(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-530234
(P2023-530234A)
(43)公表日　令和5年7月14日(2023.7.14)

(51)国際特許分類			FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*45/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	４Ｃ０８６
Ａ６１Ｐ	*13/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/10	
Ａ６１Ｐ	*1/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/16	
Ａ６１Ｐ	*7/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/00	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全162頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-575192(P2022-575192)
(86)(22)出願日　令和3年6月4日(2021.6.4)
(85)翻訳文提出日　令和5年1月25日(2023.1.25)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/035976
(87)国際公開番号　WO2021/248052
(87)国際公開日　令和3年12月9日(2021.12.9)
(31)優先権主張番号　63/035,454
(32)優先日　令和2年6月5日(2020.6.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/041,229
(32)優先日　令和2年6月19日(2020.6.19)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　515236259
ザ・ブロード・インスティテュート・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１４２・ケンブリッジ・メイン・ストリート・４１５
(71)出願人　399052796
デイナ ファーバー キャンサー インスティチュート，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２２１５， ボストン，ブルックライン アベニュー ４５０
(71)出願人　522472718
アギーレ アンドリュー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　新生物を治療するための組成物および方法

(57)【要約】
本開示は、新生物の治療に有用な組成物および方法に関する。具体的には、新生物細胞（例えば、横紋筋肉腫）の細胞死を誘導するかまたは細胞生存を低下させるための方法、および、VPS4発現の喪失を特徴とする新生物を有する対象を治療する方法が開示される。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
VPS4B発現の喪失を特徴とする横紋筋肉腫細胞の細胞死を誘導するか、または細胞生存を低下させるための方法であって、前記細胞を、VPS4Aの発現または活性を阻害する作用物質と接触させる工程を含み、それにより、前記横紋筋肉腫細胞の細胞死を誘導するか、または細胞生存を低下させる、方法
【請求項２】
VPS4A発現の喪失を特徴とする横紋筋肉腫細胞の細胞死を誘導するか、または細胞生存を低下させるための方法であって、前記細胞を、VPS4Bの発現または活性を阻害する作用物質と接触させる工程を含み、それにより、前記横紋筋肉腫細胞の細胞死を誘導するか、または細胞生存を低下させる、方法。
【請求項３】
前記細胞を、ULK3、CHMP1A、CHMP1B、VTA1、および/またはIST1の発現または活性を阻害する作用物質と接触させる工程をさらに含む、請求項1または請求項2記載の方法。
【請求項４】
VPS4A発現の喪失を特徴とする新生物細胞の細胞死を誘導するか、または細胞生存を低下させるための方法であって、前記細胞を、ULK3、CHMP1A、CHMP1B、VTA1、および/またはIST1の発現または活性を阻害する作用物質と接触させる工程を含み、それにより、前記新生物細胞の細胞死を誘導もしくは促進するか、または細胞生存を低下させる、方法。
【請求項５】
前記細胞を、VPS4Bの発現または活性を阻害する作用物質と接触させる工程をさらに含む、請求項4記載の方法。
【請求項６】
VPS4B発現の喪失を特徴とする新生物細胞の細胞死を誘導するか、または細胞生存を低下させるための方法であって、前記細胞を、ULK3、CHMP1A、CHMP1B、VTA1、および/またはIST1の発現または活性を阻害する作用物質と接触させる工程を含み、それにより、前記新生物細胞の細胞死を誘導もしくは促進するか、または細胞生存を低下させる、方法。
【請求項７】
前記細胞を、VPS4Aの発現または活性を阻害する作用物質と接触させる工程をさらに含む、請求項6記載の方法。
【請求項８】
前記新生物細胞が、脳、膀胱、胆汁、血液、乳房、管、結腸、結腸直腸、食道、胃、胚細胞、肝臓、卵巣、膵臓、子宮、または肺のがん細胞である、請求項4～7のいずれか一項記載の方法。
【請求項９】
前記新生物細胞が膵臓癌細胞である、請求項8記載の方法。
【請求項１０】
前記新生物細胞が腎細胞癌または膵管腺癌である、請求項4～7のいずれか一項記載の方法。
【請求項１１】
前記新生物細胞が肉腫細胞である、請求項4～7のいずれか一項記載の方法。
【請求項１２】
前記肉腫が骨肉腫細胞または横紋筋肉腫細胞である、請求項11記載の方法。
【請求項１３】
前記肉腫が小児横紋筋肉腫細胞である、請求項12記載の方法。
【請求項１４】
前記横紋筋肉腫細胞または新生物細胞が、SMAD4またはCDH1の喪失をさらに特徴と

する、請求項1～13のいずれか一項記載の方法。
【請求項１５】
前記新生物細胞が、検出可能なレベルのSMAD4またはCDH1のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの発現を欠く、請求項14記載の方法。
【請求項１６】
前記細胞をインターフェロンと接触させる工程をさらに含む、請求項1～15のいずれか一項記載の方法。
【請求項１７】
前記インターフェロンがインターフェロン-βである、請求項16記載の方法。
【請求項１８】
前記作用物質が、小分子化合物、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドを含む、請求項1～17のいずれか一項記載の方法。
【請求項１９】
前記作用物質が、SU6668および/またはMSC1094308を含む、請求項18記載の方法。
【請求項２０】
前記ポリヌクレオチドが阻害性核酸分子である、請求項18記載の方法。
【請求項２１】
前記阻害性核酸分子が、siRNA、shRNA、miRNA、リボザイムまたはアンチセンスRNAである、請求項20記載の方法。
【請求項２２】
前記阻害性核酸分子が、shRNAであり、かつ、5'から3'に、
GCAAGAAGCCAGUCAAAGAGA,
CGAGAAGCUGAAGGAUUAUUU, およびGCCGAGAAGCUGAAGGAUUAU

の3つの配列; 5'および/または3'末端の1、2、3、4または5つのヌクレオチドが切断された前記3つの配列のいずれか; ならびに1、2、3、4または5つの核酸塩基置換を含む前記3つの配列のいずれかのバリアントから選択される配列を含む、請求項21記載の方法。
【請求項２３】
前記作用物質が、ゲノム編集システムまたはCRISPR干渉システムを含む、請求項1～17のいずれか一項記載の方法。
【請求項２４】
前記ゲノム編集システムが、シングルガイドRNA（sgRNA）を含むCRISPR-spCas9システムである、請求項23記載の方法。
【請求項２５】
前記sgRNAが、VPS4Aを標的とし、かつ、5'から3'に、
ACUCACACUUGAUAGCGUGG,
GGGCCGCACGAAGUACCUGG, AUUGUUAUUCCCCACCCCUG, および
CCACUUAGAAACAAGAUCAG

の4つの配列; 5'および/または3'末端の1、2、3、4または5つのヌクレオチドが切断された前記4つの配列のいずれか; ならびに1、2、3、4または5つの核酸塩基置換を含む前記4つの配列のいずれかのバリアントから選択される配列を含む、請求項24記載の方法。
【請求項２６】
前記横紋筋肉腫細胞または新生物細胞が哺乳動物細胞である、請求項1～25のいずれか一項記載の方法。
【請求項２７】
前記哺乳動物細胞がヒト細胞である、請求項26記載の方法。
【請求項２８】

前記横紋筋肉腫細胞または新生物細胞が対象内にある、請求項1～27のいずれか一項記載の方法。
【請求項２９】
前記対象が動物である、請求項28記載の方法。
【請求項３０】
前記動物が哺乳動物である、請求項29記載の方法。
【請求項３１】
前記哺乳動物がヒトである、請求項30記載の方法。
【請求項３２】
VPS4A発現の喪失を特徴とする新生物を有する対象を治療するための方法であって、ULK3、CHMP1A、CHMP1B、VTA1またはIST1の発現または活性を阻害する作用物質を前記対象に投与する工程を含み、それにより、前記新生物の細胞死を誘導もしくは促進するか、または前記新生物の細胞生存を低下させる、方法。
【請求項３３】
VPS4Bの発現または活性を阻害する作用物質を投与する工程をさらに含む、請求項33記載の方法。
【請求項３４】
VPS4B発現の喪失を特徴とする新生物を有する対象を治療するための方法であって、前記細胞を、ULK3、CHMP1A、CHMP1B、VTA1およびIST1の発現または活性を阻害する作用物質と接触させる工程を含み、それにより、前記新生物の細胞死を誘導もしくは促進するか、または前記新生物の細胞生存を低下させる、方法。
【請求項３５】
VPS4Aの発現または活性を阻害する作用物質を投与する工程をさらに含む、請求項34記載の方法。
【請求項３６】
前記新生物が、脳、膀胱、胆汁、血液、乳房、管、結腸、結腸直腸、食道、胃、胚細胞、肝臓、卵巣、膵臓、子宮、または肺のがんである、請求項32～35のいずれか一項記載の方法。
【請求項３７】
前記がんが膵臓癌である、請求項36記載の方法。
【請求項３８】
前記新生物が腎癌または膵管腺癌である、請求項32～35のいずれか一項記載の方法。
【請求項３９】
前記新生物が肉腫である、請求項32～35のいずれか一項記載の方法。
【請求項４０】
前記肉腫が骨肉腫または横紋筋肉腫である、請求項39記載の方法。
【請求項４１】
前記肉腫が小児横紋筋肉腫である、請求項40記載の方法。
【請求項４２】
前記新生物が、SMAD4またはCDH1の喪失をさらに特徴とする、請求項32～35のいずれか一項記載の方法。
【請求項４３】
前記新生物が、検出可能なレベルのSMAD4またはCDH1のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの発現を欠く、請求項42記載の方法。
【請求項４４】
インターフェロンを投与する工程をさらに含む、請求項32～43のいずれか一項記載の方法。
【請求項４５】
前記インターフェロンがインターフェロン-βである、請求項44記載の方法。
【請求項４６】

前記作用物質が、小分子化合物、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドを含む、請求項32～45のいずれか一項記載の方法。
【請求項４７】
前記作用物質が、SU6668および/またはMSC1094308を含む、請求項46記載の方法。
【請求項４８】
前記ポリヌクレオチドが阻害性核酸分子である、請求項46記載の方法。
【請求項４９】
前記阻害性核酸分子が、siRNA、shRNA、miRNA、リボザイムまたはアンチセンスRNAである、請求項48記載の方法。
【請求項５０】
前記阻害性核酸分子が、shRNAであり、かつ、5'から3'に、
GCAAGAAGCCAGUCAAAGAGA,
CGAGAAGCUGAAGGAUUAUUU, およびGCCGAGAAGCUGAAGGAUUAU

の3つの配列; 5'および/または3'末端の1、2、3、4または5つのヌクレオチドが切断された前記3つの配列のいずれか; ならびに1、2、3、4または5つの核酸塩基置換を含む前記3つの配列のいずれかのバリアントから選択される配列を含む、請求項49記載の方法。
【請求項５１】
前記作用物質が、ゲノム編集システムまたはCRISPR干渉システムを含む、請求項32～50のいずれか一項記載の方法。
【請求項５２】
RNA誘導型ヌクレアーゼにより媒介されるゲノム編集システムが、シングルガイドRNA（sgRNA）を含むCRISPR-spCas9システムである、請求項51記載の方法。
【請求項５３】
前記sgRNAが、VPS4Aを標的とし、かつ、5'から3'に、
ACUCACACUUGAUAGCGUGG,
GGGCCGCACGAAGUACCUGG, AUUGUUAUUCCCCACCCCUG, およびCCACUUAGAAACAAGAUCAG

の4つの配列; 5'および/または3'末端の1、2、3、4または5つのヌクレオチドが切断された前記4つの配列のいずれか; ならびに1、2、3、4または5つの核酸塩基置換を含む前記4つの配列のいずれかのバリアントから選択される配列を含む、請求項52記載の方法。
【請求項５４】
前記対象が動物である、請求項32～53のいずれか一項記載の方法。
【請求項５５】
前記動物が哺乳動物である、請求項54記載の方法。
【請求項５６】
前記哺乳動物がヒトである、請求項55記載の方法。
【請求項５７】
VPS4A発現の喪失を特徴とするがんを有する選択された対象を治療するための方法であって、VPS4B、ULK3、CHMP1A、CHMP1B、VTA1、および/またはIST1の発現を阻害する作用物質を投与する工程を含み、前記がんがVPS4A依存性を有すると判定された場合に前記対象が選択され、多変量モデルを使用して依存性が判定され、VPS4Bマーカーのレベルならびにに CHMP4B、ITCH、およびISG15マーカーのうちの少なくとも1つのレベルが前記モデルへの入力として使用され、それにより、前記対象を治療する、方法。
【請求項５８】
前記VPS4B、CHMP4B、およびITCHマーカーレベルが、前記モデルへの入力として

使用される、請求項57記載の方法。
【請求項５９】
前記VPS4B、CHMP4B、ITCH、およびISG15マーカーレベルが、前記モデルへの入力として使用される、請求項57または請求項58記載の方法。
【請求項６０】
前記マーカーが、ポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドである、請求項57～59のいずれか一項記載の方法。
【請求項６１】
前記ポリヌクレオチドがmRNA分子である、請求項60記載の方法。
【請求項６２】
前記対象に由来する生物学的試料における前記マーカーのレベルを検出する工程を含む、請求項57～61のいずれか一項記載の方法。
【請求項６３】
前記生物学的試料が、流体試料または組織試料である、請求項62記載の方法。
【請求項６４】
前記流体試料が、血液、脳脊髄液、痰、唾液、糞便、または尿試料である、請求項63記載の方法。
【請求項６５】
前記組織試料が生検試料である、請求項63記載の方法。
【請求項６６】
前記多変量モデルが線形モデルである、請求項57～61のいずれか一項記載の方法。
【請求項６７】
前記多変量モデルが、前記VPS4B、CHMP4B、ITCH、およびISG15マーカーのうちのいずれか1つを入力として使用する単変量モデルと比較して、がんのVPS4A依存性を予測するための改善された能力を有する、請求項57～66のいずれか一項記載の方法。
【請求項６８】
VPS4Aの発現または活性を阻害する作用物質を投与する工程をさらに含む、請求項57～67のいずれか一項記載の方法。
【請求項６９】
前記がんが、脳、膀胱、胆汁、血液、乳房、管、結腸、結腸直腸、食道、胃、胚細胞、肝臓、卵巣、膵臓、子宮、または肺のがんである、請求項57～68のいずれか一項記載の方法。
【請求項７０】
前記がんが膵臓癌である、請求項69記載の方法。
【請求項７１】
前記がんが腎癌または膵管腺癌である、請求項57～70のいずれか一項記載の方法。
【請求項７２】
前記がんが肉腫である、請求項57～71のいずれか一項記載の方法。
【請求項７３】
前記肉腫が骨肉腫または横紋筋肉腫である、請求項72記載の方法。
【請求項７４】
前記肉腫が小児横紋筋肉腫である、請求項73記載の方法。
【請求項７５】
前記がんが、SMAD4またはCDH1の喪失をさらに特徴とする、請求項57～74のいずれか一項記載の方法。
【請求項７６】
前記がんが、検出可能なレベルのSMAD4またはCDH1のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの発現を欠く、請求項75記載の方法。
【請求項７７】
インターフェロンを投与する工程をさらに含む、請求項57～76のいずれか一項記載の

方法。
【請求項７８】
前記インターフェロンがインターフェロン-βである、請求項77記載の方法。
【請求項７９】
前記作用物質が、小分子化合物、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドを含む、請求項57～78のいずれか一項記載の方法。
【請求項８０】
前記作用物質が、SU6668および/またはMSC1094308を含む、請求項79記載の方法。
【請求項８１】
前記ポリヌクレオチドが阻害性核酸分子である、請求項79記載の方法。
【請求項８２】
前記阻害性核酸分子が、siRNA、shRNA、miRNA、リボザイムまたはアンチセンスRNAである、請求項81記載の方法。
【請求項８３】
前記阻害性核酸分子が、shRNAであり、かつ、5'から3'に、
GCAAGAAGCCAGUCAAAGAGA,
CGAGAAGCUGAAGGAUUAUUU, およびGCCGAGAAGCUGAAGGAUUAU

の3つの配列; 5'および/または3'末端の1、2、3、4または5つのヌクレオチドが切断された前記3つの配列のいずれか; ならびに1、2、3、4または5つの核酸塩基置換を含む前記3つの配列のいずれかのバリアントから選択される配列を含む、請求項82記載の方法。
【請求項８４】
前記作用物質がゲノム編集システムまたはCRISPR干渉システムを含む、請求項57～83のいずれか一項記載の方法。
【請求項８５】
RNA誘導型ヌクレアーゼにより媒介されるゲノム編集システムが、シングルガイドRNA（sgRNA）を含むCRISPR-spCas9システムである、請求項84記載の方法。
【請求項８６】
前記sgRNAが、VPS4Aを標的とし、かつ、5'から3'に、
ACUCACACUUGAUAGCGUGG,
GGGCCGCACGAAGUACCUGG, AUUGUUAUUCCCCACCCCUG, および
CCACUUAGAAACAAGAUCAG

の4つの配列; 5'および/または3'末端の1、2、3、4または5つのヌクレオチドが切断された前記4つの配列のいずれか; ならびに1、2、3、4または5つの核酸塩基置換を含む前記4つの配列のいずれかのバリアントから選択される配列を含む、請求項85記載の方法。
【請求項８７】
前記対象が動物である、請求項57～86のいずれか一項記載の方法。
【請求項８８】
前記動物が哺乳動物である、請求項87記載の方法。
【請求項８９】
前記哺乳動物がヒトである、請求項88記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、2020年6月5日に出願された以下の米国仮出願第63/035,454号および2020年6月19日に出願された同第63/041,229号の恩典を主張し、これらの各々の内容

全体が、参照により、本明細書に組み入れられる。
【０００２】
連邦政府による資金提供を受けた研究の下でなされた発明に対する権利の陳述
本発明は、国立衛生研究所によって授与された助成金K08 CA218420-02の下で政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。
【背景技術】
【０００３】
発明の背景
新しいバイオマーカーに関連するがん治療標的の発見は、薬物開発を可能にし、最終的に臨床的ケアの進歩をもたらし得る。腫瘍抑制遺伝子（TSG）の機能喪失をもたらす体細胞コピー数変化（CNA）は、腫瘍形成における重要な推進事象を構成する。残念ながら、腫瘍抑制因子の不活性化によって誘発される発がん過程を標的とする既存の治療選択肢はほとんど存在しない。したがって、一般的な体細胞CNAとの扱いやすい合成致死性相互作用を標的とする薬物が必要とされている。
【発明の概要】
【０００４】
以下に記載されるように、本発明は、VPS4Aおよび/またはVPS4B（すなわち、VPS4AもしくはVPS4B、またはVPS4AとVPS4Bの両方）の低下または喪失を特徴とする新生物を治療するための組成物および方法を特徴とする。いくつかの態様において、新生物は、SMAD4またはCDH1の低下または喪失をさらに特徴とする。
【０００５】
1つの局面において、本発明は、VPS4B発現の喪失を特徴とする横紋筋肉腫細胞の細胞死を誘導するかまたは細胞生存を低下させるための方法を特徴とする。この方法は、細胞を、VPS4Aの発現または活性を阻害する作用物質と接触させる工程を含み、それにより、横紋筋肉腫細胞の細胞死を誘導するか、または細胞生存を低下させる。
【０００６】
別の局面において、本発明は、VPS4A発現の喪失を特徴とする横紋筋肉腫細胞の細胞死を誘導するかまたは細胞生存を低下させるための方法を特徴とする。この方法は、細胞を、VPS4Bの発現または活性を阻害する作用物質と接触させる工程を含み、それにより、横紋筋肉腫細胞の細胞死を誘導するか、または細胞生存を低下させる。
【０００７】
上記局面のいずれかにおいて、この方法は、細胞を、ULK3、CHMP1A、CHMP1B、VTA1、および/またはIST1の発現または活性を阻害する作用物質と接触させる工程をさらに含む。
【０００８】
1つの局面において、本発明は、VPS4A発現の喪失を特徴とする新生物細胞の細胞死を誘導するかまたは細胞生存を低下させるための方法を特徴とする。この方法は、細胞を、ULK3、CHMP1A、CHMP1B、VTA1、および/またはIST1の発現または活性を阻害する作用物質と接触させる工程を含み、それにより、新生物細胞の細胞死を誘導もしくは促進するか、または細胞生存を低下させる。
【０００９】
別の局面において、本発明は、VPS4B発現の喪失を特徴とする新生物細胞の細胞死を誘導するかまたは細胞生存を低下させるための方法を特徴とする。この方法は、細胞を、ULK3、CHMP1A、CHMP1B、VTA1、および/またはIST1の発現または活性を阻害する作用物質と接触させる工程を含み、それにより、新生物細胞の細胞死を誘導もしくは促進するか、または細胞生存を低下させる。
【００１０】
上記局面のいずれかにおいて、この方法は、細胞を、VPS4Bの発現または活性を阻害する作用物質と接触させる工程をさらに含む。上記局面のいずれかにおいて、この方法は、細胞を、VPS4Aの発現または活性を阻害する作用物質と接触させる工程をさらに含む

。
【００１１】
上記局面のいずれかにおいて、新生物細胞は、脳、膀胱、胆汁、血液、乳房、管、結腸、結腸直腸、食道、胃、胚細胞、肝臓、卵巣、膵臓、子宮、または肺のがん細胞である。上記局面のいずれかにおいて、新生物細胞は膵臓癌細胞である。上記局面のいずれかにおいて、新生物細胞は腎細胞癌または膵管腺癌である。上記局面のいずれかにおいて、新生物細胞は肉腫細胞である。複数の態様において、肉腫は、骨肉腫細胞または横紋筋肉腫細胞である。複数の態様において、肉腫は、小児横紋筋肉腫細胞である。
【００１２】
上記局面のいずれかにおいて、横紋筋肉腫または新生物細胞は、ＳＭＡＤ４またはＣＤＨ１の喪失をさらに特徴とする。上記局面のいずれかにおいて、新生物細胞は、検出可能なレベルのＳＭＡＤ４またはＣＤＨ１のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの発現を欠く。
【００１３】
上記局面のいずれかにおいて、前記方法は、細胞をインターフェロンと接触させる工程をさらに含む。複数の態様において、インターフェロンは、インターフェロン-βである。
【００１４】
上記局面のいずれかにおいて、横紋筋肉腫細胞または新生物細胞は哺乳動物細胞である。複数の態様において、哺乳動物細胞は、ヒト細胞である。
【００１５】
１つの局面において、本発明は、ＶＰＳ４Ａ発現の喪失を特徴とする新生物を有する対象を治療するための方法を特徴とする。この方法は、ＵＬＫ３、ＣＨＭＰ１Ａ、ＣＨＭＰ１Ｂ、ＶＴＡ１またはＩＳＴ１の発現または活性を阻害する作用物質を対象に投与する工程を含み、それにより、新生物の細胞死を誘導もしくは促進するか、または細胞生存を低下させる。
【００１６】
上記局面のいずれかにおいて、この方法は、ＶＰＳ４Ｂの発現または活性を阻害する作用物質を投与する工程を含む。
【００１７】
１つの局面において、本発明は、ＶＰＳ４Ｂ発現の喪失を特徴とする新生物を有する対象を治療するための方法を特徴とする。この方法は、細胞を、ＵＬＫ３、ＣＨＭＰ１Ａ、ＣＨＭＰ１Ｂ、ＶＴＡ１およびＩＳＴ１の発現または活性を阻害する作用物質と接触させる工程を含み、それにより、新生物の細胞死を誘導もしくは促進するか、または細胞生存を低下させる。
【００１８】
上記局面のいずれかにおいて、この方法は、ＶＰＳ４Ａの発現または活性を阻害する作用物質を投与する工程をさらに含む。
【００１９】
上記局面のいずれかにおいて、新生物は、脳、膀胱、胆汁、血液、乳房、管、結腸、結腸直腸、食道、胃、胚細胞、肝臓、卵巣、膵臓、子宮、または肺のがんである。複数の態様において、がんは、膵臓癌である。上記局面のいずれかにおいて、新生物は腎癌または膵管腺癌である。上記局面のいずれかにおいて、新生物は肉腫である。複数の態様において、肉腫は、骨肉腫または横紋筋肉腫である。複数の態様において、肉腫は、小児横紋筋肉腫である。
【００２０】
上記局面のいずれかにおいて、新生物は、ＳＭＡＤ４またはＣＤＨ１の喪失をさらに特徴とする。上記局面のいずれかにおいて、新生物は、検出可能なレベルのＳＭＡＤ４またはＣＤＨ１のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの発現を欠く。
【００２１】
１つの局面において、本発明は、ＶＰＳ４Ａ発現の喪失を特徴とするがんを有する選択された対象を治療するための方法を特徴とする。この方法は、ＶＰＳ４Ｂ、ＵＬＫ３、ＣＨＭＰ１Ａ、ＣＨＭＰ１Ｂ、ＶＴＡ１、および/またはＩＳＴ１の発現を阻害する作用物質を投与する工程を

含み、それにより対象を治療する。がんがVPS4A依存性を有すると判定された場合に、対象が選択される。依存性は、多変量モデルを使用して決定され、VPS4Bマーカーのレベルならびに CHMP4Bマーカー、ITCHマーカー、およびISG15マーカーのうちの少なくとも1つのレベルがモデルへの入力として使用される。複数の態様において、この方法は、VPS4Aの発現または活性を阻害する作用物質を投与する工程を含む。

【００２２】

上記局面のいずれかにおいて、VPS4B、CHMP4B、およびITCHマーカーレベルが、モデルへの入力として使用される。上記局面のいずれかにおいて、VPS4B、CHMP4B、ITCH、およびISG15マーカーレベルが、モデルへの入力として使用される。

【００２３】

上記局面のいずれかにおいて、マーカーはポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドである。複数の態様において、ポリヌクレオチドはmRNA分子である。

【００２４】

上記局面のいずれかにおいて、前記方法は、対象に由来する生物学的試料におけるマーカーのレベルを検出する工程をさらに含む。

【００２５】

上記局面のいずれかにおいて、生物学的試料は、流体試料または組織試料である。複数の態様において、流体試料は、血液、脳脊髄液、痰、唾液、糞便、または尿試料である。複数の態様において、組織試料は、生検試料である。

【００２６】

上記局面のいずれかにおいて、多変量モデルは線形モデルである。上記局面のいずれかにおいて、多変量モデルは、VPS4B、CHMP4B、ITCH、およびISG15マーカーのうちのいずれか1つを入力として使用する単変量モデルと比較して、がんのVPS4A依存性を予測するための改善された能力を有する。

【００２７】

上記局面のいずれかにおいて、がんは、脳、膀胱、胆汁、血液、乳房、管、結腸、結腸直腸、食道、胃、胚細胞、肝臓、卵巣、膵臓、子宮、または肺のがんである。上記局面のいずれかにおいて、がんは膵臓癌である。上記局面のいずれかにおいて、がんは腎癌または膵管腺癌である。

【００２８】

上記局面のいずれかにおいて、がんは肉腫である。複数の態様において、肉腫は、骨肉腫または横紋筋肉腫である。複数の態様において、肉腫は、小児横紋筋肉腫である。

【００２９】

上記局面のいずれかにおいて、がんは、SMAD4またはCDH1の喪失をさらに特徴とする。上記局面のいずれかにおいて、がんは、検出可能なレベルのSMAD4またはCDH1のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの発現を欠く。

【００３０】

上記局面のいずれかにおいて、前記方法は、インターフェロンを投与する工程をさらに含む。複数の態様において、インターフェロンは、インターフェロン-βである。

【００３１】

上記局面のいずれかにおいて、作用物質は、小分子化合物、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドを含有する。上記局面のいずれかにおいて、作用物質は、SU6668および/またはMSC1094308を含有する。複数の態様において、ポリヌクレオチドは阻害性核酸分子である。複数の態様において、阻害性核酸分子は、siRNA、shRNA、miRNA、リボザイムまたはアンチセンスRNAである。複数の態様において、阻害性核酸分子は、shRNAであり、かつ、5'から3'に、

GCAAGAAGCCAGUCAAAGAGA, CGAGAAGCUGAAGGAUUAUUU, および

GCCGAGAAGCUGAAGGAUUAU

の3つの配列; 5'および/または3'末端の1、2、3、4または5つのヌクレオチドが切断さ

れた前記3つの配列のいずれか; ならびに1、2、3、4または5つの核酸塩基置換を含有する前記3つの配列のいずれかのバリアントから選択される配列を含有する。

【００３２】

上記局面のいずれかにおいて、作用物質はゲノム編集システムまたはCRISPR干渉システムを含有する。複数の態様において、ゲノム編集システムは、シングルガイドRNA（sgRNA）を含有するCRISPR-spCas9システムである。複数の態様において、sgRNAは、VPS4Aを標的とし、かつ、5'から3'に、
ACUCACACUUGAUAGCGUGG, GGGCCGCACGAAGUACCUGG,
AUUGUUAUUCCCCACCCCUG, およびCCACUUAGAAACAAGAUCAG
の4つの配列; 5'および/または3'末端の1、2、3、4または5つのヌクレオチドが切断された前記4つの配列のいずれか; ならびに1、2、3、4または5つの核酸塩基置換を含有する前記4つの配列のいずれかのバリアントから選択される配列を含有する。

【００３３】

上記局面のいずれかにおいて、横紋筋肉腫細胞または新生物細胞は対象内にある。上記局面のいずれかにおいて、対象は動物である。上記局面のいずれかにおいて、動物は哺乳動物である。上記局面のいずれかにおいて、哺乳動物はヒトである。

【００３４】

本発明は、VPS4AまたはVPS4Bの低下または喪失を特徴とする新生物を治療するための組成物および方法を提供する。本発明によって定義される組成物および物品は、以下に提供される実施例に関連して単離されたか、または他の方法で製造された。本発明の他の特徴および利点は、詳細な説明から、および特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【００３５】

定義

別段の定義がなされない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属するところの当業者によって一般的に理解される意味を有する。以下の参考文献は、本発明で使用される用語の多くの一般的な定義を当業者に提供する:Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); およびHale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。本明細書で使用される場合、以下の用語は、他に指定されない限り、以下でこれらの用語に与えられる意味を有する。

【００３６】

「カドヘリン1（CDH1）ポリペプチド」とは、細胞接着に関連する活性を有し、NCBI参照配列アクセッション番号NP_004351.1と少なくとも約85%の同一性を有するポリペプチドまたはその断片を意味する。例示的なCDH1ポリペプチドの配列は以下に提供される。

MGPWSRSLSALLLLLQVSSWLCQEPEPCHPGFDAESYTFTVPRRHLERGRVLGRVNFED
CTGRQRTAYFSLDTRFKVGTDGVITVKRPLRFHNPQIHFLVYAWDSTYRKFSTKVTLNT
VGHHHRPPPHQASVSGIQAELLTFPNSSPGLRRQKRDWVIPPISCPENEKGPFPKNLVQIK
SNKDKEGKVFYSITGQGADTPPVGVFIIERETGWLKVTEPLDRERIATYTLFSHAVSSNG
NAVEDPMEILITVTDQNDNKPEFTQEVFKGSVMEGALPGTSVMEVTATDADDDVNTYN
AAIAYTILSQDPELPDKNMFTINRNTGVISVVTTGLDRESFPTYTLVVQAADLQGEGLST
TATAVITVTDTNDNPPIFNPTTYKGQVPENEANVVITTLKVTDADAPNTPAWEAVYTILN
DDGGQFVVTTNPVNNDGILKTAKGLDFEAKQQYILHVAVTNVVPFEVSLTTSTATVTV
DVLDVNEAPIFVPPEKRVEVSEDFGVGQEITSYTAQEPDTFMEQKITYRIWRDTANWLEI
NPDTGAISTRAELDREDFEHVKNSTYTALIIATDNGSPVATGTGTLLLILSDVNDNAPIPE
PRTIFFCERNPKPQVINIIDADLPPNTSPFTAELTHGASANWTIQYNDPTQESIILKPKMAL
EVGDYKINLKLMDNQNKDQVTTLEVSVCDCEGAAGVCRKAQPVEAGLQIPAILGILGGI
LALLILILLLLLFLRRRAVVKEPLLPPEDDTRDNVYYYDEEGGGEEDQDFDLSQLHRGLD
ARPEVTRNDVAPTLMSVPRYLPRPANPDEIGNFIDENLKAADTDPTAPPYDSLLVFDYEG
SGSEAASLSSLNSSESDKDQDYDYLNEWGNRFKKLADMYGGGEDD

【００３７】

「ＣＤＨ１ポリヌクレオチド」とは、ＣＤＨ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。例示的なＣＤＨ１をコードする核酸配列は、ＮＣＢＩ参照配列アクセッション番号ＮＭ＿００４３６０.５に対応し、以下に提供される。

AGTGGCGTCGGAACTGCAAAGCACCTGTGAGCTTGCGGAAGTCAGTTCAGACTCCAGCCCG
CTCCAGCCCGGCCCGACCCGACCGCACCCGGCGCCTGCCCTCGCTCGGCGTCCCCGGCCAGC
CATGGGCCCTTGGAGCCGCAGCCTCTCGGCGCTGCTGCTGCTGCTGCAGGTCTCCTCTTGGCT
CTGCCAGGAGCCGGAGCCCTGCCACCCTGGCTTTGACGCCGAGAGCTACACGTTCACGGTGC
CCCGGCGCCACCTGGAGAGAGGCCGCGTCCTGGGCAGAGTGAATTTTGAAGATTGCACCGG
TCGACAAAGGACAGCCTATTTTTCCCTCGACACCCGATTCAAAGTGGGCACAGATGGTGTGA
TTACAGTCAAAAGGCCTCTACGGTTTCATAACCCACAGATCCATTTCTTGGTCTACGCCTGGG
ACTCCACCTACAGAAAGTTTTCCACCAAAGTCACGCTGAATACAGTGGGGCACCACCACCGC
CCCCCGCCCCATCAGGCCTCCGTTTCTGGAATCCAAGCAGAATTGCTCACATTTCCCAACTCC
TCTCCTGGCCTCAGAAGACAGAAGAGAGACTGGGTTATTCCTCCCATCAGCTGCCCAGAAAA
TGAAAAAGGCCCATTTCCTAAAAACCTGGTTCAGATCAAATCCAACAAAGACAAAGAAGGC
AAGGTTTTCTACAGCATCACTGGCCAAGGAGCTGACACACCCCCTGTTGGTGTCTTTATTATT
GAAAGAGAAACAGGATGGCTGAAGGTGACAGAGCCTCTGGATAGAGAACGCATTGCCACAT
ACACTCTCTTCTCTCACGCTGTGTCATCCAACGGGAATGCAGTTGAGGATCCAATGGAGATT
TTGATCACGGTAACCGATCAGAATGACAACAAGCCCGAATTCACCCAGGAGGTCTTTAAGG
GGTCTGTCATGGAAGGTGCTCTTCCAGGAACCTCTGTGATGGAGGTCACAGCCACAGACGCG
GACGATGATGTGAACACCTACAATGCCGCCATCGCTTACACCATCCTCAGCCAAGATCCTGA

GCTCCCTGACAAAAATATGTTCACCATTAACAGGAACACAGGAGTCATCAGTGTGGTCACCA
CTGGGCTGGACCGAGAGAGTTTCCCTACGTATACCCTGGTGGTTCAAGCTGCTGACCTTCAA
GGTGAGGGGTTAAGCACAACAGCAACAGCTGTGATCACAGTCACTGACACCAACGATAATC
CTCCGATCTTCAATCCCACCACGTACAAGGGTCAGGTGCCTGAGAACGAGGCTAACGTCGTA
ATCACCACACTGAAAGTGACTGATGCTGATGCCCCCAATACCCCAGCGTGGGAGGCTGTATA
CACCATATTGAATGATGATGGTGGACAATTTGTCGTCACCACAAATCCAGTGAACAACGATG
GCATTTTGAAAACAGCAAAGGGCTTGGATTTTGAGGCCAAGCAGCAGTACATTCTACACGTA
GCAGTGACGAATGTGGTACCTTTTGAGGTCTCTCTCACCACCTCCACAGCCACCGTCACCGT
GGATGTGCTGGATGTGAATGAAGCCCCCATCTTTGTGCCTCCTGAAAAGAGAGTGGAAGTGT
CCGAGGACTTTGGCGTGGGCCAGGAAATCACATCCTACACTGCCCAGGAGCCAGACACATTT
ATGGAACAGAAAATAACATATCGGATTTGGAGAGACACTGCCAACTGGCTGGAGATTAATC
CGGACACTGGTGCCATTTCCACTCGGGCTGAGCTGGACAGGGAGGATTTTGAGCACGTGAA
GAACAGCACGTACACAGCCCTAATCATAGCTACAGACAATGGTTCTCCAGTTGCTACTGGAA
CAGGGACACTTCTGCTGATCCTGTCTGATGTGAATGACAACGCCCCCATACCAGAACCTCGA
ACTATATTCTTCTGTGAGAGGAATCCAAAGCCTCAGGTCATAAACATCATTGATGCAGACCT
TCCTCCCAATACATCTCCCTTCACAGCAGAACTAACACACGGGGCGAGTGCCAACTGGACCA
TTCAGTACAACGACCCAACCCAAGAATCTATCATTTTGAAGCCAAAGATGGCCTTAGAGGTG
GGTGACTACAAAATCAATCTCAAGCTCATGGATAACCAGAATAAAGACCAAGTGACCACCT
TAGAGGTCAGCGTGTGTGACTGTGAAGGGGCCGCTGGCGTCTGTAGGAAGGCACAGCCTGT
CGAAGCAGGATTGCAAATTCCTGCCATTCTGGGGATTCTTGGAGGAATTCTTGCTTTGCTAAT
TCTGATTCTGCTGCTCTTGCTGTTTCTTCGGAGGAGAGCGGTGGTCAAAGAGCCCTTACTGCC
CCCAGAGGATGACACCCGGGACAACGTTTATTACTATGATGAAGAAGGAGGCGGAGAAGAG
GACCAGGACTTTGACTTGAGCCAGCTGCACAGGGGCCTGGACGCTCGGCCTGAAGTGACTC
GTAACGACGTTGCACCAACCCTCATGAGTGTCCCCCGGTATCTTCCCCGCCCTGCCAATCCC
GATGAAATTGGAAATTTTATTGATGAAAATCTGAAAGCGGCTGATACTGACCCCACAGCCCC
GCCTTATGATTCTCTGCTCGTGTTTGACTATGAAGGAAGCGGTTCCGAAGCTGCTAGTCTGA
GCTCCCTGAACTCCTCAGAGTCAGACAAAGACCAGGACTATGACTACTTGAACGAATGGGG
CAATCGCTTCAAGAAGCTGGCTGACATGTACGGAGGCGGCGAGGACGACTAGGGGACTCGA
GAGAGGCGGGCCCCAGACCCATGTGCTGGGAAATGCAGAAATCACGTTGCTGGTGGTTTTTC
AGCTCCCTTCCCTTGAGATGAGTTTCTGGGGAAAAAAAAAGAGACTGGTTAGTGATGCAGTTA
GTATAGCTTTATACTCTCTCCACTTTATAGCTCTAATAAGTTTGTGTTAGAAAAGTTTCGACT
TATTTCTTAAAGCTTTTTTTTTTTTCCCATCACTCTTTACATGGTGGTGATGTCCAAAAGATAC
CCAAATTTTAATATTCCAGAAGAACAACTTTAGCATCAGAAGGTTCACCCAGCACCTTGCAG
ATTTTCTTAAGGAATTTTGTCTCACTTTTAAAAAGAAGGGGAGAAGTCAGCTACTCTAGTTCT
GTTGTTTTGTGTATATAATTTTTTAAAAAAAATTTGTGTGCTTCTGCTCATTACTACACTGGTG
TGTCCCTCTGCCTTTTTTTTTTTTTTAAGACAGGGTCTCATTCTATCGGCCAGGCTGGAGTGCA
GTGGTGCAATCACAGCTCACTGCAGCCTTGTCCTCCCAGGCTCAAGCTATCCTTGCACCTCA

GCCTCCCAAGTAGCTGGGACCACAGGCATGCACCACTACGCATGACTAATTTTTTAAATATT
TGAGACGGGGTCTCCCTGTGTTACCCAGGCTGGTCTCAAACTCCTGGGCTCAAGTGATCCTC
CCATCTTGGCCTCCCAGAGTATTGGGATTACAGACATGAGCCACTGCACCTGCCCAGCTCCC
CAACTCCCTGCCATTTTTTAAGAGACAGTTTCGCTCCATCGCCCAGGCCTGGGATGCAGTGA
TGTGATCATAGCTCACTGTAACCTCAAACTCTGGGGCTCAAGCAGTTCTCCCACCAGCCTCCT
TTTTATTTTTTTGTACAGATGGGGTCTTGCTATGTTGCCCAAGCTGGTCTTAAACTCCTGGCCT
CAAGCAATCCTTCTGCCTTGGCCCCCCAAAGTGCTGGGATTGTGGGCATGAGCTGCTGTGCC
CAGCCTCCATGTTTTAATATCAACTCTCACTCCTGAATTCAGTTGCTTTGCCCAAGATAGGAG
TTCTCTGATGCAGAAATTATTGGGCTCTTTTAGGGTAAGAAGTTTGTGTCTTTGTCTGGCCAC
ATCTTGACTAGGTATTGTCTACTCTGAAGACCTTTAATGGCTTCCCTCTTTCATCTCCTGAGT
ATGTAACTTGCAATGGGCAGCTATCCAGTGACTTGTTCTGAGTAAGTGTGTTCATTAATGTTT
ATTTAGCTCTGAAGCAAGAGTGATATACTCCAGGACTTAGAATAGTGCCTAAAGTGCTGCAG
CCAAAGACAGAGCGGAACTATGAAAAGTGGGCTTGGAGATGGCAGGAGAGCTTGTCATTGA
GCCTGGCAATTTAGCAAACTGATGCTGAGGATGATTGAGGTGGGTCTACCTCATCTCTGAAA
ATTCTGGAAGGAATGGAGGAGTCTCAACATGTGTTTCTGACACAAGATCCGTGGTTTGTACT
CAAAGCCCAGAATCCCCAAGTGCCTGCTTTTGATGATGTCTACAGAAAATGCTGGCTGAGCT
GAACACATTTGCCCAATTCCAGGTGTGCACAGAAAACCGAGAATATTCAAAATTCCAAATTT
TTTTCTTAGGAGCAAGAAGAAAATGTGGCCCTAAAGGGGGTTAGTTGAGGGGTAGGGGGTA
GTGAGGATCTTGATTTGGATCTCTTTTTATTTAAATGTGAATTTCAACTTTTGACAATCAAAG
AAAAGACTTTTGTTGAAATAGCTTTACTGTTTCTCAAGTGTTTTGGAGAAAAAAATCAACCC
TGCAATCACTTTTTGGAATTGTCTTGATTTTTCGGCAGTTCAAGCTATATCGAATATAGTTCT
GTGTAGAGAATGTCACTGTAGTTTTGAGTGTATACATGTGTGGGTGCTGATAATTGTGTATTT
TCTTTGGGGGTGGAAAAGGAAAACAATTCAAGCTGAGAAAAGTATTCTCAAAGATGCATTTT
TATAAATTTTATTAAACAATTTTGTTAAA

【００３８】

「荷電多胞体タンパク質１Ａ（ＣＨＭＰ１Ａ）ポリペプチド」とは、リソソームの内部へのタンパク質の多胞体選別に関連する活性を有し、ＮＣＢＩ参照配列アクセッション番号ＮＰ＿００１０７６７８３．１と少なくとも約８５％の同一性を有するポリペプチドまたはその断片を意味する。例示的なＣＨＭＰ１Ａポリペプチドの配列は以下に提供される。

MDVHGEAAGEAGQEGGEGLQGGAGQSEEGPSAEKCRVCPCVCRERHPQEERRCELAS
DGVPRRRSGLQGADSCDYEGGDQEYGPGDQSPGQGPEHHGPAEGLLSDGQVRAAGAE
PGRPYIGDGGLHELGHHPDHAAGAGGQPHHADRRGEWPGGAGPAQPAARGRLCRGRE
LCAQPGGPAVTEVGRLEELAVPRRCAPPLPRDVLEGSCPLPTASCLCADPAGLRPAATLR
LSPARPAWP

【００３９】

「ＣＨＭＰ１Ａポリヌクレオチド」とは、ＣＨＭＰ１Ａポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。例示的なＣＨＭＰ１Ａをコードする核酸配列は、ＮＣＢＩ参照配列アクセッション番号ＮＭ＿００１０８３３１４．４に対応し、以下に提供される。

