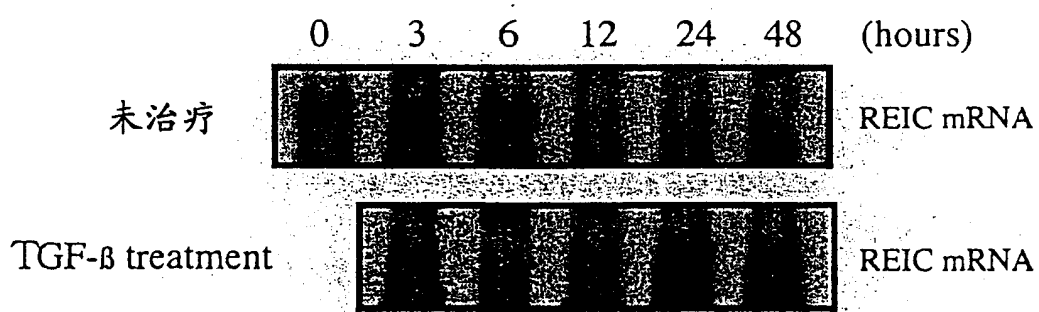


图 15

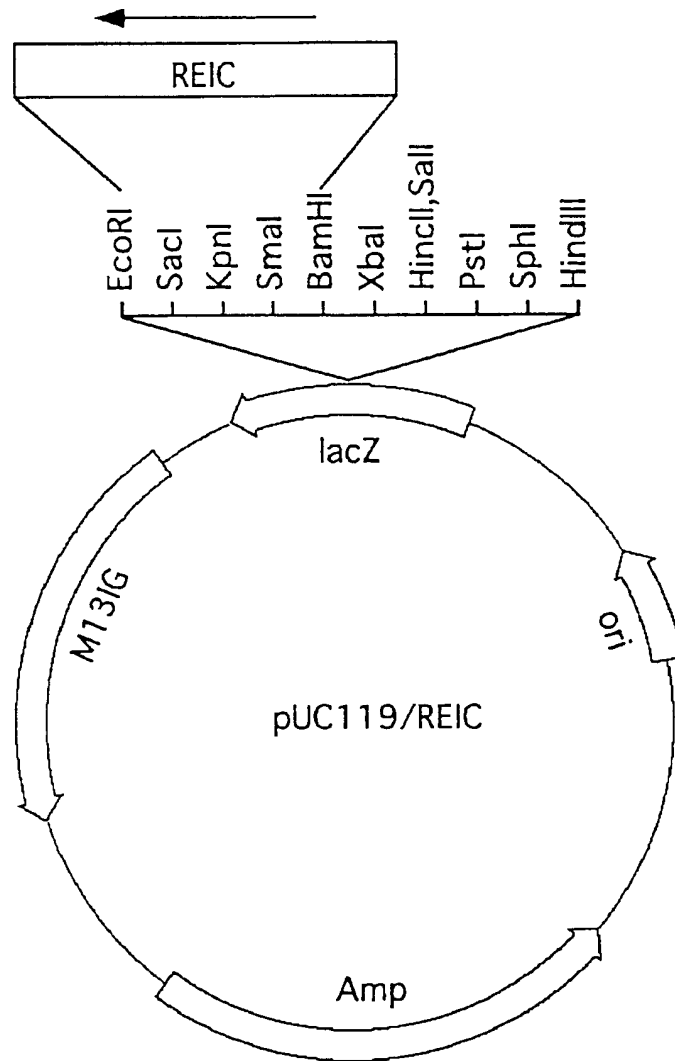


图 18