GGCGACCCCGGAAGTCCCCGCCGGGTGCAGCTTGGTCGGTTCGATCGCCGCCGGGACCTGAC
ACCGCCCGGAGTTGGCGTCCCTTCTCCCTCTCCGAGTGCTGCTCCTGTCATTGTGGCCATGGA
CGTTCACGGCGAAGCAGCTGGAGAAGCTGGCCAAGAAGGCGGAGAAGGACTCCAAGGCGG
AGCAGGCCAAAGTGAAGAAGGCCCTTCTGCAGAAAAATGTAGAGTGTGCCCGTGTGTATGC
CGAGAACGCCATCCGCAAGAAGAACGAAGGTGTGAACTGGCTTCGGATGGCGTCCCGCGTA
GACGCAGTGGCCTCCAAGGTGCAGACAGCTGTGACTATGAAGGGGGTGACCAAGAATATGG
CCCAGGTGACCAAAGCCCTGGACAAGGCCCTGAGCACCATGGACCTGCAGAAGGTCTCCTC
AGTGATGGACAGGTTCGAGCAGCAGGTGCAGAACCTGGACGTCCATACATCGGTGATGGAG
GACTCCATGAGCTCGGCCACCACCCTGACCACGCCGCAGGAGCAGGTGGACAGCCTCATCA
TGCAGATCGCCGAGGAGAATGGCCTGGAGGTGCTGGACCAGCTCAGCCAGCTGCCCGAGGG
CGCCTCTGCCGTGGGCGAGAGCTCTGTGCGCAGCCAGGAGGACCAGCTGTCACGGAGGTTG
GCCGCCTTGAGGAACTAGCCGTGCCCCGCCGGTGTGCACCGCCTCTGCCCCGTGATGTGCTG
GAAGGCTCCTGTCCTCTCCCCACCGCGTCTTGCCTTTGTGCTGACCCCGCGGGGCTGCGGCCG
GCAGCCACTCTGCGTCTCTCACCTGCCAGGCCTGCGTGGCCTTAGGGTTGTTCCTGTTCTTTT
AGGTTGGGCGGTGGGTCTGTGTCCTGGTGTTGAGTTTCTGCAAATTTCTGGGGGTGATTTCTG
TGACTCTGGGCCCACAGCGGGGAGGCCAAGAGGGGCCCTGTGGACTTTCACCCAGCACTGT
GGGGGCCTTCAGACTCTGGGGCAGCAGACATGCTGCTTCCCATCAGCCAGAGGGGGTCAGG
GCTGCCCTGTTGCCAAACAACTCCCTGAGGCCTCTCCGCACCACCTCAGCGGGCAGGAGGTC
CCACCATGTGGACAGACATAGCCCAAGGAGGCACCACAGGTCTATGTGTGCTGGGGGATGT
CAGGTGCCACCCAACGCTGTCCTGGTGGTATTTACAATGACATCCTCCTCCTCCATCACTCCA
GGGGTGGTGTCTCGGCCGCCCCTACCAGCTGGCTGAGCCCCCTGGCCTCCTGCGCTCCCTCA
CTTCCCTCAGTTCCCAAAGCTGCCCAGTCCATGGGGACAGAACCGTCACTCAGATCCACATT
CAAGTGTGCCCACCCTGCAGTCTTCATCCTCACTCAGCTGCTGCCTCTGGAGGTGCCTTTGGC
CACATGTGCTGTGCTGTTTGTCTCCTCGACAGGGAGCCTGTCCACCAGCAGGCTGCGGTCCC
AGCGGGTGCGTCTGCAGCTCCTCCCCTTGGGCAGCCTGGTTCTCCCGGAGGACCTTTCCTTGG
GGCCCTGCTTCATGACGATGCTGCCTGTGTCACCCTCTACCATCTGTAAACAACTGGGTGCCT
TCCCCGACCACACCCCAATGCCTTCCCAGCTTGGAAGCCAAGGCAGCTGATGAAGGGAGCTC
AGGAGAGCCGTCTTCAGCTGGGCTGGGGTTGGGGCTGCTGTGAGGAAAACCTGCCATTGTG
GCCCTGGAGAGTCACCAGCAGCTCTTGGGAAGGACTTGCTGGGAGGCTGAGAGAGGCTTTG
GGCACAGCCTGCTGTCTTTTCCATTTCCTAAAGTTTACTTCATTGTCTTGAGGCTTCCAGGTTT
TGTTTTTGTTTTTGCCAAAGTAGAAAAGGCAGGTGGTGGGCGGCTGGCAGGGAGTGCGGGTC
CCCGCCCCTCTTCAGTCCTGCCCTCCCCTCCTCAGTCCTGCCCACCCCGTGCAGCCCATGCTG
AGGCTGCAGTGGTGTCGTGGGTGTTACGTGCAGGAACGTGGAGACCCTGACGTGGGCTCACT
GCGTTTGGTTTTCTTTTCAGAACTTGGGAGCCCCCAGGGAGGGGCTAGTGTTGGTAGGTCCT
AGACGTGGTTCCCTCCAGCCTCCCCAAAATCAACCCTGGTGTTGAGAGAACGTCCTTCTGTC
CATCGTGGGTAACAGCCTTGGGGAGGGTGCAGAGCTCTGCAGAGCCATGGGCCAGGTGGGG

CTGCCTCAGTCCTGTCCCCTTGGGCACTGAGGAGAGGGGCCCATTCACCTTTCTCCTAGAAT
GCTGTTGTAAATAAACAAATGGATCCCTGGAAA

【００４０】

「荷電多胞体タンパク質１Ｂ（ＣＨＭＰ１Ｂ）ポリペプチド」とは、表面受容体タンパク質の分解およびエンドサイトーシス多胞体の形成に関連する活性を有し、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＡＨ１２７３３．３と少なくとも約８５％の同一性を有するポリペプチドまたはその断片を意味する。例示的なＣＨＭＰ１Ｂポリペプチドの配列は以下に提供される。

MSNMEKHLFNLKFAAKELSRSAKKCDKEEKAEKAKIKKAIQKGNMEVARIHAENAIRQ
KNQAVNFLRMSARVDAVAARVQTAVTMGKVTKSMAGVVKSMDATLKTMNLEKISAL
MDKFEHQFETLDVQTQQMEDTMSSTTTLTTPQNQVDMLLQEMADEAGLDLNMELPQG
QTGSVGTSVASAEQDELSQRLARLRDQV

【００４１】

「荷電多胞体タンパク質１Ｂ（ＣＨＭＰ１Ｂ）ポリヌクレオチド」とは、ＣＨＭＰ１Ｂポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。例示的なＣＨＭＰ１Ｂをコードする核酸配列は、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＢＣ０１２７３３．２に対応し、以下に提供される。

CTGCCTTCGGCGCGCTTCTCAGCAGGGCCGCCGACCCAAAGGAGCCGTCTGACTATGTCTAA
CATGGAGAAACACCTGTTCAACCTGAAGTTCGCGGCCAAAGAACTGAGTAGGAGTGCCAAA
AAATGCGATAAGGAGGAAAAGGCCGAAAAGGCCAAAATTAAAAAGGCCATTCAGAAGGGC
AACATGGAAGTTGCGAGGATACACGCCGAAAATGCCATCCGCCAGAAGAACCAGGCGGTGA
ATTTCTTGAGAATGAGTGCGCGAGTCGATGCAGTGGCTGCCAGGGTCCAGACGGCGGTGAC
GATGGGCAAGGTGACCAAGTCGATGGCTGGTGTGGTTAAGTCGATGGATGCGACATTGAAG
ACCATGAATCTGGAGAAGATTTCTGCTTTGATGGACAAATTCGAGCACCAGTTTGAGACTCT
GGACGTCCAGACGCAGCAAATGGAAGACACGATGAGCAGCACGACGACGCTCACCACTCCC
CAGAACCAAGTGGATATGCTGCTCCAGGAAATGGCAGATGAGGCGGGCCTCGACCTCAACA
TGGAGCTGCCGCAGGGCCAGACCGGCTCCGTGGGCACGAGCGTGGCTTCGGCGGAGCAGGA
TGAACTGTCTCAGAGACTGGCCCGCCTTCGGGATCAAGTGTGACGGCAGAACCCGCTCTGAG
GTTTCCTGGCCATAGCCACCCTTTGAAATGCTCTCTGTGTGTTAGAGAGATACTATACCCTAG
AAACTCTGAACACGCCAGAATGCTGAAATGCCCTTCTACCTTTGGGTTTACAGCCCCCTCCA
CATAAATTAAGAAATTCAGTATTTCTGCACTCTTAGCTGGATTCTAAAGTTCTGTATAGCTCG
TAATGATGGTATTTTTATAGCAGCCTTTTAACAGAACTAGTTAATTTCGTGTATATGAATCTT
TCTCGAAGATCTGGTCAAAACTGTATTCAGTTTCCTGCCCAGAATGATCAGATTGAAGGTGG
TTGGTTTTTATTATTATTTAGTGTGATTGATAGTATCTAGAATGGCAGGTGGTGCATAAAAGT
TAAAGAGAGGGGAAAGATTACTTAGTTTGGTTATACAGTTATAAACACCATGCAGTGTATTC
GGTGGACTGTGCTATTTCTGTTTATCCTTTGGGTTTTGGTTTTTGTTTTTTTTTTTTGCCTTCAC
AGTGAGACTGCAAATGATTGTTCTCATAACGTATATTATTAATAAATGTGGTCCTATAATTTA
TACTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAA

【００４２】

「荷電多胞体タンパク質４Ｂ（ＣＨＭＰ４Ｂ）ポリペプチド」とは、表面受容体タンパク質の分解およびエンドサイトーシス多胞体の形成に関連する活性を有し、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＡＨ３３８５９．１と少なくとも約８５％の同一性を有するポリペプチドまたはその断片を意味する。例示的なＣＨＭＰ４Ｂポリペプチドの配列は以下に提供される。

MSVFGKLFGAGGGKAGKGGPTPQEAIQRLRDTEEMLSKKQEFLEKKIEQELTAAKKHG
TKNKRAALQALKRKKRYEKQLAQIDGTLSTIEFQREALENANTNTEVLKNMGYAAKA
MKAAHDNMDIDKVDELMQDIADQQELAEEISTAISKPVGFGEEFDEDELMAELEELEQE
ELDKNLLEISGPETVPLPNVPSIALPSKPAKKKEEEDDDMKELENWAGSM

【００４３】

「ＣＨＭＰ４Ｂポリヌクレオチド」とは、ＣＨＭＰ４Ｂポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。例示的なＣＨＭＰ４Ｂをコードする核酸配列は、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＢＣ０３３８５９．１に対応し、以下に提供される。

GGCGGCAGGGAGCGGCGGGACTGGGAGCGGGCGCGGGAGCCGACCCGAGCCGAGCCGAGC
CGAGCCGAGCCGGAGCGGGCGGCGAAGGCCGGCGCGGCGAGCAGCAACCATGTCGGTGTTC
GGGAAGCTGTTCGGGGCTGGAGGGGGTAAGGCCGGCAAGGGCGGCCCGACCCCCCAGGAG
GCCATCCAGCGGCTGCGGGACACGGAAGAGATGTTAAGCAAGAAACAGGAGTTCCTGGAGA
AGAAAATCGAGCAGGAGCTGACGGCCGCCAAGAAGCACGGCACCAAAAACAAGCGCGCGG
CCCTCCAGGCACTGAAGCGTAAGAAGAGGTATGAGAAGCAGCTGGCGCAGATCGACGGCAC
ATTATCAACCATCGAGTTCCAGCGGGAGGCCCTGGAGAATGCCAACACCAACACCGAGGTG
CTCAAGAACATGGGCTATGCCGCCAAGGCCATGAAGGCGGCCCATGACAACATGGACATCG
ATAAAGTTGATGAGTTAATGCAGGACATTGCTGACCAGCAAGAACTTGCAGAGGAGATTTC
AACAGCAATTTCGAAACCTGTAGGGTTTGGAGAAGAGTTTGACGAGGATGAGCTCATGGCG
GAATTAGAAGAACTAGAACAGGAGGAACTAGACAAGAATTTGCTGGAAATCAGTGGACCCG
AAACAGTCCCTCTACCAAATGTTCCCTCTATAGCCCTACCATCAAAACCCGCCAAGAAGAAA
GAAGAGGAGGACGACGACATGAAGGAATTGGAGAACTGGGCTGGATCCATGTAATGGGGTC
CAGCGCTGGCTGGGCCCAGACAGACTGTGGTGGCCTGCGCAGCGAGCAGGCGTGTGCGTGT
GTGGGGCAGGCAGGATGTGGTGCAGGCAGGTTCCATCGCTTTCGACTCTCACTCCAAAGCAG
TAGGGCCGCGTTGCTGCTCACTCTCTGCATAGCATGGTCTGCACCTGGGAGATGGGCGGGGG
GAGGGGGGCGGGCGGGGTGGGAAGTGCCTGCTGTTTATAATGTTGAATTTCTGTAAAATAA
ACTGTATTTGCAAATCCAACATTGAGCTTCTGGACTACGCTGACTCCACTGCTGAATCCTCAA
TGGAAAGGGTCGACTGGTTGCAGTTGAAATGACCTGAAATGTAGCCTCTGTCCTTGTAAGTC
AGTTGACTTGCCGCACATCTCTTTGTGTACTTGTACGGTACTGGCAGAAAAGTCATTTTTCAA
AAGCCATAGGCTTTTCCTTGCCCTTAGCTGTAATAATGCATCTGATTTTGATTTCCTCCAGAG
CTGTGTTTCTGTCCATCACCTGTGTATTGGCCCTGTGTTTACCACTCTGGCCCACTCCTCACCC
CCTTGCTCCCCTGGTCTTCTGGAGTTTGTGACATTGATTTGAAATGGATGGTGTTCTCTTGAG
AGCAAGTGAGATTGTTAGAATTAAGTTCCAACTATACAGTTTTCTAACATAGCTATAAGGTC
CTTGTTGCTGTTTGTGATAACTGATAGATAACTCATTGGAAACGTGCATACATTTATATTCAG
ATGAAATTATGGTTTGCACTGTCTATTAAATATCTCGATTAATTTTCAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【００４４】

「ユビキチン様修飾因子ＩＳＧ１５（ＩＳＧ１５）ポリペプチド」とは、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞増殖に関連する活性を有し、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＡＡ３６１２８．１と少

なくとも約85％の同一性を有するポリペプチドまたはその断片を意味する。例示的なISG15ポリペプチドの配列は以下に提供される。

MGWDLTVKMLAGNEFQVSLSSSMSVSELKAQITQNIGVHAFQQRLAVHPSGVALQDRV
PLASQGLGPGSTVLLVVDKCDEPLSILVRNNKGRSSTYEVRLTQTVAHLKQQVSGLEGV
QDDLFWLTFEGKPLEDQLPLGEYGLKPLSTVFMNLRLRGGGTEPGGRS

【００４５】

「ISG15ポリヌクレオチド」とは、ISG15ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。例示的なISG15をコードする核酸配列は、GenBankアクセッション番号M13755.1に対応し、以下に提供される。

CGGCTGAGAGGCAGCGAACTCATCTTTGCCAGTACAGGAGCTTGTGCCGTGGCCCACAGCCC
ACAGCCCACAGCCATGGGCTGGGACCTGACGGTGAAGATGCTGGCGGGCAACGAATTCCAG
GTGTCCCTGAGCAGCTCCATGTCGGTGTCAGAGCTGAAGGCGCAGATCACCCAGAAGATTG
GCGTGCACGCCTTCCAGCAGCGTCTGGCTGTCCACCCGAGCGGTGTGGCGCTGCAGGACAGG
GTCCCCCTTGCCAGCCAGGGCCTGGGCCCTGGCAGCACGGTCCTGCTGGTGGTGGACAAATG
CGACGAACCTCTGAGCATCCTGGTGAGGAATAACAAGGGCCGCAGCAGCACCTACGAGGTC
CGGCTGACGCAGACCGTGGCCCACCTGAAGCAGCAAGTGAGCGGGCTGGAGGGTGTGCAGG
ACGACCTGTTCTGGCTGACCTTCGAGGGGAAGCCCCTGGAGGACCAGCTCCCGCTGGGGGA
GTACGGCCTCAAGCCCCTGAGCACCGTGTTCATGAATCTGCGCCTGCGGGGAGGCGGCACA
GAGCCTGGCGGGCGGAGCTAAGGGCCTCCACCAGCATCCGAGCAGGATCAAGGGCCGGAAA
TAAAGGCTGTTGTAAGAGAAT

【００４６】

「ITCHY E3ユビキチンタンパク質リガーゼ（ITCH）ポリペプチド」とは、ユビキチン化活性を有し、GenBankアクセッション番号AAC04845.1と少なくとも約85％の同一性を有するポリペプチドまたはその断片を意味する。例示的なITCHポリペプチドの配列は以下に提供される。

GDKEPTETIGDLSICLDGLQLESEVVTNGETTCSESASQNDDGSRSKDETRVSTNGSDDP
EDAGAGENRRVSGNNSPSLSNGGFKPSRPPRPSRPPPPTPRRPASVNGSPSATSESDGSST
GSLPPTNTNTNTSEGATSGLIIPLTISGGSGPRPLNPVTQAPLPPGWEQRVDQHGRVYYV
DHVEKRTTWDRPEPLPPGWERRVDNMGRIYYVDHFTRTTTWQRPTLESVRNYEQWQL
QRSQLQGAMQQFNQRFIYGNQDLFATSQSKEFDPLGPLPPGWEKRTDSNGRVYFVNHN
TRITQWEDPRSQGQLNEKPLPEGWEMRFTVDGIPYFVDHNRRTTTYIDPRTGKSALDNG
PQIAYVRDFKAKVQYFRFWCQQLAMPQHIKITVTRKTLFEDSFQQIMSFSPQDLRRRLW
VIFPGEEGLDYGGVAREWFFLLSHEVLNPMYCLFEYAGKDNYCLQINPASYINPDHLKY
FRFIGRFIAMALFHGKFIDTGFSLPFYKRILNKPVGLKDLESIDPEFYNSLIWVKENNIEEC
DLEMYFSVDKEILGEIKSHDLKPNGGNILVTEENKEEYIRMVAEWRLSRGVEEQTQAFF
EGFNEILPQQYLQYFDAKELEVLLCGMQEIDLNDWQRHAIYRHYARTSKQIMWFWQFV
KEIDNEKRMRLLQFVTGTCRLPVGGFADLMGSNGPQKFCIEKVGKENWLPRSHTCFNR
LDLPPYKSYEQLKEKLLFAIEETEGFGQE

【００４７】

「ＩＴＣＨポリヌクレオチド」とは、ＩＴＣＨポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。例示的なＩＴＣＨをコードする核酸配列は、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＦ０３８５６４．１に対応し、以下に提供される。

GGTGACAAAGAGCCAACAGAGACAATAGGAGACTTGTCAATTTGTCTTGATGGGCTACAGT
TAGAGTCTGAAGTTGTTACCAATGGTGAAACTACATGTTCAGAAAGTGCTTCTCAGAATGAT
GATGGCTCCAGATCCAAGGATGAAACAAGAGTGAGCACAAATGGATCAGATGACCCTGAAG
ATGCAGGAGCTGGTGAAAATAGGAGAGTCAGTGGGAATAATTCTCCATCACTCTCAAATGG
TGGTTTTAAACCTTCTAGACCTCCAAGACCTTCACGACCACCACCACCCACCCCACGTAGAC
CAGCATCTGTCAATGGTTCACCATCTGCCACTTCTGAAAGTGATGGGTCTAGTACAGGCTCT
CTGCCGCCGACAAATACAAATACAAATACATCTGAAGGAGCAACATCTGGATTAATAATTCC
TCTTACTATATCTGGAGGCTCAGGCCCTAGGCCATTAAATCCTGTAACTCAAGCTCCCTTGCC
ACCTGGTTGGGAGCAGAGAGTGGACCAGCACGGGCGAGTTTACTATGTAGATCATGTTGAG
AAAAGAACAACATGGGATAGACCAGAACCTCTACCTCCTGGCTGGGAACGGCGGGTTGACA
ACATGGGACGTATTTATTATGTTGACCATTTCACAAGAACAACAACGTGGCAGAGGCCAACA
CTGGAATCCGTCCGGAACTATGAACAATGGCAGCTACAGCGTAGTCAGCTTCAAGGAGCAA
TGCAGCAGTTTAACCAGAGATTCATTTATGGGAATCAAGATTTATTTGCTACATCACAAAGT
AAAGAATTTGATCCTCTTGGTCCATTGCCACCTGGATGGGAGAAGAGAACAGACAGCAATG
GCAGAGTATATTTCGTCAACCACAACACACGAATTACACAATGGGAAGACCCCAGAAGTCA
AGGTCAATTAAATGAAAAGCCCTTACCTGAAGGTTGGGAAATGAGATTCACAGTGGATGGA
ATTCCATATTTTGTGGACCACAATAGAAGAACTACCACCTATATAGATCCCCGCACAGGAAA
ATCTGCCCTAGACAATGGACCTCAGATAGCCTATGTTCGGGACTTCAAAGCAAAGGTTCAGT
ATTTCCGGTTCTGGTGTCAGCAACTGGCCATGCCACAGCACATAAAGATTACAGTGACAAGA
AAAACATTGTTTGAGGATTCCTTTCAACAGATAATGAGCTTCAGTCCCCAAGATCTGCGAAG
ACGTTTGTGGGTGATTTTTCCAGGAGAAGAAGGTTTAGATTATGGAGGTGTAGCAAGAGAAT
GGTTCTTTCTTTTGTCACATGAAGTGTTGAACCCAATGTATTGCCTGTTTGAATATGCAGGGA
AGGATAACTACTGCTTGCAGATAAACCCCGCTTCTTACATCAATCCAGATCACCTGAAATAT
TTTCGTTTTATTGGCAGATTTATTGCCATGGCTCTGTTCCATGGGAAATTCATAGACACGGGT
TTTTCTTTACCATTCTATAAGCGTATCTTGAACAAACCAGTTGGACTCAAGGATTTAGAATCT
ATTGATCCAGAATTTTACAATTCTCTCATCTGGGTTAAGGAAAACAATATTGAGGAATGTGA
TTTGGAAATGTACTTCTCCGTTGACAAAGAAATTCTAGGTGAAATTAAGAGTCATGATCTGA
AACCTAATGGTGGCAATATTCTTGTAACAGAAGAAAATAAAGAGGAATACATCAGAATGGT
AGCTGAGTGGAGGTTGTCTCGAGGTGTTGAAGAACAGACACAAGCTTTCTTTGAAGGCTTTA

ATGAAATTCTTCCCCAGCAATATTTGCAATACTTTGATGCAAAGGAATTAGAGGTCCTTTTAT
GTGGAATGCAAGAGATTGATTTGAATGACTGGCAAAGACATGCCATCTACCGTCATTATGCA
AGGACCAGCAAACAAATCATGTGGTTTTGGCAGTTTGTTAAAGAAATTGATAATGAGAAGA
GAATGAGACTTCTGCAGTTTGTTACTGGAACCTGCCGATTGCCAGTAGGAGGATTTGCTGAT
CTCATGGGGAGCAATGGACCACAGAAATTCTGCATTGAAAAAGTTGGGAAAGAAAATTGGC
TACCCAGAAGTCATACCTGTTTTAATCGCCTGGACCTGCCACCATACAAGAGCTATGAGCAA
CTGAAGGAAAAGCTGTTGTTTGCCATAGAAGAAACAGAAGGATTTGGACAAGAGTAACTTC
TGAGAACTTGCACCATGAATGGGCAAGAACTTATTTGCAATGTTTGTCCTTCTCTGCCTGTTG
CACATCTTGTAAAATTGGACAATGGCTCTTTAGAGAGTTATCTGAGTGTAAGTAAATTAATG
TTCTCATTTAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【００４８】

「ＥＳＣＲＴ-ＩＩＩ（ＩＳＴ１）ポリペプチドに関連するＩＳＴ１因子」とは、微小管相互作用および輸送（ＭＩＴ）ドメイン含有タンパク質、例えばＶＰＳ４を結合することができ、ＮＣＢＩ参照配列アクセッション番号ＮＰ_００１２５７９０８.１と少なくとも約８５％の同一性を有するポリペプチドまたはその断片を意味する。例示的なＩＳＴ１ポリペプチドの配列は以下に提供される。

MHKLSVEAPPKILVERYLIEIAKNYNVPYEPDSVVMAEAPPGVETDLIDVGFTDDVKKG
GPGRGGSGGFTAPVGGPDGTVPMPMPMPMPMPSANTPFSYPLPKGPSDFNGLPMGTYQ
AFPNIHPPQIPATPPSYESVDDINADKNISSAQIVGPGPKPEASAKLPSRPADNYDNFVLPE
LPSVPDTLPTASAGASTSASEDIDFDDLSRRFEELKKKT

【００４９】

「ＩＳＴ１ポリヌクレオチド」とは、ＩＳＴ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。例示的なＩＳＴ１をコードする核酸配列は、ＮＣＢＩ参照配列アクセッション番号ＮＭ_００１２７０９７９.１に対応し、以下に提供される。

CCGCCCGCGCTTGTTGTGCTGAGGCCGAGGGAGTCGCCATTTTGGATGGTGAACCCTGAAGT
CGGTGTCTGCTGCGTTCACGGCAGGATTCGGTTAGCTAATGCACAAGCTGAGTGTGGAAGCC
CCACCCAAAATCCTGGTGGAGAGATACCTGATTGAAATTGCAAAGAATTACAACGTACCCTA
TGAACCTGACTCTGTGGTCATGGCAGAAGCTCCTCCTGGGGTAGAGACAGATCTTATTGATG
TTGGATTCACAGATGATGTGAAGAAAGGAGGCCCTGGAAGAGGAGGGAGTGGTGGCTTCAC
AGCACCAGTTGGTGGACCTGATGGAACGGTGCCAATGCCCATGCCCATGCCCATGCCTATGC
CATCTGCAAATACGCCTTTCTCATATCCACTGCCAAAGGGACCATCAGATTTCAATGGACTG
CCAATGGGGACTTATCAGGCCTTTCCCAATATTCATCCACCTCAGATACCAGCAACTCCCCC
ATCGTATGAATCTGTAGATGACATTAATGCTGATAAGAATATCTCTTCTGCACAGATTGTTG
GTCCTGGACCCAAGCCAGAAGCCTCTGCAAAGCTTCCTTCCAGACCTGCAGATAACTATGAC
AACTTTGTCCTACCAGAGTTGCCATCTGTGCCAGACACACTACCAACTGCATCTGCTGGTGC
CAGCACCTCAGCATCTGAAGACATTGACTTTGATGATCTTTCCCGGAGGTTTGAAGAGCTGA
AAAAGAAAACATAGGTCTCTTAAACCAGGCAACTTTCACGTTTTGGGAGTTGAGACTGAGCA
ATTTCTCCTTGTAACAAAGAATCTCCATGAAATTCTGTTTCATCTGTTAACCGTCACTCAGCA
CAACACTCCCTCTGGGCTCTCTTCCTGCTCCTCCAGATTCTGCTGCTTTCCAGTTCTCTGTTGA

TCCTGAGACTAACAATTGGAGACTGAGGCCAGAGCAACTGGCTCCTGGCAGCTGTGCTTGTC
CGTTTCCTGTCAGAGTGATCCCAGGTTTCCTCCTGGCCCGTCCCATGGTCCCTCCACAGGAGT
GTGAGAGGATGGGGGAAGCACTGTGGGAAGACCACCAAAGATGGCTGGACAGTGGGAGAG
AGCACGTTGTGAAGCATCCCAGCCTCGTGTTGAGGTTCCAGACTTAGAAACAGACCCCTCTG
TACAGGGGGATTGTGGTGAGTGAGAATCAAGGCCACCTTGTGTGTTTTCTCACTCTCGAATG
CAAGTGGGAGAGGGAAAATGACTCGGGACGCCATTGTAACGGTTCCTGGAAGCTGGGCCCT
CTCATTGGCATATACAGTACTCCTCGCTGCAGGGCACTGTCCCACCGGGATCCAGTTGCAAA
GTTTGTCTTGACAGTTGAAGGCCTCGCTTAGTTGTACTGGATTCTCAGGGAGCCCTCTGTGGC
CTTTTGCTTTGCGTGCTGTTTCCCTTGTACCAGAGGGCGGCACCGTGGAAATTCTGTTTTCCC
TGTAGCATATTGTGTTGGATTGCATTACTGGCAGAGAAAGGACAAGGTGCCATTCAAGTCCT
AGGGTGGGCTTCCAGCTGCCTTAATAGAAGTACTCAAGTCTTTTGGGTAGTGAGCTGGAAAG
CCTACAGGAAAAGAGGGGTACCTGTTTTCATTTGAAAACTTTGATTCATGGAACCTTTAAAA
CTAATCTCAGAAAAATTTTTGGTGCCCATGCAGCTGTAGTTGTTCACTGCTTTCCTGGATGGA
TGGGACTCTTATGTCATAACTTCTGTTACTCCTTTGGCCCATAGCTAAGGTCATCCTTCCCCA
CAGGGGTGGCTTTGGGATTGGATGATACAGCTTTTGCTTCTGTGTAGTATACCTGTACATACT
TGTTTCAGGCAGCCTTTCTTTAATGTTTTCAGTTGGTTTGTATTCTGTAGCTCAGTAGCTGCTA
ATAAAGTTAAAGATCCTGTGTCCTGCTTTCTCTACTGTTTGGTCAGATGATGAAGTATAAATC
TGGATTTTAGTGGAGAATATTTTAACCAAGTGATCCATGTAAACCAGCCCTTAGTTTCAGGA
TTCCTGGAGCAGTACAGAGCTCATTTTGATCTCTGTATTTAGATAGCCCAGATAGCATCTGTG
AATTTCCTTGGTCTTCCTCAGTGGCAGGGCTCCGCATCTGCCATGCCTCATCCTTGGATGTTT
ATTTTTAGTAAGTTGCAGTGAGCTCACTTCTGACTGCTTCATTTCCCGCAGCCATCCTGGGCC
ATGGGTGGTGAGTTCTGTTACTTGCTGCTTGGCAGCAGAGCTAGTTTGTCTCGTAGTATTCTT
GCATTGTTAATCCTATCTTGACAGTGCCAAGATCCATAAGAACTTGGGACCAAGGGGATTTT
GATTCCTAACTTACAGAATTAAAAACAAAGTATATTATAATTTTAAAGCTATGCCATGCAAA
GATAAGTAGTAATACGCTAATAAATACTAAGCCAAGTAGGAGATAACAGGATTAAGGTAGT
TCATCTAAAACTTCAGTGTCACTGCCCACTGCTGTCGTGGCTGCTTGCTCAGATGAGGTTTTT
TGGGGCCAACTGATTCCTAACAAATTTGAGAGCTTCTGTAGCAGTGTATCTATTAGTGCAGC
TTCTTTCTGAGTATTGAAGACAAAAAGAGAAAAGTGAGAAAATTGAAATTACTGCTAATAGT
GGAGTAAAAAAAGTACCAAAGATTTTTAAAAAATTAGTAAATGTAAAGATACTATTTCTTTA
ATAATTTGCAGTCAGGCATTGGAGTGTTTCCACTAATGGTTGCGAGCCAACTATTTATAGGA
CAATGGCTATAGAATATTATGTAGTCTTATAAATTGGGTTTCCTAGGAAGATAGCTGGCAGA
GCTTTTGAAACTAATAAAGGGAATATGATACTGTGCATTATAAATTATGTCAGCCCGTCATC
TTAGGGGCAGTTACAGTGGAGCTTTCCCAGTGATATAACAGCATGCTAGTTTATCTTTTAGTT
ACCTACCTTAAGCGACTTTCTTTCTTTTCCAAAGGCCATGAGAATGGCCGAAACGAAAAGAT
TAATTACCACAAGTACCATCAAGATGACACTGGTGAGGATCAGAAAGGTGCCCAGGACTGG
GTCTAAAGCGAAAACCTGGGAAAACAATAAGAACACTTGCAGTGACTGACAATTTAGTTTA
TACTTTACAAACATAAGCTATATGCTAGTGTTTGGGATCTTATCAGAAGAAAAGCTTATCCG

AAGGAAACTTAGGGAGAGAGTCAAAAGATAATAAGAAGGAAAATACTTTTAAATGGACAG
AAGAGCAGGAATGACTCATTTTAAGGAGGTTAAGATAATTGTGACTGCAGGGCTTTCACAA
GAAAACAGGTGAGTTGCAGTGGAATTGGAAATGATTCAAATGTCACATGAGTTTTGGCAAA
AAATACATCTAATCATGGAAGCTAAAAGTGGGAGGGGGGTAAGCAAACACTGAAAGATTAA
ATGCATACCAGAAATGAGAATGCACACTGTCTCTGCCATATCAAGAAACTACAACCCTAAAC
ACAGGAGCATTCCAATAAAAGTTAACAGGTTGGCCACAGAAAA

【００５０】
「ＳＭＡＤファミリーメンバー４（ＳＭＡＤ４）ポリペプチド」とは、ＴＧＦ-β受容体などの、標的遺伝子の転写活性化に関連するシグナル伝達活性を有し、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＨＡ３４１８６.１と少なくとも約８５％の同一性を有するポリペプチドまたはその断片を意味する。例示的なＳＭＡＤ４ポリペプチドの配列は以下に提供される。
PEYWCSIAYFEMDVQVGETFKVPSSCPIVTVDGYVDPSGGDRFCLSQLSNVHRTEAIERA

【００５１】
「ＳＭＡＤ４ポリヌクレオチド」とは、ＳＭＡＤ４ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。例示的なＳＭＡＤ４をコードする核酸配列は、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＫＦ５７２４３３.１に対応し、以下に提供される。
ATTTATTTCCTATAGCTCCTGAGTATTGGTGTTCCATTGCTTACTTTGAAATGGATGTTCAGG
TAGGAGAGACATTTAAGGTTCCTTCAAGCTGCCCTATTGTTACTGTTGATGGATACGTGGAC
CCTTCTGGAGGAGATCGCTTTTGTTTGAGTCAACTCTCCAATGTCCACAGGACAGAAGCCAT
TGAGAGAGCAAGGTATTGATTGTATAGTCAGATAGTT

【００５２】
「ＵＮＣ５１様キナーゼ３（ＵＬＫ３）ポリペプチド」とは、キナーゼ活性を有し、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＢＡＧ５７５４１.１と少なくとも約８５％の同一性を有するポリペプチドまたはその断片を意味する。例示的なＵＬＫ３ポリペプチドの配列は以下に提供される。
MQRNGSASRGLEKTRLRLCREARIPESAFLTGLTRESWEARCWCAKDTREVVAIKCVA
KKSLNKASVENLLTEIEILKGIRHPHIVQLKDFQWDSDNIYLIMEFCAGGDLSRFIHTRRIL
PEKVARVFMQQLASALQFLHERNISHLDLKPQNILLSSLEKPHLKLADFGFAQHMSPWD
EKHVLRGSPLYMAPEMVCQRQYDARVDLWSMGVILYEALFGQPPFASRSFSELEEKIRS
NRVIELPLRPLLSRDCRDLLQRLLERDPSRRISFQDFFAHPWVDLEHMPSGESLGRATAL
VVQAVKKDQEGDSAAALSLYCKALDFFVPALHYEVDAQRKEAIKAKVGQYVSRAEEL
KAIVSSSNQALLRQGTSARDLLREMARDKPRLLAALEVASAAMAKEEAAGGEQDALDL
YQHSLGELLLLLAAEPPGRRRELLHTEVQNLMARAEYLKEQVKMRESRWEADTLDKE
GLSESVRSSCTLQ

【００５３】
「ＵＬＫ３ポリヌクレオチド」とは、ＵＬＫ３ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。例示的なＵＬＫ３をコードする核酸配列は、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＫ２９４２４５.１に対応し、以下に提供される。

AGAATGCAAAGAAATGGATCAGCTAGCCGAGGGTTGGAGAAGACCAGGCTGAGGCTGTGTC
GGGAAGCCAGGATTCCAGAATCAGCATTCCTCACTGGCCTCACAAGGGAAAGCTGGGAAGC
CCGGTGCTGGTGTGCAAAGGACACTCGTGAAGTGGTAGCCATAAAGTGTGTAGCCAAGAAA
AGTCTGAACAAGGCATCGGTGGAGAACCTCCTCACGGAGATTGAGATCCTCAAGGGCATTC
GACATCCCCACATTGTGCAGCTGAAAGACTTTCAGTGGGACAGTGACAATATCTACCTCATC
ATGGAGTTTTGCGCAGGGGGCGACCTGTCTCGCTTCATCCATACCCGCAGGATTCTGCCTGA
GAAGGTGGCGCGTGTCTTCATGCAGCAATTAGCTAGCGCCCTGCAATTCCTGCATGAACGGA
ATATCTCTCACCTGGATCTGAAGCCACAGAACATTCTACTGAGCTCCTTGGAGAAGCCCCAC
CTAAAACTGGCAGACTTTGGTTTCGCACAACACATGTCCCCGTGGGATGAGAAGCACGTGCT
CCGTGGCTCCCCCCTCTACATGGCCCCCGAGATGGTGTGCCAGCGGCAGTATGACGCCCGCG
TGGACCTCTGGTCCATGGGGGTCATCCTGTATGAAGCCCTCTTCGGGCAGCCCCCCTTTGCCT
CCAGGTCGTTCTCGGAGCTGGAAGAGAAGATCCGTAGCAACCGGGTCATCGAGCTCCCCTTG
CGGCCCCTGCTCTCCCGAGACTGCCGGGACCTACTGCAGCGGCTCCTGGAGCGGGACCCCAG
CCGTCGCATCTCCTTCCAGGACTTTTTTGCGCACCCCTGGGTGGACCTGGAGCACATGCCCA
GTGGGGAGAGTCTGGGGCGAGCAACCGCCCTGGTGGTGCAGGCTGTGAAGAAAGACCAGGA
GGGGGATTCAGCAGCTGCCTTATCACTCTACTGCAAGGCTCTGGACTTCTTTGTACCTGCCCT
GCACTATGAAGTGGATGCCCAGCGGAAGGAGGCAATTAAGGCAAAGGTGGGGCAGTACGTG
TCCCGGGCTGAGGAGCTCAAGGCCATCGTCTCCTCTTCCAATCAGGCCCTGCTGAGGCAGGG
GACCTCTGCCCGAGACCTGCTCAGAGAGATGGCCCGGGACAAGCCACGCCTCCTAGCTGCCC
TGGAAGTGGCTTCAGCTGCCATGGCCAAGGAGGAGGCCGCCGGCGGGGAGCAGGATGCCCT
GGACCTGTACCAGCACAGCCTGGGGGAGCTACTGCTGTTGCTGGCAGCGGAGCCCCCGGGC
CGGAGGCGGGAGCTGCTTCACACTGAGGTTCAGAACCTCATGGCCCGAGCTGAATACTTGA
AGGAGCAGGTCAAGATGAGGGAATCTCGCTGGGAAGCTGACACCCTGGACAAAGAGGGACT
GTCGGAATCTGTTCGTAGCTCTTGCACCCTTCAGTGACCCTAGAAGAATGATTGGACAGTGC
TGAGACCCCCATATCCCAGAGTCCCCAGCCTCCCTCAGGTTACTCTGCACCCCACAGATGGT
TTGATGGCTGTGCTGTATACTGGAGGGGAGGGCAGGACTCTGGGAGAACAGCACTTCTTTCA
TGAGACCTTTGTTACTCGGTGGTTACT

【００５４】

「ＶＰＳ４Ａポリペプチド」とは、ＡＴＰアーゼ活性を有し、ＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿０３７３７７.１と少なくとも約８５％の同一性を有するポリペプチドまたはその断片を意味する。例示的なＶＰＳ４Ａポリペプチドの配列は以下に提供される。

MTTSTLQKAIDLVTKATEEDKAKNYEEALRLYQHAVEYFLHAIKYEAHSDKAKESIRAKCVQYL
DRAEKLKDYLRSKEKHGKKPVKENQSEGKGSDSDSEGDNPEKKKLQEQLMGAVVMEKPNIRW
NDVAGLEGAKEALKEAVILPIKFPHLFTGKRTPWRGILLFGPPGTGKSYLAKAVATEANNSTFFS
VSSSDLMSKWLGESEKLVKNLFELARQHKPSIIFIDEVDSLCGSRNENESEAARRIKTEFLVQMQG
VGNNNDGTLVLGATNIPWVLDSAIRRRFEKRIYIPLPEEAARAQMFRLHLGSTPHNLTDANIHEL
ARKTEGYSGADISIIVRDSLMQPVRKVQSATHFKKVCGPSRTNPSMMIDDLLTPCSPGDPGAME
MTWMDVPGDKLLEPVVCMSDMLRSLATTRPTVNADDLLKVKKFSEDFGQES

【００５５】

「ＶＰＳ４Ａポリヌクレオチド」とは、ＶＰＳ４Ａポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。例示的なＶＰＳ４Ａをコードする核酸配列は以下に提供される。

GCCCTCGGACTCGGCTCCCGCTGCGAGCGGCCGCCCTGCCCGCGCACCGCGCTCAGC
GCCCACCGCCGGGCTTCCCGCGCCGGACCCAGTACCTCGGCTCCCCGGGGCCGGAC
CGAGGCCGCAAGCAGCGCCGCGGGGTGTGGGGCGGACCCAGGAGATGAAATGACA
ACGTCAACCCTCCAGAAAGCCATTGATCTGGTGACGAAAGCCACAGAGGAGGACAA
AGCCAAGAACTACGAGGAGGCGCTGCGGCTGTACCAGCATGCGGTGGAGTACTTCC
TCCACGCTATCAAGTATGAGGCCCACAGCGACAAGGCCAAGGAGAGCATTCGAGCC
AAGTGCGTGCAGTACCTAGACCGGGCCGAGAAGCTGAAGGATTATTTACGAAGCAA
AGAGAAACACGGCAAGAAGCCAGTCAAAGAGAACCAGAGTGAGGGCAAGGGCAGT
GACAGTGACAGTGAAGGGGATAATCCGGAGAAAAAGAAACTGCAAGAACAGCTGA
TGGGTGCCGTCGTGATGGAGAAGCCCAACATACGGTGGAACGACGTGGCCGGGCTG
GAGGGGGCCAAGGAGGCCCTCAAAGAAGCTGTCATTTTGCCAATCAAATTCCCACA
CTTGTTCACAGGCAAGCGCACCCCCTGGCGGGGGATTCTGCTGTTCGGACCCCCTGG
CACAGGGAAATCCTACCTGGCCAAAGCCGTGGCAACAGAGGCCAACAACTCCACCT
TCTTCTCTGTGTCCTCCTCAGATCTGATGTCCAAGTGGCTGGGGGAGAGTGAAAAGC
TGGTCAAGAACCTGTTTGAGCTGGCCAGGCAGCACAAGCCCTCCATCATCTTCATCG
ATGAGGTGGATTCCCTCTGCGGGTCCCGAAATGAAAATGAGAGTGAGGCCGCCCGG
AGGATCAAAACGGAGTTCTTGGTCCAGATGCAGGGGGTGGGGAATAACAATGATGG
GACTCTGGTTCTTGGAGCCACAAACATCCCATGGGTGTTGGATTCGGCCATCAGGAG
GAGGTTTGAAAAACGAATTTATATCCCCTTGCCGGAGGAAGCTGCCCGCGCCCAGA
TGTTCCGGTTGCATCTCGGGAGCACTCCCCACAACCTCACGGATGCAAACATCCACG
AGCTGGCCCGGAAGACGGAAGGCTACTCGGGCGCGGACATCAGCATCATCGTGCGG
GACTCTCTCATGCAGCCCGTGAGGAAGGTGCAGTCGGCCACACACTTCAAAAAGGT
CTGTGGCCCCTCTCGCACCAACCCCAGCATGATGATTGATGACCTCCTGACTCCATG
CTCACCAGGGGACCCAGGAGCCATGGAGATGACTTGGATGGATGTCCCTGGGGACA
AACTCTTAGAGCCTGTGGTTTGCATGTCGGACATGCTGCGGTCTCTGGCCACCACCC
GGCCCACGGTGAATGCAGACGACCTCCTGAAAGTGAAGAAATTCTCAGAGGACTTT
GGGCAAGAGAGTTAAAAGCTGCTTCACTTGGGCAATGGTGAAGGTGGGAGGTTGAT
TGGGGCAAATCCAGGCACTCCCCATGTCAACAGCCAGACAGGGCTCCAGGGCTTGT
CCCAGTCAATACAGAGTTCCCTCTGCTGTCTGGCCGTCTGCCAGGGAGCCAGAAGGA
AGGGCCTTGCAGCCACAGAGACACTCCACTGCCCTGGGGCACACAGTGGACACTGC
TCTTCCTACTTCCTCCTCTCCTGGATGCTCATCAGCTCCTTCTGCCTCCCCCCCTTTTT
TTTCCATCTTTTGTTCCCCTAAATTAATGCTGCTTGGATTTTCATCTTATTTATAAAGA
TAAAATCACCTGGAAGTGTCAAGGAGTGGGGCGGGGTGGCGGGGGAGAAGCAGCC
GTGCTGCCAGGTCACCCAGACCTCCAGACAGCCGGCTAGCCCCACTGCCCGTTCCTT

TTACGCCCAAGTTTTGCTCCTTGAGAGCAGATTGGCTGATGCCCCTGCAACCCCAGC
CCAAGCTCTGCCTCAAAGACCGAGTGACATAAGCCATTCCCACCCTCCTAGGTTCAC
ATCCAGGGCTGTGTCTTCCTTGGGGGAGGAGATGGTGTCGTTTAGATCAGGGTAAGG
CAGTCAGGCGGGTGTTCACCACTGCCTTTTCTTCCTCTGAGCGTGAGAACACTGAAC
CCAGCCACTGCCCCTGGGTCCCTGTCCTGGAAATGGTCTAATAAATCCTTTTCCCTTC
TTGAGCTACCCAAGTGATCTCATCTTTCCTTGACTCTTAACTGAGACTCTGAAGGGC
CACCCTTGCTTCCAATTAAAAGACCCTCTGGTTTTCTGTCTCCTCTCTTTTCTAAAGC
AGAGCAGGAAACAGAACACTGCAGTTCTTAGGCCTGTTCTCCAGTCAGGTGTGCAA
GGCCTCCTCCCCTTAAGGCCTCAGAAGTTTGGCTGGGGATGTTTGTGGGATCCAGAC
AGTTCTTGCCGTTGTTCGGCCTACAGATCAGAGACTGCAAAGTGGGAGCCCTGCGTA
CCAGACCCGTCCTGCAGCTGTGTTTGTTTGGTTTGGTCTGCCGCTAACATTTAAAAGT
CGAGAGTTGCTGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGCCGCTAA
CATTTAAAAGTCGAGAGTTGCTGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTT
TGGGAGGCCGACGCGGGCGGATCACAAGGTCAGGAAATCGAGAACATCCTGGCTAA
CACAGTGAAACCCCGTCTCACTAAAAATAAAAAAATTAGCCGGGCGTGGTGGTGGG
CGCCTGCAGTCCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATGGCGTGAACCCGGG
GGACGGAGCTTGCAGTGAGCCGAGATCGCGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCGACAG
AGCAAGACTCTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAGTCGAGAGTTGACATAAAAATTCAG
AATTCTGACTTCTAGAAGATTAAATTAGGTAATGTTGGGCCTGCGTCCTCATGGGGC
AGCCTGTCAGCGGCCACTAAGTAGAGGCTGCTCTGTACAGAAGGGGTCCCCCATCC
CCACTCATCTGTGTTGCCTGCCCAGATAGCCCCATGGCCATTTCAGTTTGCGACCCCC
AACAGACCAAGGACCCAGAGCTGGCAGCCCTGGACCCACGTCCGGCAGGCAGTGAA
GCTGCAGAGGCTGTCCCACGTTTACCCCATGCATATAAACAGACCAAAGTCAAAGC
ACATTCACACAGAAAGACCTGGCCTAGTAAATGAAGCTTATAGCCTGCAAAGGGCT
TTGTTCCAACCTTCCCTCTCCAAAACCCAGTACTGCTCCTCTACCTTTCAAACCTGGT
TGGGCCAGAACTGATTACATGGCCAACTCTTGGCTCACACTGGGCTTGCACTGGGCC
ATTTCTTTGCTCTGGTTCAGAGCCTCTGCAGAAGTGAGCTAACTTTGGATCAGTAGC
TCCAACACTTGGCTCCAGTGCTGGCAGGTTACCCCTCAACCATAGCAGCTGGGATCT
TTGTGGCTTGGGGGTGCTTGTGTAAGTTCTTGGTTATGTGCCCTCAGCCACCAGGAT
ATGAACCGTGTCTGCAGAGCTTCACTTTAGTGAGCTTACAAGTTTTTAAATTTTTACT
TCTAGTTACATTTACTTGAATCAGAACGTTGTTTCCTCATTCCTACTGCTTAAACACC
TTGACAAGTCCTAGGGGTTAACAAAGGTTAGCATGGCTATGGTCCATCCCTGTGCTC
TAGTTAGAGCGTGAAGACACCTGACTTTCCAGTTGTCTCTCTCCATGACCAGCAACA
GGAACCACTGACGCTGAACTTTGGACAGTGGCCTCAGACTCTGGCTGCCAGCACAC

AACCTGCCATCATCGATGTTAAACATGCTGACATGTGCAGAGGAGTTTCCTCCCTGA
AATGCTCTGAAATTCACTTCTCTGCCTGGGGATTCTGTTATAAACCTTCTGCCTACAT
TGGCTTTCACTGTGGAAGTTGATTTCTAAAACTCTGATGAGCTCACAACGTTGACAT
GTATATGCGTTTTTTGTGAGTGCTTCCTGCTCAAAGTGGGAGAGATTTTACTGGAAA
TGCAATAAAGTTTGCATTTTATTGCTA

【００５６】

「ＶＰＳ４Ｂポリペプチド」とは、ＡＴＰアーゼ活性を有し、ＮＣＢＩアクセッションＮＰ＿００４８６０.２と少なくとも約８５％の同一性を有するポリペプチドまたはその断片を意味する。例示的なＶＰＳ４Ｂポリペプチドの配列は以下に提供される。

MSSTSPNLQKAIDLASKAAQEDKAGNYEEALQLYQHAVQYFLHVVKYEAQGDKAKQS
IRAKCTEYLDRAEKLKEYLKNKEKKAQKPVKEGQPSPADEKGNDSDGEGESDDPEKKK
LQNQLQGAIVIERPNVKWSDVAGLEGAKEALKEAVILPIKFPHLFTGKRTPWRGILLFGP
PGTGKSYLAKAVATEANNSTFFSISSSDLVSKWLGESEKLVKNLFQLARENKPSIIFIDEID
SLCGSRSENESEAARRIKTEFLVQMQGVGVDNDGILVLGATNIPWVLDSAIRRRFEKRIY
IPLPEPHARAAMFKLHLGTTQNSLTEADFRELGRKTDGYSGADISIIVRDALMQPVRKVQ
SATHFKKVRGPSRADPNHLVDDLLTPCSPGDPGAIEMTWMDVPGDKLLEPVVSMSDML
RSLSNTKPTVNEHDLLKLKKFTEDFGQEG

【００５７】

「ＶＰＳ４Ｂポリヌクレオチド」とは、ＶＰＳ４Ｂポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。例示的なＶＰＳ４Ｂをコードする核酸配列は以下に提供される。

AGAGGGCCTCGGGATTGCGGAAGTTTGGTGGGGAGGGTCGGAGCTCTGGTGGAGAG
AGTGTTGTCTAAAACAAGTTCCGGAAGGGAGGCTGCCCTTCGCGGTCCGAGAACCA
CCGGCCTCCCCAGTTTGAGGGCTGTTACCCCGTGCGCGCTTCGACGTTGCTGCTGTT
GGCTCTCCTCGCCCCTCGTTCCCTTGGGAACCGCCTGGGAACTCCGCCATGTCATCC
ACTTCGCCCAACCTCCAGAAAGCGATAGATCTGGCTAGCAAAGCAGCGCAAGAAGA
CAAGGCTGGGAACTACGAAGAAGCCCTTCAGCTCTATCAGCATGCTGTGCAGTATTT
TCTTCATGTCGTTAAATATGAAGCACAGGGTGATAAAGCCAAGCAAAGTATCAGGG
CAAAGTGTACAGAATATCTTGATAGAGCAGAAAAACTAAAGGAGTACCTGAAAAAT
AAAGAGAAAAAAGCACAGAAGCCAGTGAAAGAAGGACAGCCGAGTCCAGCAGATG
AGAAGGGGAATGACAGTGATGGGGAAGGAGAATCTGATGATCCTGAAAAAAAGAA
ACTACAGAATCAACTTCAAGGTGCCATTGTTATAGAACGACCAAATGTGAAATGGA
GTGACGTTGCTGGACTTGAAGGAGCCAAAGAAGCACTGAAAGAGGCTGTGATACTG
CCTATTAAATTTCCTCATCTTTTTACAGGCAAGAGAACACCTTGGAGGGGAATCCTA
TTATTTGGGCCGCCTGGAACAGGAAAGTCCTACTTAGCCAAAGCTGTAGCAACAGA
AGCCAACAACTCAACATTTTTTTCAATATCTTCCTCTGATCTTGTTTCTAAGTGGCTA
GGTGAAAGTGAAAAACTGGTTAAGAATTTATTCCAACTTGCCAGAGAGAACAAGCC

50

CTCCATTATCTTCATTGATGAAATTGATTCTCTCTGTGGTTCAAGAAGTGAAAATGA
AAGTGAAGCCGCACGTAGAATTAAGACGGAGTTCCTAGTGCAAATGCAAGGGGTTG
GTGTAGACAATGATGGAATTTTGGTTCTGGGAGCTACAAATATACCCTGGGTTCTGG
ATTCTGCCATTAGGCGAAGATTTGAGAAACGAATTTATATTCCCTTGCCGGAACCCC
ATGCCCGAGCAGCAATGTTTAAACTGCACCTAGGGACCACTCAGAACAGTCTCACG
GAAGCAGACTTTCGGGAACTTGGGAGGAAAACAGATGGTTATTCAGGGGCAGATAT
AAGTATCATTGTACGTGATGCCCTTATGCAGCCTGTTAGGAAAGTACAGTCAGCTAC
TCATTTTAAAAAGGTTCGCGGACCTTCCCGAGCTGATCCTAACCATCTTGTAGATGA
TCTGCTAACACCTTGCTCTCCAGGTGACCCTGGTGCCATTGAAATGACATGGATGGA
TGTCCCTGGAGATAAACTTTTGGAGCCAGTTGTTTCCATGTCGGATATGTTGCGGTC
ACTATCTAACACAAAACCTACAGTCAATGAACATGACTTGTTGAAATTAAAGAAGTT
TACAGAAGATTTTGGTCAAGAAGGCTAAGCCAAAGACAAGGAAGATGCTTACCATA
TGTATTCTTTCTTTCATAGATATTTTTGTCTATTTGGATCGCATTAATTGTTTCCAGTA
AAACTCTTTTACCACAGGGAAATACACATCTCACTTCAGAGTTCCATTAGGTTTTAT
ATTGTACTTTTCCTCCATTACTTATTAAATACTCCTATTAACAAAAGGTACAAAATAA
CAGGTTATGAGGAAATGAGCGATATATGAACGGCATAAAAACAGAAATTACCCAGT
AAAAAGGATGTCAGAAATTGACATACAAATATTTACAATTTTTATGAATGGTGGTCT
TTGCAAAGAGCATTTATATTTTCTTTTTTTTTTACTAAAATGATATAGGGTTTATTTTA
TATTTTCAAAAAAATTGTTAAACATCATTCTTATCAATGTAAAATTTACGTTATTAAA
AAATTACAAATGATAGAATCTTTACTCAGGGATGGGCAATAAAACAGCAAAGAGCT
TTGTGATTGGGTTTGAAAGATTTTGAATTATAGACAGTGCTCTTAATAGTTTTTAATA
AGTTGATATTTTTTTCTGTGTAGATTTAAATAATTTCTTTAAAAGCGTAAGCTTTGGC
TGGGCATGGTGGCTTATGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCTACGATGGGTGGA
TCACCTGAGGTCAGGAGTTCAAGACCAGTCTGGCCAACATGGTGAAATGCCGTCTCT
ACTAAAAATACAAAAATTAGCTGGGCATGATGGCGAGTGTCTGTAATCCCAGCTAC
TCAGGAGGCTGAGGCGGGAGAATCACTTGAACCTGGGAGGCAGAGGTTGCAGTGAG
CTGAGATCGCGCTACTGCATTCCAGCCTGGGCGCCGAGATAGCGCCATTGCACTCCA
GCCTGGGCGACTGAATAAAACTCTGTCTCAAAAAAAAACAAAAACGGTAAGCTTTT
ATATTTAATTAACTGATACCTTTCACTGTGCAATCTCAAGAGGAAGATTTTCTAAATT
AGACATTGTCTTTACCTTAAAGAAGAAAATTGTCTATTTCAGTGTCTTTTTTAGCAAG
ATTGACCAAAACAGGTGGTAGGTGTGTAATTTTTAACTGTCATGAAATACTGTAATG
CGCACCTTTGCTAATAAGGAAATGGTCTCCCTTTGAATTATGGGAAGTTTCTTGTCTG
TGATATGGGGTGTCTGTGTACATATATGTATATTTCCTTTTTTAATACAGGATAATAA
TATGGGGTCTTGTCCTTCACCTTTTAAGTTCAGGGAACAGTTTGTCCTGACCACACAT

ATGTTATCAGTGTAATGCTTTATGAAGCTTTAGAAATGAGCTCATGACTCATTAAAA
AATAATAAACGATGCTATTTTAATATTTTCAAATAAATAATCTGAGGATGTGTTTCA
TACTTTAGCATCAACGCTGAGTTGTGCCTTGTAGAATTGCATTGTCTATACATGCAA
AAGACTATTAAGTTAGGATGAACTAGATTCCCTAATTACAGTGAAATTCTATCTTGC
AAATGCTATAGAATAACTTGCATTTTAAAGTGTATTTGCACATTTTACATATGCTATG
TGGTTGCCTTTGGGTTTTCTGTACAGATTGTTTTTGTTATTAAATGGAAAAGGCCTGA
ATTATGCTCTTATGTGAAGTAAATTGATATAACCTATTGACTGTATTCTGTGTATTAT
TCTTTATTTTGGGACCTTCTGTGTAAAAGAAAATATTACCTAAATTGGTTAGATACA
AAGAAATCATTAAAATTATTAATGTATATATGAAAA

【００５８】

「小胞輸送１（ＶＴＡ１）ポリペプチド」とは、多胞体の輸送に関連する活性を有し、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＡＨ０６９８９．１と少なくとも約８５％の同一性を有するポリペプチドまたはその断片を意味する。例示的なＶＴＡ１ポリペプチドの配列は以下に提供される。

MAALAPLPPLPAQFKSIQHHLRTAQEHDKRDPVVAYYCRLYAMQTGMKIDSKTPECRK
FLSKLMDQLEALKKQLGDNEAITQEIVGCAHLENYALKMFLYADNEDRAGRFHKNMIK
SFYTASLLIDVITVFGELTDENVKHRKYARWKATYIHNCLKNGETPQAGPVGIEEDNDIE
ENEDAGAASLPTQPTQPSSSSTYDPSNMPSGNYTGIQIPPGAHAPANTPAEVPHSTGVAS
NTIQPTPQTIPAIDPALFNTISQGDVRLTPEDFARAQKYCKYAGSALQYEDVSTAVQNLQ
KALKLLTTGRE

【００５９】

「ＶＴＡ１ポリヌクレオチド」とは、ＶＴＡ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。例示的なＶＴＡ１をコードする核酸配列は、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＢＣ００６９８９．１に対応し、以下に提供される。

AGGAAGTGGTGAGTTCGGAGTAGAGATGGCCGCGCTTGCACCGCTGCCCCCGCTCCCCGCAC
AGTTCAAGAGCATACAGCATCATCTGAGGACGGCTCAGGAGCATGACAAGCGAGACCCTGT
GGTGGCTTATTACTGTCGTTTATACGCAATGCAGACTGGAATGAAGATCGATAGTAAAACTC
CTGAATGTCGCAAATTTTTATCAAAGTTAATGGATCAGTTAGAAGCTCTAAAGAAGCAGTTG
GGTGATAATGAAGCTATTACTCAAGAAATAGTGGGCTGTGCCCATTTGGAGAATTATGCTTT
GAAAATGTTTTTGTATGCAGACAATGAAGATCGTGCTGGACGATTTCACAAAAACATGATCA
AGTCCTTCTATACTGCAAGTCTTTTGATAGATGTCATAACAGTATTTGGAGAACTCACTGATG
AAAATGTGAAACACAGGAAGTATGCCAGATGGAAGGCAACATACATCCATAATTGTTTAAA
GAATGGGGAGACTCCTCAAGCAGGCCCTGTTGGAATTGAAGAAGATAATGATATTGAAGAA
AATGAAGATGCTGGAGCAGCCTCTCTGCCCACTCAGCCAACTCAGCCATCATCATCTTCAAC
TTATGACCCAAGCAACATGCCATCAGGCAACTATACTGGAATACAGATTCCTCCGGGTGCAC
ACGCTCCAGCTAATACACCAGCAGAAGTGCCTCACAGCACAGGTGTAGCAAGTAATACTAT
CCAACCTACTCCACAGACTATACCTGCCATTGATCCCGCACTTTTCAATACAATTTCCCAGGG

GGATGTTCGTCTAACCCCAGAAGACTTTGCTAGAGCTCAGAAGTACTGCAAATATGCTGGCA
GTGCTTTGCAGTATGAAGATGTAAGCACTGCTGTCCAGAATCTACAAAAGGCTCTCAAGTTA
CTGACGACAGGCAGAGAATGAAGCCTTTGTATGACAGACCCATGTATTTTTGGCATGAGGAA
CTAACAGTCCATTACTCTATCTTCAGCCTATCAGGATCACAGTTTTAAGGAAGACTTGGTTTT
GTTGAATATGACAATGAAATCTGTGTGTATCAGATTTTTATTGAAGCATTCATCAGCAGCCTC
AACCAGTTTTCATTGTCCATTTACTAGATTCAATCGTCTCTGAGTATATAGGGCTGATGTTAG
CAAGACCCTAAAAATGTCCATTGAACCCTGCTTCAAAAAATGAAAACACACCTCTATAAAAT
GTGTACTGGGAATAAGCTTTGTATTTACATACATTAGGGGAATTTTTTAAAATCTGTAATGTT
TGGACAAACAGATGATATTACTTTGCTATAAAATTATAAATGTAACTTTTAATAAAGATAGC
CAGAATATTCTAAATTAGAAATTACGTTTTTGTTTCCCTCAAGACATAAAACAAATATAAAC
ATTCTAAACTGCTGGATGAATCTGAAAAGACATTAAGTTCAAATTTTAATTTATTCTCATATT
AAATATAACTCCATTAAAAGTTTAAAATTTCATGGGAGAAAATATAATAAGGTAAAGAGGT
AGAATCACTTTCAGACTTAAGAATAATGTTGATTTCCCAAGTGCTTTACCTTATCTGTTAAAG
CGTAAGATGAATTGGTATTTGCTTCATAGGCAGTTTGACTGCATGTATTAGAGAATGAAAAG
AAGATATTTGTAGTAATGCCTGGAAACTTGGTGCTTTAAATTAAGGTACTCCTCTGCTGCTGT
AGAATGGATTCCACACAGTGGATAGCTATGGGTGATTCAGAATATTATGTTTAGATTCCCAT
TTGTTAAGTTTATAAGTTTTGTGGGGAATTATGAACTTACTGTGTACTACCTGCATTTGTGCT
GTGTGAAAAATAAATACAAGGATTCGTTTAGCTAATTCAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAA

【００６０】

「作用物質」とは、任意の小分子化学化合物、抗体、核酸分子もしくはポリペプチド、またはこれらの断片を意味する。本開示において使用するための作用物質としては、抗VPS4A抗体、VPS4A siRNA、VPS4A shRNA、VPS4A miRNA、VPS4Aリボザイム、VPS4Aアンチセンス RNA、VPS4A発現を減少させる核酸、VPS4A核酸発現を減少させる少なくとも1つの核酸を発現するベクター、抗VPS4B抗体、VPS4B siRNA、VPS4B shRNA、VPS4B miRNA、VPS4Bリボザイム、VPS4Bアンチセンス RNA、VPS4B発現を減少させる核酸、VPS4B核酸発現を減少させる少なくとも1つの核酸を発現するベクター; 抗ULK3抗体、ULK3 siRNA、ULK3 shRNA、ULK3 miRNA、ULK3リボザイム、ULK3アンチセンス RNA、ULK3発現を減少させる核酸、ULK3核酸発現を減少させる少なくとも1つの核酸を発現するベクター; 抗CHMP1A抗体、CHMP1A siRNA、CHMP1A shRNA、CHMP1A miRNA、CHMP1Aリボザイム、CHMP1Aアンチセンス RNA、CHMP1A発現を減少させる核酸、CHMP1A核酸発現を減少させる少なくとも1つの核酸を発現するベクター; 抗CHMP1B抗体、CHMP1B siRNA、CHMP1B shRNA、CHMP1B miRNA、CHMP1Bリボザイム、CHMP1Bアンチセンス RNA、CHMP1B発現を減少させる核酸、CHMP1B核酸発現を減少させる少なくとも1つの核酸を発現するベクター; 抗IST1抗体、IST1 siRNA、IST1 shRNA、IST1 miRNA、IST1リボザイム、IST1アンチセンス RNA、IST1発現を減少させる核酸、IST1核酸発現を減少させる少なくとも1つの核酸を発現するベクター; 抗VTA1抗体、VTA1 siRNA、VTA1 shRNA、VTA1 miRNA、VTA1リボザイム、VTA1アンチセンス RNA、VTA1発現を減少させる核酸、VTA1核酸発現を減少させる少なくとも1つの核酸を発現するベクター; 抗IST1抗体、IST1 siRNA、IST1 shRNA、IST1 miRNA、IST1リボザイム、IST1アンチセンス RNA、IST1発現を減少させる核酸、IST1核酸発現を減少させる少なくとも1つの核酸を発現するベクター、およびそれらの任意の組み合わせが挙げられ得るが、これら

に限定されない。作用物質のさらなる非限定的な例としては、VPS4Aを標的とするガイドRNA、VPS4Bを標的とするガイドRNA、ULK3を標的とするガイドRNA、CHMP1Aを標的とするガイドRNA、CHMP1Bを標的とするガイドRNA、VTA1を標的とするガイドRNA、IST1を標的とするガイドRNA、標的指向性の遺伝子編集のためのまたはCRISPR干渉のためのポリペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、およびこれらの様々な組み合わせが挙げられる。作用物質はまた、VPS4A、VPS4B（例えば、MSC1094308）、ULK3（例えば、SU6668）、CHMP1A、CHMP1B、VTA1またはIST1の小分子阻害剤であり得る。

【００６１】

「改善する」とは、疾患の発症または進行を減少、抑制、減弱、低減、停止または安定化させることを意味する。

【００６２】

「変化」とは、本明細書に記載されるものなどの標準的な本技術分野で公知の方法によって検出される遺伝子またはポリペプチドの発現レベルまたは活性の変化（増加または減少）を意味する。本明細書で使用される場合、変化は、発現レベルの10％の変化、好ましくは25％の変化、より好ましくは40％の変化、最も好ましくは発現レベルの50％またはそれを超える変化を含む。

【００６３】

「類似体」とは、同一ではないが、類似の機能的または構造的特徴を有する分子を意味する。例えば、ポリペプチド類似体は、対応する天然に存在するポリペプチドの生物学的活性を保持するが、天然に存在するポリペプチドと比較して類似体の機能を増強するある種の生化学的修飾を有する。このような生化学的修飾は、例えばリガンド結合を変化させることなく、類似体のプロテアーゼ耐性、膜透過性、または半減期を向上させることができる。類似体は、非天然アミノ酸を含み得る。

【００６４】

「アンチセンス核酸」とは、RNA-RNAまたはRNA-DNA相互作用によって標的RNAに結合し、標的RNAの活性を変化させる非酵素的核酸分子を意味する（総説については、SteinおよびCheng. Science 261:1004-1012, 1993; Woolfら、米国特許第5,849,902号を参照）。典型的には、アンチセンス分子は、アンチセンス分子の単一の連続した配列に沿って標的配列に相補的である。しかしながら、ある特定の態様においては、アンチセンス分子は、基質分子がループを形成するように基質に結合することができ、および/またはアンチセンス分子は、アンチセンス分子がループを形成するように結合することができる。したがって、アンチセンス分子は、2つ（またはそれより多く）の不連続な基質配列に相補的であり得るか、またはアンチセンス分子の2つ（またはそれより多く）の不連続な配列部分は、標的配列に相補的であり得るか、またはその両方であり得る。アンチセンス戦略の総説については、Schmajuk NA et al. J Biol Chem, 274 (31): 21783-21789, 1999; Delihas N et al., Nat Biotechnol. 15 (8): 751-753, 1997; Aboul-Fadl T, Curr Medicinal Chem 12:763-771, 2005参照）。

【００６５】

本開示では、「含む（comprises）」、「含む（comprising）」、「含有する（containing）」および「有する（having）」などは、米国特許法でこれらに定められている意味を有することができ、「含む（includes）」、「含む（including）」などを意味することができる。「から本質的になる（consisting essentially of）」または「から本質的になる（consists essentially）」も同様に、米国特許法において定められた意味を有し、本用語は非限定的であり、列挙されているもの以外の存在によって、列挙されているものの基本的なまたは新規な特徴が変化しない限り、列挙されているもの以外の存在を許容するが、先行技術の態様は除外される。

【００６６】

「検出する」とは、検出されるべき分析物の存在、非存在または量を同定することを指す。

【００６７】
「疾患」とは、細胞、組織または器官の正常な機能を損なうまたは妨げる任意の症状または障害を意味する。疾患の例としては、がん、例えば、脳、膀胱、胆汁、血液、乳房、管（例えば、胆管または膵管）、結腸、結腸直腸、食道、胃、胚細胞、肝臓、卵巣、膵臓、子宮、および肺のがん、腎細胞癌、膵管腺癌、ならびに肉腫、例えば、骨肉腫および横紋筋肉腫（例えば、小児横紋筋肉腫（ＲＭＳ））が挙げられる。複数の態様において、がんは、小児がんである。複数の態様において、がんは、成人/成体対象に生じる。
【００６８】
「有効量」とは、処置されていない患者と比較して疾患の症候を改善するのに必要な量を意味する。疾患の治療的処置のために本発明を実施するために使用される活性化合物の有効量は、投与様式、対象の年齢、体重および全般的な健康状態に応じて変化する。最終的には、主治医または獣医が適切な量および投与レジメンを決定する。このような量は、「有効」量と称される。いくつかの態様において、有効量は、新生物細胞においてアポトーシスを誘導し、細胞生存を低下させ、増殖を低下させるか、またはがん進行を低下させるか、もしくは安定化させる。
【００６９】
本発明は、本明細書に記載される方法によって特徴付けられる障害を治療するための高度に特異的な薬物の開発に有用な多数の標的を提供する。さらに、本発明の方法は、対象における使用にとって安全な治療を同定するための容易な手段を提供する。さらに、本発明の方法は、本明細書に記載される疾患に対する効果について、大規模な処理量、高い感度および低い複雑さで実質的に任意の数の化合物を分析するための経路を提供する。
【００７０】
「断片」とは、ポリペプチドまたは核酸分子の一部を意味する。この一部は、好ましくは、参照核酸分子またはポリペプチドの全長の少なくとも10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％または90％を含有する。断片は、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100、200、300、400、500、600、700、800、900、または1000個のヌクレオチドまたはアミノ酸を含有し得る。
【００７１】
「ハイブリダイゼーション」は、相補的核酸塩基間での、ワトソン-クリック、フーグスティーンまたは逆フーグスティーン水素結合であり得る水素結合を意味する。例えば、アデニンおよびチミンは、水素結合の形成を介して対になる相補的な核酸塩基である。
【００７２】
「阻害性核酸」とは、哺乳動物細胞に投与された場合に標的遺伝子の発現の減少（例えば、10％、25％、50％、75％、またはさらには90～100％）をもたらす二本鎖RNA、siRNA、shRNAもしくはアンチセンスRNA、またはこれらの一部、またはこれらの模倣物を意味する。典型的には、核酸阻害剤は、標的核酸分子もしくはそのオルソログの少なくとも一部を含むか、または標的核酸分子の相補鎖の少なくとも一部を含む。例えば、阻害性核酸分子は、本明細書に記載される核酸のいずれかまたはすべての少なくとも一部を含む。
【００７３】
「単離された」、「精製された」または「生物学的に純粋な」という用語は、その天然の状態で見出されるような通常その物質に付随する成分が様々な程度まで含まれていない物質を指す。「単離する」は、元の源または周囲からのある程度の分離を意味する。「精製する」は、単離よりも高い分離度を意味する。「精製された」または「生物学的に純粋な」タンパク質は、いかなる不純物もそのタンパク質の生物学的特性に実質的に影響を与えないか、または他の有害な結果を引き起こさないように、十分に他の物質が存在しない。すなわち、本発明の核酸またはペプチドは、組換えDNA技術によって産生された場合に、細胞物質、ウイルス物質もしくは培養培地を実質的に含まなければ、または化学合成された場合に、化学的前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まなければ、精製されている。純度および均一性は、典型的には、分析化学技術、例えばポリアクリルアミドゲル

電気泳動または高速液体クロマトグラフィーを用いて決定される。「精製された」という用語は、核酸またはタンパク質が電気泳動ゲル中に本質的に1つのバンドを生じることを意味し得る。修飾、例えばリン酸化またはグリコシル化に供することができるタンパク質の場合、異なる修飾は、異なる単離されたタンパク質を生じ得、これらは別々に精製することができる。

【００７４】

「単離されたポリヌクレオチド」とは、本発明の核酸分子が由来する生物の天然に存在するゲノムにおいてその遺伝子に隣接する遺伝子を含まない核酸（例えば、ＤＮＡ）を意味する。したがって、この用語には、例えば、ベクター中に；自律複製プラスミドもしくはウイルス中に；または原核生物もしくは真核生物のゲノムＤＮＡ中に組み込まれているか；または他の配列とは独立した別個の分子（例えば、ＰＣＲまたは制限エンドヌクレアーゼ消化によって産生されたｃＤＮＡまたはゲノムもしくはｃＤＮＡ断片）として存在する組換えＤＮＡが含まれる。さらに、この用語には、ＤＮＡ分子から転写されるＲＮＡ分子の他、追加のポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部である組換えＤＮＡが含まれる。

【００７５】

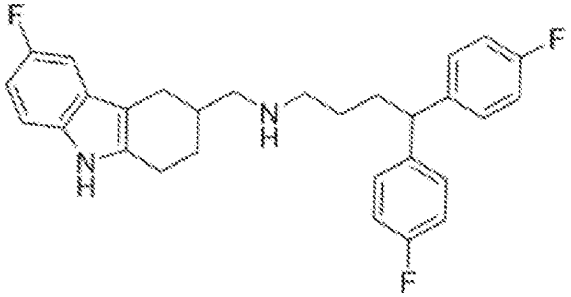
「単離されたポリペプチド」とは、天然に付随する成分から分離された本発明のポリペプチドを意味する。典型的には、ポリペプチドは、該ポリペプチドが天然に会合しているタンパク質および天然に存在する有機分子を少なくとも６０重量％含まない場合に単離されている。好ましくは、調製物は、少なくとも７５重量％、より好ましくは少なくとも９０重量％、最も好ましくは少なくとも９９重量％、本発明のポリペプチドである。本発明の単離されたポリペプチドは、例えば、天然源からの抽出によって、このようなポリペプチドをコードする組換え核酸の発現によって；またはタンパク質を化学的に合成することによって取得され得る。純度は、任意の適切な方法、例えばカラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってまたはＨＰＬＣ分析によって測定することができる。

【００７６】

「マーカー」とは、疾患または障害に関連する発現レベルまたは活性の変化を有する任意のタンパク質またはポリヌクレオチドを意味する。マーカーの非限定的な例としては、ＶＰＳ４Ａポリペプチドまたはポリヌクレオチド、ＶＰＳ４Ｂポリペプチドまたはポリヌクレオチド、ＣＤＨ１ポリペプチドまたはポリヌクレオチド、ＵＬＫ３ポリペプチドまたはポリヌクレオチド、ＳＭＡＤ４ポリペプチドまたはポリヌクレオチド、ＣＨＭＰ４Ｂポリペプチドまたはポリヌクレオチド、ＩＳＧ１５ポリペプチドまたはポリヌクレオチド、およびＩＴＣＨポリペプチドまたはポリヌクレオチドが挙げられる。

【００７７】

「ＭＳＣ１０９４３０８」とは、ＣＡＳ番号２２１９３２０-０８-６に対応し、構造



を有する化合物、またはその薬学的に許容され得る塩もしくは溶媒和物を意味する。

【００７８】

本明細書で使用される場合、「作用物質を取得すること」におけるような「取得すること」は、作用物質を合成すること、購入すること、またはその他入手することを含む。

【００７９】

「新生物」とは、不適切に高いレベルの細胞分裂、不適切に低いレベルのアポトーシス、もしくはその両方によって引き起こされるか、またはこれらをもたらす任意の疾患を意味する。

【００８０】

「核酸」とは、リボ核酸もしくはデオキシリボ核酸のオリゴマーもしくはポリマー、またはこれらの類似体を意味する。この用語は、天然に存在する塩基、糖、および糖間（骨格）結合からなるオリゴマー、ならびに同様に機能する天然に存在しない部分を有するオリゴマーを含む。このような修飾されたまたは置換されたオリゴヌクレオチドは、例えばヌクレアーゼの存在下での増強された安定性などの特性のために、天然の形態よりも好ましいことが多い。

【００８１】

「阻害性核酸分子を取得すること」におけるような「取得すること」とは、阻害性核酸分子を合成するか、購入するか、またはその他の入手することを意味する。

【００８２】

「機能的に連結された」とは、適切な分子（例えば、転写活性化因子タンパク質）が第2のポリヌクレオチドに結合したときに第1のポリヌクレオチドの転写を指示する第2のポリヌクレオチドに隣接して第1のポリヌクレオチドが配置されていることを意味する。

【００８３】

「発現のために配置される」とは、本発明のポリヌクレオチド（例えば、DNA分子）が、配列の転写および翻訳を指令する（すなわち、例えば、本発明の組換えタンパク質またはRNA分子の産生を促進する）DNA配列に隣接して配置されることを意味する。

【００８４】

「低下する」とは、少なくとも10％、少なくとも25％、少なくとも50％、少なくとも75％、または100％の負の変化を意味する。

【００８５】

「参照」とは、標準または対照条件を意味する。

【００８６】

「参照配列」は、配列比較の基礎として使用される定義された配列である。参照配列は、指定された配列の一部または全体、例えば、完全長cDNAもしくは遺伝子配列のセグメント、または完全なcDNAもしくは遺伝子配列であり得る。ポリペプチドの場合、参照ポリペプチド配列の長さは、一般に、少なくとも約16アミノ酸、好ましくは少なくとも約20アミノ酸、より好ましくは少なくとも約25アミノ酸、さらにより好ましくは約35アミノ酸、約50アミノ酸、または約100アミノ酸である。核酸の場合、参照核酸配列の長さは、一般に、少なくとも約50ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約60ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約75ヌクレオチド、さらにより好ましくは約100ヌクレオチドもしくは約300ヌクレオチド、またはこれらの付近もしくはこれらの間の任意の整数である。

【００８７】

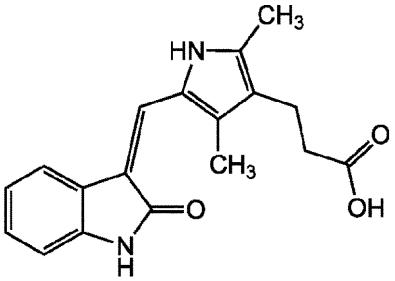
「siRNA」は、二本鎖RNAを意味する。最適には、siRNAは、18、19、20、21、22、23または24ヌクレオチド長であり、その3'末端に2塩基のオーバーハングを有する。これらのdsRNAは、個々の細胞または動物全体に導入することができ、例えば、血流を介して全身に導入され得る。そのようなsiRNAは、mRNAレベルまたはプロモーター活性を下方制御するために使用される。

【００８８】

「特異的に結合する」とは、本発明のポリペプチドを認識し、結合するが、試料、例えば本発明のポリペプチドを天然に含む生物学的試料中の他の分子を実質的に認識せず、結合しない化合物または抗体を意味する。

【００８９】

「SU6668」とは、CAS番号252916-29-3に対応し、構造



を有する化合物、またはその薬学的に許容され得る塩もしくは溶媒和物を意味する。

【００９０】

本発明の方法において有用な核酸分子としては、本発明のポリペプチドまたはその断片をコードする任意の核酸分子が挙げられる。このような核酸分子は、内因性核酸配列と100％同一である必要はないが、典型的には実質的な同一性を示す。内因性配列と「実質的な同一性」を有するポリヌクレオチドは、典型的には、二本鎖核酸分子の少なくとも1つの鎖とハイブリダイズすることができる。本発明の方法において有用な核酸分子としては、本発明のポリペプチドまたはその断片をコードする任意の核酸分子が挙げられる。このような核酸分子は、内因性核酸配列と100％同一である必要はないが、典型的には実質的な同一性を示す。内因性配列と「実質的な同一性」を有するポリヌクレオチドは、典型的には、二本鎖核酸分子の少なくとも1つの鎖とハイブリダイズすることができる。「ハイブリダイズする」とは、対になって、様々なストリンジェンシー条件下で、相補的ポリヌクレオチド配列（例えば、本明細書に記載される遺伝子）またはその一部の間で二本鎖分子を形成することを意味する。（例えば、Wahl, G.M. and S.L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152:399; Kimmel, A.R. (1987) Methods Enzymol. 152: 507を参照）。

【００９１】

例えば、ストリンジェントな塩濃度は、通常、約750mMNaClおよび75mMクエン酸三ナトリウム未満、好ましくは約500mMNaClおよび50mMクエン酸三ナトリウム未満、より好ましくは約250mMNaClおよび25mMクエン酸三ナトリウム未満である。低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、有機溶媒、例えばホルムアミドの非存在下で得ることができ、一方、高ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、少なくとも約35％のホルムアミド、より好ましくは少なくとも約50％のホルムアミドの存在下で得ることができる。ストリンジェントな温度条件は、通常、少なくとも約30℃、より好ましくは少なくとも約37℃、最も好ましくは少なくとも約42℃の温度を含む。ハイブリダイゼーション時間、界面活性剤、例えばドデシル硫酸ナトリウム（SDS）の濃度、および担体DNAの包含または除外などの様々な追加パラメータが当業者に周知である。必要に応じてこれらの様々な条件を組み合わせることにより、様々なレベルのストリンジェンシーが達成される。好ましい態様では、ハイブリダイゼーションは、750mMNaCl、75mMクエン酸三ナトリウム、および1％SDS中、30℃で行われる。より好ましい態様では、ハイブリダイゼーションは、500mMNaCl、50mMクエン酸三ナトリウム、1％SDS、35％ホルムアミドおよび100μg/ml変性サケ精子DNA（ssDNA）中、37℃で行われる。最も好ましい態様では、ハイブリダイゼーションは、250mMNaCl、25mMクエン酸三ナトリウム、1％SDS、50％ホルムアミドおよび200μg/ml ssDNA中、42℃で行われる。これらの条件に対する有用な変更は、当業者には自明であろう。

【００９２】

ほとんどの用途では、ハイブリダイゼーションに続く洗浄工程もストリンジェンシーが異なる。洗浄ストリンジェンシー条件は、塩濃度および温度によって定義することができる。上記のように、洗浄ストリンジェンシーは、塩濃度を減少させることによって、または温度を上昇させることによって増加させることができる。例えば、洗浄工程のためのストリンジェントな塩濃度は、好ましくは約30mMNaClおよび3mMクエン酸三ナトリウ

ム未満、最も好ましくは約15mMNaClおよび1.5mMクエン酸三ナトリウム未満である。洗浄工程のためのストリンジェントな温度条件は、通常、少なくとも約25℃、より好ましくは少なくとも約42℃、さらにより好ましくは少なくとも約68℃の温度を含む。好ましい態様において、洗浄工程は、30mMNaCl、3mMクエン酸三ナトリウムおよび0.1%SDS中、25℃で行われる。より好ましい態様において、洗浄工程は、15mMNaCl、1.5mMクエン酸三ナトリウムおよび0.1%SDS中、42℃で行われる。より好ましい態様において、洗浄工程は、15mMNaCl、1.5mMクエン酸三ナトリウムおよび0.1%SDS中、68℃で行われる。これらの条件に対するさらなる変更は、当業者には自明であろう。ハイブリダイゼーション技術は当業者に周知であり、例えば、Benton and Davis（Science 196:180, 1977）；Grunstein and Hogness（Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961, 1975）；Ausubel et al.（Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001）；Berger and Kimmel（Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York）；およびSambrook et al., Molecular Cloning:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkに記載されている。

【００９３】

「実質的に同一の」とは、参照アミノ酸配列（例えば、本明細書中に記載されるアミノ酸配列のいずれか1つ）または核酸配列（例えば、本明細書中に記載される核酸配列のいずれか1つ）に対して少なくとも50%の同一性を示すポリペプチドまたは核酸分子を意味する。好ましくは、そのような配列は、比較のために使用される配列とアミノ酸レベルまたは核酸において少なくとも60%、より好ましくは80%または85%、より好ましくは90%、95%またはさらには99%同一である。

【００９４】

配列同一性は、典型的には、配列解析ソフトウェア（例えば、Genetics Computer Group、University of Wisconsin Biotechnology Center、1710 University Avenue、Madison、WI 53705のSequence Analysis Software Package、BLAST、BESTFIT、GAPまたはPILEUP/PRETTYBOXプログラム）を使用して測定される。このようなソフトウェアは、様々な置換、欠失および/または他の修飾に対して相同性の程度を割り当てることによって、同一または類似の配列をマッチする。保存的置換は、典型的には、以下の群内の置換を含む:グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リジン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。同一性の程度を決定するための例示的なアプローチでは、BLASTプログラムを使用することができ、e^{-3}とe^{-100}との間の確率スコアは密接に関連する配列を示す。

【００９５】

「対象」とは、動物を意味する。動物の非限定的な例としては、ヒトまたは非ヒト哺乳動物、例えばウシ、ウマ、イヌ、ヒツジ、げっ歯類またはネコが挙げられる。

【００９６】

本明細書で提供される範囲は、その範囲内の値のすべてに対する省略表現であると理解される。例えば、1から50の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50からなる群からの任意の数、数の組み合わせ、または部分範囲を含むと理解される。

【００９７】

本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療すること」、「治療」などの用語は、障害および/またはそれに関連する症候を軽減または改善することを指す。除外されるものではないが、障害または症状を治療することは、障害、それに関連する症状または症候が完全に除去されることを必要としないことが理解されよう。

【００９８】

本明細書で使用される場合、特に明記されない限り、または文脈から明らかでない限り、「または」という用語は包括的であると理解される。本明細書で使用される場合、特に明記しない限り、または文脈から明らかでない限り、「a」、「an」および「the」という用語は単数または複数であると理解される。

【００９９】

本明細書で使用される場合、特に明記されない限り、または文脈から明らかでない限り、「約」という用語は、当技術分野における通常の許容範囲内、例えば平均の2標準偏差以内であると理解される。約は、記載された値の１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、0.5％、0.1％、0.05％または0.01％以内と理解することができる。文脈から他の意味であることが明らかでなければ、本明細書で提供されるすべての数値は、約という用語によって修飾される。

【０１００】

本明細書での変数のあらゆる定義における化学基のリストの記載は、任意の単一の基または列挙された基の組み合わせとしてのその変数の定義を含む。本明細書での変数または局面についての態様の記載は、その態様を任意の単一の態様として含み、または任意の他の態様もしくはその一部と組み合わせて含む。

【０１０１】

本明細書で提供される任意の組成物または方法は、本明細書で提供される他の組成物および方法のうちのいずれかの1つまたは複数と組み合わせることができる。

【図面の簡単な説明】

【０１０２】

【図１Ａ】図1Aは、合成致死性分析ワークフローの背後に存在する概念を詳述する模式図である。50の選択された腫瘍抑制遺伝子のそれぞれについて（表5も参照）、そのコピー数は、CRISPR-SpCas9またはRNAi干渉機能喪失スクリーニングからの遺伝子依存性スコアとがん細胞株にわたって相関していた。腫瘍抑制遺伝子と同じ染色体アームに局在する依存性遺伝子との相関はシス相互作用として分類されるのに対して、他の染色体アームに局在する遺伝子との相互作用はトランス相互作用として分類される。

【図１Ｂ】図1Bは、遺伝子依存性スコアと腫瘍抑制遺伝子欠失との間での有意な正のピアソン相関を示す（すなわち、より少ないコピー数は、より低い/より高い負の依存性スコア＝合成致死性相互作用と相関する）q-qプロットである。それぞれの対について、依存性遺伝子が最初に列挙され、関連する腫瘍抑制遺伝子がその後に列挙されている。CRISPR-SpCas9（y軸）およびRNAi（x軸）の遺伝子依存性スコアについてのlog正規化q値が示されている。t分布を使用して両側p値を計算し、１０％（q値＜0.1、灰色の領域より上）のベンジャミーニ・ホッホベルク偽陽性率（FDR）を使用して調整した。高度に有意な相関が強調表示されており（枠で囲まれていない）、VPS4A-SMAD4およびVPS4B-CDH1の合成致死性相互作用（枠で囲まれている）を強調している。

【図１Ｃ】図1Cは、q値＜0.1FDR閾値でRNAiおよびCRISPR-SpCas9データセットの両方において正の依存性コピー数相関のみを含む、示された各腫瘍抑制因子についての有意な合成致死性相互作用の数を示す棒グラフである。

【図１Ｄ】図1Dは、10個の最も相関が高い腫瘍抑制遺伝子について、すべての有意かつ正の相関する遺伝子依存性についてのlog正規化q値を示すプロットである。CRISPRドットは、CRISPR-SpCas9によってスコア化された遺伝子依存性q値を示すのに対して、RNAiドットはRNAiスコアを示す。CRISPRドット:VPS4A; GRHL2; TUBB4B; KRAS; WDR77; PRMT5; CDK6; EGFR; AIFM1; WDR77; CCND1; ARF1; TRA2B（上）。RNAiドット:TTC24; JUNB; PRMT5（上）; WDR77（上）; FUBP1; GRK2; RPL36A; RPM1; VCP; TRA2B（下）。

【図１Ｅ】図1Eは、ヒト18番染色体上のSMAD4およびVPS4Bのゲノム位置の概略図を示す。

【図１Ｆ】図1Fは、1,657種のがん細胞株におけるSMAD4（x軸）とVPS4B（y軸）の間の$\log_2$正規化相対コピー数のピアソン相関係数を示す散布図である（p値＜0.0001;

F検定）。r:0.784。n:1.657。
【図１Ｇ】図1Gは、ESCRTおよびVPS4によって媒介される逆トポロジー膜リモデリングを示す図である。
【図１Ｈ】図1Hは、CRISPR-SpCas9遺伝子依存性スコアとSMAD4コピー数との間のピアソン相関係数（x軸）およびDepMap（19Q3）からの622のがん細胞株にわたるこれらの相関のそれぞれについての$\log_{10}$正規化q値（y軸）を示すボルケーノプロットである。各ドットは異なる遺伝子依存性を表す。灰色の影が付いた領域の上には、高度に有意な依存性が示されている。水平の破線:10%の偽陽性率閾値（q値＜0.1、ベンジャミーニ・ホッホベルク）。
【図１Ｉ】図1Iは、がん細胞株にわたるCRISPR-SpCas9 DepMapデータセット（19Q3）からのCHMP4B依存性スコアの分布を示す平滑化ヒストグラムである。探査した細胞株の総量に対する依存性細胞株（依存性スコア＜－0.5、中央の破線）の量が左上隅に示されている。－1における左の破線は、高度必須遺伝子のセットに対するCRISPRスコアを示すのに対して、0における右の黒い破線は、ガイドを標的とする陰性対照のCRISPRスコアを示す。
【図１Ｊ】図1Jは、中立のまたは低下したVPS4BまたはVPS4Aのコピー数（Log_2相対コピー数＜0.66）を有するがん細胞株にわたるCRISPR-SpCas9 CHMP4B遺伝子依存性スコアの分布を示す箱ひげ図を表す。箱は、中央値とともに25および75パーセンタイルを示す。ひげは10および90パーセンタイルを示し、外れ値は円として示されている。＊＊＊＊両側p値＜0.0001; ダンの補正によるANOVAクラスカル-ウォリスノンパラメトリック検定。
【図１Ｋ】図1Kは、腫瘍系統によるVPS4A依存性がん細胞株の頻度を示す棒グラフである。各腫瘍系統に対する2つの系統（上および下）は、CRISPR-SpCas9（上の棒）またはRNAi（下の棒）について－0.5未満のスコアを示す場合に、依存性として分類された。各腫瘍系統について、系統の総量に対する依存性細胞株の数が示されている。
【図１Ｌ】図1Lは、腫瘍型によって分類されたTCGA Pan-Cancer Atlas患者試料におけるVPS4Bコピー数変化の要約を提供するプロットを提示する。値は、平均試料倍数性（プロイディ）に対する$\log_2$正規化VPS4Bコピー数を示す。各ドットは患者試料を表し、より濃いドットは深いVPS4B喪失（スコア＜－0.75）を有する試料を示す。灰色のバーは、平均VPS4Bコピー数±標準偏差を示す。
【図１．１Ａ】図1.1A～1.1Gは、確立された腫瘍抑制因子のゲノム喪失との合成致死性相互作用の発見を示すヒストグラムを提示する。図1.1Aは、合成致死性相互作用分析からのシス相関のピアソン相関係数の密度分布を示す平滑化されたヒストグラムを提供する。CRISPR-SpCas9（高いピーク）およびRNA干渉（低いピーク）についての係数が示されている。
【図１．１Ｂ】図1.1Bは、CRISPR-SpCas9遺伝子依存性と腫瘍抑制遺伝子コピー数との間のすべてのシス相関について、ピアソン相関係数（x軸）およびこれらの相関の正規化された偽発見補正された有意性q値の－log10値（y軸）を示すボルケーノプロットを提供する。水平の破線は、10%の偽陽性率閾値（q値＜0.1、ベンジャミーニ・ホッホベルク）を表す。各ドットは、遺伝子の依存性スコアと腫瘍抑制遺伝子のコピー数との間の相互作用を表す。正および負の相関の両方についての20の最も有意な相互作用には、名称が記載されている。
【図１．１Ｃ】図1.1Cは、CRISPR-SpCas9遺伝子依存性スコアの代わりにRNAiを用いることを除いて、図1.1Bと同様である。
【図１．１Ｄ】図1.1Dは、合成致死性相互作用分析からのトランス相関のピアソン相関係数の密度分布を示す平滑化されたヒストグラムを提供する。CRISPR-SpCas9（高いピーク）およびRNA干渉（低いピーク）についての係数が示されている。
【図１．１Ｅ】図1.1Eは、CRISPR-SpCas9遺伝子依存性と腫瘍抑制遺伝子コピー数との間のすべてのトランス相関について、ピアソン相関係数（x軸）およびこれらの相関の正規化された偽発見補正された有意性q値の－log10値（y軸）を示すボルケーノプロッ