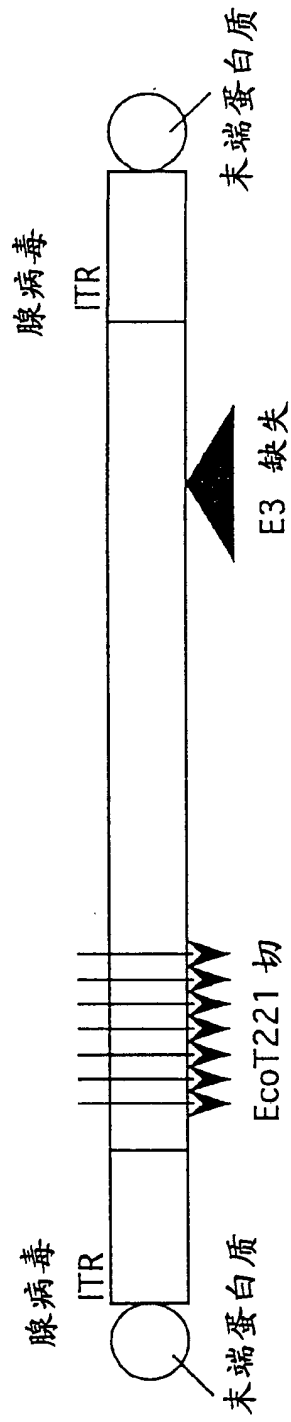


图 17

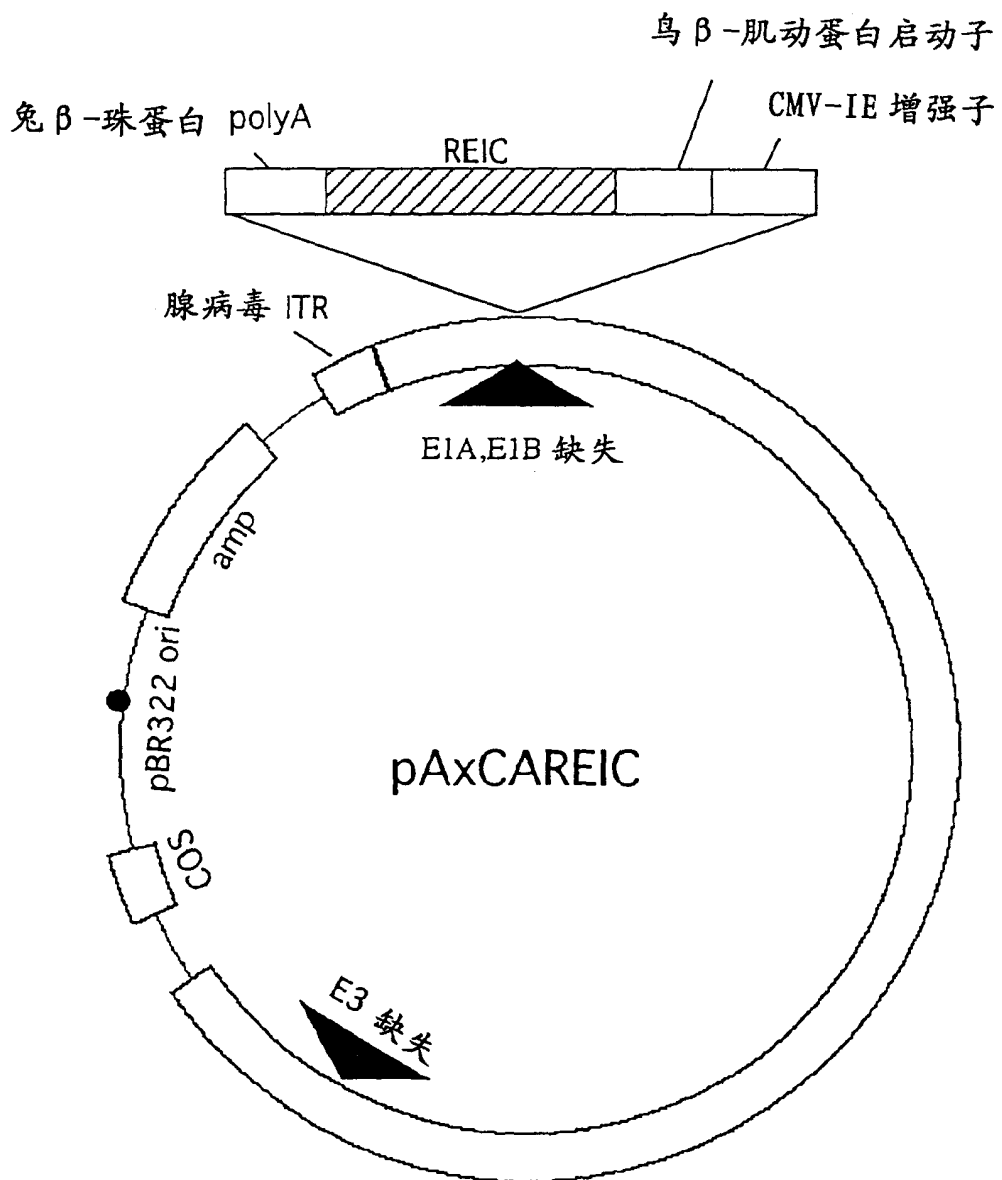


图 16