トを提供する。水平の破線は、10%の偽陽性率閾値（q値＜0.1、ベンジャミーニ・ホッホベルク）を表す。各ドットは、遺伝子の依存性スコアと腫瘍抑制遺伝子のコピー数との間の相互作用を表す。正および負の相関の両方についての20の最も有意な相互作用には、名称が記載されている。

【図１．１Ｆ】図1.1Fは、CRISPR-SpCas9遺伝子依存性スコアの代わりにRNAiを用いることを除いて、図1.1Eと同様である。

【図１．１Ｇ－１】図1.1Gは、遺伝子依存性スコア（x軸）と腫瘍抑制遺伝子コピー数（y軸）との間のすべての重複する有意な正の相関（合成致死性相互作用）を示すヒートマップを提供する。有意な相互作用の数が各腫瘍抑制因子の隣に示されている。ヒートマップの濃淡は、どのデータセットにおいて相互作用が最も顕著であったかを示す。濃い灰色（CRISPR-SpCas9）、中間の濃さの灰色（等しい）、薄い灰色（RNAi）。例えば、濃い灰色のボックス（CRISPR-SpCas9）:SMAD4/VPS4A; SMAD4/GRHI2; 薄い灰色のボックス（RNAi）:CDKN2B/PRMT5; CDKN2A/PRMT5。左から右へ順に、図1.1Gの上部には、以下のもの:VPS4A、GRHL2、TUBB4B、KRAS、KLF5、GRK2、EGFR、ITGA3、SCAP、UPF1、RAPGEF1、RAB6A、TTC24、JUNB、COPS4、SREBF1、METAP1、GMNN、AKAP9、LIMS1、UBE2Z、CSNK1D、COPS7A、PSMD6、WDR77、PRMT5、KIF2C、CCND1、NFE2L2、CDK6、WWTR1、GYPA、MSI2、RBL1、PRSS42、IPO9、LMO2、AIFM1、EDF1、CIAPIN1、FUBP1、ADAR、ESR1、PHF2、PCM1、FBXO11、EAF1、ARF1、ERBB3、UBE2H、GAB1、ERBB2、RPL36A、MTA2、MTOR、HSP9AB1、SH2D2A、AHCYL1、EXOC2、TUBB、USP5、RRM1、VCP、DCPS、PSMA1、PCDHB13、TRA2B、ZC3H18、H2AFZ、SRRT、ACTG1、POLR2J、MED1、MYBL2、MED12、RUNX1、MED16、MYT1、TEAD1、OR5M1、RPL22、ZFC3H1、ATR、METTL1、MED1、CHD4、IGF1R、ZFP36、PLXNA1、AMOTL2、DDX39B、SMARCA2、CDC4、CUL4B、PPP2R1A、ITGAV、CSTF3、MDM2、CD33、SAMD4B、MEIS3、WDR92、SDHAF3、NAA15、NONO、FBXW11、PIK3CB、BRAF、CMA1、SNRPB、ARF4、VPS4B、MNT、MAGOH、YME1L1、CDK2、SKP2、RAB1A、SNRPB2、SPDEF、DDX5、ELMSAN1、SF3B4、GRPEL1、ATP6AP1、ARID1BおよびACTB。

【図１．１Ｇ－２】図1.1G-1の続きを示す。

【図１．１Ｇ－３】図1.1G-3の続きを示す。

【図１．１Ｇ－４】図1.1G-4の続きを示す。

【図２Ａ】図2A～2Jは、VPS4Bのコピー喪失を伴うがん細胞における依存性としてのVPS4Aの検証を示す。図2Aは、CRISPR-SpCas9により安定に形質導入された8つのVPS4B^{中立}細胞株および10のVPS4B^{喪失}細胞株からの7日間の生存アッセイを示すプロットを提供する。各ドットは、CellTiter-Glo（登録商標）発光によって測定した、96ウェルプレートの少なくとも3つのウェルの表記されたsgRNAに感染した細胞の平均生存効果（y軸）を表す。黒い棒は、3つすべてのVPS4A sgRNAにわたる平均細胞生存効果を示す。生存スコアは、0（陰性対照:3つのsgRNA切断対照の平均効果）から－1（陽性対照:汎必須遺伝子に対する3つのsgRNAの平均効果; 方法を参照）までのスケールで正規化されている。少なくとも2つの独立した実験からの単一の代表的な結果が示されている。＊＊＊＊両側p値＜0.0001; VPS4B^{中立}群およびVPS4B^{喪失}群におけるすべてのsgRNAの総平均に対する独立t検定。例えば、0.-1（sgVPS4A1）; 0.25-0.35（sgVPS4A3）; および0.3-0.4（sgVPS4A2）のYAPCに対応するVPS4A依存性スコア。

【図２Ｂ】図2Bは、0.5μMドキシサイクリン（0.222μg/mL）での処理後に、C9-11で変異されたshSeed2対照（左）（Marine et al. J Biomol Screen. 17 (3): 370-378, 2012）およびshVPS4A-2（右）テトラサイクリン誘導性RNAi試薬で安定に形質導入された2つのVPS4B^{中立}細胞株および5つのVPS4B^{喪失}細胞株からの7日間の生存アッセイをプロットする。各ドットは、技術的反復実験（technical replicate）を表し、CellTiter-Glo（登録商標）発光によって測定された、非処理細胞と比較した相対細胞生存率（y軸）を示す。箱ひげ図は中央値とともに25～75パーセンタイルを示し

、ひげは最大の外れ値の値を示す。プロットは、少なくとも1回繰り返された代表的な実験を表す。Ns:有意ではない、＊＊＊＊p値＜0.0001（サイダックの多重比較検定による2元配置反復測定ANOVA）。

【図２Ｃ】図2Cは、C9-11で変異されたshSeed2対照（菱形および四角）またはshVPS4A-2（三角）について、テトラサイクリン誘導性RNAiシステムで安定に形質導入されたVPS4B喪失SNU213膵臓癌細胞の10日間増殖曲線をプロットしたグラフである。対照または1μMドキシサイクリン（dox; 0.444μg/mL）含有細胞培養培地中のいずれかで細胞を増殖させ、培地は2～4日ごとに新しいものと交換した。y軸は、トリパンブルー排除によって測定された、当初の量と比較した総生細胞の倍数増加を示す。図形記号は、2つの独立した実験の平均±標準偏差を表す。

【図２Ｄ】図2Dは、免疫不全NOGマウスの側腹部への注射後に、shSeed2対照（菱形;（＋Dox）ベージュ色の正方形）またはshVPS4A-2（三角形;（＋Dox）インジゴ逆三角形）テトラサイクリン誘導性RNAiシステムのいずれかを安定に形質導入されたVPS4B喪失SMSCTR横紋筋肉腫細胞のインビボ腫瘍増殖をプロットしたグラフである。腫瘍が約300mm^{3}に達したら、ビヒクルまたはドキシサイクリン（dox; 625ppm）食のいずれかにマウスを無作為に割り当てた。各ドットは単一の測定値を表し、各線は個々のマウス腫瘍の腫瘍体積（y軸）を時間（x軸）に対して追跡する。＊＊＊＊p値＜0.0001; ボンフェローニ補正したログランクマンテル・コックス分析。

【図２Ｅ】図2Eは、図2Dに記載される皮下SMSCTR異種移植片を有するNOGマウスのカプラン・マイヤー生存プロットを提供する。時間（x軸）に対して生存（y軸）がプロットされている。Dox:ドキシサイクリン。バツ印は打ち切られたマウスを示す。＊＊＊＊p値＜0.0001; ボンフェローニ補正したログランクマンテル・コックス分析。

【図２Ｆ】図2Fは、Protein Simpleキャピラリーベースの発光によって可視化された、無作為化（dox:ドキシサイクリン）の7日後のNOGマウスにおけるSMSCTR異種移植腫瘍からのVPS4AおよびVinculinについてのデジタル化された免疫ブロットを提供する。

【図２Ｇ】図2Gは、免疫不全NOGマウスの側腹部への注射後に、shSeed2対照（菱形、正方形）またはshVPS4A-2（三角）テトラサイクリン誘導性RNAiシステムのいずれかを安定に形質導入されたVPS4B喪失SNU213膵臓癌細胞のインビボ腫瘍増殖を示すグラフを提供する。腫瘍が約300mm^{3}に達したら、ビヒクルまたはドキシサイクリン（dox; 625ppm）食のいずれかにマウスを無作為に割り当てた。各ドットは単一の測定値を表し、各線は個々のマウス腫瘍の腫瘍体積（y軸）を時間（x軸）に対して追跡する。＊＊＊＊p値＜0.0001; ボンフェローニ補正したログランクマンテル・コックス分析。

【図２Ｈ】図2Hは、図2Gに記載される皮下SNU213異種移植片を有するNOGマウスのカプラン・マイヤー生存プロットを提供する。時間（x軸）に対して生存（y軸）がプロットされている。Dox:ドキシサイクリン。バツ印は、打ち切られたマウスを示す。＊＊＊＊p値＜0.0001; ボンフェローニ補正したログランクマンテル・コックス分析。

【図２Ｉ】図2Iは、IncuCyte（登録商標）蛍光生細胞画像化によって測定された、4つのがん細胞株での時間（x軸）にわたるカスパーゼ3/7アポトーシス活性（y軸）を示す4つのプロットを提供する。VPS4Aを標的とするsgRNAで、レンチウイルスによって、SpCas9を安定に発現する細胞を形質導入した。時間を合わせた非感染細胞に対して、カスパーゼ3/7シグナルを正規化した; 方法を参照されたい。ドットおよびエラーバーは、3つの異なるウェルからのウェルあたり4つの画像の平均を使用した単一の実験の平均±標準誤差を表す。＊＊＊＊p値＜0.0001; 反復測定2元配置ANOVA。

【図２Ｊ】図2Jは、CRISPR-SpCas9によるVPS4A消失の4日後にフローサイトメトリーによって分析されたDAPI染色およびEdu取り込みを使用した、VPS4B喪失細胞株JR、SMSCTRおよび59Mの細胞周期分布を示すプロットを提示する。各ドットは、処理された対照sgRNA（sgChr2:黒い点の第1群、各期において左から右へ）またはVPS4Aを標的とするsgRNA（灰色のドット:sgVPS4A-1（第2）; sgVPS4A-2（第3）; sgVPS4A-3（第4）群）の個々の技術的反復実験を表す。水平の黒いバーは、各sgRNAに対す

る平均を表す。有意性は、sgChr2と3つのVPS4A sgRNAすべての組み合わせとの間での両側t検定によって決定される。すべてのパネルについて、＊p＜0.05、＊＊p＜0.01、＊＊＊p＜0.001および＊＊＊＊p＜0.0001。

【図２．２Ａ】図2.2Aは、ヒトVPS4AおよびVPS4Bの主要なタンパク質アイソフォームのアミノ酸配列アラインメントである。類似のアミノ酸は灰色で強調して表示されているが、相違は最も濃い灰色の影で強調されている。VPS4A/Bは80.5％の相同性を示す。アラインメントは、Geneious Prime 2019ソフトウェアパッケージのBlosum62を用いて行った。

【図２．２Ｂ】図2.2Bは、JR（上のパネル）およびRD（下のパネル）横紋筋肉腫がん細胞株におけるSMAD4（JR:左点線上のドット; RD:中央の点線の下のドット）およびVPS4Bコピー数（JR:右点線の下のドット; RD:右点線の下）を強調する、18番染色体にわたる（x軸）遺伝子プローブのlog2正規化相対コピー数（y軸）のプロットを提供する。JRは、VPS4Bの喪失を有するがSMAD4の喪失を有さず、CRISPR-SpCas9によって媒介されるVPS4Aのノックアウトに対して感受性であるのに対して、RDは、SMAD4の喪失を示すが、VPS4Bの喪失を示さず、VPS4Aのノックアウトに対して感受性でない。Mb＝メガベース。

【図２．２Ｃ】図2.2Cは、染色体16q22.1（ヒト）上でのVPS4AおよびCDH1の位置を示すカリオマップを提供する。Mb＝メガベース。VPS4AとCDH1のコピー数は、がん細胞株にわたって強く相関する。下のパネルは、1,657種のがん細胞株におけるCDH1（x軸）とVPS4A（y軸）との間のlog2正規化相対コピー数のピアソン相関係数を示すプロットを提供する（p値＜0.0001; F検定）。

【図２．２Ｄ－１】図2.2Dは、がん細胞株にわたる、VPS4A（左パネル）またはVPS4B（右パネル）のCRISPR-SpCas9（第1列）またはRNAi（第2列）依存性スコア（x軸）と、VPS4BもしくはVPS4A（上の行）またはSMAD4もしくはCDH1（下の行）の相対コピー数（y軸）との間のピアソン相関係数を示す散布図を提供する。

【図２．２Ｄ－２】図2.2D-1の続きを示す。

【図２．２Ｅ】図2.2Eは、CRISPR-SpCas9またはRNAiのいずれかによってVPS4A依存性についてもスクリーニングされた805種のがん細胞株にわたる総倍数性に対する正規化されたVPS4BおよびAのコピー数のlog2値を示すバープロットを提供する。プロットは、低い（左）コピー数から高い（右）コピー数へと順にソートされている。バーの濃淡は、CRISPR-SpCas9（例えば、ランク500～625における線）、RNAi（例えば、ランク700の右側の第2の線）またはその両方（マゼンタ; 例えば、ランク450の右側の第1の線）によって判定された場合に、その細胞株がVPS4A枯渇に対して感受性であるかどうかを示し、非感受性細胞株は灰色で示されている。一部の分析において使用された部分的VPS4Bコピー喪失に対する閾値（log2正規化相対コピー数が0.8）が示されている。

【図２．２Ｆ】図2.2Fは、CRISPR-SpCas9またはRNAiのいずれかによってVPS4A依存性についてもスクリーニングされた805種のがん細胞株にわたる総倍数性に対するlog2正規化VPS4Bコピー数を示すバープロットを提供する。プロットは、低い（左）コピー数から高い（右）コピー数へと順に並べられている。バーの濃淡は、CRISPR-SpCas9（例えば、ランク300における線）、RNAi（例えば、ランク350～400における線）またはその両方（マゼンタ; ランク500の右側の2つの線）によって判定された場合に、その細胞株がVPS4A枯渇に対して感受性であるかどうかを示し、非感受性細胞株は灰色で示されている。一部の分析において使用された部分的VPS4Bコピー喪失に対する閾値（log2正規化相対コピー数が0.8）が示されている。

【図３Ａ】図3Aは、CCLE中の1,171のがん細胞株からのVPS4B RNAseq発現（y軸）と、VPS4B相対コピー数（x軸）との間での散布図を提供する; ピアソン相関:0.593、p値:$4.589e^{-112}$（F検定）。

【図３Ｂ】図3Bは、各遺伝子のRNAseq遺伝子発現について、CCLEからのそのそれぞれのコピー数との相関分析から導出されたピアソン相関のヒストグラムを提供する（同じ

遺伝子、密度2.5右ヒストグラム）。分布中のVPS4AおよびVPS4Bの位置が線によって示されている。7の密度を有する異なる遺伝子左ヒストグラムは、遺伝子発現とコピー数プロファイルのランダムな対の順序を変えることによって生成されたピアソン相関係数の帰無分布を示す。

【図３Ｃ】図3Cは、CCLE中の375のがん細胞株からのVPS4B定量的質量分析タンパク質発現（y軸）とVPS4B相対コピー数（x軸）との間の相関散布図を提供する; ピアソン相関:0.498、p値＝$8.19e^{-25}$（F検定）。Y軸は、様々な系統からの10種の参照がん細胞株のセットにおけるタンパク質発現に対して正規化された、細胞株の$\log_2$タンパク質発現を表す（0を平均参照値とする）。X軸は、$\log_2$正規化相対コピー数（TPM）を表す。

【図３Ｄ】図3Dは、VPS4Bコピー数に基づいた23種のがん細胞株（n: $VPS4B^{中立}$ 11種、および$VPS4B^{喪失}$ 12種）からのProtein Simpleキャピラリーベースの発光によるデジタル化されたVPS4B免疫ブロットを提供する。総タンパク質染色をローディングのために使用した。CCLEコピー数コールに基づいて、相対コピー数が下に示されている。

【図３Ｅ】図3Eは、図3Dにおいて総タンパク質から正規化されたVPS4Bタンパク質定量（y軸）と、VPS4B相対コピー数（x軸）との間の散布図を提供する。ピアソン相関:0.652、p値＝7e-4（F検定）。

【図３Ｆ】図3Fは、親RD-SpCas9がん細胞株（$VPS4B^{中立}$）および4つのモノクローナルなRD-SpCas9 $VPS4B^{-/-}$ CRISPR-SpCas9ノックアウト細胞株の2つのプールの混合物から得られたVPS4B免疫ブロットを提供する。

【図３Ｇ】図3Gは、$VPS4B^{中立}$RD-SpCas9細胞（左パネル）および4つのモノクローナルなRD-SpCas9$VPS4B^{-/-}$細胞株の2つのプール（図3Fから）のCellTiter-Glo（登録商標）発光によって測定された細胞生存率を示す。各ドットは、表記されたsgRNAで処理した個々のアッセイウェルからの正規化された細胞生存率を表す（方法を参照のこと）。水平の黒いバーは各群の平均を示す。統計:このセクションの末尾を参照されたい。

【図３Ｈ】図3Hは、$VPS4B^{喪失}$JR-SpCas9がん細胞株および$VPS4B^{WT}$cDNAを過剰発現するJR-SpCas9がん細胞株からのVPS4B免疫ブロットを提供する。

【図３Ｉ】図3Iは、$VPS4B^{喪失}$JR-SpCas9がん細胞（左）およびVPS4Bを過剰発現するJR-SpCas9細胞（右）のCellTiter-Glo（登録商標）発光によって測定された細胞生存率を示す。統計:このセクションの末尾を参照されたい。

【図３Ｊ】図3Jは、$VPS4B^{喪失}$JR-SpCas9がん細胞（左）および$VPS4A^{WT}$（中央）または$VPS4A^{L64A}$cDNA（右）を過剰発現するJR-SpCas9細胞のCellTiter-Glo（登録商標）発光によって測定された細胞生存率を示す。図3G、3Iおよび3Jにおいて、各ドットは、個々のウェルからの正規化された細胞生存率を表す（方法を参照のこと）。水平の黒いバーは各群の平均を示す。すべてのパネルについて、ns:有意ではない、＊p＜0.05、＊＊p＜0.01、＊＊＊p＜0.001および＊＊＊＊p＜0.0001（独立t検定、陰性対照sgRNAの平均生存効果を表記されたsgRNA処理と比較する）。

【図３．３Ａ】図3.3A～3Dは、VPS4パラログに依存するがん細胞株が他のESCRTメンバーの遺伝子操作に対しても感受性であることを示す。図3.3Aは、624のがん細胞株にわたるCRISPRSpCas9遺伝子依存性スコアとCDH1相対コピー数との間の相関について、ピアソン相関係数（x軸）およびこれらの相関の正規化された偽発見補正された有意性q値の－log10値（y軸）を示すボルケーノプロットを提供する。水平の破線は、10%の偽陽性率閾値（q値＜0.1、ベンジャミーニ・ホッホベルク）を表す。各ドットは、異なる遺伝子の依存性スコアとCDH1コピー数との間の相互作用を表す。正の相関（0.0における点線の右および灰色の影が付された領域の上）および負の相関（点線の左および灰色の影が付された領域の上）の両方についての最も有意な相互作用には名称が付されている。

【図３．３Ｂ】図3.3Bは、CRISPRSpCas9遺伝子依存性とVPS4A CRISPR依存性スコアとの間の相関について、ピアソン相関係数（x軸）およびこれらの相関の正規化された

偽発見補正された有意性q値の－log10値（y軸）を示すボルケーノプロットを提供する。水平の破線は、10％の偽陽性率閾値（q値＜0.1、ベンジャミーニ・ホッホベルク）を表す。各ドットは、異なる遺伝子の依存性スコアとVPS4A依存性スコアとの間の相互作用を表す。正の（0.0における点線の概ね右側で、灰色の影が付された領域の上; 例えば、TIPARP、PIK3C3、NARS、WDR7、ZNF-407）および負の（－0.15～－0.2）相関の両方についての最も有意な相互作用には、ESCRT関連遺伝子とのすべての相関（一般に曲線の最下点付近）に加えて、名称が付されている。

【図３．３Ｃ】図3.3Cは、VPS4B CRISPR依存性スコアを用いたことを除き、図3.3Bと同様の結果を示す。

【図３．３Ｄ】図3.3Dは、VPS4AおよびVPS4B相対コピー数状態（図中の説明を参照）によって分類された表記のESCRT関連遺伝子（x軸）についてのCRISPR遺伝子依存性スコア（y軸）の分布を示すバイオリンプロットを提供する。ESCRT関連遺伝子は、注釈が付けられた機能によって群に分けられている。プロットは、観察された値の全範囲を示し、黒い水平のバーは中央値スコアを示し、破線は25～75％の四分位範囲を示す。－1における線は、高度必須遺伝子のセットに対するCRISPRスコアを示すのに対して、0における上の線は、ガイドを標的とする陰性対照のCRISPRスコアを示す。＊p値＜0.05、＊＊p値＜0.01、＊＊＊＊p値＜0.0001（ボンフェローニ補正（C:90）を用いた対応のないウェルチのt検定（ANOVA））。

【図４Ａ】図4A～4Hは、VPS4A抑制が、VPS4B^{喪失}がん細胞におけるESCRT-IIIフィラメントの蓄積、変形した核および脱離欠陥をもたらすことを示す。図4Aは、膜生物学におけるESCRT機構の公知の細胞機能を示す概略図を提供する。

【図４Ｂ】図4Bは、ドキシサイクリン誘導性shVPS4A-2 RNAiシステムで安定に形質導入された、VPS4B^{中立}がん細胞株（KP4）および3つのVPS4B^{喪失}がん細胞株（PANC0403、SNU213、59M）におけるVPS4AおよびVinculinタンパク質レベルを示すデジタル化された免疫ブロットを提供する。対照培地または1μMドキシサイクリン（dox）を含有する培地で細胞を5日間処理し、1回新しい培地に交換した。ローディング対照:ビンキュリン。

【図４Ｃ】図4Cは、ドキシサイクリン誘導性shVPS4A-2 RNAiシステムで安定に形質導入された4つの異なるがん細胞株におけるCHMP4Bの共焦点免疫蛍光画像化を提供する。対照培地（上列）または1μMドキシサイクリンを補充した培地（下列）中で6日間インキュベートした後、細胞を画像化した。免疫蛍光法によってCHMP4Bを検出し、画像は灰色スケール値を示す（白いスケールバー:50μm）。単一の実験からの代表的な画像が示されている。

【図４Ｄ】図4Dは、CellProfiler v3.1.9を使用した単一の実験からの複数の共焦点画像（n:3～9）上での、図4Cからの非処理（各細胞型について左の群）およびドキシサイクリン処理（各細胞型について右の群）細胞中のCHMP4B小斑点形成の定量を提供する。KP4非処理（n:100の細胞）、KP4＋dox（n:67の細胞）、PANC0403非処理（n:311の細胞）、PANC0403＋dox（n:395の細胞）、SNU213非処理（n:113の細胞）、SNU213＋dox（n:85の細胞）、59M非処理（n:81の細胞）、59M＋dox（n:48の細胞）。ns:有意でない、＊＊＊＊q値＜0.0001、＊＊q値＜0.01（補正されたベンジャミーニ・エクティエリ偽陽性率による両側ブラウン・フォーサイスANOVA）。

【図４Ｅ】図4Eは、VPS4Bコピーについて正倍数体の親RD-SpCas9がん細胞およびVPS4Bのノックアウトを伴うクローンB2 RD-SpCas9がん細胞（図3F～3G、6.6C）の、DAPIを使用したDNAの共焦点蛍光画像化からの結果を示す画像およびバイオリンプロット（下の画像およびプロットの右）を提示する。白いスケールバー:50μm。CellProfilerを使用して核サイズを定量した（＊＊＊＊p値＜0.0001、ウェルチの補正を用いた両側独立t検定）。

【図４Ｆ】図4Fは、4つの異なるがん細胞株における核内膜タンパク質エメリン（Alexa Fluor 561、蛍光を発している周縁）およびDNA（DAPI、影の付いた中央）の共焦点免疫蛍光画像を提供する。細胞を対照培地中（上）で6日間増殖させるか、または1μM

ドキシサイクリン（下）で処理した。矢印:エメリンおよびDNAの両方について陽性の小核。単一の実験からの代表的な画像が示されている。白いスケールバー:50μm。
【図４Ｇ】図4Gは、3つの異なるがん細胞株におけるチューブリン（Alexa Fluor 488、蛍光シグナルの外側領域）およびDNA（DAPI、中央）を使用した細胞質分裂ブリッジおよび中心体の免疫蛍光画像を提示する。遺伝子間領域（sgChr2-2）またはVPS4A（sgVPS4A-1）のCRISPR-SpCas9媒介性遺伝子破壊の誘導後に、細胞を4日間増殖させた。矢印は細胞質分裂ブリッジを示す。単一の実験からの代表的な画像が示されている。
【図４Ｈ】図4Hは、細胞質分裂ブリッジによって隣接細胞に接続されたがん細胞の定量を示す棒グラフを提示する。ImageJを使用して、図4Fからの複数の画像（n:9～17）を手作業で定量した。Ns:有意でない、＊＊＊＊p値＜0.0001、＊＊p値＜0.01（ボンフェローニ補正（SMSCTR/JRについては、C:2）を用いた両側フィッシャーの直接確率検定）。図5Aは、CCLE中の1,171のがん細胞株からのVPS4B RNAseq発現（y軸）とVPS4B相対コピー数（x軸）との間の散布図である; ピアソン相関:0.593、p値:4.589e-112（F検定）。
【図４．４Ａ】図4.4A～4.4Hは、VPS4AおよびVPS4Bが成人および小児のがん型の両方にわたって頻繁なコピー喪失を受けることを示す。図4.4Aは、CRISPRSpCas9（明るい陰影）およびRNAi（暗い陰影）DepMap 19Q3データセットにおけるVPS4AおよびVPS4B依存性スコアの密度分布を示すヒストグラムを提供する。－0.5（中央の破線）未満の依存性スコアを有するものとして決定される依存性細胞株の数が、各プロットの左上の挿入図に示されている。－1における一番左の破線は、高度必須遺伝子のセットに対するCRISPRスコアを示すのに対して、0における破線は、ガイドを標的とする陰性対照のCRISPRスコアを示す。上のパネル（CRISPR-左のピーク; RNAi-右のピーク）。下のパネル（CRISPR-右のピーク; RNAi-左のピーク）。
【図４．４Ｂ】図4.4Bは、腫瘍系統によるVPS4B依存性細胞株の頻度を示す棒グラフを提供する。CRISPR-SpCas9（各細胞型について上のバー）またはRNAi（各細胞型について下）について－0.5未満のスコアを示す場合に、株を依存性として分類した。各腫瘍型について、細胞株の総量に対する依存性細胞株の数が示されている。
【図４．４Ｃ】図4.4Cは、腫瘍型によって分類されたTCGA Pan-Cancer Atlas試料にわたるVPS4Aコピー数変化の概要を示すプロットを提供する。値は、平均試料倍数性に対するlog2正規化VPS4Aコピー数を示す。各ドットは患者試料を表し、より濃いドットは強いVPS4A喪失（スコア＜－0.75）を有する試料を示す。灰色のバーは、平均VPS4Aコピー数±標準偏差を示す。
【図４．４Ｄ】図4.4Dは、TCGA Pan-Cancer Atlasからの10,712の試料についての遺伝子コピー数間のピアソン相関係数を示すプロットを提供する。左パネル:VPS4A相対コピー数（y軸）およびCDH1相対コピー数（x軸）を示す散布図。右パネル:VPS4B相対コピー数（y軸）およびSMAD4相対コピー数（x軸）を示す散布図。
【図４．４Ｅ】図4.4Eは、TCGA Pan-Cancer Atlas試料においてVPS4Bコピー数を予測するために、18番染色体（x軸）上の表記された遺伝子マーカーの陽性的中率（PPV; 暗い線）および陰性的中率（NPV; 明るい線）（y軸）を提供するプロットと組み合わされた概略図である。VPS4Bの約70kb上流に位置するBCL2コピー数が最も高い的中率を有した。
【図４．４Ｆ】図4.4Fは、Dana-Farber Cancer Institute PROFILEデータベースからの小児がん試料におけるVPS4Bコピー喪失の観察された例を提示する棒グラフである。観察されたBCL2コピー喪失から、VPS4Bコピー数が推測された。
【図４．４Ｇ】図4.4Gは、DFCI PROFILEデータベース中の横紋筋肉腫（RMS）患者試料からの表記遺伝子のコピー喪失の率を提供するマトリックスを提示する。各カラムは個々の患者試料を表す。BCL2およびCDH1コピー数は、それらの染色体での近接性の故に、それぞれ、VPS4BおよびVPS4Aコピー数を推測することが示されている。
【図４．４Ｈ】図4.4Hは、RMS患者試料からの18番染色体についてのコピー数ヒートマップを提供するヒートマップを提示する（Chen et al., Cancer Cell 24 (6): 710

-724, 2013）。各縦のカラムは個々の患者試料を表す。SMAD4およびVPS4Bの位置が線によって示されており、組織学的サブタイプが試料の上に陰影の付いたバーとして列記されている。

【図５Ａ】図5A～5Fは、CRISPR-SpCas9スクリーニングが、ESCRTタンパク質およびULK3キナーゼがVPS4A抑制に対する感受性を改変することを明らかにすることを示す。図5Aは、VPS4A依存性の修飾因子を同定するためのCRISPR-SpCas9機能喪失スクリーニングのワークフローを提供する概略図である。CRISPR-SpCas9エンドヌクレアーゼおよびshVPS4A-2誘導性RNAiシステムで安定に形質導入されたSNU213膵臓癌細胞を、Brunelloゲノム規模レンチウイルスsgRNAライブラリーで感染させた。実験は2つ組で1回行った。

【図５Ｂ】図5Bは、そのノックアウトによって、VPS4Aが抑制されたSNU213-SpCas9細胞の細胞生存率が変化した遺伝子を明らかにするボルケーノプロットを提供する。各ドットは遺伝子を表す。非処理細胞とドキシサイクリン処理細胞との間の正規化された平均sgRNA存在量の$\log_2$値の差（x軸）およびこの差のSTARS有意性q値（y軸）が示されている。細胞のVPS4A抑制に対する感受性を増強した重要な遺伝子が、中央の点線の左側の影が付いた領域の上に示されており（増感; 上部および中央の左パネル）、一方、VPS4A抑制中に細胞増殖および生存を促進させる遺伝子が、中央の点線の右側の影が付いた領域の上に示されている（抵抗性; 上部および中央の右側パネル）。STARS5％偽陽性率閾値が示されている（q値＜0.05）。

【図５Ｃ】図5Cは、非処理（各遺伝子において左側の群）およびドキシサイクリン（各遺伝子において右側の群）処理試料の示差分析（図5B）において上位ヒットとしてスコアリングされた遺伝子についてpDNA中のsgRNA存在量に対してスクリーニングした後の個々のsgRNA存在量についての正規化された平均倍数変化の$\log_2$値を示すバイオリンプロットを提供する。各ドットは、表記された遺伝子を標的とするsgRNAを表す（両反復実験の平均）。バイオリンプロットは、25～75％パーセンタイル（ストリッピングされた黒いバー）とともに中央値（水平の黒いバー）を示す。

【図５Ｄ】図5Dは、図5Bと同様に、ESCRT機構に関連する遺伝子のみを示すボルケーノプロットを提供する。挿入図中に示されているESCRT機構内でのそれらの機能的注釈を示すために、遺伝子には陰影が付されている。例えば、ESCRT-0/Bro1:STAM2; ESCRT-1:VPS37B、VPS28; ESCRT-II:SNF8、VPS36; ESCRT-III:CHMP1A、CHMP1B、CHMP4B、CHMP5、CHMP7、IST1; VPS4/VTA1:MPS4B、VPS4A; 補助:UK3、SPAST、ZFYVE19; MITD1。

【図５Ｅ】図5Eは、スクリーニング（図5B）から得られた上位50スコアの遺伝子の、定型化され、手作業で注釈付けされたタンパク質ネットワークを示す。灰色の接続は、STRING（https://string-db.org）を使用して予測された機能的関連によって規定されるタンパク質間の相互作用の強度を示す。STRINGを用いてクラスタを得、次いで、手作業での検査によって機能的な群へとグループ分けした。より明るい球（例えば、ULK3、VTA1、CHMP1A、STAM、RUNX1、TIAL1）は増感遺伝子を示し、一方、より暗い球は、VPS4A抑制の状況における抵抗遺伝子を示す。

【図５Ｆ】図5Fは、GO Biological Processes、Reactome、KEGGおよびCORUMベースの遺伝子セットを使用するスクリーニングから得られた上位50スコアの遺伝子にマッピングするMetascape（https://metascape.org）要約遺伝子セットの統計的有意性（x軸）を示す遺伝子セットエンリッチメントプロットを示す棒グラフを提示する。遺伝子セット名の後ろの数字は、そのセット内の上位50の遺伝子の数を遺伝子セット内の遺伝子の総量で割ったものを示す。

【図５．５Ａ】図5.5A～5.5Fは、VPS4Bのコピー喪失を伴うがん細胞における依存性としてのVPS4Aの検証を示す。図5.5Aは、VPS4Aを標的とする3つの異なるsgRNAまたは2番染色体上の遺伝子砂漠を標的とする陰性「切断対照」sgRNAでのレンチウイルス形質導入後の5つの異なるCRISPR-SpCas9安定細胞株におけるVPS4AおよびGAPDH免疫ブロットを提供する。すべての細胞株について、sgRNA感染の4日後にタンパク質

可溶化液を収集した。GAPDHは、内部対照としての役割を果たした。実験は1回行った。
【図５．５Ｂ】図5.5Bは、VPS4Aを標的とする3つの異なるテトラサイクリン誘導性shRNA（shVPS4A-1～shVPS4A-3）および配列をマッチさせた対応するC9-11シード対照（shSeed-1～shSeed-3）の効果を試験する、VPS4AおよびGAPDH免疫ブロットを示す。オンターゲットshRNAとマッチさせたC9-11shRNAとの間のVPS4A抑制の比に基づいて、その後の実験で使用するためにshVPS4A-2およびshVPS4A-3を選択した。GAPDHは、ローディング対照としての役割を果たした。実験は1回行った。
【図５．５Ｃ】図5.5Cは、持続的なRNAi媒介性VPS4A抑制後の長期コロニー形成アッセイを示すウェル画像および棒グラフを提示する。表記された時点後に、クリスタルバイオレットでコロニーを染色した。左パネル:示されたshRNAシステムで安定に形質導入された6つの細胞株（n＝2 VPS4B中立; n＝4 VPS4B喪失）を24ウェルプレート中に3つ組で播種し、対照またはドキシサイクリン含有培地で8～29日間処理した。右パネル:酢酸色素抽出後のクリスタルバイオレット染色の吸光度を用いた分光光度測定による定量。バーは、3つの異なる抽出されたウェルの4つの技術的反復実験の平均±標準偏差を示す。最初に反復最適化実験を異なる細胞密度で実施し、異なる時点で採集したが、一般的な傾向は常に類似していた。
【図５．５Ｄ】図5.5Dは、アネキシンVフローサイトメトリーによるアポトーシス誘導を示すプロットを提示する。CRISPR-SpCas9を安定に発現するVPS4B喪失細胞株JRおよびSNU213を、示されたsgRNAでレンチウイルスにより形質導入し、FITCに連結されたアネキシンVを使用するフローサイトメトリーによって感染の5日後にアッセイした。SF3B1の不活性化をアポトーシス誘導についての陽性対照として使用した。両側t検定; p＜0.05、＊＊p＜0.01、＊＊＊p＜0.001。
【図５．５Ｅ】図5.5Eは、IncuCyte（登録商標）蛍光生細胞画像化によって測定された、CRISPR-SpCas9＋、VPS4A^{中立}ES2がん細胞株における時間（x軸）に対するカスパーゼ3/7アポトーシス活性（y軸）を示すプロットを提供する。VPS4Aを標的とするsgRNAに細胞を感染させた。時間を合わせた非感染細胞に対して、カスパーゼ3/7シグナルを正規化した。ドットおよびエラーバーは、3つの異なるウェルからのウェルあたり4画像の平均を使用した単一の実験の平均±標準誤差を表す。Ns:有意でない; 反復測定2元配置ANOVA。
【図５．５Ｆ】図5.5Fは、生細胞の数（y軸）が時間（x軸）で経時的に比較され、ドキソサイクリンの存在下または非存在下（±dox）でのSeed2対照をドキソサイクリンの存在下または非存在下（±dox）でのVPS4A-2と比較する、SNU213のインビトロ生存性品質管理を示すプロットを提供する。
【図６Ａ】図6A～6Dは、インターフェロンシグナル伝達およびCHMP4B発現がVPS4A依存性を調節することを示す。図6Aは、619種のCCLEがん細胞株にわたって、遺伝子mRNA発現とCRISPR-SpCas9 VPS4A依存性スコアとの間のピアソン相関係数（x軸）およびこれらの相互作用の正規化された統計学的有意性（q値）のlog値（y軸）を示すボルケーノプロットを提供する。上位の負に相関する遺伝子は－0.1の左側に存在し、一方、染色体18qに局在化する遺伝子は、一般に、－0.1の右側に存在する。灰色の領域:5％の偽陽性率カットオフを下回る値（－Log（q値）＜1.31、ベンジャミーニ・ホッホベルク）。
【図６Ｂ】図6Bは、GO Biological Processes、ReactomeおよびKEGG遺伝子セットを使用して、そのmRNA発現がVPS4A CRISPR依存性スコアと有意に逆相関した上位250個の遺伝子（図6A）にマッピングされるMetascape（https://metascape.org）要約遺伝子セットの統計的有意性（x軸）を示す遺伝子セットエンリッチメントプロットを提供する。遺伝子セット名の後ろの数字は、そのセットの一部である逆相関した遺伝子の数を遺伝子セット内の遺伝子の総量で割ったものを示す。インターフェロンシグナル伝達に関連する遺伝子セットは太字で強調されている（すなわち、ウイルスに対する応答; インターロイキン-10分泌; 生物学的刺激に対する応答の調節）。
【図６Ｃ】図6Cは、ドキシサイクリン誘導性shVPS4A-2 RNAiシステムを安定に発現

するKP4、PANC0403およびSNU213膵臓癌細胞株のCellTiter-Glo発光によって測定された6日間の細胞生存率を示す用量応答曲線を提供する。細胞を非処理（doxなし）または1μMドキシサイクリン（dox）で3日間処理した。次いで、培地およびドキシサイクリンを新しいものと交換し、精製されたインターフェロン-βまたはインターフェロン-γ（ng/mL）の滴定を上部に添加した。細胞をさらに3日間インキュベートした後、生存率を測定した。各ドットは、3つ組で行われた2回の実験の平均を表し、エラーバーは標準偏差を示す。4パラメータの対数ベースのモデルを用いて、用量応答曲線をフィッティングした。

【図６Ｄ】図6Dは、10分割交差検証多重線形回帰モデルからの予測値（y軸）と観察されたVPS4A CRISPR依存性スコア（x軸）との間のピアソン相関係数を示す散布図を提供する。この線形モデルは、VPS4A依存性を予測するために、621のがん細胞株にわたって、正規化されたVPS4B、CHMP4B、ISG15およびITCH mRNA発現値を利用する。これら4つの項の各々が、このモデルの価値を著しく高めた。

【図６．６Ａ】図6.6A～6.6Hは、変化したVPS4B発現ががん細胞におけるVPS4A依存性を調節することを示す。図6.6Aは、VPS4B RNAseq発現（y軸）とVPS4B相対コピー数（x軸）との間の散布図を提供する。TCGA Pan-Cancer Atlas中の10,712の患者試料からの相関。

【図６．６Ｂ】図6.6Bは、VPS4A RNAseq発現（y軸）とVPS4A相対コピー数（x軸）との間の散布図を提供する。CCLE中の1,171の細胞株からの相関; R:＝0.51p＝1.892e-78。

【図６．６Ｃ】図6.6Cは、VPS4Bを標的とするsgRNAによる感染後の、VPS4B^{中立}RD＋SpCas9細胞株に由来する16の異なるモノクローナル細胞株におけるVPS4B免疫ブロットを提供する。TIDEseqによって分析されたサンガー配列決定からの対応するVPS4B挿入/欠失率が各ゲルレーンの下に列記されている。

【図６．６Ｄ】図6.6Dは、VPS4Bに対するsgRNAを感染させたポリクローナルRD-SpCas9細胞において、TIDEseqによって決定されたVPS4B中の挿入/欠失率を示す棒グラフを提供する。数字は、インタクトなVPS4B配列決定リードのパーセンテージを示す。

【図６．６Ｅ】図6.6Eは、VPS4Bを標的とするsgRNAでレンチウイルスによって形質導入されたポリクローナルRD-SpCas9細胞株（図6.6D参照; 図6.6Cにおけるモノクローナル培養物が由来した親集団）を使用したCellTiter-Glo（登録商標）生存アッセイによって定量された相対細胞生存率（y軸）を示すバープロットを提供する。各ドットは、表記のsgRNA（x軸）で形質導入された個々のウェルの生存効果を表す。CellTiter-Glo発光値を陰性対照sgRNA（sgLacZおよびsgChr2）の平均効果に対して正規化することによって、相対生存率を計算した。バーは、表記されたsgRNAのそれぞれの平均生存効果を示す。エラーバーは標準偏差を表す。陰性対照ガイドおよびsgVPS4A-1の平均に対する両側t検定によって有意性を決定した。細胞生存率のパーセント低下は、図6.6Dからの推定されたVPS4Bインデル率と密接に一致した。

【図６．６Ｆ】図6.6Fは、陰性対照sgRNA、2番染色体を標的とするsgRNA、または内因性VPS4A対立遺伝子を不活性化することができるが、ORF対立遺伝子を不活性化することはできない、イントロン－エクソン接合部を標的とするsgVPS4A-2による感染後の、VPS4Aオープンリーディングフレーム（ORF）を発現しない（-）か、またはVPS4A^{WT}ORFを発現するVPS4B喪失 59M-SpCas9細胞におけるVPS4A免疫ブロットを提供する。内因性VPS4Aを発現するのみの細胞とORFを発現する細胞との間でVPS4A発現レベルを例示するために、短時間または長時間の曝露を伴う免疫ブロットが提供されている。

【図６．６Ｇ】図6.6Gは、示されたVPS4A野生型および変異体cDNAオープンリーディングフレームの感染および抗生物質選択後の59MSpCas9細胞の時間（x軸）に対する生存細胞の数（y軸）を示す細胞増殖曲線を提供する。感染後の細胞増殖中にトリパンブルー排除を用いて、生細胞の単一細胞数の定量を行った。

【図６．６Ｈ】図6.6Hは、VPS4B喪失　59M-SpCas9細胞（左）およびVPS4A^{WT}（

中央）またはVPS4A^{L64A}ORF（右）を過剰発現するVPS4B喪失59M-SpCas9細胞におけるCellTiter-Glo生存アッセイによって測定された相対細胞生存率（y軸）を示すドットプロットを提供する。各ドットは、表記されたsgRNAで処理したアッセイプレートの個々のウェルからの正規化された細胞生存度を表す（方法を参照のこと）。水平の黒いバーは各群の平均を示す。すべてのパネルについて、＊p＜0.05、＊＊p＜0.01、＊＊＊p＜0.001および＊＊＊＊p＜0.0001（独立t検定、陰性対照sgRNAの平均生存効果を表記されたsgRNA処理と比較）。

【図７Ａ】図7A～7Dは、VPS4A抑制が、VPS4B喪失細胞における膜生物学に影響を及ぼすことを示す。図7Aは、ドキシサイクリン誘導性shVPS4A-2 RNAiシステムに安定に感染した3つの異なる横紋筋肉腫細胞株におけるCHMP4B、エメリンおよびDNA（DAPI）の共焦点免疫蛍光画像を提供する。対照培地（上列）またはVPS4A抑制のために1μMドキシサイクリンを補充した培地（下列）中で5日後に、細胞を画像化した。免疫蛍光法によってCHMP4Bおよびエメリンを検出し、DAPIで染色することによってDNAを検出した（白いスケールバー:50μm）。

【図７Ｂ】図7Bは、図7Aからの非処理（各細胞型について左）およびドキシサイクリン（dox）処理（各細胞型について右）細胞におけるCHMP4B小斑点形成の定量化を提供するバイオリンプロットを示す。単一の実験からの複数の共焦点画像（n:5～14画像）をCellProfiler v3.1.9で分析した。RD非処理（n:46細胞）、RD＋dox（n:50細胞）、JR非処理（n:243細胞）、JR＋dox（n:193細胞）、SMSCTR非処理（n:172細胞）、SMSCTR＋dox（n:174細胞）。Ns:有意ではない、＊q値＜0.05、＊＊q値＜0.01（補正されたベンジャミーニ・エクティエリ偽陽性率を用いた両側ブラウン・フォーサイスANOVA）。

【図７Ｃ】図7Cは、ドキシサイクリン誘導性shVPS4A-2 RNAiシステムで安定に形質導入されたSNU213膵臓癌細胞におけるVPS4A抑制後のRAB7、LC3BおよびSEC61Bの共焦点免疫蛍光画像を提供する。対照培地（上列）または1μMドキシサイクリンを補充した培地（下列）中で6日間インキュベートした後、細胞を画像化した。本実験は1回行った。画像はグレースケール値を示す（白いスケールバー:50μm）。

【図７Ｄ】図7Dは、図7Cに記載されている非処理（各枠内の左側）およびドキシサイクリン（dox）処理（各枠内の右側）SNU213細胞におけるRAB7、LC3BおよびSEC61B小斑点形成の定量化を提供するバイオリンプロットを提示する。単一の実験からの複数の共焦点画像（n:2～4画像）をCellProfiler v3.1.9で分析した。RAB7:50（非処理）対52（処理）細胞、LC3B:73（非処理）対49細胞、SEC61B:85（非処理）対30（処理）細胞。上のパネル:3つの染色のそれぞれについて、バックグラウンド補正および閾値処理された、細胞あたりの絶対的な明るい小斑点の量が示されている。下のパネル:3つの染色のそれぞれについて、バックグラウンド補正後に細胞中で特定された閾値処理された小斑点の小斑点サイズ。Ns:有意ではない、＊q値＜0.05、＊＊q値＜0.01（2段階ベンジャミーニ、クリーガーおよびエクティエリ偽陽性率によって補正された両側クラスカル-ウォリスANOVA）。

【図８Ａ】図8A～8Dは、VPS4A依存性の修飾因子についてのスクリーニングが、ESCRTタンパク質およびULK3キナーゼについての重要な役割を明らかにすることを示す。図8Aは、CRISPR-SpCas9ゲノムスケールの修飾因子スクリーニングの2つの非処理反復実験からのpDNAに対するsgRNAガイドレベルの正規化された倍数変化のlog2値を示すプロットを提供する。各ドットは異なるsgRNAを表し、存在量は、Illuminaをベースとする次世代配列決定リードカウントの100万当たりリード（RPM＋1）正規化を使用して決定した。線形回帰はピアソン相関を示す。

【図８Ｂ】図8Bは、図8Aと同様であるが、修飾因子スクリーニングの2つのドキシサイクリン処理された反復実験に対するものである。

【図８Ｃ】図8Cは、CRISPR-SpCas9ゲノムスケールの修飾因子スクリーニングの2つの非処理反復実験の遺伝子レベル平均に対するsgRNAガイドレベルの倍数変化を崩壊させた後の、pDNAに対する遺伝子レベルの正規化された倍数変化のlog2値を示すプロッ

トを提供する。各ドットは遺伝子を表し、sgRNA存在量は、Illuminaをベースとする次世代配列決定リードカウントの100万当たりリード（RPM＋1）正規化を使用して決定した。線形回帰はピアソン相関係数を示す。

【図８Ｄ】図8Dは、図8Cと同様であるが、修飾因子スクリーニングの2つのドキシサイクリン処理された反復実験に対するものである。

【図９Ａ】図9A～9Iは、インターフェロンシグナル伝達およびCHMP4B発現がVPS4A依存性を調節することを示す。図9Aは、CCLEがん細胞株にわたって、正規化された相対定量的タンパク質存在量とCRISPR-SpCas9 VPS4A依存性スコアとの間のピアソン相関係数（x軸）およびこれらの相互作用の正規化された統計学的有意性（q値）のlog値（y軸）を示すボルケーノプロットを提供する。上位の負に相関するタンパク質は一般に左上に示されているのに対して、上位の正に相関するタンパク質には濃い灰色で陰影が付されている。プロットは、少なくとも150のがん細胞株にわたって検出されたタンパク質間の相関のみを取り込んでいる。定量的質量分析後に、10の参照がん細胞株の定量的質量分析から得られた参照タンパク質存在量値に対する正規化を使用してタンパク質存在量を決定した。灰色の領域:5％の偽陽性率カットオフを下回る値（－log（q値）＜1.31、ベンジャミーニ・ホッホベルク）。

【図９Ｂ】図9Bは、GO Biological Processes、ReactomeおよびKEGG遺伝子セットを使用して、VPS4A CRISPR依存性スコアと有意に逆相関したタンパク質（図9A）にマッピングされるMetascape（https://metascape.org）要約遺伝子セットの統計的有意性（x軸）を示す遺伝子セットエンリッチメントプロットを示す棒グラフを提供する。遺伝子セット名の後ろの数字は、そのセットの一部である逆相関した遺伝子の数を遺伝子セット内の遺伝子の総量で割ったものを示す。

【図９Ｃ】図9Cは、VPS4Bコピー喪失を示す210のがん細胞株（VPS4Bについて1または2コピーのみを有し、0.8未満の相対的なVPS4Bコピー数を有する細胞株）にわたって、遺伝子mRNA発現とCRISPR-SpCas9 VPS4A依存性スコアとの間のピアソン相関係数（x軸）およびこれらの相互作用の正規化された統計学的有意性（q値）のlog値（y軸）を示すボルケーノプロットを提供する。上位の負に相関する遺伝子は、灰色の影が付された領域の上および垂直の点線の左側に生じるのに対して、上位の相関する遺伝子は、灰色の影が付された領域の上および垂直の点線の右側に生じる。灰色の領域:5％の偽陽性率カットオフを下回る値（－log（q値）＜1.31、ベンジャミーニ・ホッホベルク）。

【図９Ｄ】図9Dは、GO Biological Processes、ReactomeおよびKEGG遺伝子セットを使用して、VPS4B欠損がん細胞株にわたって、そのmRNA発現がVPS4A CRISPR依存性スコアと有意に逆相関した遺伝子（図9C）にマッピングされるMetascape（https://metascape.org）要約遺伝子セットの統計的有意性（x軸）を示す遺伝子セットエンリッチメントプロットを提供する。遺伝子セット名の後ろの数字は、そのセットの一部である逆相関した遺伝子の数を遺伝子セット内の遺伝子の総量で割ったものを示す。

【図９Ｅ】図9Eは、shVPS4A-2誘導性RNAiシステムを発現する3つの膵臓癌細胞株（x軸）にわたる相対細胞生存率（y軸）を示す箱ひげ図を提供する。ドキシサイクリンを用いてまたは用いずに細胞を6日間処理し、CellTiter-GloによるATPベースの発光読み出し情報を用いて細胞生存率を測定し、非処理試料の平均生存率に対して正規化した。各ドットは、6つ組で実施された2つの実験からの別個の測定値を示す。箱は、平均とともに10～90％のパーセンタイルを示す。

【図９Ｆ】図9Fは、3つの膵臓癌細胞株（図の説明文）にわたって分類された5つのインターフェロン受容体（x軸）についての正規化されたmRNA発現値（y軸）を示す棒グラフを提供する。

【図９Ｇ】図9Gは、10分割交差検証線形回帰モデルからの予測スコア（y軸）と観察されたVPS4A CRISPR依存性スコア（x軸）との間のピアソン相関係数を示す散布図を提供する。線形モデルは、621のCCLEがん細胞株にわたって、正規化されたCHMP4B mRNA発現（左上）、VPS4B mRNA発現（左下）、ISG15 mRNA発現（右上）またはITCH mRNA発現（右下）値のいずれかを利用する。

【図９Ｈ】図9Hは、10分割交差検証線形回帰モデルからの予測スコア（y軸）と観察されたVPS4B CRISPR依存性スコア（x軸）との間のピアソン相関係数を示す散布図を提供する。線形モデルは、621のCCLEがん細胞株にわたって、正規化されたCHMP4B mRNA発現（左上）、VPS4A mRNA発現（左下）、ISG15 mRNA発現（右上）またはITCH mRNA発現値（右下）のいずれかを利用する。

【図９Ｉ】図9Iは、10分割交差検証多重線形回帰モデルからの予測値（y軸）と観察されたVPS4B CRISPR依存性スコア（x軸）との間のピアソン相関係数を示す散布図を提供する。この線形モデルは、予測のために、621のCCLEがん細胞株にわたって、正規化されたVPS4B、CHMP4B、ISG15およびITCH mRNA発現値を利用する。このモデルでは、VPS4A＋CHMP4B線形モデルへのISG15およびITCH発現の追加は著しくは寄与しなかった。

【図１０Ａ】図10Aは、625種の細胞株（CRISPR）および711種の細胞株（RNAi）に基づいてCRISPR/RNAi遺伝子依存性スコアを比較する模式図を提供し、細胞株の±20％にSMAD4が存在しない（SMAD4-）こと、および細胞株の±80％にSMAD4が存在する（SMAD4＋）ことを示している。

【図１０Ｂ】図10Bは、CRISPR-SpCas9（x軸）およびRNAi（y軸）遺伝子依存性スコアについて示されたLog正規化q値を例示する散布図を提供する。t分布を使用して両側p値を計算し、10％（q値＜0.1、薄い灰色の領域より上）のベンジャミーニ・ホッホベルク偽陽性率（FDR）を使用して調整した。HAUS1、SKA1、CHMP4Bなどの必須遺伝子（中間の灰色の陰影）およびVPS4AおよびKRASなどの選択的遺伝子（より濃い灰色）が示されている。

【図１０Ｃ】図10Cは、VPS4A（y軸）CRISPRスコアに関して、SMAD4の存在下または非存在下のがん細胞株（x軸）を示すバイオリンプロットを提示する。

【図１１】図11は、SNU213膵臓癌およびJR横紋筋肉腫細胞株においてチューブリン（Alexa Fluor 488）、DNA（DAPI）、エメリンおよびCHMP4Bを使用した細胞質分裂ブリッジおよび中心体の免疫蛍光画像を提供する。VPS4A抑制（下のパネル）は、核変形、ESCRT-III蓄積、脱離欠陥、G2/M停止およびアポトーシスを示した。矢印は、小核（SNU213）または分解していない細胞質分裂ブリッジ（JR）の形態のいずれかの核異常を示す。単一の実験からの代表的な画像が示されている。本実験は1回繰り返された。

【図１２Ａ】図12Aは、COV413A（上のパネル）卵巣がんおよびJR（下のパネル）横紋筋肉腫がん細胞株におけるSMAD4コピー数およびVPS4Bコピー数（ドット）に焦点を当てた、18番染色体（x軸）にわたる遺伝子プローブのlog2正規化相対コピー数（y軸）のプロットを提供する。

【図１２Ｂ】図12Bは、VPS4B-/-RDおよびVPS4B＋JR細胞株に由来する横紋筋肉腫細胞株におけるプロットおよびVPS4B免疫ブロットを提供する。VPS4Aノックアウト後の対応するVPS4B相対生存率が、各ゲルレーンの下のプロットに示されている。

【図１２Ｃ】図12Cは、VPS4Bコピー喪失（n＝12種のがん細胞株）または中立のVPS4Bコピー数（n＝11種のがん細胞株）のいずれかを有するがん細胞株において、総タンパク質に対して正規化されたVPS4Bタンパク質レベルの定量化（y軸）を提供するバイオリンプロットを提示する。＊＊＊p値＜0.0005、両側独立T検定

【図１２Ｄ】図12Dは、腫瘍型によって分類されたTCGA Pan-Cancer Atlas試料におけるVPS4Bコピー数変化の要約を提供するプロットを提示する。患者試料の細胞略語は、The Cancer Genome Atlas（https://gdc.cancer.gov/resources-tcga-users/tcga-code-tables/tcga-study-abbreviations）中に特定されている。VPS4Bのコピー喪失は、TCGA試料にわたって共通であった。値は、平均試料倍数性に対する$\log_2$正規化VPS4Bコピー数を示す。各ドットは、VPS4Bコピー数低下を有する試料を表す。灰色のバーは、平均VPS4Bコピー数±標準偏差を示す。

【図１３Ａ】図13Aは、種々のがん細胞株におけるVPS4Bに対するデジタル化された免疫沈降（IP）およびデジタル化された免疫ブロット（ブロット）を示し、VPS4Aの存在

下では、IPは、VPS4Bコピー数が中立または喪失の両方の試料におけるVPS4Bを示すのに対して、ブロットについては、VPS4B中立試料についてのみ、VPS4Bが存在する。
【図１３Ｂ】図13Bは、VPS4Bに対するデジタル化されたグリセロール勾配分画および免疫ブロットを示し、VPS4AおよびVPS4Bが主に低分子量複合体中に存在することを示唆している。
【図１３Ｃ】図13Cは、VPS4AおよびVPS4Bが、ヘテロマー複合体と比較してホモマー複合体に対してより高い親和性を有することを示す画像を提示する。
【図１４Ａ】図14Aは、様々な濃度でのVPS4Bの相対蛍光単位（RFU）に対する分単位の時間（x軸）を含むVPS4B-Hcp1進行曲線を提示する。
【図１４Ｂ】図14Bは、異なるVPS4A構築物のATPアーゼ活性を示すプロットを提示する。
【発明を実施するための形態】
【０１０３】
発明の詳細な説明
本発明は、がんの治療に有用な組成物および方法を特徴とする。
【０１０４】
本発明は、ESCRT ATPアーゼであるVPS4AおよびVPS4Bが強力な合成致死依存性としてスコア化されたという発見に少なくとも部分的に基づく。本明細書で以下に提供される実施例において、VPS4Aは、VPS4Bの喪失を有するがんにおいて選択的に必須であることが見出され、VPS4BがSMAD4に近接しているために、いくつかのがんにおいては、VPS4BはSMAD4とともに失われ得る。VPS4BもVPS4Aの喪失を有するがんにおいて選択的に必須であることも見出され、VPS4AはE-カドヘリンをコードする近位のCDH1とともに失われ得る。CHMP4Bのより高い発現レベルを有する細胞は、生存可能であるためにVPS4をより強く必要とすることが見出された。また、VPS4A/Bは、CHMP1A、VTA1およびIST1とともに共必須であることが見出された。
【０１０５】
本発明は、VPS4A依存性を首尾よく予測するために、マーカーVPS4B、CHMP4B、ITCHおよび/またはISG15の発現レベルを多変量モデルへの入力として使用することができるという発見にも少なくとも部分的に基づく。多変量モデルを作成するための方法は、当技術分野において公知である（例えば、H. Joe, Multivariate Models and Dependence Concepts, Chapman & Hall, 1997; F. Harrell, "Regression Modeling Strategies", Springer, 2001; およびStephan et al., "PSA and new biomarkers within multivariate models to improve early detection of prostate cancer", Cancer Letters, 249:18-29 (2007) を参照）。
【０１０６】
以下に詳細に報告されているように、一般的な腫瘍抑制遺伝子のゲノム喪失に関連する新しいがん治療標的を同定するために、CRISPR-SpCas9およびRNA干渉機能喪失スクリーニングを実施した。ESCRT ATPアーゼVPS4AおよびVPS4Bは、強力な合成致死依存性としてスコア化された。VPS4B欠損細胞におけるVPS4A抑制は、ESCRT-IIIフィラメント蓄積、細胞質分裂欠陥、核変形、G2/M停止、アポトーシスおよび強力な腫瘍退縮を選択的にもたらした。CRISPR-SpCas9スクリーニングおよび統合ゲノム解析は、他のESCRTメンバー、脱離の調節因子およびインターフェロンシグナル伝達をVPS4A依存性の修飾因子として明らかにした。合成致死脆弱性の一覧表が本明細書に記載されており、VPS4AおよびVPS4Bががんに対する有望な治療標的として同定された。
【０１０７】
合成致死性
合成致死性とは、ある特定の遺伝子対について、いずれかの遺伝子の不活性化は許容されるが、両遺伝子の機能喪失が組み合わされると、減少した細胞生存性がもたらされるという観察を指す（Dobzhansky, T. Genetics 31:269-290, 1946; Hartwell et al., Science 278:1064-1068, 1997; Huang et al., Nature Reviews Drug Di

scovery. 11:1-16, 2019; Kaelin, The Journal of clinical investigation, 104 (11): 1503-1506, 1999）。がんにおける合成致死関係は、いくつかの異なる状況で定義されてきた。例えば、BRCA1/2変異がんは、相同組換えDNA修復中に欠陥を有し、ポリ（ADP-リボース）ポリメラーゼ（PARP）DNA修復酵素の阻害に対して特に感受性である。この合成致死性相互作用は、複数のヒト治療試験で検証されており、いくつかのがん型におけるPARP阻害剤療法の臨床的承認に至っている（Sonnenblick et al. Nature reviews Clinical oncology, 12 (1): 27-41, 2015）。

【０１０８】

SMARCA2-SMARCA4、ARID1A-ARID1B、UBB-UBCおよびMAGOH-MAGOHBの間で実証されたように、第2の機能的に冗長なパラログ遺伝子の喪失によって1つのパラログへの依存性が付与されるパラログ遺伝子の間にも合成致死関係が観察されてきた（Helming et al. Nat. Med., 20 (3): 251-254, 2014; Hoffman et al. Proc Natl Acad Sci USA, 111 (8): 3128-3133, 2014; Tsherniak, A. et al. Cell 170, 564-576 e516 (2017); Viswanathan et al. Nat Genet, 50 (7): 937-943, 2018）。このようなパラログ合成致死性は、ドライバー腫瘍抑制遺伝子（TSG）および近くのパラログパッセンジャー遺伝子の同時喪失が存在する場合に生じ得、これは「付随的致死性」と呼ばれている現象である。例としては、染色体1p36上のENO1の喪失を伴うENO2依存性またはSMAD4/18q遺伝子座におけるME2欠失を伴うME3依存性が挙げられる（Dey et al. Nature, 542（7639:119-123, 2017; Muller et al. Nature, 488 (7411): 337-42, 2012）。あるいは、MTAPがCDKN2A/9p21遺伝子座において欠失している場合のPRMT5必須性など、腫瘍抑制遺伝子に隣接する第2の機能的に関連する非パラログ遺伝子の喪失の結果として1つの遺伝子における依存性が生じる場合にも、付随的致死性が起こり得る（Kryukov et al. Journal of Experimental Med, 214 (10): 2933-2946, 2016; Mavrakis et al. Science, 351 (6278): 1208-13, 2016）。合成致死性に加えて、それ自体、がんにおいてコピー数低下を受けた遺伝子に対する選択的脆弱性（Nijhawan et al., Cell, 150 (4): 842-854, 2012; Paolella et al. Elife, 6:e23268, 2017）も記載されてきた。例えば、TP53のヘテロ接合欠失は、しばしば、必須遺伝子POLR2A、MED11およびAURKBのバイスタンダー喪失をもたらし、これらの遺伝子のノックダウンに対するがん細胞の感受性を増強する（Liu et al. Nature, 520 (7549): 697-701, 2015; McDonald, E.R., 3rd et al. Cell 170, 577-592 e510 (2017)）。がんにおいて合成致死関係を標的とすることは、腫瘍細胞と正常細胞との間で有効性の幅広い治療域をもたらし得るので、薬理学的に扱いやすい合成致死の標的の同定は、腫瘍薬開発プログラムにとって優先事項であり続ける。

【０１０９】

確立されたTSGのゲノム喪失に関連する合成致死脆弱性を体系的に定義するために、ゲノム規模のCRISPR-SpCas9およびRNA干渉機能喪失スクリーニングデータを、600を超えるがん細胞株から分析した。合成致死性相互作用（193）を特定し、50の一般的なTSGの1つまたは複数で優先順位を付けた（表5）。特に、液胞タンパク質局在4ホモログAおよびB（VPS4AおよびVPS4B）をコードするパラログ遺伝子は、SMAD4またはCDH1遺伝子とのそれぞれVPS4BまたはVPS4Aの同時欠失のために、SMAD4またはCDH1のゲノムコピー喪失を有する腫瘍に対する選択的遺伝的脆弱性であることが見出された。VPS4Bは18番染色体の長腕（q）上に位置し、SMAD4から12.3Mb離れており、一方、VPS4Aは染色体16q上の（E-カドヘリンをコードする）CDH1の0.476Mb下流に位置する。SMAD4とVPS4Bの同時欠失は、膵臓、結腸直腸、胃および腎細胞癌において一般的に観察され、胆管、肺、前立腺、食道、子宮、子宮頸部および卵巣のがんにおいてより少ない程度で観察される（Kojima, K. et al. Cancer Res 67, 8121-8130 (2007); Thiagalingam, S. et al. Nat Genet 13, 343-346 (1996); Zack, T.I. et al. Nat Genet 45, 1134-1140 (2013)）。一方、CDH1およびVPS4Aの喪失は、胃、乳房、皮膚、結腸および前立腺のがんにおいて生じる（Berx et al. Genomics,

26 (2): 281-289, 1995; Graff et al. Cancer Res, 55 (22): 5195-5199, 1995; Yoshiura et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92:7416-7419, 1995; Zack, T.I. et al. Nat Genet 45, 1134-1140 (2013)) 。

【０１１０】

VPS4AおよびVPS4BはAAA ATPアーゼとして機能し、AAA ATPアーゼは反転膜リモデリングのために必須の多量体タンパク質複合体であるエンドソーム輸送選別複合体（ESCRT）の調節のために極めて重要である。ESCRT機構は、細胞質分裂、膜修復、オートファジーおよびエンドソームプロセシングを含む様々な細胞過程に関与している（Schoneberg, J. et al. Nat Rev Mol Cell Biol 18, 5-17 (2017); Vietri et al. Nature Review Molecular Cell Biology, 21:25-42, 2020）。ここで、低下したコピー数のVPS4Bを有する腫瘍におけるVPS4Aの抑制は、ESCRT-IIIフィラメントの蓄積、細胞質分裂欠陥、核膜異常および微小核形成をもたらし、最終的にはG2/M細胞周期停止およびアポトーシスをもたらす。さらに、CRISPR-SpCas9ゲノム規模修飾因子スクリーニングを使用して、VPS4A依存性を促進または抑制する複数の遺伝子が同定された。がん細胞生存におけるESCRT経路には極めて重要な役割が存在し、VPS4酵素は、染色体18q上のVPS4Bの喪失または染色体16q上のVPS4Aの喪失を有する腫瘍に対して特異的な合成致死標的として使用され得る。

【０１１１】

RNA干渉

RNA干渉（RNAi）は、関心対象の特定のタンパク質の細胞発現を減少させるための方法である（Tuschl, Chembiochem 2:239-245, 2001; Sharp, Genes&Devel. 15:485-490, 2000; Hutvagner and Zamore, Curr. Opin. Genet. Devel. 12:225-232, 2002; およびHannon, Nature 418:244-251, 2002に概説されている）。RNAiでは、遺伝子サイレンシングは、典型的には、細胞内の二本鎖RNA（dsRNA）の存在によって転写後に引き起こされる。このdsRNAは、細胞内で、低分子干渉RNA（siRNA）と呼ばれるより短い断片に加工される。dsRNAの形質移入によるまたはプラスミドベースの発現システムを用いたshRNAの発現を通じた細胞中へのsiRNAの導入は、現在、哺乳動物細胞に機能喪失表現型を作り出すために使用されている。本明細書に記載されるように、VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1を標的とするsiRNAは、インビボまたはインビトロで標的遺伝子の発現を減少させる。

【０１１２】

阻害性核酸分子

VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1阻害性核酸分子は、本質的に、VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1発現を減少させるために一本鎖または二本鎖核酸分子として使用され得る核酸塩基オリゴマーである。1つのアプローチにおいて、VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1阻害性核酸分子は、RNA干渉（RNAi）によって媒介されるVPS4AまたはVPS4B遺伝子発現のノックダウンのために使用される二本鎖RNAである。一態様において、本発明の核酸塩基オリゴマーの8～25（例えば、8、10、12、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25）の連続する核酸塩基を含む二本鎖RNA（dsRNA）分子が作製される。dsRNAは、二重鎖化したRNAの2つの相補鎖、または自己二重鎖化した単一RNA（低分子ヘアピン型（sh）RNA）であり得る。典型的には、dsRNAは約21または約22塩基対であるが、所望であれば、より短くてもよく、またはより長くてもよい（最大約29の核酸塩基）。二本鎖RNAは、標準的な技術（例えば、化学合成またはインビトロ転写）を用いて作製することができる。キットは、例えば、Ambion（Austin、Tex.）およびEpicentre（Madison、Wis.）から入手可能である。哺乳動物細胞においてdsRNAを発現させるための方法は、Brummelkamp et al. Science 296:550-553, 2002; Paddison et al. Genes&Devel. 16:948-958, 2002.Paul et al. Nature Biotechnol. 20:505-508, 2002; Sui et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:5515-5520, 2002; Yu et al. Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 99:6047-6052, 2002; Miyagishi et al. Nature Biotechnol. 20:497-500, 2002; およびLee et al. Nature Biotechnol. 20:500-505 2002に記載されており、これらの各々は参照により本明細書に組み入れられる。VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1遺伝子に「対応する」阻害性核酸分子は、二本鎖阻害性核酸分子の各鎖が標的VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1遺伝子の相補鎖に結合することができるように、二本鎖遺伝子の少なくとも1つの断片を含む。阻害性核酸分子は、参照VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1配列への完全な対応を有する必要はない。一態様において、siRNAは、標的核酸と少なくとも約85％、90％、95％、96％、97％、98％、またはさらには99％の配列同一性を有する。例えば、1～2塩基対のミスマッチを有する19塩基対の二重鎖は、本発明の方法において有用であると考えられる。他の態様において、阻害性核酸分子の核酸塩基配列は、1、2、3、4、5またはそれより多くのミスマッチを示す。

【０１１３】

本発明によって提供される阻害性核酸分子は、siRNAに限定されず、VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1核酸分子またはポリペプチドの発現を減少させるのに十分な任意の核酸分子を含む。本明細書中に提供されるDNA配列の各々は、例えば、VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1の発現を減少させるための治療用アンチセンス核酸分子の発見および開発において使用され得る。本発明はさらに、触媒性RNA分子またはリボザイムを提供する。このような触媒性RNA分子は、インビボでVPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1核酸分子の発現を阻害するために使用することができる。アンチセンスRNA内にリボザイム配列を含めることにより、その分子にRNA切断活性が付与され、それによって構築物の活性を増加させる。標的RNA特異的リボザイムの設計および使用は、Haseloff et al., Nature 334:585-591.1988および米国特許出願公開第2003/0003469号に記載されており、これらの各々は参照により組み入れられる。本発明の様々な態様において、触媒性核酸分子はハンマーヘッドまたはヘアピンモチーフ内に形成される。このようなハンマーヘッドモチーフの例は、Rossi et al., Aids Research and Human Retroviruses, 8:183, 1992によって記載されている。ヘアピンモチーフの例は、1988年9月20日に出願された米国特許出願第07/247,100号の一部継続出願である1989年9月20日に出願されたHampelらの"RNA Catalyst for Cleaving Specific RNA Sequences"、Hampel and Tritz, Biochemistry, 28:4929, 1989、ならびにHampel et al., Nucleic Acids Research, 18:299, 1990によって記載されている。本発明において、これらの特異的モチーフは限定的なものではなく、当業者は、本発明の酵素的核酸分子において重要なことは、酵素的核酸分子が標的遺伝子RNA領域の1つまたは複数に相補的である特異的基質結合部位を有すること、および酵素的核酸分子が、RNA切断活性を当該分子に付与するヌクレオチド配列をその基質結合部位内または基質結合部位周囲に有することであることを認識するであろう。

【０１１４】

対象が新生物（例えば、脳、膀胱、胆汁、乳房、管、結腸、食道、胃、胚細胞、肝臓、または頭頸部のがん、肺がん、骨肉腫、卵巣がん、膵臓癌、横紋筋肉腫（例えば、小児横紋筋肉腫））を有すると診断された後に、VPS4A、VPS4B、SMAD4、CDH1、CHMP4B、ITCH、および/またはISG15の存在または非存在について新生物細胞を特徴付けることによって、処置の方法が選択される。VPS4Aを欠く細胞（例えば、VPS4A欠損コピー数）は、VPS4Bの発現または活性を阻害する作用物質による処置を選択される。VPS4Bを欠く細胞（例えば、VPS4B欠損コピー数）は、VPS4Aの発現または活性を阻害する作用物質による処置を選択される。したがって、合成致死対の一方、例えば、VPS4A/VPS4B合成致死対のうちのVPS4Aが欠損している細胞は、当該対の他方（例えばVPS4B）の発現または活性を阻害する作用物質で処理され得る。

【０１１５】

一態様において、本発明の阻害性核酸分子は、約1～約100mg/kg（例えば、1、5、10、20、25、50、75および100mg/kg）の投与量で全身投与される。他の態様において、投与量は、約25～約500mg/m^2/日の範囲である。

【０１１６】

修飾された阻害性核酸分子

望ましい阻害性核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性のために一部または全部のヌクレオチド間結合がホスホロチオアートに修飾されたオリゴデオキシヌクレオチドギャップを含有する2'修飾されたオリゴヌクレオチドに基づくものである。メチルホスホナート修飾の存在は、その標的RNAに対するオリゴヌクレオチドの親和性を増加させ、したがってIC_{50}を低下させる。この修飾はまた、修飾されたオリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性を増加させる。本発明の方法および試薬は、阻害性核酸分子の安定性または有効性を増強するために開発され得る任意の技術と併せて使用され得ることが理解される。

【０１１７】

阻害性核酸分子には、修飾された骨格または非天然のヌクレオシド間結合を含有する核酸塩基オリゴマーが含まれる。修飾された骨格を有するオリゴマーには、骨格中にリン原子を保持するものおよび骨格中にリン原子を有しないものが含まれる。本明細書において、ヌクレオシド間骨格中にリン原子を有さない修飾されたオリゴヌクレオチドも、核酸塩基オリゴマーであると考えられる。修飾されたオリゴヌクレオチド骨格を有する核酸塩基オリゴマーとしては、例えば、ホスホロチオアート、キラルホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、ホスホトリエステル、アミノアルキルーホスホトリエステル、3'-アルキレンホスホナートおよびキラルホスホナートを含むメチルおよび他のアルキルホスホナート、ホスフィナート、ホスホロアミダート、チオノホスホロアミダート、チオノアルキルホスホナート、チオノアルキルホスホトリエステルおよびボラノホスファートが挙げられる。様々な塩、混合塩および遊離酸形態も含まれる。上記のリン含有結合の調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第3,687,808号; 同第4,469,863号; 同第4,476,301号; 同第5,023,243号; 同第5,177,196号; 同第5,188,897号; 同第5,264,423号; 同第5,276,019号; 同第5,278,302号; 同第5,286,717号; 同第5,321,131号; 同第5,399,676号; 同第5,405,939号; 同第5,453,496号; 同第5,455,233号; 同第5,466,677号; 同第5,476,925号; 同第5,519,126号; 同第5,536,821号; 同第5,541,306号; 同第5,550,111号; 同第5,563,253号; 同第5,571,799号; 同第5,587,361号; および同第5,625,050号が含まれるが、これらに限定されるものではなく、これらの各々は参照により本明細書に組み入れられる。

【０１１８】

その中にリン原子を含まない修飾されたオリゴヌクレオチド骨格を有する核酸塩基オリゴマーは、短鎖アルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合したヘテロ原子とアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、または1つもしくは複数の短鎖ヘテロ原子もしくは複素環ヌクレオシド間結合によって形成される骨格を有する。これらには、（部分的にヌクレオシドの糖部分から形成される）モルホリノ結合; シロキサン骨格; スルフィド、スルホキシドおよびスルホン骨格; ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格; メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格; アルケン含有骨格; スルファマート骨格; メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ骨格; スルホナートおよびスルホンアミド骨格; アミド骨格を有するもの; ならびに混合したN、O、SおよびCH_2成分部分を有するその他のものが含まれる。上記オリゴヌクレオチドの調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第5,034,506号; 同第5,166,315号; 同第5,185,444号; 同第5,214,134号; 同第5,216,141号; 同第5,235,033号; 同第5,264,562号; 同第5,264,564号; 同第5,405,938号; 同第5,434,257号; 同第5,466,677号; 同第5,470,967号; 同第5,489,677号; 同第5,541,307号; 同第5,561,225号; 同第5,596,086号; 同第5,602,240号; 同第5,610,289号; 同第5,602,240号; 同第5,608,046号; 同第5,610,289号; 同第5,618,704号; 同第5,623,070号; 同第5,663,312号; 同第5,633,360号; 同第5,677,437号; および同第5,677,439号が含ま

れるが、これらに限定されるものではなく、これらの各々は参照により本明細書に組み入れられる。

【０１１９】

核酸塩基オリゴマーはまた、1つまたは複数の置換された糖部分を含有し得る。このような修飾としては、2'-O-メチルおよび2'-メトキシエトキシ修飾が挙げられる。別の望ましい修飾は、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、2'-アミノプロポキシおよび2'-フルオロである。同様の修飾は、オリゴヌクレオチドまたは他の核酸塩基オリゴマー上の他の位置、特に3'末端ヌクレオチド上の糖の3'位置においても行われ得る。核酸塩基オリゴマーはまた、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分などの糖模倣物を有し得る。このような修飾された糖構造の調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第4,981,957号; 同第5,118,800号; 同第5,319,080号; 同第5,359,044号; 同第5,393,878号; 同第5,446,137号; 同第5,466,786号; 同第5,514,785号; 同第5,519,134号; 同第5,567,811号; 同第5,576,427号; 同第5,591,722号; 同第5,597,909号; 同第5,610,300号; 同第5,627,053号; 同第5,639,873号; 同第5,646,265号; 同第5,658,873号; 同第5,670,633号; および同第5,700,920号が含まれるが、これらに限定されるものではなく、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【０１２０】

他の核酸塩基オリゴマーでは、糖およびヌクレオシド間結合の両方、すなわち骨格が新規な基で置き換えられている。核酸塩基単位は、VPS4AまたはVPS4B核酸分子とのハイブリダイゼーションのために維持される。これらの核酸塩基オリゴマーを作製および使用する方法は、例えば、"Peptide Nucleic Acids（PNA）:Protocols and Applications" Ed. P.E. Nielsen, Horizon Press, Norfolk, United Kingdom, 1999に記載されている。PNAの調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第5,539,082号; 同第5,714,331号; および同第5,719,262号が含まれるが、これらに限定されるものではなく、これらの各々は参照により本明細書に組み入れられる。PNA化合物のさらなる教示は、Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500に見出すことができる。

【０１２１】

ポリヌクレオチド

一般に、本発明は、VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1ポリペプチドをコードする任意の核酸配列を含む。このようなVPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1核酸配列とハイブリダイズする少なくとも1つの鎖を含有する任意の核酸分子（例えば、dsRNA、siRNA、shRNAまたはアンチセンス分子などの阻害性核酸分子）も本発明の方法に含まれる。VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1ポリペプチドをコードする本発明の阻害性核酸分子は、19～21ヌクレオチド長であり得る。いくつかの態様において、本発明の阻害性核酸分子は、20またはそれより少ない（例えば、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8または7つの）同一のヌクレオチド残基を含む。さらに他の態様において、一本鎖または二本鎖アンチセンス分子は、VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1標的配列に対して60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％相補的である。単離された核酸分子は、当技術分野において周知の組換えDNA技術を使用して操作することができる。したがって、5'および3'制限部位が知られているベクター中に含有されるヌクレオチド配列またはそのベクターに対するポリメラーゼ連鎖反応（PCR）プライマー配列が開示されているベクター中に含有されるヌクレオチド配列は単離されていると考えられるが、その天然宿主中にその天然の状態で存在する核酸配列は単離されていない。単離された核酸は、実質的に精製され得るが、実質的に精製されている必要はない。例えば、クローニングまたは発現ベクター内に単離されている核酸分子は、該核酸分子がその中に存在している細胞中の材料のごくわずかなパーセンテージのみを構成することがあり

得る。しかしながら、このような核酸は、当業者に公知の標準的な技術を使用して操作することができるので、この用語が本明細書で使用される場合、単離されている。

【０１２２】

さらなる態様は、VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1もしくはIST1遺伝またはこれらの一部を対象とする上記阻害性ポリヌクレオチドのいずれをも含むことができる。

【０１２３】

ポリヌクレオチドおよび/またはオリゴヌクレオチドの送達

裸のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、腫瘍細胞に進入し、VPS4AまたはVPS4Bの発現を阻害することができる。それにもかかわらず、阻害性核酸分子または他の核酸塩基オリゴマーの細胞への送達を助ける製剤を利用することが望ましいことがあり得る（例えば、その各々が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,656,611号、同第5,753,613号、同第5,785,992号、同第6,120,798号、同第6,221,959号、同第6,346,613号および同第6,353,055号を参照）。

【０１２４】

ポリヌクレオチド治療

VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、もしくはIST1の阻害性核酸分子をコードするポリヌクレオチドまたはこれらの類似体を特徴とするポリヌクレオチド治療は、対象における新生物を治療するための、または対象における多剤耐性を治療するための別の治療アプローチである。阻害性核酸分子をコードする発現ベクターは、新生物を有する対象の細胞に送達されることができる。核酸分子は、治療有効レベルが達成され得るように、核酸分子が取り込まれることができ、有利に発現される形態で対象の細胞に送達されなければならない。

【０１２５】

本発明による細胞へのポリヌクレオチドの送達方法は、リポソーム、ポリマー、ミクロスフェア、遺伝子治療ベクターおよび裸のDNAベクターなどの送達システムを使用することを含む。

【０１２６】

形質導入ウイルス（例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、レンチウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）ベクターは、特にそれらの高い感染効率ならびに安定した組込みおよび発現のために、体細胞遺伝子治療のために使用することができる（例えば、Cayouette et al., Human Gene Therapy 8:423-430, 1997; Kido et al., Current Eye Research 15:833-844, 1996; Bloomer et al., Journal of Virology 71:6641-6649, 1997; Naldini et al., Science 272:263-267, 1996; およびMiyoshi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:10319, 1997を参照）。例えば、VPS4AまたはVPS4B阻害性核酸分子をコードするポリヌクレオチドをレトロウイルスベクター中にクローニングすることができ、その内因性プロモーターから、レトロウイルス末端反復配列から、または関心対象の標的細胞型に対して特異的なプロモーターから発現を駆動することができる。使用することができる他のウイルスベクターとしては、例えば、ワクシニアウイルス、ウシパピローマウイルスまたはエプスタイン・バーウイルスなどのヘルペスウイルスが挙げられる（例えば、Miller, Human Gene Therapy 15-14, 1990; Friedman, Science 244:1275-1281, 1989; Eglitis et al., BioTechniques 6:608-614, 1988; Tolstoshev et al., Current Opinion in Biotechnology 1:55-61, 1990; Sharp, The Lancet 337:1277-1278, 1991; Cornetta et al., Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-322, 1987; Anderson, Science 226:401-409, 1984; Moen, Blood Cells 17:407-416, 1991; Miller et al., Biotechnology 7:980-990, 1989; Le Gal La Salle et al., Science 259:988-990, 1993; およびJohnson, Chest 107:77S-83S, 1995のベクターも参照されたい）。レトロウイルスベクターは特によく開発されており、臨床現場で使用されている（Rosenberg et al., N. Engl. J.Med 323:370, 1990; Ande

rsonら、米国特許第5,399,346号）。

【０１２７】

新生物を有すると診断された患者の細胞に治療的なVPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1阻害性核酸分子を導入するために、非ウイルスアプローチを使用することもできる。例えば、VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1阻害性核酸分子は、リポフェクション（Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413, 1987; Ono et al., Neuroscience Letters 17:259, 1990; Brigham et al., Am. J.Med. Sci. 298:278, 1989; Staubinger et al., Methods in Enzymology 101:512, 1983）、アシアロオロソムコイド-ポリリジンコンジュゲーション（Wu et al., Journal of Biological Chemistry 263:14621, 1988; Wu et al., Journal of Biological Chemistry 264:16985, 1989）の存在下で核酸を投与することによって、または外科的条件下でのマイクロインジェクション（Wolff et al., Science 247:1465, 1990）によって細胞中に導入することができる。好ましくは、VPS4AまたはVPS4B阻害性核酸分子は、リポソームおよびプロタミンと組み合わせて投与される。

【０１２８】

遺伝子導入はまた、インビトロでの形質移入を含む非ウイルス手段を使用して達成することができる。このような方法には、リン酸カルシウム、DEAEデキストラン、電気穿孔およびプロトプラスト融合の使用が含まれる。リポソームはまた、細胞中へのDNAの送達に潜在的に有益であり得る。

【０１２９】

ポリヌクレオチド治療方法において使用するためのVPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1阻害性核酸分子発現は、任意の適切なプロモーター（例えば、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）、サルウイルス40（SV40）またはメタロチオネインプロモーター）から指示されることができ、任意の適切な哺乳動物調節エレメントによって制御されることができる。例えば、所望であれば、核酸の発現を指示するために、特定の細胞型における遺伝子発現を優先的に指示することが知られているエンハンサーを使用することができる。使用されるエンハンサーには、組織または細胞特異的エンハンサーとして特徴付けられるものが含まれ得るが、これらに限定されない。

【０１３０】

任意の特定の対象について、特定の投与計画は、個々の必要性および組成物の投与を管理または監督する者の専門的判断に従って経時的に調整されるべきである。

【０１３１】

抗体

他の局面において、本発明は、ポリペプチド（例えば、VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1）の機能を選択的に妨害することによって疾患を治療方法を提供する。いくつかの態様において、ポリペプチド機能の妨害は、ポリペプチドに結合する抗体を使用して達成される。

【０１３２】

抗体は、本発明のポリペプチド（例えば、VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1）またはその免疫原性断片を免疫原として利用する当技術分野において公知の方法のいずれによっても作製することができる。抗体を得る1つの方法は、適切な宿主動物を免疫原で免疫化し、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体の産生のための標準的な手順に従うことである。免疫原は、細胞表面上の免疫原の提示を促進する。適切な宿主の免疫化は、多くの方法で行うことができる。本発明のポリペプチドまたはその免疫原性断片をコードする核酸配列は、宿主の免疫細胞によって取り込まれる送達ビヒクル中で宿主に提供することができる。次いで、細胞は、細胞表面上に受容体を発現し、宿主において免疫原性応答を生じさせる。あるいは、ポリペプチドまたはその免疫原性断片をコードする核酸配列をインビトロで細胞内で発現させた後、ポリペプチドを単離し、抗体がその中で産生される適切な宿主にポリペプチドを投与することができる。

【０１３３】
あるいは、ポリペプチドに対する抗体は、所望であれば、抗体ファージディスプレイライブラリーに由来し得る。バクテリオファージは、細菌に感染し、細菌内で複製することができ、ヒト抗体遺伝子と組み合わせた場合、ヒト抗体タンパク質をディスプレイするように操作することができる。ファージディスプレイは、ファージに、その表面上にヒト抗体タンパク質を「ディスプレイ」させる過程である。ヒト抗体遺伝子ライブラリーからの遺伝子が、ファージの集団中に挿入される。各ファージは、異なる抗体に対する遺伝子を保有し、したがって、その表面上に異なる抗体をディスプレイする。
【０１３４】
次いで、当技術分野において公知の任意の方法によって作製された抗体を宿主から精製することができる。抗体精製方法は、塩沈殿（例えば、硫酸アンモニウムを用いて）、イオン交換クロマトグラフィー（例えば、中性pHで走行され、増加するイオン強度の段階勾配で溶出されるカチオンまたはアニオン交換カラムで）、ゲル濾過クロマトグラフィー（ゲル濾過HPLCを含む）、ならびにプロテインA、プロテインG、ヒドロキシアパタイトおよび抗免疫グロブリンなどの親和性樹上でのクロマトグラフィーを含み得る。
【０１３５】
抗体は、抗体を発現するように操作されたハイブリドーマ細胞から都合よく生産することができる。ハイブリドーマを作製する方法は、当技術分野において周知である。ハイブリドーマ細胞は、適切な培地中で培養することができ、使用済み培地を抗体源として使用することができる。次に、抗体を産生するハイブリドーマから、関心対象の抗体をコードするポリヌクレオチドを得ることができ、次いで、抗体は、これらのDNA配列から合成的または組換え的に産生され得る。大量の抗体を生産するためには、一般に、腹水を得ることがより都合がよい。腹水を生じさせる方法は、一般に、ハイブリドーマ細胞を免疫学的にナイーブな組織適合性または免疫寛容性の哺乳動物、特にマウス中に注射することを含む。哺乳動物は、適切な組成物（例えば、Pristane）の事前投与によって腹水産生のために準備刺激され得る。
【０１３６】
ゲノム編集
治療用遺伝子編集は生物医学研究の主要な焦点であり、基礎科学と臨床科学との間の境界領域を包含する。変性または損傷したニューロンは、標的遺伝子（例えば、VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1）をノックアウトすることによって（例えば、欠失によって）またはその発現を阻害することによって、本発明の方法に従って処置され得る。新規な「遺伝子編集」ツールの開発は、ゲノムの他の部位に突然変異を導入することなく、特定の染色体遺伝子座において細胞のDNA配列を操作する（例えば、標的遺伝子を欠失させる）能力を提供する。この技術は、研究者がインビトロまたはインビボで対象の細胞のゲノムを操作することを効果的に可能にする。
【０１３７】
一態様において、遺伝子編集は、エンドヌクレアーゼ（DNA分子内の内部にDNA切断を引き起こす酵素）をゲノムの特定の部位にターゲティングされ、それによって選択された部位で染色体二本鎖切断（DSB）の形成を引き起こすことを含む。染色体切断の導入と同時に、（例えば、プラスミドまたはオリゴヌクレオチド導入によって）ドナーDNA分子が導入され得る場合、特に2つの配列が相同性を共有すれば、切断された染色体と導入されたDNAとの間での相互作用が起こり得る。この例では、染色体のDNA末端が相同組換え（HR）によってドナーDNAの相同配列に侵入する「遺伝子ターゲティング」と呼ばれる過程が起こり得る。ドナープラスミド配列をHRのための鋳型として使用することによって、染色体DSBのシームレスな修復を達成することができる。いくつかの態様においては、ドナーDNA分子は導入されず、二本鎖切断は、エラーを起こしやすい非相同末端結合NHEJ経路によって修復され、（例えば、インデルまたはナンセンス変異の導入を通じて）標的遺伝子のノックアウトまたは欠失をもたらす。いくつかの態様において、エンドヌクレアーゼは、異なる部位における染色体の二本鎖切断が2つの異なる部位に隣

接するヌクレオチド配列の切除および欠失をもたらすように、遺伝子配列内に位置する少なくとも2つの異なる選択された部位を標的とすることができる。

【０１３８】

いくつかの態様において、選択された部位は、VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1の1つまたは複数から選択される遺伝子をコードするヌクレオチド配列に関連するか、またはその中に配置されている。いくつかの態様において、1つより多くの選択された部位が選択される。いくつかの態様において、選択された部位は、前述の遺伝子の少なくとも1、2、3、4、5、6つまたはすべてに関連する。

【０１３９】

現在のゲノム編集ツールは、遺伝子の欠失またはノックアウトを含む細胞の遺伝子操作を増強するために、二本鎖切断（DSB）の誘導を使用する。このような方法には、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN; 例えば、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第6,534,261号、同第6,607,882号、同第6,746,838号、同第6,794,136号、同第6,824,978号、同第6,866,997号、同第6,933,113号、同第6,979,539号、同第7,013,219号、同第7,030,215号、同第7,220,719号、同第7,241,573号、同第7,241,574号、同第7,585,849号、同第7,595,376号、同第6,903,185号および同第6,479,626号、ならびに米国特許出願公開第20030232410号および同第20090203014号に記載されている）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN; 例えば、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第8,440,431号、同第8,440,432号、同第8,450,471号、同第8,586,363号および同第8,697,853号、ならびに米国特許出願公開第20110145940号、同第20120178131号、同第20120178169号、同第20120214228号、同第20130122581号、同第20140335592号および同第20140335618号）、およびCRISPR（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat）/Cas9システム（例えば、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第8,697,359号、同第8,771,945号、同第8,795,965号、同第8,871,445号、同第8,889,356号、同第8,906,616号、同第8,932,814号、同第8,945,839号、同第8,993,233号および同第8,999,641号、ならびに米国特許出願公開第20140170753号、同第20140227787号、同第20140179006号、同第20140189896号、同第20140273231号、同第20140242664号、同第20140273232号、同第20150184139号、同第20150203872号、同第20150031134号、同第20150079681号、同第20150232882号および同第20150247150号に記載されている）が含まれる。いくつかの態様において、CRISPR/Cas12システムを遺伝子編集のために使用することができる。いくつかの態様において、Cas12ポリペプチドはCas12bである。いくつかの態様において、任意のCasポリペプチドを遺伝子編集のために使用することができる（例えば、CasX）。様々な態様において、Casポリペプチドは、Casポリペプチドをコードするヌクレオチドがアデノ随伴ウイルス（AAV）キャプシド内に適合することができるように選択される。例えば、ZFN DNA配列認識能力および特異性は予測不可能であり得る。同様に、TALENおよびCRISPR/Cas9は、所望の部位においてのみならず、他の「オフターゲット」部位においてもしばしば切断する。これらの方法は、オフターゲット二本鎖切断誘導ならびにこれらのオフターゲット効果に関連する、インデル、ゲノム再編成および染色体再編成を含む有害な変異の可能性と関連する重大な問題を有する。ZFNおよびTALENは、ゲノム中の約18bpの配列に対する特異性を生じさせるために、モジュール配列特異的DNA結合タンパク質の使用を伴う。CRISPR/Cas9、TALENおよびZFNはすべて、臨床試験で使用されている（例えば、Li., H, et al., "Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases:mechanisms, advances and prospects", Signal Transduct Target Ther., 5:1 (2020), DOI:10.1038/s41392-019-0089-yを参照）。

【０１４０】

2型CRISPR（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat）/Cas（CRISPR Associated）システムに基づくRNA誘導型ヌクレアーゼにより媒介

されるゲノム編集は、ゲノムを変化させるための貴重なアプローチを提供する。簡単に記載すると、シングルガイドRNA（sgRNA）によってガイドされるヌクレアーゼであるCas9は、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）の隣の標的とされるゲノム遺伝子座に結合し、二本鎖切断（DSB）を生成する。次いで、DSBは、挿入/欠失（インデル）変異をもたらす非相同末端結合（NHEJ）によって、または外因性鋳型を必要とし、標的遺伝子座において正確な修飾を生成することができる相同組換え修復（HDR）によって修復される（Mali et al., Science. 2013 Feb 15; 339 (6121): 823-6）。操作されたヌクレアーゼを使用する遺伝子操作は、組織培養細胞および疾患の齧歯類モデルにおいて実証されている。

【０１４１】

CRISPRは、パン酵母（S. cerevisiae）、ゼブラフィッシュ、線虫（C. elegans）、植物、マウス、およびいくつかの他の生物を含む広範囲の生物で使用されている。さらに、CRISPRは、科学者が特定の遺伝子を標的とし、活性化するかまたはサイレンシングすることを可能にするプログラム可能な転写因子を作製するように改変されている。数万のガイドRNAのライブラリーが現在利用可能である。

【０１４２】

2012年以来、CRISPR/Casシステムは、マウスおよび霊長類のような真核生物中でさえ機能する遺伝子編集（特定の遺伝子をサイレンシングさせ、増強させ、または変化させる）のために使用されてきた。Cas遺伝子および特別に設計されたCRISPRを含有するプラスミドを挿入することによって、生物のゲノムを任意の所望の位置で切断することができる。

【０１４３】

CRISPRリピートは、24～48塩基対のサイズの範囲である。CRISPRリピートは通常、いくらかのダイアド対称性を示し、ヘアピンなどの二次構造の形成を暗示するが、真に回文的ではない。リピートは、同様の長さのスペーサーによって分離されている。いくつかのCRISPRスペーサー配列は、プラスミドおよびファージ由来の配列と正確に一致するが、いくつかのスペーサーは、原核生物のゲノムと一致する（自己ターゲティングスペーサー）。ファージ感染に応答して新しいスペーサーを迅速に添加することができる。

【０１４４】

CRISPR関連（cas）遺伝子は、しばしば、CRISPRリピート-スペーサーアレイと関連する。2013年現在、40を超える異なるCasタンパク質ファミリーが記載されている。これらのタンパク質ファミリーのうち、Cas1は、異なるCRISPR/Casシステムの間で遍在しているようである。Cas遺伝子とリピート構造の特定の組み合わせを使用して8つのCRISPRサブタイプ（E. coli、Y. pest、Nmeni、Dvulg、Tneap、Hmari、ApernおよびMtube）を定義し、それらの一部はリピート関連ミステリアスタンパク質（RAMP）をコードする追加の遺伝子モジュールに関連している。複数のCRISPRサブタイプが単一のゲノムに存在し得る。CRISPR/Casサブタイプの散発的な分布は、微生物進化の間に系が遺伝子の水平伝播を受けることを示唆している。

【０１４５】

外因性DNAは、明らかに、Cas遺伝子によってコードされるタンパク質によって小さなエレメント（約30塩基対の長さ）に加工され、次いで、何らかの方法でリーダー配列の近くのCRISPR遺伝子座に挿入される。CRISPR遺伝子座からのRNAは構成的に発現され、Casタンパク質によって、隣接するリピート配列を有する個々の外因由来配列エレメントから構成される低分子RNAへと加工される。RNAは、RNAまたはDNAレベルで外因性遺伝要素をサイレンシングするように他のCasタンパク質を誘導する。証拠は、CRISPRサブタイプ間の機能的多様性を示唆している。Cse（Cas subtype E. coli）タンパク質（大腸菌（E. coli）ではCasA-Eと呼ばれる）は、CRISPR RNA転写物をCascadeが保持するスペーサーリピート単位へ加工する機能的複合体であるCascadeを形成する。他の原核生物では、Cas6がCRISPR転写物を加工する。興味深いことに、大腸菌におけるCRISPRベースのファージ不活性化は、CascadeおよびCas3を必要とするが、Cas

1およびCas2を必要としない。パイロコッカス・フリオサス（Pyrococcus furiosus）および他の原核生物に見られるCmr（Cas RAMPモジュール）タンパク質は、相補的標的RNAを認識して切断する小さなCRISPR RNAとともに機能的複合体を形成する。RNA誘導型CRISPR酵素は、V型制限酵素として分類される。参照によりその全体が組み入れられる米国特許出願公開第2014/0068797号も参照されたい。

【０１４６】

Cas9

Cas9は、二重らせんの各鎖に対して1つ、2つの活性切断部位を有する、DNAの切断に特化した酵素であるヌクレアーゼである。チームは、位置するその標的DNAに的を絞るCas9の能力を維持しながら、一方または両方の部位を無効化できることを実証した。Jinekら（2012）は、tracrRNAとスペーサーRNAとを組み合わせて「シングルガイドRNA」分子にし、これは、Cas9と混合すると、正しいDNA標的を見つけて切断することができた。このような合成ガイドRNAを遺伝子編集のために使用することが可能であり得ることが提案されている（Jinek et al., Science. 2012 Aug 17; 337 (6096): 816-21）。

【０１４７】

Cas9タンパク質は、病原性細菌および共生細菌中に高度に濃縮されている。CRISPR/Cas媒介性遺伝子調節は、特に真核生物宿主との細菌の相互作用中に、内因性細菌遺伝子の調節に寄与し得る。例えば、フランシセラ・ノビシダ（Francisella novicida）のCasタンパク質Cas9は、フランシセラ・ノビシダが宿主応答を弱め、病原性を促進するために極めて重要である細菌性リポタンパク質をコードする内因性転写物を抑制するために、特有の小さなCRISPR/Cas関連RNA（scaRNA）を使用する。Cas9 mRNAおよびsgRNAの生殖系列（接合子）中への同時注射は、変異を有するマウスを生成した。Cas9 DNA配列の送達も企図される。

【０１４８】

sgRNAを有するアデノ随伴ウイルス（AAV）キャプシドに適合することができるCas9バリアントが開発または発見されている。本開示の本発明の態様における使用に適したこのようなバリアント（例えば、Cas9オルソログ）の非限定的な例には、saCas9（黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）Cas9）、cjCas9（カンフィロバクター・ジェジュニ（Camphylobacter jejuni）Cas9）、NmeCas9（髄膜炎菌（Neisseria meningitidis）Cas9）、およびspCas9（ストレプトコッカス・ピロゲネス（Streptococcus pyrogenes）Cas9）が含まれる。AAVベクターによる送達に適したsaCas9の例は、Ann Ran, F. et al. "In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9", Nature, 9:186-91, DOI:10.1038/nature14299に提供されている。

【０１４９】

gRNA

RNAによって誘導されるタンパク質として、Cas9は、DNA標的の認識を指示するための短いRNAを必要とする。Cas9は、PAM配列NGGを含有するDNA配列を優先的に調べるが、ここにはプロトスペーサー標的なしで結合することができる。しかしながら、Cas9-gRNA複合体は、二本鎖切断を作り出すためにgRNAへの密接な合致を必要とする。細菌中のCRISPR配列は、複数のRNA中で発現され、次いで、RNAに対するガイド鎖を作製するために加工される。真核生物系は、CRISPR RNAを加工するために必要とされるタンパク質のいくつかを欠いているので、Cas9ターゲティングのためのの必須片をRNAポリメラーゼ2I型プロモーターU6）によって発現される単一のRNAに組み合わせるために、合成構築物gRNAが作製された。合成gRNAは、最小長さが100bpをわずかに超えており、PAM配列NGGの直前に位置する20のプロトスペーサーヌクレオチドを標的とする部分を含有する; gRNAはPAM配列を含有しない。

【０１５０】

CRISPR干渉

いくつかの態様において、標的遺伝子は、CRISPR干渉（CRISPRi）を用いて阻害することができる。CRISPRiは、任意で転写リプレッサーを含むヌクレアーゼ不活性なCRISPRシステム（CRISPRiシステム）の結合によって標的遺伝子の発現が阻害される技術である。いくつかの態様において、CRISPRiの方法は、標的遺伝子のプロモーターまたはエクソン配列に相補的なsgRNAを設計する工程を含む。いくつかの態様において、CRISPRiは、転写リプレッサーを標的遺伝子の転写開始部位に誘導することを含む。CRISPRiは、マウスにおける遺伝子発現の抑制のために首尾よく使用されており、遺伝子を抑制するためにCRISPRiを使用するための例示的な方法が、MacLeod, et al., "Effective CRISPR interference of an endogenous gene via a single transgene in mice", Scientific Reports, 9:17312 (2019) に提供されている。

【０１５１】

薬学的組成物

本明細書で報告されるように、VPS4AまたはVPS4Bの発現の喪失は、種々の細胞型における新生物と関連する。したがって、本発明は、新生物を治療または予防するために、VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1の発現を減少させる治療用組成物を提供する。一態様において、本発明は、VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1の核酸分子またはポリペプチドの発現を減少させるVPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1の阻害性核酸分子（例えば、アンチセンス、siRNAまたはshRNAポリヌクレオチド）を含む薬学的組成物を提供する。所望であれば、VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1阻害性核酸分子は、化学療法剤と組み合わせて投与される。様々な態様において、VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1阻害性核酸分子は、化学療法剤の投与前、投与と同時、または投与後に投与される。理論に拘束されることを望むものではないが、VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1阻害性核酸分子の投与は、化学療法剤の蓄積または有効性を増強する可能性が高い。本発明のポリヌクレオチドは、薬学的組成物の一部として投与され得る。組成物は無菌とすべきであり、対象への投与に適した重量または体積の単位で治療有効量のポリペプチドまたは核酸分子を含有すべきである。

【０１５２】

本発明の阻害性核酸分子、VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1もしくはIST1の他の負の調節因子、または本発明の任意の他の作用物質は、薬学的に許容され得る希釈剤、担体または賦形剤中に単位剤形で投与され得る。過剰な細胞増殖によって引き起こされる疾患に罹患している患者に化合物を投与するための適切な製剤または組成物を提供するために、従来の製薬慣行が使用され得る。投与は、患者が症候性になる前に開始し得る。任意の適切な投与経路が使用され得、例えば、投与は、非経口投与、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、腫瘍内投与、筋肉内投与、頭蓋内投与、眼窩内投与、眼内投与、脳室内投与、肝内投与、関節内投与、髄腔内投与、嚢内投与、腹腔内投与、鼻腔内投与、エアロゾル投与、坐剤投与または経口投与であり得る。例えば、治療用製剤は、液体溶液または懸濁液の形態であり得、経口投与の場合、製剤は錠剤またはカプセル剤の形態であり得、鼻腔内製剤の場合、散剤、点鼻薬またはエアロゾルの形態であり得る。

【０１５３】

製剤を作製するための当技術分野において周知の方法は、例えば、"Remington:The Science and Practice of Pharmacy" Ed. A.R. Gennaro, Lippincourt Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa., 2000に見出される。非経口投与のための製剤は、例えば、賦形剤、無菌水または生理食塩水、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール、植物起源の油または水素化ナフタレンを含有し得る。化合物の放出を制御するために、生体適合性の生分解性ラクチドポリマー、ラクチド/グリコリドコポリマーまたはポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマーが使用され得る。VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1阻害性核酸分子のための他の潜在的に有用な非経口送達システムとしては、エチレン-酢酸ビニルコポリマー

粒子、浸透圧ポンプ、埋め込み型注入システムおよびリポソームが挙げられる。吸入のための製剤は、賦形剤、例えばラクトースを含有し得るか、または例えばポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、グリココール酸塩もしくはエステルおよびデオキシコール酸塩もしくはエステルを含有する水溶液であり得るか、または点鼻薬の形態でもしくはゲルとして投与するための油性溶液であり得る。

【０１５４】

製剤は、新生物性疾患または症状の治療を提供するために、治療有効量（例えば、病的症状を予防、排除または低減する量）でヒト患者に投与することができる。本発明の核酸塩基オリゴマーの好ましい投与量は、障害の種類および程度、特定の患者の全体的な健康状態、化合物賦形剤の調合およびその投与経路などの変数に依存する可能性が高い。

【０１５５】

新生物性疾患または障害を有する対象に関して、有効量は、新生物の増殖を安定化させ、遅延し、または低減するのに十分である。一般に、本発明の活性なポリヌクレオチド組成物の用量は、約0.01mg/kg/日～約1000mg/kg/日である。約50～約2000mg/kgの範囲の用量が適切であると予想される。より低い用量は、静脈内投与などのある特定の投与形態から生じる。適用された初期用量では、対象における応答が不十分である場合には、患者の耐容性が許容する程度まで、より高い用量（または異なる、より局所的な送達経路による効果的により高い用量）が使用され得る。本発明のVPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1ポリヌクレオチドまたはポリペプチド組成物の適切な全身レベルを達成するために、1日当たり複数回の用量が企図される。

【０１５６】

様々な投与経路が利用可能である。本発明の方法は、一般的に言えば、医学的に許容され得る任意の投与様式を使用して実施され得、これは、臨床的に許容され得ない有害作用を引き起こすことなく有効レベルの活性化合物を生成する任意の様式を意味する。他の投与様式には、経口、直腸、局所、眼内、頬側、膣内、嚢内、脳室内、気管内、鼻、経皮、インプラント内/インプラント上、例えば、コラーゲンなどの繊維、浸透圧ポンプ、または適切に形質転換された細胞を含む移植片など、または非経口経路が含まれる。

【０１５７】

治療

治療は、がん治療が行われるどのような場所でも、すなわち、自宅、医院、診療所、病院の外来診療部、または病院で提供され得る。治療は一般に、医師が治療の効果を綿密に観察し、必要とされる調整を行うことができるように、病院で開始される。治療の期間は、治療されるがんの種類、患者の年齢および状態、患者の疾患のステージおよびタイプ、ならびに患者の身体が治療にどのように応答するかに依存する。薬物投与は、異なる間隔（例えば、毎日、毎週、または毎月）で行われ得る。治療は、患者の身体が健康な新しい細胞を構築し、身体の強度を回復する機会を有するように、休止期間を含むオンオフサイクルで与えられ得る。

【０１５８】

がんの種類およびその発達段階に応じて、治療は、がんの拡散を遅らせるために、がんの増殖を遅らせるために、元の腫瘍から身体の他の部分に拡散した可能性があるがん細胞を死滅もしくは停止させるために、がんによって引き起こされる症候を軽減するために、または最初にがんを予防するために使用することができる。上記のように、所望であれば、本発明の阻害性核酸分子による治療は、増殖性疾患の治療のための治療（例えば、放射線療法、手術または化学療法）と組み合わされ得る。上記の適用方法のいずれについても、本発明の阻害性核酸分子は望ましくは静脈内投与されるか、または（例えば、注射によって）新生物の部位に適用される。

【０１５９】

対象が新生物（例えば、がん、例えば、脳、膀胱、胆汁、血液、乳房、管（例えば、胆管または膵管）、結腸、結腸直腸、食道、胃、胚細胞、肝臓、卵巣、膵臓、子宮および肺がん、腎細胞癌、膵管腺癌、ならびに肉腫、例えば、骨肉腫および横紋筋肉腫（例えば、

小児横紋筋肉腫（ＲＭＳ））を有すると診断された後に、処置の方法が選択される。いくつかの標準的な処置レジメンが臨床医に公知である。

【０１６０】

一態様において、VPS4A発現の喪失を特徴とする新生物細胞または新生物（例えば、がん、例えば、脳、膀胱、胆汁、血液、乳房、管（例えば、胆管または膵管）、結腸、結腸直腸、食道、胃、胚細胞、肝臓、卵巣、膵臓、子宮および肺がん、腎細胞癌、膵管腺癌、ならびに肉腫、例えば、骨肉腫および横紋筋肉腫（例えば、小児横紋筋肉腫（ＲＭＳ））の細胞死を誘導するか、または細胞生存を低下させるための方法であって、細胞が、VPS4Aの発現または活性を阻害する作用物質と接触させられ、それにより、新生物細胞もしくは新生物の細胞死が誘導されるか、または新生物細胞もしくは新生物の細胞生存が低下する、方法が提供され得る。

【０１６１】

別の態様は、VPS4A発現の喪失を特徴とする新生物細胞または新生物（例えば、胆管または膵管）、結腸、結腸直腸、食道、胃、胚細胞、肝臓、卵巣、膵臓、子宮および肺がん、腎細胞癌、膵管腺癌、ならびに肉腫、例えば、骨肉腫および横紋筋肉腫（例えば、小児横紋筋肉腫（ＲＭＳ））の細胞死を誘導するための、または細胞生存を低下させるための方法であって、細胞が、VPS4Bの発現または活性を阻害する作用物質と接触させられ、それにより、新生物細胞もしくは新生物の細胞死が誘導されるか、または新生物細胞もしくは新生物の細胞生存が低下する、方法が提供され得る。

【０１６２】

さらなる態様は、VPS4Aおよび/またはVPS4Bおよび/またはマザーズアゲンストデカペンタプレジックホモログ4としても公知のSMADファミリーメンバー4（SMAD4）および/またはカドヘリン-1（CDH1）の喪失を特徴とする新生物細胞の細胞死を誘導するかまたは細胞生存を低下させる方法であって、前記細胞を、VPS4B（細胞がVPS4Aの喪失を有する場合）、VPS4A（細胞がVPS4Bの喪失を有する場合）、Ulk3キナーゼ、クロマチン修飾タンパク質（CHMP）1A（CHMP1A）および/またはCHMP1Bの発現または活性を阻害する作用物質と接触させる工程を有し、それにより、新生物細胞の細胞死を誘導するか、または細胞生存を低下させる、方法を提供する。例示的なUnc-51様キナーゼ3（ULK3）阻害剤は、SU6668を含み得る。例示的なVSP4B阻害剤には、MSC1094308またはPohler, et al., "A Non-Competitive Inhibitor of VCP/p97 and VPS4 Reveals Conserved Allosteric Circuits in Type I and II AAA ATPases", Angew. Chem. Int. Ed., 57:1576-1580 (2018) に記載される阻害剤のいずれもが含まれ得る。他の作用物質としては、小分子、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが挙げられ得る。本開示の方法において有用な作用物質の非限定的な例としては、抗VPS4A抗体、VPS4A siRNA、VPS4A shRNA、VPS4A miRNA、VPS4Aリボザイム、VPS4Aアンチセンス RNA、VPS4A発現を減少させる核酸、VPS4A核酸発現を減少させる少なくとも1つの核酸を発現するベクター、抗VPS4B抗体、VPS4B siRNA、VPS4B shRNA、VPS4B miRNA、VPS4Bリボザイム、VPS4Bアンチセンス RNA、VPS4B発現を減少させる核酸、VPS4B核酸発現を減少させる少なくとも1つの核酸を発現するベクター; 抗ULK3抗体、ULK3 siRNA、ULK3 shRNA、ULK3 miRNA、ULK3リボザイム、ULK3アンチセンス RNA、ULK3発現を減少させる核酸、ULK3核酸発現を減少させる少なくとも1つの核酸を発現するベクター; 抗CHMP1A抗体、CHMP1A siRNA、CHMP1A shRNA、CHMP1A miRNA、CHMP1Aリボザイム、CHMP1Aアンチセンス RNA、CHMP1A発現を減少させる核酸、CHMP1A核酸発現を減少させる少なくとも1つの核酸を発現するベクター; 抗CHMP1B抗体、CHMP1B siRNA、CHMP1B shRNA、CHMP1B miRNA、CHMP1Bリボザイム、CHMP1Bアンチセンス RNA、CHMP1B発現を減少させる核酸、CHMP1B核酸発現を減少させる少なくとも1つの核酸を発現するベクター; 抗IST1抗体、IST1 siRNA、IST1 shRNA、IST1 miRNA、IST1リボザイム、IST1アンチセンス RNA、IST1発現を減少させる核酸、IST1核酸発現を減少させる少なくとも1つの核酸を発現するベクター; 抗VTA1抗体、VTA1 siRNA、VTA1 shR

NA、VTA1 miRNA、VTA1リボザイム、VTA1アンチセンスRNA、VTA1発現を減少させる核酸、VTA1核酸発現を減少させる少なくとも1つの核酸を発現するベクター; 抗IST1抗体、IST1 siRNA、IST1 shRNA、IST1 miRNA、IST1リボザイム、IST1アンチセンスRNA、IST1発現を減少させる核酸、IST1核酸発現を減少させる少なくとも1つの核酸を発現するベクター、およびそれらの任意の組み合わせが挙げられる。作用物質のさらなる非限定的な例としては、VPS4Aを標的とするガイドRNA、VPS4Bを標的とするガイドRNA、ULK3を標的とするガイドRNA、CHMP1Aを標的とするガイドRNA、CHMP1Bを標的とするガイドRNA、VTA1を標的とするガイドRNA、IST1を標的とするガイドRNA、標的指向性の遺伝子編集のためのまたはCRISPR干渉のためのポリペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、およびこれらの様々な組み合わせが挙げられる。

【０１６３】

本開示の方法のいずれも、新生物細胞または新生物をインターフェロン（例えば、インターフェロン-β、インターフェロン-γ）と接触させる工程をさらに含み得る。したがって、新生物細胞または新生物の細胞死を誘導するための方法または細胞生存を低下させるための方法、ならびに新生物に罹患している対象および/またはVPS4コピー数欠損を有する対象を治療する方法において、併用療法（例えば、VPS4阻害剤および/またはULK3阻害剤および/またはインターフェロン）が利用され得る。

【０１６４】

治療法の選択

一態様において、がんの治療法は、新生物を有するかまたは新生物を発症するリスクがある患者からの生物学的試料におけるマーカーを測定し、参照分子の配列または発現と比較した試験マーカー分子の発現の変化を検出することによって選択される。マーカーは、VPS4A、VPS4B、マザーズアゲンストデカペンタプレジックホモログ4としても公知のSMADファミリーメンバー4（SMAD4）、カドヘリン-1（CDH1）、CHMP4B、ITCH、およびISG15のポリペプチドまたはポリヌクレオチドから選択することができる。以下のアプローチは、VPS4A、VPS4B、SMAD4、CDH1、CHMP4B、ITCH、およびISG15を特徴とする診断方法を記載するが、当業者は、本明細書に記載されるマーカーのうちのいずれか1つまたは複数がこのような方法において有用であることを認識するであろう。

【０１６５】

VPS4A、VPS4B、SMAD4、またはCDH1の核酸分子またはポリペプチドのうちの1つまたは複数の発現の喪失は、新生物と相関している。さらに、本明細書中に提供される実施例は、VPS4B、CHMP4B、ITCHおよび/またはISG15の（例えば、mRNAレベルを測定することによって決定される）発現レベルが（例えば、VPS4A依存性を判定するための）バイオマーカーとして使用され得ることを実証する。したがって、本発明は、治療を選択するために対象における新生物を特徴付けるための組成物および方法（例えば、多変量モデルの使用）を提供する。本発明は、新生物の同定または特徴付けに有用である多数のアッセイを提供する。遺伝子発現の変化は、当業者に公知であり、本明細書に記載される方法を使用して検出される。このような情報は、新生物を診断するために使用することができる。

【０１６６】

多変量モデルを作成するための方法は、当技術分野において公知である（例えば、H. Joe, Multivariate Models and Dependence Concepts, Chapman & Hall, 1997; F. Harrell, "Regression Modeling Strategies", Springer, 2001; およびStephan et al., "PSA and new biomarkers within multivariate models to improve early detection of prostate cancer", Cancer Letters, 249:18-29 (2007) を参照）。

【０１６７】

1つのアプローチにおいて、参照（例えば、対応する対照組織中に存在する以下のよう

なポリペプチドのレベル）と比較した生物学的試料中のVPS4A、VPS4B、SMAD4、CDH1、CHMP4B、ITCHまたはISG15ポリペプチドの発現をアッセイするために、本発明の診断方法が使用される。一態様において、VPS4A、VPS4B、SMAD4、CDH1、CHMP4B、ITCHまたはISG15ポリペプチドのレベルが、VPS4A、VPS4B、SMAD4、CDH1、CHMP4B、ITCHまたはISG15ポリペプチを特異的に結合する抗体を使用して検出される。このようなポリペプチドを特異的に結合する例示的抗体は、当技術分野において公知である。「抗体」とは、任意の免疫グロブリンポリペプチドまたは免疫原結合能を有するその断片を意味する。このような抗体は、新生物を特徴付けるために有用である。抗体-VPS4A、VPS4B、SMAD4、CDH1、CHMP4B、ITCHまたはISG15複合体を測定するための方法としては、例えば、蛍光、発光、化学発光、吸光度、反射率、透過率、複屈折または屈折率の検出が挙げられる。光学的方法としては、顕微鏡法（共焦点および非共焦点の両方）、画像化法および非画像化法が挙げられる。これらのアッセイを行うための方法は、当技術分野において容易に知られている。他の有用なアッセイとしては、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）などの酵素免疫アッセイ（EIA）、放射免疫アッセイ（RIA）、ウエスタンブロットまたはスロットブロットアッセイが挙げられる。これらの方法は、例えば、Methods in Cell Biology:Antibodies in Cell Biology, volume 37（Asai, ed. 1993）; Basic and Clinical Immunology（Stites&Terr, eds., 7th ed. 1991）; およびHarlow&Lane、上記にも記載されている。試料中のVPS4A、VPS4B、SMAD4、CDH1、CHMP4B、ITCHまたはISG15の量を決定するためにイムノアッセイを使用することができ、このようなポリペプチドのレベルの減少が新生物を特徴付ける。

【０１６８】

1つのアプローチにおいて、VPS4A、VPS4B、SMAD4、CDH1、CHMP4B、ITCHまたはISG15の核酸分子の発現の減少を特定するために、定量的PCR法が使用される。別のアプローチにおいては、VPS4A、VPS4B、SMAD4、CDH1、CHMP4B、ITCHまたはISG15核酸分子の配列の変化を特定するために、PCR法が使用される。一態様において、ゲノム配列または密接に関連する分子を含む、VPS4A、VPS4B、SMAD4、CDH1、CHMP4B、ITCHまたはISG15核酸分子を検出することができるプローブが使用される。このようなプローブは、新生物を有する患者に由来する核酸配列にハイブリダイズするために使用され得る。プローブの特異性は、プローブが天然に存在する配列、対立遺伝子バリアント、または他の関連配列にハイブリダイズするかどうかを決定する。ハイブリダイゼーション技術は、新生物を示す変異を同定するために使用され得るか、またはこれらの遺伝子の発現レベルを（例えば、ノーザン分析によって（上記のAusubelら）監視するために使用され得る。

【０１６９】

別の態様は、新生物を有するか、または新生物を発症する傾向を有するものとして対象を特徴付ける方法を包含する。この方法は、対象の試料におけるVPS4A、VPS4B、SMAD4、CDH1、CHMP4B、ITCHまたはISG15遺伝子を配列決定する工程を含み、参照と比較したVPS4A、VPS4B、SMAD4、CDH1、CHMP4B、ITCHまたはISG15の喪失または変異が新生物を特徴付ける。

【０１７０】

一般に、対象試料中の核酸分子の測定は、参照中に存在する量と比較される。診断量は、新生物組織と対照組織とを区別する。当業者は、診断医の選好に応じて、診断アッセイの感度または特異性を増加させるために、使用される特定の診断量を調整することができることを理解する。一般に、参照と比較して対象試料中の試験核酸分子または試験ポリペプチドのレベルの任意の有意な減少（例えば、少なくとも約10％、少なくとも約15％、少なくとも約30％、少なくとも約50％、少なくとも約60％、少なくとも約75％、少なくとも約80％または少なくとも約90％）が、新生物を診断するために使用され得る。試験分子には、VPS4A、VPS4B、SMAD4、CDH1、CHMP4B、ITCHまたはISG15が含まれる。一態様において、参照は、新生物を有しない患者から得られた対照試料中に存在

する試験ポリペプチドまたは核酸分子のレベルである。別の態様において、参照は、新生物に対する治療前、治療中、または治療後の患者に由来する生物学的試料中に存在する試験分子のベースラインレベルである。さらに別の態様において、参照は標準化された曲線であり得る。

【０１７１】

生物学的試料の種類

新生物を有するかまたは新生物を発症するリスクがある患者からの生物学的試料におけるマーカーのレベルを測定することができ、参照分子の配列または発現と比較した試験マーカー分子の発現の変化を、異なる種類の生物学的試料において決定することができる。試験マーカーとしては、VPS4A、VPS4B、SMAD4、CDH1、CHMP4B、ITCHまたはISG15が挙げられる。生物学的試料は、一般に、好ましくは体液（組織試料、血液、糞便、脳脊髄液、痰、唾液または尿など）または組織試料（例えば、生検によって得られた組織試料）として患者に由来する。

【０１７２】

ハードウェアおよびソフトウェア

本発明はまた、計算（例えば、多変量モデルに関連する計算）および配列決定の両方に関連して本発明の方法を実行することに関与するコンピュータシステムに関する。

【０１７３】

コンピュータシステム（またはデジタル装置）は、結果を受信、送信、表示および/もしくは保存し、結果を分析し、ならびに/または結果および分析の報告を生成するために使用され得る。コンピュータシステムは、固定媒体を有するサーバに任意で接続することができる、媒体（例えば、ソフトウェア）および/または（例えば、インターネットからの）ネットワークポートからの命令を読み取ることができる論理装置として理解され得る。コンピュータシステムは、CPU、ディスクドライブ、キーボードおよび/またはマウスなどの入力デバイス、ならびにディスプレイ（例えば、モニタ）のうちの1つまたは複数を備え得る。命令または報告の伝達などのデータ通信は、ローカルまたは遠隔位置のサーバに通信媒体を介して達成することができる。通信媒体は、データを送信および/または受信する任意の手段を含むことができる。例えば、通信媒体は、ネットワーク接続、無線接続またはインターネット接続とすることができる。このような接続は、ワールドワイドウェブを介した通信を提供することができる。本発明に関するデータは、受信者/受信機による受信および/または閲覧のために、このようなネットワークまたは接続（または、印刷出力などの物理的な報告を郵送することが含まれるがこれに限定されない、情報を送信するための任意の他の適切な手段）を介して送信することができることが想定される。コンピュータによって行われた計算の結果（例えば、ハイブリッド捕捉プローブ配列の配列分析またはリスト）を、例えば、メモリドライブまたはディスクなどのコンピュータ可読フォーマットで、コンピュータモニタもしくはその他のモニタ上に表示される出力として、または単に紙に印刷して、有形媒体上に記録することができる。結果は、コンピュータ画面上に報告することができる。受信者/受信機は、個人または電子システム（例えば、1つもしくは複数のコンピュータ、および/または1つもしくは複数のサーバ）であり得るが、これらに限定されない。

【０１７４】

いくつかの態様において、コンピュータシステムは、1つまたは複数のプロセッサを備え得る。プロセッサは、コンピュータシステムの1つもしくは複数のコントローラ、計算ユニットおよび/もしくは他のユニットに関連付けられ得るか、または所望であればファームウェアに埋め込まれ得る。ソフトウェアに実装される場合、ルーチンは、RAM、ROM、フラッシュメモリ、磁気ディスク、レーザディスク、または他の適切な記憶媒体などの任意のコンピュータ可読メモリに保存され得る。同様に、このソフトウェアは、例えば、電話回線、インターネット、無線接続などの通信チャネルを介して、またはコンピュータ可読ディスク、フラッシュドライブなどの輸送可能な媒体を介してなど、任意の公知の配信方法を介してコンピューティングデバイスに配信され得る。様々な工程は、次いでハ

ードウェア、ファームウェア、ソフトウェアまたはハードウェア、ファームウェアおよび/もしくはソフトウェアの任意の組み合わせに実装され得る様々なブロック、動作、ツール、モジュールおよび技術として実装され得る。ハードウェアに実装される場合、ブロック、動作、技術などの一部または全部は、例えば、カスタムチップ（IC）、特定用途向け集積回路（ASIC）、フィールドプログラマブルロジックアレイ（FPGA）、プログラマブルロジックアレイ（PLA）などに実装され得る。

【０１７５】

本発明の態様においては、クライアント・サーバ、リレーショナル・データベース・アーキテクチャを使用することができる。クライアント・サーバ・アーキテクチャは、ネットワーク上の各コンピュータまたはプロセスがクライアントまたはサーバのいずれかであるネットワークアーキテクチャである。サーバコンピュータは、典型的には、ディスクドライブ（ファイルサーバ）、プリンタ（プリントサーバ）、またはネットワークトラフィック（ネットワークサーバ）の管理専用の強力なコンピュータである。クライアントコンピュータは、ユーザがアプリケーションを実行するPC（パーソナルコンピュータ）またはワークステーションの他、本明細書に開示される例示的な出力デバイスを含む。クライアントコンピュータは、ファイル、デバイス、さらには処理能力などのリソースに関してサーバコンピュータに依存している。本発明のいくつかの態様において、サーバコンピュータは、データベース機能のすべてを処理する。クライアントコンピュータは、すべてのフロントエンドデータ管理を処理するソフトウェアを有することができ、ユーザからのデータ入力を受け取ることもできる。

【０１７６】

コンピュータ実行可能なコードを含み得る機械可読媒体は、有形記憶媒体、搬送波媒体または物理伝送媒体を含むがこれらに限定されない多くの形態をとり得る。不揮発性記憶媒体には、例えば、図面に示されるデータベースなどを実装するために使用され得る任意のコンピュータなどの中の記憶装置のいずれかなどの光学または磁気ディスクが含まれる。揮発性記憶媒体には、このようなコンピュータプラットフォームのメインメモリなどのダイナミックメモリが含まれる。有形伝送媒体には、同軸ケーブル; コンピュータシステム内にバスを備えるワイヤを含む、銅ワイヤおよび光ファイバが含まれる。搬送波伝送媒体は、電気信号もしくは電磁信号、または無線周波数（RF）および赤外線（IR）データ通信中に生成されるような音波もしくは光波の形態をとり得る。したがって、コンピュータ可読媒体の一般的な形態には、例えば、フロッピーディスク、フレキシブルディスク、ハードディスク、磁気テープ、任意の他の磁気媒体、CD-ROM、DVDもしくはDVD-ROM、任意の他の光学媒体、パンチカード穿孔テープ、穴のパターンを有する任意の他の物理的記憶媒体、RAM、ROM、PROMおよびEPROM、FLASH-EPROM、任意の他のメモリチップもしくはカートリッジ、データもしくは命令を搬送する搬送波、このような搬送波を搬送するケーブルもしくはリンク、またはコンピュータがプログラミングコードおよび/もしくはデータをそこから読み取り得る任意の他の媒体が含まれる。コンピュータ可読媒体のこれらの形態の多くは、実行のために1つまたは複数の命令の1つまたは複数のシーケンスをプロセッサに搬送することに関与し得る。

【０１７７】

主題のコンピュータ実行可能なコードは、サーバ、PC、またはスマートフォンもしくはタブレットなどのモバイル機器を含む、プロセッサを備え得る任意の適切な機器上で実行することができる。任意のコントローラまたはコンピュータは、任意でモニタを含み、モニタは、陰極線管（「CRT」）ディスプレイ、フラットパネルディスプレイ（例えば、アクティブマトリクス液晶ディスプレイ、液晶ディスプレイなど）などであり得る。コンピュータ回路は、しばしば、マイクロプロセッサ、メモリ、インターフェース回路などの多数の集積回路チップを含むボックス内に配置される。ボックスは、任意で、ハードディスクドライブ、フロッピーディスクドライブ、書き込み可能なCD-ROMなどの大容量リムーバブルドライブ、および他の一般的な周辺要素も含む。キーボード、マウスまたはタッチセンサ式スクリーンなどの入力機器は、任意にユーザからの入力をもたらす。コン

ピュータは、例えばGUI中の一群のパラメータフィールドへのユーザ入力の形態で、または例えば様々な異なる特定の動作のために予めプログラムされた、予めプログラムされた命令の形態で、ユーザ命令を受け取るための適切なソフトウェアを含むことができる。

【０１７８】

キット

本発明は、新生物を特徴付けるためのキットを提供する。一態様において、キットは、発現の参照レベルと比較したマーカー（例えば、VPS4A、VPS4B、SMAD4、CDH1、CHMP4B、ITCHまたはISG15）核酸分子またはポリペプチドの発現の変化を検出する。関連する態様において、キットは、VPS4A、VPS4B、SMAD4、CDH1、CHMP4B、ITCHまたはISG15核酸分子の発現をモニターするための試薬、例えば、前記核酸分子にハイブリダイズするプライマーまたはプローブを含む。他の態様において、キットは、VPS4A、VPS4B、SMAD4、CDH1、CHMP4B、ITCHまたはISG15ポリペプチドに結合する抗体を含む。いくつかの態様において、キットは、VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1の発現または活性を変化させる作用物質を含む。

【０１７９】

任意で、キットは、対象に由来する生物学的試料におけるマーカーの核酸分子またはポリペプチドレベルをモニタリングするための指示を含む。他の態様において、キットは、プライマー、プローブ、抗体またはその他の検出試薬を含有する滅菌容器; このような容器は、箱、アンプル、瓶、バイアル、チューブ、袋、パウチ、ブリスターパック、または当技術分野において公知の他の適切な容器形態であり得る。このような容器は、プラスチック、ガラス、ラミネート紙、金属箔、または核酸を保持するのに適した他の材料で作ることができる。説明書は、一般に、本明細書に記載されるプライマーまたはプローブの使用および新生物を診断する上でのそれらの使用に関する情報を含むであろう。好ましくは、キットは、本明細書に記載される診断アッセイに記載される試薬の任意の1つまたは複数をさらに含む。他の態様において、説明書は、以下のうちの少なくとも1つを含む:プライマーもしくはプローブの説明; 封入された材料を新生物の診断のために使用するための方法; 注意; 警告; 指示; 臨床もしくは調査研究; および/または参考文献。説明書は、容器に直接印刷されてもよく（存在する場合）、または容器に貼付されたラベルとして、または容器内にまたは容器とともに供給される別個のシート、パンフレット、カードまたはフォルダとして印刷されてもよい。

【０１８０】

患者のモニタリング

新生物を有する患者の疾患状態または治療は、本発明の方法および組成物を使用してモニタリングすることができる。VPS4A、VPS4B、CHMP1A、CHMP1B、ULK3、VTA1、またはIST1のポリペプチドの発現を変化させる治療薬は、本発明において特に有用であると考えられる。

【０１８１】

以下の実施例は、当業者に、本発明のアッセイ、スクリーニングおよび治療方法を作製および使用する方法の完全な開示および説明を提供するために記載されており、本発明者らが本発明とみなすものの範囲を限定することを意図するものではない。

【実施例】

【０１８２】

実施例1: 確立された腫瘍抑制因子のゲノム喪失との合成致死性相互作用の発見

腫瘍抑制遺伝子（TSG）のゲノム喪失との合成致死性相互作用を明らかにするために、ゲノム規模のRNA干渉（RNAi）およびCRISPR-SpCas9がん依存性データセットを分析した（depmap.org）。分析は、大部分のヒトがんに関連し得る合成致死関係を同定するために、50種の一般的に失われるTSG（表5）に焦点を当てた。これらの腫瘍抑制因子のそれぞれについて、log2正規化コピー数コールの、正規化された遺伝子レベルCRISPR-SpCas9（622種の細胞株、18,333個の遺伝子）およびRNAi（669種の細胞株

、16,905個の遺伝子）依存性スコアとの相関分析を行った（図1A）。CRISPR-SpCas9依存性-TSG相互作用の1.0%（9,142/916,650）およびRNAi依存性-TSG相互作用の1.9%（16,435/845,250）のみが、10%の偽陽性率で有意であった。興味深いことに、有意なCRISPR-SpCas9相関（31.5%; 2,877/9,142）およびRNAi相関（7.1%; 1,174/16,435）のかなりの割合が、依存性遺伝子がTSGと同じ染色体アームに局在するシス相関に相当した（図1.1A～1.1C）。TSG喪失は主に染色体アーム全体の欠失によって推進されるので、TSGに隣接する必須遺伝子の付随的（部分的）喪失がしばしば起こり、これらの遺伝子の発現への増大した依存性がもたらされる。このようなシスで発生する遺伝子依存性は、以前に「CYCLOPS」（copy-number alterations yielding cancer liabilities owing to partial loss（部分的喪失によるがん傾向をもたらすコピー数変化））として記載されている。

【０１８３】

CYCLOPS遺伝子以外にも一般的なTSGとの合成致死性相互作用の理解を拡げるために、異なる染色体上、すなわちTSGに対してトランスに位置する遺伝子依存性に焦点を当てた（図1A）。シス相関を除外した後、3,897のCRISPR-SpCas9（0.4%）および14,525のRNAi（1.8%）の有意な相関が10%の偽陽性率（FDR）で発見された（図1.1D～1.1F）。これらのトランス相関の合計337は、CRISPR-SpCas9分析およびRNAi分析の両方において有意であった（表4）。表4は、CRISPR-SpCas9およびRNAi分析による合成致死分析の両方においてスコア化された腫瘍抑制遺伝子コピー数との有意なトランス相関を記載している。

【０１８４】

いくつかの合成致死性相互作用は1つのデータセットに特有であったが、これは1つには、両データセット間での探査された遺伝子とスクリーニングされた細胞株における重複が不完全であるためであった。合成致死性相互作用を同定するために、TSG喪失（より低いコピー数）が増加した依存性（より低い依存性スコア）を与える正の相関を使用して、127個の遺伝子にわたって193個の有意な相互作用を明らかにした（図1Bおよび1.1G）。SMAD4、CDKN2B、RHOA、CDKN2A、およびBAP1 TSGのコピー喪失は、合成致死関係の最大数を示した（図1Cおよび1.1G）。例えば、476症例の膵管腺癌（PDAC）におけるSMAD4コピー数は、増加（gain）（3.8%）、減少/喪失（loss）（16.8%）、中立（neutral）（22.9%）および浅い（shallow）（56.5%）を示した。一方、すべてのがんでは、28,231症例におけるSMAD4コピー数は、増加（4.7%）、減少/喪失（1.2%）、中立（78.2%）および浅い（16.0%）を示した。

【０１８５】

CDKN2AとMAGOH-CDKN1BおよびPRMT5/WDR77について以前に報告されたものを含む、いくつかのパラログおよび付随的合成致死性相互作用が分析において最も有意であった（図1Bおよび1D）（Kryukov et al. Journal of Experimental Med, 214 (10): 2933-2946, 2016; Viswanathan et al., Nat Genet, 50 (7): 937-943, 2018）。スプライシング関連DExD-ボックスヘリカーゼ39B（DDX39B）への依存性は、MEF2B、SMARCA4、KEAP1およびSTK11腫瘍抑制遺伝子のコピー数と強く相関し、これらはすべて染色体19pにマッピングされる（図1Bおよび表4）。DDX39Bの主要なパラログであるDDX39Aは染色体19p上に位置しており、19pの喪失がDDX39Aの喪失をもたらし、続いて、これがDDX39Bの枯渇に対する細胞の感受性を増強することを示唆している。同様に、必須のセリン/トレオニン-タンパク質ホスファターゼ2A調節サブユニットAα（PPP2R1A）への依存性は、PPP2R1Aの主要なパラログであるPPP2R1Bに隣接する染色体11q上のATMおよびCBL腫瘍抑制因子のコピー数と強く相関していた（図1Bおよび表4）。遺伝子依存性と同じ経路またはタンパク質複合体の他のメンバーのコピー喪失との間にも強い相関が同定された。例えば、メディエータ複合体サブユニット1（MED1）への依存性は、いずれもMED9、MED11およびMED31とともに染色体17pにマッピングされるTP53およびMAP2K4の喪失と強く相関し、これらのメディエータサブユニットの喪失がMED1の喪失に対する細胞の感受性を増強するこ

とを示している。さらに、FUBP1への依存性は、染色体19p上に位置するTSG（SMARCA4、KEAP1、STK11）のコピー数と相関していた（図1Bおよび表4）。以前に報告されたように、FUBP1の結合パートナーであるKHSRP（FUBP2としても知られる）をコードする遺伝子は、染色体19pに局在する（Paolella et al. Elife, 6:e23268, 2017; Viswanathan et al. Nat Genet, 50 (7): 937-943, 2018）。

【０１８６】

実施例2: ESCRT酵素VPS4AおよびVPS4Bは、SMAD4またはCDH1の喪失を有するがんにおけるパラログ合成致死脆弱性である。

顕著な数のトランス依存性相関が、ヒトがんにおいて最も一般的に失われる腫瘍抑制遺伝子の1つであるSMAD4欠失に観察された（図1Cおよび1.1G）。VPS4Aは、SMAD4/18qのコピー喪失との最も強い相関の遺伝子依存性としてスコア化された（図1B～1D、表4）。注目すべきことに、VPS4Aのパラログであるvps4B（図2.2A）は、SMAD4に隣接して12.3Mb存在する（図1E）。がん細胞株にわたって、VPS4Bコピー喪失は高頻度であり、SMAD4喪失と強く相関していた（図1F; R^2:0.615）。SMAD4はいくつかの細胞株においてホモ接合的に失われたが、VPS4Bのホモ接合性の喪失は観察されなかった（図1F）。興味深いことに、いくつかのVPS4A依存性細胞株は、正常なSMAD4コピー数を有していたが、VPS4Bの限局的な喪失を示したのに対して、いくつかのVPS4A非依存性細胞株は、SMAD4の喪失を有していたが、VPS4Bについては正常なコピー数を保持していた（図2.2B）。これらの結果は、VPS4AへのVPS4Aの依存性がSMAD4よりもむしろVPS4Bの喪失によって引き起こされることを示している。

【０１８７】

SMAD4欠損がん細胞株は選択的にVPS4Aに依存することが示された。SMAD4欠損がん細胞において必須である遺伝子を特定するために、中立のSMAD4コピーを有するがん細胞株と、SMAD4コピー喪失を有するがん株との間で、CERES（CRISPR）およびDEMETER2（RNAi）遺伝子依存性スコアを比較した。次いで、一般的に必須遺伝子（必須）、選択的な必須遺伝子（選択的）および重要でない遺伝子として、遺伝子依存性を分類した（図10A～10C）。統計的有意性は、SMAD4中立がん細胞株対SMAD4欠損がん細胞株における各遺伝子に対して、平均遺伝子依存性スコアの間での10%偽陽性率補正された（ベンジャミーニ・ホッホベルク）独立両側T検定を使用して決定した。

【０１８８】

図12Aは、COV413A（上のパネル）卵巣がんおよびJR（下のパネル）横紋筋肉腫がん細胞株におけるSMAD4コピー数およびVPS4Bコピー数（ドット）に焦点を当てた、18番染色体（x軸）にわたる遺伝子プローブのlog2正規化相対コピー数（y軸）のプロットにおける結果を示す。＊＊＊＊p値＜0.0001、＊＊p値＜0.005; 独立両側T検定。

【０１８９】

さらに、VPS4Bのコピー喪失は、CRISPR-SpCas9（R^2:0.208対R^2:0.116）およびRNAiデータセット（R^2:0.118対R^2:0.021）の両方において、SMAD4のコピー喪失よりVPS4A依存性とよく相関した（図2.2D、左のパネル）。さらに、すべてのVPS4A依存性がん細胞株のうちで、63.9%（106/166）が、VPS4Bコピーの少なくとも部分的なゲノム喪失を示した（図2.2E）。

【０１９０】

次に、VPS4B依存性とVPS4Aコピー数との間に相反関係が存在するかどうかを評価した。VPS4B依存性は、染色体16q22.1上のCDH1腫瘍抑制因子遺伝子座の喪失と有意に相関した（図1B、表4）。驚くべきことに、VPS4Aは、CDH1腫瘍抑制遺伝子のわずか476キロベース下流に局在する（図2.2C）。その結果、VPS4Aコピー数は、CDH1コピー数と強く相関していた（図2.2C、R^2:0.846）。予想されたように、VPS4Bへの依存性は、CRISPR-SpCas9およびRNAiデータセットの両方においてVPS4Aコピー数と相関した（図2.2Dおよび2.2F）が、この相関性は、VPS4A依存性とVPS4Bコピー喪失との間で観察された相関性より大きくなかった（図2.2Eおよび2.2Fを比較せよ）。

【０１９１】

VPS4AおよびVPS4Bは49kDaのAAA ATPアーゼをコードし、これらのパラログタンパク質は81%同一である（図2.2A）。VPS4AおよびVPS4Bは、ESCRT機構と多量体複合体を形成して、多くの細胞過程にわたって逆トポロジー膜リモデリングおよび分裂を調節する（図1G）。CHMP4Bは、ESCRT媒介性膜リモデリングに不可欠なコアフィラメント形成ESCRT-IIIタンパク質である。VPS4A依存性スコアはSMAD4/VPS4Bコピー数と正に相関したが（すなわち、より低いコピー数はより低い遺伝子依存性スコアと相関する）、CHMP4B依存性とSMAD4コピー数との間に強い逆相関が観察された（図1H、表4）。CHMP4Bは、正倍数体VPS4Bコピー数を有する細胞における増殖および生存にとって強く必須であるが、VPS4Bの喪失を有する細胞は、CHMP4Bノックアウトに対して感受性がより低い（図1Iおよび1J）。

【０１９２】

VPS4AおよびVPS4BのCRISPR依存性スコアと他のすべての遺伝子のCRISPR依存性スコアとの相関は、VPS4AおよびVPS4BがCHMP1A、VTA1およびIST1などの他の特殊なESCRT遺伝子と共必須であることを強調した。逆に、CHMP4Bへの依存性は、VPS4A/VPS4B依存性と逆相関した（図3.3A～3.3D）（Vietri et al. Nature Review Molecular Cell Biology, 21:25-42, 2020）。予想されたように、CHMP1AおよびCHMP4B依存性スコアはまた、VPS4A/Bコピー数低下との有意な相互作用を実証した（図3.3D）。要約すると、これらの結果は、がん細胞生存を維持させる上でのESCRT経路の極めて重要な役割を実証し、ESCRT経路メンバーのゲノム喪失の状況での合成致死脆弱性を強調する。

【０１９３】

実施例3: VPS4AおよびVPS4Bは成人および小児のがん型の両方にわたって頻繁なコピー喪失を受ける

データセットにわたって、CRISPR-SpCas9によってスクリーニングされたがん細胞株の22.7%（142/624）およびRNAiによってスクリーニングされたがん細胞株の10.0%（55/546）が、増殖および生存に関してVPS4Aに依存し（図4.4A上のパネル）、膵臓癌および小児横紋筋肉腫（RMS）がん細胞株の40%超は頑強な依存性を示した（図1K）。さらに、VPS4Aは、膀胱、胆管、肺、卵巣、結腸および食道がん細胞株のかなりの割合において必須であった（図1K）。VPS4Bについては、CRISPR-SpCas9によってスクリーニングされたがん細胞株の12.5%（78/624）およびRNAiによってスクリーニングされたがん細胞株の20.9%（146/700）がVPS4Bに依存し（図4.4A、下のパネル）、卵巣、乳房、膵臓、肝臓、胃および胆管がん細胞株の25%超が強い依存性を示した（図4.4B）。

【０１９４】

がん細胞株を超えてこれらの知見の妥当性を確認するために、The Cancer Genome Atlas（TCGA）Pan-Cancerコピー数データセット（Taylor et al. Cancer Cell, 33 (4): 676-689, 2018）からの患者腫瘍試料において、VPS4A/Bコピー喪失の頻度を調べた。10,712の成人がんにおいて、VPS4Bのコピー喪失ががんの33%（3,546/10,712）において生じた（図1L）。特に、食道がん、結腸直腸がんおよび膵臓癌など、SMAD4喪失を示すことが公知のがんは、頻繁なVPS4B喪失を示した。例えば、VPS4Bは、膵管腺癌試料の47.5%において失われていた。同じTCGAデータセットにわたって、VPS4Aコピー喪失が腫瘍の27.1%において生じ、卵巣、子宮および肉腫試料において共通して喪失していた（図4.4C）。予想されたように、TCGA試料にわたって、VPS4BとSMAD4コピー数との間に、およびVPS4AとCDH1コピー数に対して、強い相関が観察された（図4.4D）。

【０１９５】

分析を小児試料に拡張するために、Dana-Farber Cancer Instituteの患者ターゲットシーケンス解析データベースを調査した（Oncopanel/PROFILE）（Sanchez-Vega et al. Cell, 173 (2): 321-337, 2018）。約70Kb離れた近傍のBCL2遺伝子のターゲットシーケンス解析を通じたコピーコールから、VPS4Bコピー数を推測した（図

4.4E）。955の小児がん試料が、20%の最小新生物細胞型を有すると特定され、42の試料が、明確なVPS4Bコピー喪失によって定義された（3.9%）（図4.4F）。注目すべきVPS4Bコピー喪失が、胚細胞腫瘍の40%（6/15）、骨肉腫の19%（6/31）および脳腫瘍の9%（16/176）において観察された。小児RMSがん細胞株がVPS4A依存性について最も濃縮されていたことを考慮して（図1K）、41人の小児患者のDFCI PROFILE RMSコホートおよび公表されたRMSコホートを調査した。RMS腫瘍の5%（2/39; DFCI PROFILE RMS）および16%（10/62; 公表されたコホート（Chen et al. Cancer Cell 24 (6): 710-724, 2013）は、部分的なVPS4Bコピー喪失を有することが観察され、これはサブタイプ特異的ではなかった（図4.4Gおよび4.4H）。

【0196】

総合すると、これらのデータは、VPS4AおよびVPS4Bのコピー喪失が多くの異なる系統からの成人腫瘍および小児腫瘍の両方で起こることを示しており、すべてのヒトがんの3分の1超が生存のためにVPS4AまたはVPS4Bに依存し得ることを示唆している。VPS4AとVPS4B/SMAD4喪失との間の頑強な合成致死性相互作用、およびがんにわたるVPS4B/SMAD4喪失の顕著さに鑑みて、VPS4Bコピー喪失の状況での脆弱性としてのVPS4Aに関するその後の検証および機構的研究に焦点を当てた。

【0197】

実施例4: VPS4Bのコピー喪失を有するがん細胞において強い遺伝的依存性として検証されたVPS4A

VPS4Aの不活性化が、VPS4Bコピー喪失を有する細胞を選択的に死滅させることができるかどうかを確認するために、部分的なVPS4Bコピー喪失を伴うがん細胞（VPS4B^{喪失}細胞）が、VPS4Bコピー数変化を伴わない細胞（VPS4B^{neutras}細胞）よりも、VPS4A消失に対してより感受性であるかどうかを調べた。3つの異なるsgRNAによるVPS4AのCRISPR-SpCas9媒介性ノックアウトを最初に評価し、VPS4A発現を消失させるこれらのsgRNAの能力を免疫ブロッティングによって確認した（図5.5A）。次に、レンチウイルス形質導入の7日後に、発光に基づく細胞ATPの読み出し情報を使用して、8つのVPS4B^{neutras}および10のVPS4B^{喪失}細胞株に対して、生存率に対するCRISPR-SpCas9媒介性VPS4Aノックアウトの効果を測定した。予想通り、VPS4Aを標的とする3つのsgRNAのいずれかに感染されたVPS4B^{喪失}細胞において、細胞生存率は有意に減少した（図2A）。これらの結果を裏付けるために、RNAiによって媒介されるVPS4A発現の抑制を使用した。ドキシサイクリン誘導性RNAiシステムを使用して、VPS4A発現を選択的に抑制する能力について、3つのVPS4A shRNAおよびそれらの対となったC9-11シード対照を評価した。C9-11シード対照は、「オンターゲット」ノックダウンを抑制するが、「オフターゲット」RNAiシード効果を保持するためにshRNAの9～11位に変異を有する。それらの最適なノックダウン効果および最小のオフターゲットシード効果に基づいて、さらなる実験において使用するために、shVPS4A-2および対応するshSeed2対照を選択した（図5.5B）。この対を使用して、VPS4AのRNAi媒介性抑制は、細胞生存率および長期コロニー形成アッセイにおいて、VPS4B^{喪失}がん細胞株の増殖を著しく低下させたが、VPS4B^{中立}がん細胞株の増殖は低下させなかった（図2Bおよび2C、図5.5C）。

【0198】

インビトロでのVPS4A抑制後の細胞生存率の低下に基づいて、次に、VPS4A抑制が確立された腫瘍異種移植片の増殖を損ない得るかどうかを問うた。横紋筋肉腫（SMSCTR）および膵管腺癌（SNU213）についてのヒトVPS4B^{喪失}がん細胞株を使用して、皮下マウス異種移植片を確立した。これらの細胞株に、ドキシサイクリン誘導性shVPS4A-2または陰性対照C9-11RNAiシステムを安定に形質導入した。確立された腫瘍異種移植片は、VPS4A抑制の誘導に応答してほぼ完全な退縮を示したが、C9-11対照の誘導に応答してほぼ完全な退縮を示すことはなく（図2D、2E、2Gおよび2H）、両モデルにおいて生存の顕著な延長をもたらした（図2E、生存期間中央値30日対74日、SMSCTR; 図2H、生存期間中央値21日対63日、SNU213）。免疫ブロッティングにより、shVPS4A-2

腫瘍におけるVPS4Aノックダウンが確認され、C9-11または非処置対照では確認されなかった（図2F）。

【０１９９】

何がVPS4A依存性がん細胞において細胞生存能の喪失を引き起こすのかをよりよく理解するために、インビトロアッセイを行ってアポトーシスおよび細胞周期分布を特徴付けた（図2H～2Jおよび図5.5D）。CRISPR-SpCas9によって媒介されるVPS4Aの破壊により、VPS4B^{喪失}喪失を伴うRMS、頭頸部、膵臓、および卵巣のがん細胞株において、アポトーシスの指標となるカスパーゼ3/7活性の有意な誘導が観察された（図2Iおよび図5.5D）。対照的に、VPS4A破壊後のVPS4B^{中立}卵巣がん細胞株ES2では、アポトーシス誘導は観察されなかった（図5.5E）。アポトーシスに加えて、VPS4B^{喪失}がん細胞におけるVPS4A消失による一貫したG2/M停止も観察された（図2H）。

【０２００】

合わせると、これらのCRISPRおよびRNAi検証実験は、VPS4Aが、VPS4Bのゲノムコピー喪失を伴うがん細胞の増殖および生存にとって極めて重要であることを実証する。

【０２０１】

VPS4Bの過剰発現は、依存性JR横紋筋肉腫細胞株を、VPS4AのCRISPR媒介性ノックアウトから救済することが見出された（図12B）。生存率プロット中の点は、技術的反復実験を示す。アスタリスクはp値＜0.005を示す（対応のないウェルチのt検定）。VPS4BのCRISPR媒介性ノックアウトは、VPS4Aの抑制に対する非依存性RD横紋筋肉腫細胞株の感受性を増強する。生存率プロット中の点は、技術的反復実験を示す。アスタリスクはp値＜0.0001を示す（対応のないウェルチのt検定）。

【０２０２】

実施例5: 変化したVPS4B発現は、がん細胞におけるVPS4A依存性を調節する

VPS4Bコピー喪失がVPS4BのmRNAおよびタンパク質レベルを低下させるかどうかを調べるために、Cancer Cell Line Encyclopedia（CCLE）由来の1,171種の細胞株および10,712個のTCGA患者試料にわたって、まず、VPS4B発現（RNAseq）とコピー数との相関分析を行った。両データセットにおいて、VPS4B発現は、VPS4Bコピー数と強く相関しており（図3A、3Bおよび6.6A）、遺伝子量がVPS4B発現を駆動すること、および、VPS4B^{喪失}細胞が、VPS4B^{中立}細胞より少ないVPS4Bを発現することを示している。同様の知見が、VPS4Aに対して得られた（図3Bおよび6.6B）。次に、374のがん細胞株からの定量的プロテオミクスデータを調べたところ、VPS4B^{喪失}細胞におけるVPS4Bタンパク質発現において有意な低下が観察された（図3C）。23の細胞株におけるVPS4Bの定量的Protein Simpleキャピラリーベース免疫検出によって、VPS4B^{喪失}細胞における低下したVPS4Bタンパク質レベルが独立して確認された（図3Dおよび3E; n:11 VPS4B^{中立}およびn:12 VPS4B^{喪失}）。

【０２０３】

VPS4B発現の低下がVPS4A枯渇に対するVPS4B^{中立}細胞の感受性を増強するかどうかを確かめるために、CRISPR-SpCas9を使用して、VPS4B^{中立}非依存性RMSがん細胞株RDにおいてVPS4Bをノックアウトした。免疫ブロットおよびTIDEseqを使用して、VPS4B消失について16の単一細胞由来モノクローナル培養物をスクリーニングし、14/16でノックアウトを達成した（図3Fおよび図6.6C）。8つのVPS4B$^{-/-}$モノクローナル培養物を4つのクローンの2つの異なるプール中に混合し、VPS4AのCRISPR-SpCas9媒介性ノックアウトに対する各プールの耐容性を試験した。VPS4Aが消失すると、VPS4B$^{-/-}$クローンプールは、陰性対照と比較して、実質的に低下した生存率を示し、このことは、VPS4Bの喪失が、これらの細胞においてVPS4Aに対する依存性を付与するのに十分であったことを示している（図3G）。元のポリクローナルVPS4Bノックアウト培養物でも同様の結果が観察された（図6.6Dおよび6.6E）。増強されたVPS4B発現がVPS4A依存性から細胞を救済することができるかどうかを決定するために、VPS4B^{喪失}細胞株JRにおいてVPS4Bを安定に過剰発現させた（図3H）。VPS4Bの過剰発現は、細胞をVPS4A抑制から救済するのに十分であった（図3I）。合わせると、これらの結果は、VPS4B発現

レベルがVPS4Aに対する依存性を調節することを実証する。

【０２０４】

野生型および機能喪失型のVPS4A対立遺伝子が、VPS4A依存性からVPS4B^{喪失}がん細胞を救済する能力を評価するために、およびVPS4A sgRNAの特異性を確認するために、外因性レスキュー実験を行った。内因的に発現されたVPS4Aバリアントを不活性化するが、外因的に発現されたVPS4Aバリアントは不活性化しないために、イントロン-エクソン接合部を標的とするsgVPS4A-2およびsgVPS4A-3を使用した（図6.6F）。野生型VPS4A^{WT}; ESCRT-IIIフィラメントへの微小管相互作用輸送（MIT）ドメインの結合を妨げるVPS4A^{L64A}; ATPを結合することができないVPS4A^{K173Q}; ATPを加水分解することができないVPS4A^{E228Q}という4つの異なるVPS4Aバリアントの安定した発現を試みた。いずれかのATP変異体（VPS4A^{K173Q}またはVPS4A^{E228Q}）の安定した発現は、長期の細胞培養に適合しなかった（図6.6G）。VPS4 ATPアーゼ変異体に関連する毒性は、これらの変異体についてのドミナントネガティブ機能の報告と一致しており（Fujita, 2003）、ATP結合または加水分解の障害が、変異体VPS4Aタンパク質のみならず、共発現された野生型VPS4AまたはVPS4Bタンパク質も機能的に不活性化することを示している。興味深いことに、VPS4A^{WT}およびVPS4A^{L64A}構築物の両方が、JR細胞株および59M細胞株の両方において、CRISPR-SpCas9による内因性VPS4Aの破壊に際して細胞生存性を完全に救済することができた（図3Jおよび図6.6H）。VPS4A^{L64A}変異体によるレスキューは、VPS4A枯渇後に生存性をレスキューするために、ESCRT-IIIフィラメントとのMITドメイン相互作用が必要とされないことを示唆する。

【０２０５】

実施例6: VPS4A抑制が、VPS4B^{喪失}がん細胞におけるESCRT-IIIフィラメントの蓄積、変形した核および脱離欠陥をもたらす

VPS4の抑制は、ヒト細胞においてESCRT-III媒介性の膜リモデリングおよび分裂に影響を及ぼし、有糸分裂紡錘体形成、オートファゴソームの成熟、細胞外小胞の分泌、DNA損傷および細胞脱離を含むいくつかの細胞機能の障害をもたらすことが示されている。VPS4A抑制がどのようにして非感受性（VPS4B^{中立}）および感受性（VPS4B^{喪失}）がん細胞株においてESCRT機能を変化させるかを、公知のESCRT依存性細胞過程を研究するために免疫蛍光法を使用して調べた（図4A）。まず、VPS4Aの抑制後に、共焦点免疫蛍光画像化によってコアESCRT-IIIサブユニットCHMP4Bを可視化した。VPS4A抑制の6日後に（図4B）、感受性細胞株（PANC0403、SNU213および59M）の細胞質および核における明るいCHMP4B小斑点の著しく増加した形成が観察されたが、VPS4B^{中立}細胞株KP4では観察されず（図4C～4D）、VPS4A/Bの機能喪失がCHMP4Bフィラメントの蓄積をもたらすことを示している。

【０２０６】

VPS4Aが抑制されると、VPS4B^{喪失}がん細胞における核の変形および拡大も認められた。この表現型はまた、VPS4A抑制がなくても（図4E）、以前に作製されたVPS4B$^{-/-}$モノクローナルRD細胞株において観察された（図3F～3G、6.6C）。この表現型をさらに調べるために、DAPIを用いて核DNAを可視化し、エメリン染色によって核内膜を可視化した。持続的なVPS4A抑制は、断片化された分葉核構造の存在ならびに小核および多核細胞化の存在から明らかなように、VPS4B^{喪失}膵臓癌細胞および卵巣がん細胞において核区画の顕著な変形をもたらした（図4F）。3つの横紋筋肉腫系統（RD、JRおよびSMSCTR）のさらなるパネルを調べると、これらの骨格筋由来細胞は、明確なフィラメント形成ならびにいくらかの核変形および多核細胞化を伴うより高いベースラインCHMP4B発現を示した（図7A）。VPS4Aの5日間の抑制の後、VPS4B^{喪失}JR細胞およびSMSCTR細胞において、細胞質CHMP4B小斑点および核変形のわずかな増加が観察されたのに対して、VPS4B^{中立}RD細胞では、明らかな変化は観察されなかった（図7B）。

【０２０７】

細胞質小胞輸送のためにESCRT機構が必要とされるので、VPS4A抑制がVPS4B^{喪失}SNU213がん細胞株中の細胞質膜構造の変化を誘導するかどうかも調べた。RAB7（エン

ドソーム）、LC3B（オートファゴソーム）およびSEC61B（小胞体）の免疫蛍光可視化によって、7日間の持続的なVPS4A抑制はエンドソームおよび小胞体構造の変化を誘導するが、オートファゴソームの量またはサイズを有意に変化させないことが観察された（図7Cおよび7D）。

【０２０８】

最後に、VPS4A抑制を受けているがん細胞は、長い細胞質分裂ブリッジを介して他の細胞に依然として付着していることが観察され、脱離欠陥を示した。ESCRTおよびVPS4機構は細胞の脱離において極めて重要な役割を果たすので、VPS4AのCRISPR-SpCas9媒介性ノックアウトの4日後にチューブリンの免疫蛍光染色によってこの表現型をさらに調べた（図4G）。細胞質分裂ブリッジは、複数の系統のVPS4B^{喪失}がん細胞における目視検査で明らかであり、定量化によって、有意に増加した割合のVPS4B^{喪失}がん細胞が細胞質分裂ブリッジによって依然として隣接細胞に接続されていることが明らかになった（図4H）。

【０２０９】

図11は、VPS4A依存性がん細胞株SNU213に対するVPS4A抑制の下流効果を特定する。VPS4Aに対する誘導性shRNAによるVPS4Aの抑制は、膵臓SNU213がん細胞における核膜（エメリン）および核（DAPI）の変形、ならびにESCRT-III CHMP4B含有フィラメントの細胞質蓄積をもたらす。一方、VPS4AのCRISPRノックアウトは、VPS4A依存性横紋筋肉腫JRがん細胞株における脱離欠陥（チューブリン＋DAPI）を誘発した。

【０２１０】

実施例7: VPS4A依存性の修飾因子についてのCRISPR-SpCas9スクリーニングは、ESCRTタンパク質およびULK3脱離チェックポイントキナーゼについての重要な役割を明らかにする

ESCRT経路はがん細胞生存にとって不可欠ないくつかの過程に関与しているので、VPS4A抑制に際して誘発されるがん細胞死のサプレッサーおよびエンハンサーをマッピングするために、VPS4AのRNAi媒介性サイレンシングと組み合わせて、ゲノム規模のCRISPR-SpCas9機能喪失スクリーニングを実施した。この目的のために、VPS4Bコピー喪失を有し、VPS4Aに依存するSNU213膵臓癌細胞株を利用した（図2A～2Cおよび図5.5C）。Brunello sgRNAライブラリー（Doench et al. Nature Biotechnol, 34 (2): 184-191, 2016）を、SpCas9およびdox誘導性shVPS4A-2 RNAiシステムを安定に発現するSNU213細胞に形質導入し、ドキシサイクリンの存在下または非存在下でスクリーニングを行った（図5A）。継代後、STARSアルゴリズム（Doench et al., 2016）を使用して遺伝子レベルスコアを計算し、VPS4A抑制に対する抵抗性または増強された感受性を促進する遺伝子を同定するために、スクリーニング間で値を比較した（図5B、表5）。表5は、誘導性shVPS4A-2 RNAiシステムを発現する非処理およびドキシサイクリン処理SNU213細胞を用いたCRISPR-SpCas9修飾因子スクリーニングからの結果を記載する。sgRNA正規化リードカウント、sgRNAおよび遺伝子レベルの$\log_2$倍数変化、STARS分析の結果が含まれる。

【０２１１】

複製ガイドおよび遺伝子レベルスコアは強く相関しており、頑強なスクリーニング性能を示している（図8A～8D）。

【０２１２】

ドキシサイクリン処理された（VPS4A抑制された）細胞中に濃縮されたsgRNAは、そのノックアウトがRNAi媒介性VPS4A抑制の存在下で細胞生存を促進する抵抗遺伝子を示す（図5B、中央点線の右、灰色の陰影が付された領域の上の点）。VPS4A抑制中に細胞増殖および生存性を促進する遺伝子（例えば、ELF2、COMMD7、AGO2、FAU、RPS18、CHMP4B、ITCH、DKC1、RL1、MYLK2）は、図5Bの灰色の影が付された領域の上および中央点線の左側に見出される。RNAi媒介遺伝子サイレンシングに必須のタンパク質であるアルゴノート2タンパク質（AGO2）が最も高度に濃縮された遺伝子として同定され、スクリーニングの頑強性をさらに確認した（図5Bおよび5C）。CHMP4B

を標的とするsgRNAは、2番目に多く濃縮されたsgRNAのセットとしてスコア化され（図5B～5E）、CHMP4B ESCRT-IIIフィラメントが、VPS4A抑制によって与えられる抗増殖性の機構を媒介する上で極めて重要な役割を果たすという考えを裏付ける。ESCRT機構のさらなるメンバーを標的とするsgRNAも著しく濃縮され、ESCRT-I VPS28およびVPS37B、ESCRT-II SNF8およびESCRT-III CHMP5を標的とするsgRNAが含まれた（図5C～5E）。他の上位の濃縮された標的遺伝子には、Itchy E3ユビキチンリガーゼをコードするITCH、エンドソーム関連および未特定のCOMMD7遺伝子、RNA G-四重鎖アンフォールディングDEAH/RHAヘリカーゼDHX36、およびETSファミリー転写因子ELF2が含まれた（図5Bおよび5E）。種々のリボソーム遺伝子および核小体遺伝子、エンドソーム関連COMMD2およびCOMMD3遺伝子、ならびにGMPS、IMPDH2およびPGDなどの種々の代謝関連遺伝子を標的とするさらなるsgRNAの濃縮も観察された（図5E、表5）。

【０２１３】

非処理細胞（VPS4A発現）と比較して、ドキシサイクリン処理された（VPS4A抑制）細胞では、多数の遺伝子を標的とするsgRNAの強い枯渇が観察され、そのノックアウトが合成致死性相互作用またはVPS4A抑制の抗増殖性効果の選択的増強をもたらす遺伝子を示している（図5B、0、すなわち、垂直点線における効果量の左側で、上および中央パネル中に見られる点（例えば、ULK3、CHMP1A、VTA1、RUNX1、TIAL1）を参照）。最も注目すべきことには、VPS4A/VPS4B複合体補因子VTA1を標的とするsgRNAに加えて、2つのアクセサリーESCRT-IIIフィラメント遺伝子CHMP1AおよびCHMP1Bが、VPS4A抑制に対する強力な増感剤としてスコア化された（図5B～5E）。VTA1の次に、脱離チェックポイントキナーゼをコードするULK3遺伝子が、上位の合成致死遺伝子としてスコア化された。スプライシングおよびアポトーシス関連調節タンパク質をコードするTIAL1、および転写複合体-コア結合因子をコードするRUNX1のノックアウトも、強力な増感機構としてスコア化された（図5Bおよび5E）。スクリーニングからの上位50の抵抗性および増感因子遺伝子の遺伝子セット濃縮分析は、スクリーニングからの上位スコアリング遺伝子が濃縮された多くの共通経路を定義した（図5F）。

【０２１４】

実施例8: インターフェロンシグナル伝達およびCHMP4B発現はVPS4A依存性を調節する

VPS4A依存性は、VPS4Bのコピー数および発現と強く相関しているが（図3F～3Iおよび図2.2D、2.2F）、VPS4Bコピー喪失を示すすべてのがん細胞株が、VPS4A抑制に対して感受性であるわけではない（図2.2Dおよび2.2F）。VPS4B喪失に加えて、VPS4A依存性を予測するためのさらなるバイオマーカーを探索するために、がん細胞株にわたって、VPS4A CRISPR依存性スコアと、遺伝子レベルのRNAseq発現値との相関分析を行った（図6A）。予想されたように、VPS4A依存性は、18qに位置する遺伝子のより低い発現と相関し、SMAD4/VPS4Bコピー数との合成致死関係が確認された。VPS4A依存性を有する上位250の逆相関した遺伝子に対する遺伝子セット濃縮分析は、ウイルス感染に対する細胞応答、サイトカイン（インターロイキン）シグナル伝達、細胞接着経路、および細胞骨格組織化の濃縮を示した（図6B）。上位の濃縮された経路は、インターフェロン1型および2型のシグナル伝達経路によって駆動され、定量的プロテオミクスデータの相補性分析（図9A）は、さらに、VPS4A依存性と、1型インターフェロンおよびインターロイキンのシグナル伝達を含む自然免疫応答遺伝子との間の強い逆相関関係を指し示した（図9B）。VPS4A CRISPR依存性とウイルスに対する自然応答との間のこの逆相関はVPS4B喪失を考慮に入れた後でさえも残存し（図9C～9D）、インターフェロン応答遺伝子の増加した発現が、VPS4A消失に対する細胞の感受性を増強し得ることを示している。この仮説を試験するために、ドキシサイクリンありまたはなしで、様々な用量のインターフェロン-βおよびインターフェロン-γと組み合わせて、shVPS4A-2 RNAiシステムを発現する3つの膵臓癌細胞株のセットを処理した。驚くべきことに、ドキシサイクリンとのII型インターフェロン-γの同時処理は、$VPS4B^{喪失}$細胞株であるPANC0403およびSNU213のVPS4A抑制に対する感受性を強く増強したが、$VPS4B^{normal}$

細胞株であるKP4の感受性を増強しなかった（図6C、9E）。インターフェロン-βは、おそらくはIFNAR2受容体の低下した発現によって（図9F）、SNU213細胞のVPS4A抑制に対する感受性を強く増強したが、PANC0403細胞の感受性を変化させなかった（図6C）。

【０２１５】

インターフェロン応答遺伝子がVPS4A依存性と相関することに鑑みて、次に、VPS4B発現とともにさらなる特徴を組み入れた多変量モデルが、VPS4A依存性についての改善されたバイオマーカーをもたらし得るかどうかを調べた。この目的のために、VPS4B、CHMP4B、およびITCHの遺伝子mRNA発現レベル、CRISPR VPS4A依存性スクリーニングの上位スコアを与えた2つの修飾因子（図5B）、ならびにインターフェロン応答遺伝子ISG15を組み込むことによってVPS4A依存性を予測するために、10分割交差検証4パラメータ線形モデルを作成した。この組み合わせモデルは、独立して各遺伝子に基づくか、または4つの遺伝子の対もしくは3つ組の任意の組み合わせに基づくモデルよりも、VPS4A依存性スコアの予測値と実測値との間の相関を有意に改善した（図6D、9G）。このモデルはまた、VPS4A依存性スコアと他の遺伝子発現、コピー数または遺伝子依存性特徴との間の任意の単変量相関を上回る成績を収めた。同様のモデル化戦略をVPS4B依存性予測に適用すると、CHMP4B発現をVPS4A発現に追加することによっても、単変量モデルおよび相関を上回って予測力を強く増加させることが示された（図9H～9I）。要約すると、これらのデータは、VPS4A-VPS4B合成致死性相互作用が、関連するVPS4パラログおよびCHMP4Bの発現レベルによって駆動され、インターフェロン応答遺伝子の発現が、VPS4AまたはVPS4B依存性をさらに調節する働きをすることを示している。

【０２１６】

考察

Cancer Dependency Map（www.depmap.org）からのゲノム規模のCRISPR-SpCas9およびRNAiスクリーニングデータの系統的分析を実施し、50の一般的なTSGのうちの1つのコピー数低下と相関する遺伝的脆弱性をマッピングした（表4および5参照）。がんに対する合成致死性相互作用のこの一覧表は、潜在的な治療開発およびさらなる機構的研究のための複数の公知のおよび新規な標的を指定する。ヒトがんにおける最も頻繁なゲノム変化の1つである、染色体18q上のSMAD4腫瘍抑制因子のコピー喪失との著しい数の合成致死性相互作用が、本明細書に記載されている。最も注目すべきことに、SMAD4欠損がん細胞の大きなサブセットは、18q上でSMAD4の12.3Mb下流に位置するVPS4Aのパラログ VPS4Bのゲノム喪失の故に、生存のためにESCRT関連ATPアーゼであるVPS4Aの発現を選択的に必要とすることが観察された。さらに、VPS4A抑制は、低下したコピー数のVPS4Bを有するインビトロがんモデルにおいてアポトーシスおよび細胞周期停止を誘導し、皮下がん異種移植マウスモデルにおいて多大なインビボ腫瘍退縮をもたらす。これとは逆に、染色体16q上のCDH1（E-カドヘリンをコードする）の低下を有するがん細胞はVPS4Aの付随的喪失を示し、これはVPS4Bの枯渇に対するこれらの細胞の感受性を増強する。さらに、VPS4B喪失を有する細胞は、ESCRT-IIIコアフィラメント形成タンパク質CHMP4Bの枯渇に対して減感される。これらの結果は、がん細胞生存を維持する上でのESCRT機構の極めて重要な役割を実証し、ESCRTタンパク質間の用量依存的関係に加えて、1つまたは複数の経路成分のゲノムコピー喪失の状況における合成致死脆弱性を強調する。

【０２１７】

VPS4A-VPS4Bパラログ依存性は付随的合成致死性の一例であり、隣接するバイスタンダー遺伝子の欠失が別の関連遺伝子へのがんの依存性をもたらす。付随的致死性は、パラログENO2への依存性をもたらす染色体1p36上のENO1の喪失に関して最初に記載された（Muller et al. Nature, 488 (7411): 337-42, 2012）。本明細書で提供される分析は染色体1p上に位置する腫瘍抑制遺伝子を一切含まなかったので、ENO1-ENO2パラログ依存性は検証されなかった。より最近では、SMAD4に隣接するME2について

付随的致死関係が特定され、パラログ遺伝子ME3への依存性につながった。しかしながら、ME3は、本研究においてまたはSanger InstituteのCRISPR-SpCas9 Cancer Dependency Mapにおいて評価されたCRISPR-SpCas9またはRNAiスクリーニングデータセット中のがん細胞株のいずれにおいても依存性としてスコア化されなかった。考えられる理由としては、試薬の品質の技術的差異または実験的差異が挙げられる。PRMT5への依存性が、腫瘍抑制因子CDKN2AとのMTAPの同時欠失に関連することが報告されており、この付随的致死関係は、本分析において頑強にスコア化された（Kryukov et al. Journal of Experimental Med, 214 (10): 2933-2946, 2016; Marjon et al., Cell Rep, 15 (3): 574-58, 2016; Mavrakis et al., Science, 351 (6278): 1208-13, 2016）。VPS4A-VPS4Bのパラログ依存性関係は、機能的特徴付けまたは機構的研究なしにスクリーニングデータにおいて以前に報告されており（McDonald, E.R., 3rd et al. Cell 170, 577-592 e510 (2017); Viswanathan et al. Nat Genet, 50 (7): 937-943, 2018）、最近の相補的研究により、結腸がんのマウス異種移植モデルにおけるVPS4A-VPS4Bの合成致死性相互作用が実証された（Szymanska et al., EMBO Mol Med e10812 (2020)）。

【０２１８】

ESCRT機構は逆方向の膜巻き込みを媒介し、巻き込んでいる膜の首部分の細胞質側に複合体を形成する（図1G）。VPS4A/B ATPアーゼは六量体複合体として機能してESCRT-IIIフィラメントの動態を調節し、ESCRT媒介性の膜分裂および密封を引き起こして、多数の細胞過程を支援すると考えられている（Vietri et al. Nature Review Molecular Cell Biology, 21:25-42, 2020）（図4A）。VPS4A抑制に応答して、VPS4Bのゲノム喪失を有するがん細胞は、G2/Mで停止し、CHMP4B ESCRT-IIIフィラメントを蓄積し、細胞質分裂欠陥、核変形および微小核形成を示し、最終的にはアポトーシスをもたらす。抗がん治療の開発以外に、VPS4抑制はまた、有糸分裂紡錘体形成の欠陥、エンドサイトーシスおよび小胞輸送の破壊、オートファゴソームの成熟障害、受容体チロシンキナーゼの細胞表面蓄積の増加、細胞膜修復の欠陥、さらにはDNA損傷を引き起こすことが示されている（Bishop and Woodman. Mol. Biol. Of the Cell, 11 (1): 227-239, 2000; Lin et al. Molecular and Cellular Bio, 32 (6): 1124-1138, 2012; Mierzwa et al. Nat Cell Biol., 19 (7): 787-798, 2017; Morita et al. Cancer Research, 70 (1): 257-265, 2010; Scheffer et al. Nat Commun, 5:5646, 2014; Szymanska et al., EMBO Mol Med e10812 (2020); Takahashi et al. Nature Communications, 9:1249, 2018; Vietri et al. Nature, 2015, Jun 11; 522 (7555): 231-5, 2015; Zheng et al. Oncogene, 31 (43): 4630-8, 2012）。本明細書に提示される結果と合わせると、これらの報告は、VPS4消失が、多大な抗がん活性に寄与し得る多数の細胞過程に影響を及ぼすことを示している。それに加えて、VPS4AおよびVPS4Bの複合的枯渇は、結腸直腸HCT-116がん細胞においてNF-κBシグナル伝達によって媒介される炎症性シグナル伝達の細胞自律的活性化および免疫調節性サイトカインの発現を引き起こし、免疫原性細胞死およびインビトロでのM1マクロファージの潜在的活性化をもたらすことが示された（Szymanska et al., 2020）。

【０２１９】

CHMP4Bは、多量体フィラメント構造を形成するために核形成および活性化を必要とする主要なフィラメント形成ESCRT-IIIタンパク質である（Christ et al. Trends in biochemical sciences, 43 (1): 42-56, 2017）。ゲノム規模のスクリーニングデータにおいて、CHMP4B依存性とVPS4B喪失との間に逆相関が観察され（図1H～1J）、VPS4B欠損細胞がCHMP4Bの蓄積から低下した適応性を有すること、およびCHMP4Bの枯渇がこれらの細胞の増殖を補助することを示す。この仮説と一致して、VPS4A依存性の修飾因子を同定するためのCRISPR-SpCas9スクリーニングにより、CHMP4Bのノックアウトが、VPS4B欠損細胞におけるVPS4A抑制に対する抵抗性を付与することが明らかにされた。さらに、多重線形モデルにおけるVPS4BmRNA発現または遺伝子コピ

ー数とのCHMP4BmRNA発現レベルの統合は、VPS4A依存性の有意に改善された予測をもたらした。まとめると、これらのデータは、CHMP4Bのレベルが増加したがん細胞は生存性を維持するためにVPS4活性をより強く必要とし、VPS4抑制が、1つには過剰なCHMP4B蓄積に起因して細胞死を誘導するというパラダイムを支持する。このパラダイムはまた、部分的なVPS4BまたはVPS4Aのコピー喪失を有する細胞株のサブセットが、相反性パラログに対する強い依存性を示さない理由を説明するのに役立ち得る。

【０２２０】

VPS4A抑制に対するがん細胞感受性はまた、ULK3キナーゼならびにESCRT-IIIタンパク質CHMP1AおよびCHMP1Bをコードする遺伝子を含む、脱離チェックポイントの調節因子の破壊によって強力に増強された。脱離チェックポイントは、DNA損傷および異数性を回避するために染色体の誤分離に応答して脱離を遅延させるためにAuroraBキナーゼ（AURKB）およびESCRT-IIIサブユニットに依存するゲノム保護機構である。ULK3は、AURKBによって調節され、CHMP1A、CHMP1B、CHMP2A、およびIST1を含むESCRT-IIIタンパク質に結合してリン酸化し、ESCRT-III重合およびVPS4活性の阻害をもたらす。その結果、ULK3、CHMP1A、またはCHMP1Bのノックアウトは、脱離チェックポイントをさらに破壊し、VPS4A抑制単独で観察されるものを超えて細胞質分裂のさらなる障害をもたらすと予想される。さらに、CHMP1AおよびCHMP1Bは、VPS4タンパク質に対して最も強い親和性を有する調節性ESCRT-IIIタンパク質であるので、これらの遺伝子のノックアウトはまた、残存するVPS4タンパク質のESCRT-IIIフィラメントへの動員を損なって、CHMP4Bまたは他のESCRT-IIIフィラメントの過剰な蓄積をさらに増強し、ESCRT媒介性細胞過程のさらなる破壊に寄与し得る。したがって、ESCRT機構の重要な構成要素は、がん細胞の生存を調節し、特異的に、VPS4A抑制に対する感受性および抵抗性を調節する。これらの知見は、ESCRT経路の阻害および脱離チェックポイントの遮断が、VPS4A抑制に対するがん細胞の感受性をさらに高める戦略を提供し得ることを示している。

【０２２１】

統合したトランスクリプトームおよびプロテオーム解析はまた、ベースラインインターフェロン応答遺伝子発現とVPS4A依存性との間の強い相関を特定した。特に、ユビキチン様タンパク質であるインターフェロン活性化遺伝子15（ISG15）は、VPS4酵素が出芽ウイルス粒子の部位でESCRT-IIIフィラメントと相互作用するのを妨げることによってウイルス放出を阻止するために、ウイルス感染時のインターフェロン応答によって上方制御されることが報告されている（Kuang et al. J Virology, 85 (14): 7153-7161, 2011; Pincetic et al. J Virol, 84 (9): 4725-36, 2010）。さらに、細胞のインターフェロン応答はまた、ウイルス成熟をさらに停止させるためにVPS4発現を下方制御することも示されている（Cabrera et al. mBio, 10 (2): e02567-18, 2019）。VPS4A依存性を予測するための本明細書に記載されている多重線形モデルに含められると、インターフェロン応答遺伝子ISG15および免疫関連E3ユビキチン-タンパク質リガーゼITCHは、単独でのまたは組み合わせたVPS4BまたはCHMP4Bの発現を上回ってモデルの予測力を改善した。さらに、VPS4A依存性細胞株のインターフェロン処理は、VPS4Aノックダウンに対する感受性を高めた。したがって、これらのデータは、総合すると、ベースラインインターフェロン応答シグナル伝達がVPS4A依存性を強力に調節することを示す。VPS4A＋VPS4B枯渇が結腸直腸がん細胞において免疫原性細胞死をもたらすという観察と組み合わせると、本明細書に記載されている結果は、VPS4枯渇の状況における炎症性シグナル伝達の調節が、将来検討するための潜在的な組み合わせ治療戦略を形成することを示している。

【０２２２】

染色体18q21.33上のSMAD4腫瘍抑制因子はヒトがんのおよそ33％において失われており、膵臓癌（68％）、結腸直腸がん（71％）および腎細胞癌（17％）において特に高い喪失率が認められる（Zack, T.I. et al. Nat Genet 45, 1134-1140 (2013)）。SMAD4へのその近接性を考慮すると、VPS4BはしばしばSMAD4と同時に欠失さ

れ、それにより、18qの喪失を有する細胞のVPS4A抑制に対する感受性を増強する。逆に、VPS4AはCDH1に隣接しており、VPS4Bが一般に欠失していないがん系統を含む他の腫瘍型においても失われ、したがってそれらの腫瘍細胞のVPS4B枯渇に対する感受性を増強する。興味深いことに、SMAD4およびCDH1が時折完全に失われるにもかかわらず、VPS4AまたはVPS4Bのいずれかの完全なゲノム喪失はほとんど観察されなかった。全体として、がんの1/3超が、VPS4AまたはVPS4Bの部分的なコピー喪失を有し、VPS4AまたはVPS4Bの喪失を示す多様な範囲の腫瘍が、関連するパラログの枯渇または阻害に対して感受性であろう。

【0223】

最後に、変異体レスキュー実験は、VPS4Bの部分的なコピー喪失を伴う細胞の生存を媒介することにおけるVPS4Aの機能にとってATPアーゼドメインが極めて重要であることを示した。VPS4AおよびBは80.5%の相同性を示すが、VPS4B喪失を有する細胞においてVPS4Aをまたは VPS4A喪失を有する細胞においてVPS4Bを異なって標的とする小分子の開発は、ATP結合ポケット付近の小さな構造的差異のため、扱いやすい可能性がなお存在する。さらに、正常細胞と比較した腫瘍中での遺伝子量の変化および総VPS4A/Bレベルの差から生じる潜在的な治療域を考慮すれば、VPS4AおよびVPS4Bの複合阻害も有効であり、臨床的に許容され得ることが明らかとなり得る。現在のところ、特異的なVPS4A/B阻害剤は開発されていないが、AAA ATPアーゼの非特異的阻害剤は、VPS4タンパク質を結合することが報告されている（Pohler et al. Angew Chem Int Ed Engl, 57 (6): 1576-1580, 2018; Zhang et al. Mycopathologia, 181（5-6）:329-39, 2016）。例えば、本明細書中に記載されている知見は、VPS4AおよびVPS4Bの機能的冗長性を支持するが、ESCRT機構によって調節される細胞過程の幅広い範囲を考えると、各パラログタンパク質の異なる機能も存在し得る。さらに、インビトロ実験または酵母細胞（通常は単一のVPS4タンパク質のみを発現する）を用いた様々な研究により、VPS4AとVPS4Bが相互作用し得ることが実証されている（Huttlin et al. Cell, 162 (2): 425-440, 2015; Scheuring, S. et al. J Mol Biol 312, 469-480 (2001)）。生存しているヒト（がん）細胞において、VPS4AおよびVPS4Bがどの程度協働し、機能的なホモマー複合体対ヘテロマー複合体を形成するかは、完全には解明されていない。しかしながら、中立または喪失のいずれかのVPS4Bコピー数を有する種々のがん細胞株（RD、SMSCTR、YAPC、SNU213）におけるVPS4Aとの免疫沈降、ならびに中立のVPS4Bコピー数を有する横紋筋肉腫（RD）および膵臓（YAPC）細胞株における免疫ブロットは、VPS4AとVPS4Bとの間には弱い相互作用が存在すること、ならびにVPS4AおよびVPS4Bの大部分がヘテロマー状態にはないことを示唆している（図13A）。VPS4Bに対するグリセロール勾配分画および免疫ブロットは、VPS4AおよびVPS4Bが主に低分子量プール中に存在することを示唆した（図13B）。DNA（DAPI）、VPS4A（Alexa Fluor 488）およびVPS4B（Alexa Fluor 568）の膵臓癌（SNU213）細胞株（$VPS4B^{喪失}$）における共焦点蛍光可視化によって明らかになったように、VPS4AおよびVPS4Bは、細胞においてほとんど共局在化しないことが見出された。これらの3つの可視化の重ね合わせは、VPS4AおよびVPS4Bが主に細胞質に局在化し、著しく重なり合わないことを実証した。これは、VPS4AおよびVPS4Bが、ヘテロマー複合体よりもホモマー複合体に対してより高い親和性を有する可能性が高いことを示している（図13C）。

【0224】

組換え生産によってVPS4AおよびVPS4Bの活性オリゴマーを得て、インビトロアッセイを用いてATPアーゼ活性を測定した。VPS4活性が検出され、VPS4B-Hcp1タグ付き構築物の進行曲線（図14A）によって実証されたように、VPS4Bについて時間依存性かつ濃度依存性であることが確認された。VPS4A-Hcp1、VPS4A-FLおよびVPS4B-FLを含む他のVPS4構築物のATPアーゼ活性は、同様に濃度依存性を示した（図14B）。Hcp1（His6タグとしても公知である）およびFL（FLAGタグとしても公知である）を使用した。VPS4AおよびVPS4Bタグ化構築物に対して計算された予備代謝回転数は、VPS4

A-Hcp1構築物とVPS4B-Hcp1構築物との間で600倍を超える変化を示し、VPSrA-FLとVPS4B-FLとの間では1倍を超える変化を示した（表1）。データは、六量体タンパク質が最も高い比活性を示したことを実証する。

【０２２５】

（表１）VPS4AおよびVPS4B構築物について計算された予備代謝回転数。

	VPS4A-Hcp1	VPS4B-Hcp1	VPS4A-FL	VPS4B-FL
代謝回転 (sec^{-1})	53	33280	10	21

【０２２６】

ゲノムバイオマーカーの普及および本明細書で実証された強力な合成致死関係を考えると、VPS4タンパク質の小分子阻害剤の開発は、がんの治療における重要な進歩を証明し得る。

【０２２７】

方法および材料

上記の本明細書に報告された結果は、以下の材料および方法を使用して得られた。

【０２２８】

腫瘍抑制因子のゲノム喪失との合成致死性相互作用の発見

確立されたTSGの体細胞CNAとの合成致死性相互作用を発見するために、Broad's Institute Cancer Dependency Map Public 19Q3リリース（depmap.org）内の600を超える十分に注釈付けされたがん細胞株からの細胞増殖に対する効果についての、プールされた、ゲノム規模のRNA干渉（RNAi）およびCRISPR-SpCas9機能喪失スクリーニングからデータを分析し、統合した（McFarland, J.M. et al. Nat Commun 9, 4610 (2018); Meyers, R.M. et al. Nature genetics 49, 1779-1784 (2017); Tsherniak, A. et al. Cell 170, 564-576 e516 (2017)）。分析は、50の一般的なTSGに限定され（表5）、これらの腫瘍抑制因子のそれぞれについてのlog2正規化コピー数のコールについて、正規化された遺伝子レベルのCRISPR（622の細胞株、18,333の遺伝子）およびRNAi（669の細胞株、16,905の遺伝子）依存性スコアとの相関分析を行った。これらの相関は、内蔵されたcor.test関数を使用して、統計的計算およびグラフィックスのための言語および環境であるRで実行された。腫瘍抑制遺伝子および依存性遺伝子の各対について、ピアソン相関をそのp値とともに計算した。R中のp.adjust関数を使用して、10％の偽陽性率（FDR、ベンジャミーニ・ホッホベルク）を適用した。遺伝子染色体の位置情報は、Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematologyから入手した（2019年6月にダウンロード）。依存性遺伝子の染色体アームレベルの位置が、相関する腫瘍抑制遺伝子のアームレベルの位置と同じである場合、この相互作用はシス相互作用として分類された。依存性遺伝子を収容する染色体アームが腫瘍抑制遺伝子の位置と異なる場合、その相互作用はトランス相互作用として分類された。合成致死性相互作用分析のために、腫瘍抑制遺伝子のコピー喪失と正の相関を示すトランス依存性遺伝子のみを組み入れた。次いで、有意な合成致死性相互作用をRNAiデータセットとCRISPRデータセットとの間で相互参照して、信頼性の高い合成致死性相互作用のリストを得た（表4）。GraphPad Prism v8.3.0を用いて、最終結果を可視化した。

【０２２９】

コード、データおよび材料の入手可能性

すべてのコードは、公開リポジトリ上で入手可能であり、要求に応じて入手できる。Public 19Q3 Broad InstituteのCancer Dependency MapおよびCancer Cell Li

ne Encyclopediaデータセット（depmap.org）もfigshare:doi.org/10.6084/m9.figshare.9201770.v3; doi.org/10.6084/m9.figshare.9170975.v1で入手可能である。

【０２３０】

がん患者試料コピー数データの分析

TCGA PanCanコホートからのコピー数分析

gdc.cancer.gov/about-data/publications/pancan-aneuploidyでNIH Genomic Data Commonsから、10,712のTCGA患者試料（Sanchez-Vega et al. Cell, 173 (2): 321-337, 2018; Taylor et al. Cancer Cell, 33 (4): 676-689, 2018）からのコピー数データをダウンロードした。GISTIC閾値処理されたコピー数コール（Mermel et al. Genome Biol., 12 (4): R41, 2011）を使用して、VPS4Bのコピー数ステータスを決定した。「－1」または「－2」のコピー数値を有する試料は、それぞれ少なくとも部分的なコピー喪失またはより深い欠失を有すると呼ばれた。

【０２３１】

RMS患者試料データからのVPS4Bコピー数分析

（Chen et al., Cancer Cell 24 (6): 710-724, 2013）によって公開されたRMS患者試料から、Illumina全エクソームおよび全ゲノムペアードエンド配列をダウンロードした。相対コピー数値を得るためにGATK4を使用してコピー数を呼び出し（DePristo et al. Nat. Genet, 43 (5): 491-498, 2011; Van der Auwera et al. Curr Protoc Bioinformatics, 43 (1110): 11.10.1-11.10.33, 2013）、擬似カウント1を用いてこれをlog2変換した。彼らの研究では、各患者からの複数の試料が、原発性、転移性または患者由来の異種移植片から可能であった。それらの事例については、VPS4Bコピー数コールは高度に一致していたので、二重カウントを防ぐために追加の試料を除去した。

【０２３２】

OncoPanelを使用したDana-Farber Cancer Institute（DFCI）プロファイルプロジェクトからのコピー数分析

DFCIの独立審査委員会による承認に従って、OncoPanelターゲットシーケンス解析アッセイ（Garcia et al. Archives of Pathology and Laboratory Medicine, 141 (6): 751-758, 2017; Sholl et al. JCI Insight, 1 (19): e87062, 2016）を使用して、すべての小児、成人膵臓、成人卵巣、および成人肉腫患者試料のDFCIのデータベースを分析した。公知の/注釈付き原発性腫瘍型および20％を超える組織学的腫瘍純度を有する試料を選択した。VPS4BはOncoPanelに包含されていないが、隣接遺伝子のコピー数状態を代用物として使用できるかどうかを調べた。まず、両遺伝子のコピー数状態が公知の場合に、VPS4Bの同時欠失を予測するために、18番染色体上の240の遺伝子について陽性的中率と陰性的中率を評価するため、TCGA PanCancerAtlasコピー数コール（cBioPortal（Cerami et al. Cancer Discov, 2 (5): 401-404, 2012; Gao et al. Sci. Signal, 6 (269): pl1-pl1, 2013）中の10,967の試料を使用した。特に、その試料中のVPS4Bコピーコールもまた「浅い欠失」であるかどうかを推測するために、所与の遺伝子の「浅い欠失」コピーコールを使用した。Oncopanelに包含されている18番染色体遺伝子のうち、BCL2の浅い欠失が、VPS4Bの浅い欠失の最良の予測因子であり、99.7％の陽性的中率および99.9％の陰性的中率であった（図2.2Eを参照）。次に、DFCI PROFILEにわたってBCL2/VPS4Bの推定の浅い欠失の頻度を計算した。

【０２３３】

細胞培養

すべての細胞株は、確認された供給元からのものであり、Broad InstituteのDependency Mapプロジェクト細胞バンクを通じて調達された。親細胞株は、Cancer Cell Line Encyclopediaから入手し、SpCas9発現細胞株は、Broad InstituteのGenetic Perturbation Platformから入手した。すべての細胞株は、元は、American Type

Culture Collection（ATCC）、Korean Cell Line Bank（KCLB）、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen（DSMZ）および日本の理研細胞株バンクを含む認可された細胞株バンクから得られた。示されている場合には追加の補充物質を有する10％ウシ胎児血清を含むRPMI-1640中ですべての細胞を培養した。最初に細胞を解凍し、それらの天然培地中で拡大増殖させたが、それらの天然培地がRPMIでない場合には、すべての実験のために、細胞をRPMI中で適合させ維持した。STRプロファイリングによって細胞株を検証し、マイコプラズマについて日常的に試験した。

【０２３４】

検証実験のための細胞株の作製

SpCas9ヌクレアーゼを安定に発現するがん細胞株へのsgRNAのレンチウイルス形質導入を用いて、CRISPR-SpCas9およびshRNA検証実験を行った。レンチウイルス形質導入を使用して、SpCas9または誘導性RNAiシステムを発現する安定な細胞株を作製した。パッケージング（psPAX2）およびVSV-Gエンベローププラスミド（pMD2.G）を用いたHEK293T細胞への同時形質移入によって、SpCas9、shRNAおよびsgRNAのためのレンチウイルス粒子を作製した。

【０２３５】

CellTiter-gloを用いたCRISPRベースの細胞生存アッセイ

全体的なアッセイ設計および細胞株の最適化

図2Aについては、96ウェルプレート中で、安定に発現するSpCas9細胞株を用いてCellTiter-Glo生存アッセイを行った。細胞を播種し、0日目にウェル中で、sgRNAを発現するレンチウイルスに感染させ、24時間後にピューロマイシンで選択した。プレーティングおよび感染の7日後に細胞力価-Glo生存率を読み取った。CellTiter-Glo生存アッセイの前に、細胞播種密度および感染のために使用されるウイルス量の両方を滴定するなど、すべての細胞株をアッセイに対して個別に最適化した。下記の各sgRNAのすべてのレンチウイルス調製物をバッチ制御し、低、中および高形質導入効率を有する細胞株を代表する3つの異なる細胞株に対して滴定した。次いで、CRISPRを使用したその後のすべての生存アッセイに対して、最適な細胞播種密度および感染のためのウイルス量を使用した。

【０２３６】

sgRNAの設計および理論的根拠

生存アッセイのために、3つの陰性対照ガイド（sgLacZ、sgChr2およびsgAAVS1）、汎必須遺伝子を標的とする3つの陽性対照ガイド（sgPOLR2D、sgSF3B1およびsgKIF11）、およびVPS4Aを標的とする3つのガイド（sgVPS4A-1、sgVPS4A-2およびsgVPS4A-3）を使用した。陰性対照ガイドについては、DNA二本鎖切断の影響を考慮に入れるために、CRISPR-SpCas9がヒトゲノムの安全な領域を切断することを可能にする2つの「切断対照」ガイドを設計した。sgChr2の場合、sgRNAは、同じくがん全体で最小のコピー数が変化した染色体である第2染色体上の遺伝子砂漠を標的とした（Beroukhim et al. Nature, 463 (7283): 899-905, 2010）。sgAAVS1の場合、sgRNAは、PPP1R12C中のイントロン領域であるセーフハーバーAAVS1組み込み遺伝子座を標的とする。sgLacZは、ヒトゲノムには見られない非標的配列に相当する。各sgRNAの20bpのターゲティング配列は以下の通りであった:

sgLacZ: 5’-AACGGCGGATTGACCGTAAT

sgChr2: 5'-GGTGTGCGTATGAAGCAGTG

sgAAVS1: 5'-AGGGAGACATCCGTCGGAGA

sgPOLR2D: 5'-AGAGACTGCTGAGGAGTCCA

sgSF3B1: 5'-AAGGGTATCCGCCAACACAG

sgKIF11: 5'-CAGTATAGACACCACAGTTG

sgVPS4A-1: 5’-ACTCACACTTGATAGCGTGG

sgVPS4A-2: 5’-GGGCCGCACGAAGTACCTGG

（イントロン/エクソン接合部、ORFレスキューにおいても使用される）

sgVPS4A-3: 5’-ATTGTTATTCCCCACCCCTG

（イントロン/エクソン接合部、ORFレスキューにおいても使用される）

【０２３７】

生存アッセイデータの品質管理

各アッセイは、特定の品質管理基準を満たすことが必要であった。上記9つのガイドのそれぞれに加えて感染なし対照に対して1つずつ、10個の固有の条件が存在した。sgRNA感染あたり6つの複製ウェルが存在し、3つはピューロマイシンで選択され、3つは選択されなかった。CellTiter-Gloからの生の発光の品質管理のために、感染効率（各sgRNAについてpuro選択あり/puro選択なし）は少なくとも80％である必要があり、すべての複製ウェルはそのsgRNA感染に関して平均の2標準偏差以内でなければならなかった。DNA二本鎖切断に対応する切断対照からの生存率低下は、非標的sgLacZの30％以下であるべきであった。各細胞株からのSpCas9活性はまた、陰性対照（sgLacZ、sgChr2およびsgAAVS1）に対する、3つの汎必須遺伝子（sgPOLR2D、sgSF3B1およびsgKIF11）の平均のパーセント生存率低下によって決定された、50％を超える必要があった。

【０２３８】

データの正規化

DepMap依存性スコアと同様に、生存データの正規化およびスケール変更を行った（CRISPRについてはCERES（Meyers, R.M. et al. Nature genetics 49, 1779-1784 (2017)、RNAiについてはDEMETER2（McFarland, J.M. et al. Nat Commun 9, 4610 (2018)）。生存スコアは、0（陰性sgRNA切断対照の平均効果）から－1（3つの異なる汎必須遺伝子からのノックアウトの平均効果）までのスケールで正規化した。2つの切断対照sgRNA（sgChr2およびsgAAVS1）の平均に対する各ウェルの距離を最初に計算した。

切断対照で正規化された値 ＝ 個々のウェル値 － （平均（切断対照ウェル））

次いで、これらの値を、各アッセイウェルについて0から－1にスケール調整した。0は、切断対照の平均生存効果を表し、－1は、アッセイにおいて実行される3つの汎必須遺伝子の平均生存効果ノックアウトを表す。

$$\text{スケール調整された生存率:} = \frac{\text{切断対照で正規化されたウェル値}}{\text{平均（切断対照で正規化されたウェル）} - \text{平均（汎必須対照で正規化されたウェル）}}$$

【０２３９】

細胞生存効果をこのようにスケール調整することにより、CRISPRの「オフターゲット」効果、例えばDNA二本鎖切断に対して異なる応答を有する細胞株、および細胞株が汎必須遺伝子消失によって死滅される細胞の最大数に差を示す場合に異なるCas9活性を有する細胞株全体にわたって比較することが可能になる。

【０２４０】
ドキシサイクリンによって誘導されるRNAi試薬の作製
プロジェクトDRIVE（McDonald, E.R., 3rd et al. Cell 170, 577-592 e510 (2017)）からVPS4A shRNA配列を選択し、ドキシサイクリン誘導性shRNA発現のために、pRSITEP-U6Tet-（shRNA）-EF1-TetRep-2A-Puroベクター（Cellecta＃SVSHU6TEP-L）にクローニングした。各オンターゲットshRNAに対して、陰性対照shRNAシード配列を生成した。シード配列は、オンターゲットノックダウンを除去するが、同じシード配列（bp位置2～8）およびオフターゲット効果を保持することを意図した変異をshRNAの塩基対位置9～11中に含有する（Buehler et al. PLoS One, 7 (12): e51942, 2012）。shRNA標的配列を以下に提供する。
shVPS4A-1: 5'-GCAAGAAGCCAGTCAAAGAGA
shSeed-1: 5'-GCAAGAAGCCTCACAAAGAGA
shVPS4A-2: 5'-CGAGAAGCTGAAGGATTATTT
shSeed-2: 5'-CGAGAAGCTGTTCGATTATTT
shVPS4A-3: 5'-GCCGAGAAGCTGAAGGATTAT
shSeed-3: 5'-GCCGAGAAGCACTAGGATTAT

【０２４１】
CellTiter-gloを用いたRNAiベースの細胞生存アッセイ
図2Bでは、ドキシサイクリン誘導性shVPS4A-2または配列をマッチさせたshSeed-2対照を安定に発現する細胞株を、1uMドキシサイクリンの存在下または非存在下で96ウェルプレートに播種した。細胞を7日間培養し、次いで、CellTiter-Gloを用いて細胞数についてアッセイした。各細胞株について、ドキシサイクリン条件の発光値をドキシサイクリン処理なしで割ることによって、相対細胞生存率を計算した。
【０２４２】
SMSCTRを用いた皮下異種移植研究
動物研究は、Dana Farber Cancer InstituteのIACUCによって承認されたプロトコル（DFCI 16-015）に従って行った。CRISPR-SpCas9エンドヌクレアーゼおよびshVPS4A-2またはshSeed2テトラサイクリン誘導性RNAiシステムにより安定に形質導入された横紋筋肉腫SMSCTR細胞を、10％FBSおよび300μg/mLハイグロマイシンを含むRPMI-1640中で対数期増殖に維持した。これらの細胞はマイコプラズマを含まないことが確認され、雌CIEA NOGマウス（NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/JicTac）（Taconic labs）への皮下注射のために準備した。マトリゲルを含まない100μLのPBS中に再懸濁された$8e^6$細胞を合計38匹のマウスの脇腹に一回注射した。剪毛後および注射の3～5週間後に、カリパス測定によって少なくとも隔週で腫瘍サイズをモニタリングし、腫瘍が約300mm^3に達したら、ドキシサイクリン含有食餌（625ppm）または対照食餌にマウスを無作為に割り当てた。腫瘍が2000mm^3超に達したら、マウスを殺し、腫瘍を採取し、－80℃で保存した。VPS4Aのオンターゲットノックダウンを評価するために、各処置群についてならびにshSeed2およびshVPS4A-2腫瘍の両方について1匹のマウスを選択し（合計4匹のマウス）、処置無作為化の7日後に　殺した。初期時点の腫瘍を採取し、秤量し、Precellys（登録商標）Evolutionビーズミルホモジナイゼーションに連結された2mL微量遠心管を7500rpmで3×30秒間使用して、体積RIPA溶解緩衝液中に15×腫瘍重量で溶解した。ホモジナイゼーション後、管を4℃で遠心沈殿させ、溶解上清を収集し、免疫ブロッティングまで－20℃で保存した。マウスあたり2つの側腹部腫瘍を有する8匹のNRGマウス（NOD.Cg-Rag1tm1Mom Il2rgtm1Wjl/SzJ、007799; The Jackson Laboratory）のコホートを使用してこの実験を再び繰り返し、同様の結果を達成した。
【０２４３】

タンパク質の免疫ベースの検出

Odyssey CLx Imager（LI-COR Biosciences）でLI-COR蛍光二次抗体を使用して画像化された標準的な湿式転写プロトコルまたはWesシステム（Protein Simple）でHRPコンジュゲート化二次抗体によって生成された化学発光シグナルの自動化されたキャピラリーベースの検出のいずれかに従って、RIPA生成された可溶化液に対して免疫ブロットを行った。

【０２４４】

ウェスタンブロッティング

cOmplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets（Roche）を補充した冷RIPA緩衝液（１５０ｍＭNaCl、1.0％IGEPAL（登録商標）CA-６３０、0.5％デオキシコール酸ナトリウム、0.1％SDS、５０ｍＭTris、pH8.0）中に全細胞タンパク質可溶化液を収集した。4℃の卓上遠心分離機中で、最大速度で回転させることによって、細胞抽出物を清澄化した。BCA Protein Assay Kit（Pierce）を使用してタンパク質濃度を定量し、等しい濃度に希釈した。NuPAGE（商標）４～１２％Bis-Tris Protein Gels上で可溶化液を走行させ、PVDF膜に転写した。Odyssey CLx Imagerを使用してタンパク質を検出するために、Licor蛍光二次抗体を使用した。ウェスタンブロッティングで使用した抗体を表2に列挙する。

【０２４５】

Protein Simpleキャピラリーベースの検出

プロテイナーゼ阻害剤を補充した冷RIPA緩衝液を使用して同様に細胞可溶化液を調製した。BCA Protein Assay Kit（Pierce）を使用して、タンパク質濃度を決定した。次いで、試料を0.１２５mg/mLの総タンパク質に希釈し、ProteinSimple Wes Systemの説明書に従って調製した。簡潔には、１％SDSおよび４０ｍＭDTTを含む試料緩衝液中、９５℃で5分間沸騰させることによって可溶化液を変性させた。次いで、３μLの変性した試料を分離し、Wes System（SM-W004; ProteinSimple）とともに使用される１２～２３０kDa 25-キャピラリー分離モジュールについて標準的な設定および体積を使用して、西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートさせた抗マウスおよび抗ウサギ二次抗体によって生成された化学発光を使用して検出した。ProteinSimple Wes Systemで使用される抗体を表2に列挙する。

【０２４６】

（表２）ウェスタンブロッティングおよびProteinSimple Wes Systemに対して使用された抗体

標的	種	クローナリティ	ウェスタン希釈度	Protein Simple 希釈度	供給業者	カタログ番号
VPS4A	マウス	モノクローナル	1:500	1:20	Santa Cruz Biotechnology	sc-133122
VPS4B	ウサギ	モノクローナル	1:1000	1:33	Abcam	ab137027
V5	ウサギ	モノクローナル	1:1000	1:50	Cell Signaling Technology	13202S
GAPDH	ウサギ	モノクローナル	1:1000	-	Cell Signaling Technology	2118
ビンキュリン	ウサギ	モノクローナル	-	1:75	Abcam	ab129002
抗マウス IRDye 680LT	ヤギ	NA	1:10000	-	LI-COR Biosciences	926-68020
抗ウサギ IRDye 800CW	ヤギ	NA	1:10000	-	LI-COR Biosciences	926-32211
抗マウス HRP	ヤギ	NA	-	希釈なし	ProteinSimple	DM-002
抗ウサギ HRP	ヤギ	NA	-	希釈なし	ProteinSimple	DM-001

【０２４７】

カスパーゼ3/7蛍光レポーター色素によるIncucyteベースのアポトーシス

細胞播種

上記のCRISPR Cell-Titer Glo生存アッセイと同じように、安定なSpCas9発現細胞を播種し、感染させた。10％ウシ胎仔血清および1×ペニシリン-ストレプトマイシン-グルタミンを補充したEMEM培地を含む透明底96ウェルプレート中に、sgRNAあたり6つの複製ウェルを播種した。標準的なRPMI-1640は、Incucyteアッセイにおいてカスパーゼ3/7シグナルとともに蛍光バックグラウンドを生成し得るリボフラビンを含有するので、使用しなかった。細胞播種と同じ日に、細胞にsgRNA発現ベクターを感染させた。

【０２４８】

抗生物質選択およびカスパーゼ色素処理:

プレーティングの24時間後に、6つの反復実験のうちの3つに1μg/mLのピューロマイシンを含む新鮮な培地を与え、6つの反復実験物のうちの3つにピューロマイシンを含まない新鮮な培地を与えた。すべての培地条件は、5μMのIncuCyte Caspase-3/7 Green Apoptosis Assay Reagent（カタログ番号:4440）を含有した。アポトーシス試薬の光感受性の性質のために、培地選択は暗所で行った。

【０２４９】

選択後、画像化のためにプレートをIncuCyte（登録商標）S3 Live-Cell Analysis System（カタログ番号:4647）中に移した。位相コントラスト画像および緑色蛍光チャネル画像は、合計46の時点について2時間ごとに10倍の対物倍率を使用して捕捉された

。各ウェルについて、位相コントラストおよび緑色チャネルデータの両方を含有する4つの画像を得た。

【０２５０】

Incucyteデータ分析:

IncuCyte（登録商標）S3 Analysis Systemソフトウェアを使用して、μm^2/ウェルでの緑色（アポトーシス陽性）物体の総面積とともに、経時的な細胞密集度を定量した。時点および密集度レベルにわたって画像の試料セットに対して訓練された、密集度および緑色の領域に対するコンピュータ生成されたマスクを正確性について手作業でチェックした。次いで、訓練画像セットによって生成されたルールセットをすべての画像およびすべての時点に適用した。

【０２５１】

各メトリックをウェルあたり4つの四分円にわたって平均した。まず、各ウェルの緑色物体面積メトリックを各ウェルの密集度メトリックで除算し、アポトーシスについて陽性のパーセント視野を定量化した。その後、擾乱されていない細胞増殖を表す、ウェル平均時間を合わせた非感染対照、非ピューロマイシン条件に対して、各時点での各ウェルのこれらの値を正規化した。それぞれが96ウェルアッセイプレートの単一ウェルを表す、条件当たり3つの得られた値を使用して、標準誤差を計算し、プロットした。

$$\text{正規化されたシグナル}_{W,T} = \frac{(G_{W,T} - P_{W,T})}{(G_{N,T} / P_{N,T})}$$

W＝ウェル

T＝時点

G＝緑色物体総面積

P＝位相コントラスト密集度

N＝非感染対照ウェル平均

【０２５２】

フローサイトメトリーによるEduおよびDAPI染色をベースとする細胞周期分析

SpCas9細胞を安定に発現する細胞株を6ウェルプレートに播種し、sgRNA発現ベクターに感染させた。感染の24時間後にピューロマイシンで細胞を選択した。感染の4日後、EdUで細胞を1～3時間標識し、Click-iT（商標）Plus EdU Flow Cytometry Assay Kit（ThermoFisher、カタログ番号:C10632）で染色した。DAPIで細胞を共染色し、次いでフローサイトメトリーによって分析し、FlowJo v10で分析した。

【０２５３】

長期コロニー形成アッセイ

ドキシサイクリン誘導性shVPS4Aまたはシードを合わせた対照RNAi試薬を安定に発現する細胞株を、1μMドキシサイクリンありまたはなしで、3つ組で24ウェルプレートに播種した。3つの異なるプレーティング密度（18,000、9,000、または4,500細胞/ウェル）を使用して、最適なプレーティング密度を決定した。プレーティングの14日後に密集状態に達した陰性対照ウェルを生成したプレーティング密度として、最適な密度を有するプレートを選択した。染色のために、24ウェルプレートを10％緩衝ホルマリンで15分間固定し、脱イオン水で洗浄し、0.1％クリスタルバイオレットで20分間染色し、再び脱イオン水で洗浄した。定量のために、1mLの10％酢酸を用いてクリスタルバイオレット色素を20分間抽出し、水で4倍に希釈し、50μLを96ウェルプレートに3つ組で播種した。吸光度を590nmで定量した。

【０２５４】

アネキシンVフローサイトメトリーによるアポトーシス誘導

Cas9安定細胞株を播種し、6ウェルプレート中で表記されたsgRNAに感染させた（1ウェルあたり2e^5～5e^{5}細胞の細胞プレーティング範囲）。プレーティングおよび感染の24時間後にピューロマイシンを用いて細胞を選択し、感染の5日後にフローサイトメト

リーによってアッセイした。アポトーシス誘導についての陽性対照として、汎必須遺伝子SF3B1の不活性化を使用した。BD Pharmingen FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit（カタログ番号:556547）を製造者の仕様書に従って使用して細胞を染色し、FloJoバージョン10を用いたフローサイトメトリーによって分析した。

【０２５５】

VPS4Bタンパク質レベルの定量

2つのデータ源を使用して、VPS4Bタンパク質レベルを調べた。CCLEからの375の細胞株（Nusinow et al. Cell 180 (2): 387-402.e16, 2020）のサブセットからの第1のVPS4B定量的プロテオミクス（データは、depmap.orgで入手可能）。

【０２５６】

簡潔には、MS3スキャンからのタンデム質量タグ化（TMT）シグナル対ノイズ値をエクスポートし、それらのMS2ペプチド同一性と対にした。フィルターをかけたTMT値を合計し、10プレックス以内の積載に対して正規化した。正規化されたタンパク質存在量の値をlog2変換し、細胞株当たりの平均タンパク質発現を0で中央に配置した。第2に、VPS4B発光ピークシグナル強度を抽出し、それをすべての総タンパク質ピーク強度の和で割ることによって、細胞株可溶化液からのVPS4Bの、Protein Simpleによる定量を計算した。

【０２５７】

図12Cは、コピー数低下またはコピー数中立を有する細胞におけるVPS4Bタンパク質レベルを定量し、統計学的に有意な差を示す。図12Dは、多数のTCGA Pan-Cancer Atlas試料における相対的なVPS4Bコピー数を実証する。

【０２５８】

同質遺伝子のVPS4B-/-細胞株の作製

SpCas9を安定に発現するVPS4A^{中立}RD細胞に、VPS4Bの第6エクソンを標的とするsgRNA
(sgVPS4B: 5’-CCACTTAGAAACAAGATCAG)

を発現するレンチウイルスを感染させた。単一細胞にわたってのSpCas9の可変的酵素活性のために、感染した細胞を透明底96ウェルプレート中に連続的に希釈し、単一細胞の存在について調べた。単一細胞を含有するウェルを拡大増殖させた。得られたクローン集団のうちの16個をウエスタンブロットによってVPS4Bノックアウトについて調べた。同質遺伝子細胞クローンからのDNA抽出物をサンガー配列決定し、VPS4Bの第6エクソンを標的とするプライマー
(VPS4B-For: 5’-GCCTAATCATGTTTCAGGTACAGA,
VPS4B-Rev: 5’-GGCAAGAGAACACCTTGGAG)

を使用する逆畳み込みのTIDEseq法（tide.deskgen.com/）によってインデルの存在を評価した。ウエスタンブロットによりヌルであり、かつ、TIDEseqにより80％以上のインデルを含有する細胞株をさらなる実験のために選択し、クローン変異の影響を軽減するために4つからなる2つの群にプールした。

【０２５９】

VPS4AおよびVPS4B過剰発現プラスミドおよび細胞株の作製

VPS4Bを含有するpLX313 ORF発現ベクターをBroad Genetic Perturbation Platform（portals.broadinstitute.org/gpp/public/）から調達した。VPS4Bの過剰発現のために、SpCas9を安定に発現するVPS4B^{喪失} JR細胞株をpLX313-VPS4Bレンチウイルス粒子に感染させ、200ug/mLハイグロマイシンで選択した。細胞を拡大増殖させ、ウエスタンブロットによって増加したVPS4B発現について調べた。次いで、「CellTiter-gloを用いたCRISPRベースの細胞生存アッセイ」の方法の節で上述したように、7日間のCell-Titer Glo生存アッセイに細胞を配置した。

【０２６０】

VPS4A ORF発現後のVPS4A部位特異的突然変異誘発および定量化生存率

pDONR223 VPS4AベクターをBroad Genetic Perturbation Platformから調達した。内因性のVPS4A不活性化後にVPS4A依存性細胞株における細胞生存性をレスキューする能力を調べるために、機能を変化させることが報告されているVPS4A中の3つの変異を文献から選択した。$VPS4A^{L64A}$は、MITドメイン折り畳みを破壊することなく、ESCRT-IIIフィラメントCHMP1BのMITドメイン結合を妨げることが報告された（Scott et al. Proc Natl Acad Sci USA, 102 (39): 13813-8, 2005）。$VPS4A^{K173Q}$は、ATP結合を消失させるドミナントネガティブ活性を示した（Stuchell et al. J Biol Chem, 279 (34): 36059-71, 2004）。最後に、ATP加水分解を妨げる$VPS4A^{E228Q}$変異体を操作した（Scheuring, S. et al. J Mol Biol 312, 469-480 (2001); Tanaka et al. J Biol Chem, 277 (42):40142-7）, 2002）。NEBasechangerツール（nebasechanger.neb.com/）を用いて部位特異的突然変異誘発のためのプライマーを設計し、Q5（登録商標）Site-Directed Mutagenesisキット（カタログ番号:E0554S）を用いて部位特異的突然変異誘発を実施した。サンガー配列決定による確認の後に、変異体構築物および野生型VPS4A構築物をpLX_TRC313発現ベクター中にGatewayクローニングした。サンガー配列決定による確認の後、HEK293T細胞においてレンチウイルスを作製した。6ウェルの皿において、SpCas9発現細胞株JRおよび59Mを変異体発現レンチウイルスで形質導入した。形質導入の24時間後、培養培地を、200μg/mLハイグロマイシンを含有する培地と交換した。Vi-CELL XR（Beckman-Coulter）を使用して、反復細胞数測定によって59M培養物の増殖速度を追跡した。

【０２６１】

細胞免疫染色および共焦点顕微鏡法

8ウェルチャンバースライド中に播種された細胞に対して免疫染色を実施し、5～6日間増殖させた。細胞を固定し、標準的なパラホルムアルデヒドおよびトリトンベースのプロトコルを用いて透過処理した。alexa fluorをコンジュゲートした二次抗体とともに、検証された一次抗体（表3）を用いて、免疫染色を行った。DNAをDAPIで可視化し、正立落射蛍光顕微鏡、またはYokogawa Life Sciences CSU-W1回転円板共焦点システムを備えたNikon Eclipse Ti倒立顕微鏡のいずれかで画像を得た。示されている場合、CellProfiler v3.1.9およびImageJを使用して画像を定量化した。

【０２６２】

プレーティングについては、8ウェルチャンバースライド（Nunc Lab-Tek II Chamber Slides、またはIbidi組織培養で処理されたμ-Slide 8-Wellのいずれか）に細胞を播種した。Lab-Tekスライドの場合、37℃で1～3時間、1×PBS中のコラーゲンI（Corning Collagen I、カタログ番号:354249）およびラミニン（Sigma、カタログ番号:L2020）の1:50希釈物で、チャンバーをコーティングした。細胞株に応じて、5,000から30,000細胞/チャンバーの密度の範囲で細胞を播種した。ドキシサイクリンで誘導されるRNAiを用いた実験のために、まず、1μMドキシサイクリンの存在下または非存在下で小型T25フラスコ中に細胞を播種し、4～5日間処理し、次いで0.25%トリプシンを用いて採集し、次いでチャンバースライドに播種し、これをさらに1～2日間インキュベートした。CRISPRベースの遺伝子不活性化のために、まず、SpCas9安定細胞株を播種し、6ウェルプレートに感染させた。培地を24時間後に交換し、ピューロマイシンでさらに24時間選択した。次いで、選択された細胞を6ウェルプレートからトリプシン処理し、ピューロマイシンを含まない培地中でチャンバースライドに移し、さらに3日間培養した。

【０２６３】

インキュベーション後、細胞を1×PBSで洗浄し、1×PBS中の新鮮な4%パラホルムアルデヒドで15分間固定した。1×PBS中の0.2Mグリシンの2回の洗浄で固定をクエンチした。1×PBS中の0.1～0.2%（v/v）Triton X-100で室温にて10～15分間、細胞を透過処理し、ブロッキング緩衝液（1×PBS中1%（w/v）のウシ血清アルブミン（BSA）、または1×PBS中10%の正常ヤギ血清（w/v））でブロッキングした。すべての一

次抗体をブロッキング緩衝液で希釈し、4℃で一晩インキュベートした（抗体源および希釈については以下を参照）。1×PBSで細胞を3回洗浄し、ブロッキング緩衝液で1:500～1:1000に希釈されたAlexa Fluorコンジュゲート化二次抗体（Molecular Probes、ThermoFisher）で染色した。1×PBS中2～5μg/mLのDAPIで細胞を対比染色した。次いで、Nunc Lab-Tek IIプレートに播種した細胞を20分間インキュベートし、脱イオン水で2回洗浄し、ProLong Gold Antifade Mountant（ThermoFisher）を用いてカバーガラスで覆った。細胞脱離の画像は正立落射蛍光顕微鏡で収集し、他の画像はYokogawa Life Sciences CSU-W1回転円板共焦点を備えたNikon Eclipse Ti倒立顕微鏡で撮影した。

【０２６４】

（表３）免疫蛍光法のために使用される抗体

標的	種	クローナリティ	希釈	供給業者	ロット	カタログ番号
CHMP4B	ウサギ	ポリクローナル	4 μg/mL	Proteintech		13683-1-AP
エメリン	マウス	クローン 0203	0.5 μg/mL	Novus Biologicals	2602	NBP2-52877
RAB7	ウサギ	クローンD95F2		Cell Signaling Technology	1	#9367S
LC3B	ウサギ	クローン D11	0.5 μg/mL	Cell Signaling Technology	13	#3868P
SEC61B	ウサギ	ポリクローナル	1 μg/mL	Sigma-Aldrich	A113820	HPA049407
チューブリン	マウス	クローンDM1A		Sigma-Aldrich		T6199
抗ウサギ Alexa Fluor 488	ヤギ	ポリクローナル	2 μg/mL	ThermoFisher Scientific	2018309	A-11008
抗マウス Alexa Fluor 568	ヤギ	ポリクローナル	4 μg/mL	ThermoFisher Scientific	2014175	A-11004

【０２６５】

細胞免疫染色の定量

CHMP4B小斑点ならびにLC3B、RAB7およびSEC61Bの他の点状染色の共焦点蛍光画像を分析し、CellProfiler（Kamentsky et al. Bioinformatics, 27 (8): 1179-1180, 2011）中のカスタム画像解析パイプラインを使用して、対照およびドキシサイクリン処理後に定量した。簡潔には、バックグラウンド制御した核（DAPI）および細胞質（CHMP4B-alexa fluor 488/561またはCellmask Deep Red Stain-ThermoFisher Scientific-H32721）免疫蛍光シグナルを使用して、細胞およびバックグラウンドを同定した。バックグラウンド制御された適応閾値を上回る蛍光シグナルを定量化し、3μm超の小斑点として計数し、バックグラウンドまたは細胞領域に割り当てた。次いで1の値を加えた後に、細胞小斑点カウントをlog2正規化した。GraphPad Prism v8.3.0を使用してデータをプロットし、ベンジャミーニおよびエクティエリの補正された方法を使用する偽発見補正とともにGraphPadの内蔵ANOVA検定を使用して統計的有意性を決定した。

【０２６６】

VPS4A依存性の修飾因子についてのCRISPR-SpCas9機能喪失スクリーニング

CRISPR-SpCas9エンドヌクレアーゼおよびshVPS4A-2誘導性RNAiシステムで安定に形質導入されたSNU213膵臓癌細胞を、ゲノム規模Brunelloレンチウイルスsg RNAライブラリー（Addgene-73179）で感染させた。感染の準備のために、SNU213細胞を継代し、標準化スクリーニング培地; 10％FBS（Sigma-Aldrich-F4135）、2μg/mLブラストサイジンS（SpCas9選択; Gibco ThermoFisher Scientific-A1113903）および300μg/mLハイグロマイシンB（RNAiシステム選択; Gibco ThermoFisher Scientific-10687010）を補充したL-グルタミン含有RPMI-1640培地を加えたT75、T175、次いで500cm^{2}バイオアッセイプレート（Nunc Nunclon Delta Treated Square BioAssay Dish、ThermoFisher Scientific-166508）中で、1.5週間、37℃、5％CO_2で300×10^{6}に規模を拡大した。次いで、トリプシンを用いて細胞を採集し、Vi-CELL XRおよびトリパンブルー排除（Beckman Coulter）を用いて計数した。

【０２６７】

感染のために、抗生物質を含まない300mLのL-グルタミン含有RPMI-1640培地中に、1×10^{6}細胞/mLになるように細胞を希釈した。8μg/mLの最終濃度になるようにポリブレン（MilliPore-Sigma-TR-1003-G）を添加し、続いて16mLの予め滴定したBrunelloレンチウイルス粒子を添加して、0.4の感染多重度（MOI）および約1.500細胞/sgRNAのカバレッジを得た。手動ピペッティングによって細胞懸濁液を混合し、次いで、12個の12ウェルプレート中にウェルあたり2×10^{6}細胞で播種した。プレートを750×g、35℃で1.5時間スピンフェクトし、次いでさらに37℃、5％CO_2で一晩インキュベートした。翌朝、すべての感染した細胞をトリプシン処理によって回収し、1つのプールに合わせた。次いで、2μg/mLピューロマイシン（Gibco ThermoFisher Scientific-A1113803）を補充した標準化スクリーニング培地で細胞を希釈し、プレートあたり120mLの細胞懸濁液を加えた12の500cm^{2}バイオアッセイプレートに播種した。次いで、細胞を増殖させ、ピューロマイシンで5日間選択して、CRISPR-SpCas9突然変異誘発を可能にした。

【０２６８】

計数後、トリプシン収集によってすべての細胞を採集し、計数した。次いで、各処理群について、プレートあたり120mLの培地を加えた4つの500cm^{2}バイオアッセイプレート中に40×10^{6}個の細胞を播種した（プレートあたり10×10^{6}細胞、約500×カバレッジ）。各処理群を複製し（反復実験あたり4プレート、合計16プレート）、2μg/mLピューロマイシンを含む標準化スクリーニング培地または2μMドキシサイクリンおよび2μg/mLピューロマイシンを含む標準化スクリーニング培地のいずれかで細胞を2週間処理した。この期間中、3日ごとに培地を新しいものと交換し、細胞をモニターし、反復実験あたり40×10^{6}個の細胞を維持するように継代した。

【０２６９】

処理後、穏やかなトリプシン処理によって生存細胞を収集し、500×gでの遠心分離によって収集し、上清を除去し、細胞ペレットを－80℃で凍結した。細胞ペレット（反復実験あたり少なくとも3000万個の細胞）からのゲノムDNAを、QiaAMP DNA Miniキット（QiaGen 51304）を用いたシリカ膜ベースの核酸抽出を用いて精製した。この目的のために、各反復実験の細胞ペレットを25×106細胞/mLの濃度でPBSに懸濁し、それぞれ5×10^{6}細胞を含有する1.5mLチューブに分割した。次いで、2つの改変を伴うQiaAMP DNA Miniキットプロトコルに従ってこれらを処理した。プロテイナーゼKインキュベーション工程中に、1mg/mLのRNaseA（QiaGen 19101）を添加して、夾雑する細胞RNAを分解した。gDNA溶出のために、スピンカラムを125μLの溶出緩衝液とともに56℃で1時間インキュベートした後、遠心分離によって溶出し、この工程を1回繰り返し、両方の125μL画分を合わせた。gDNA抽出後、NanoDrop 8000（ThermoFisher Scientific ND-8000-GL）を用いてgDNA濃度を測定した。

【０２７０】

生存細胞のgDNA中に存在するsgRNA配列を決定するために、Illumina P5およびP7アダプターを有するプライマーを使用して、各反復実験について合計240μgのgDNAをPCR増幅に供した。各PCR反応は、10μgの投入gDNAを使用して100μLで行った。ExTaqホットスタートDNAポリメラーゼ（Clontech RR001C）を使用して、PCRを28サイクルにわたって行った。AMPure XP磁気ビーズ精製システム（Beckman Coulter、A63880）を使用して、増幅されたsgRNAを精製した。HiSeq 2500での次世代単一ショートリード50サイクルIlluminaに基づく配列決定によって、増幅された産物を配列決定した。100万当たりのリードカウントに対して個々のsgRNAリードカウントを試料正規化し、1の値によって調整し、次いでlog2変換した。次いで、Log2正規化sgRNAスコアをプラスミド投入ライブラリーと比較して、sgRNA倍数変化を決定した。次いで、倍数変化スコアを並べ替え、pythonスクリプトとしてSTARS v1.3アルゴリズムを使用して統計学的有意性の値を有する単一の遺伝子スコアにまとめた（Doench et al. Nature Biotechnol, 34 (2): 184-191, 2016）。この目的のために、50%の閾値を1000×帰無分布とともに使用した。分析は、負（枯渇）および正（濃縮）の両方向で実施され、これらの2つの方向の最も低いFDR q値を各遺伝子について取得した。0.05未満のQ値を有意とみなした。次いで、上位50の最も有意な遺伝子をクラスター化し、STRING v11.0（string-db.org）で予測された機能的関連を使用して可視化した。

【０２７１】

metascapeのヒト標準化された発現分析（GO、Reactome、KEGG、CORUM遺伝子セット）（metascape.org、2019-08-14更新）を使用して、上位50の有意な遺伝子に対して、統合された遺伝子セット濃縮分析を行った。Graphpad Prism v8.3.0を使用してデータを可視化し、プロットした。

【０２７２】

インターフェロン用量-反応曲線

インターフェロン処理がVPS4A抑制と協同するかどうか決定するために、VPS4Aに対するドキシサイクリン誘導性RNAiシステム（shVPS4A-2）を安定に発現する膵臓癌細胞株（KP4、PANC0403およびSNU213）を、1μMドキシサイクリンありまたはなしの、L-グルタミンを加えた100μLの10%FBS補充RPMI-1640中で、100～400細胞/ウェルで白色壁の96ウェルプレートに播種した。プレートを37℃、5%CO_2で3日間インキュベートした。次いで、0.3%Tween-20とともにPBSを含有する1%BSA中に溶解した精製された組換えヒトインターフェロン-β1またはインターフェロン-γ（PeproTech 300-02BC; 300-02）のストック溶液（5μg/mL）の9点log10滴定を、T8＋およびD4＋分注カセットヘッド（HP）を使用するD300e Digital Dispenser（Tecan）を使用して細胞に添加した。同時に、ドキシサイクリンを新しくした。次いで、細胞を37℃、5%CO_2でさらに3日間インキュベートした。その後、100μLの予め混合されたCellTiter-Glo（Promega）試薬をウェルに添加して、プレートを500RPMで10分間室温で振盪することによって細胞を溶解した。次いで、ATPベースの読み出し情報を使用して細胞生存率を測定するために、Envisionプレートリーダー（Perkin Elmer）を使用して各ウェルの発光を測定した。各細胞株についてインターフェロンなしで処理された6ウェルからの平均シグナルに対して、各ウェルの発光シグナルを正規化した。次いで、4パラメータの対数ベースの非線形用量-反応曲線にフィッティングしたGraphPad Prism 8.3.0を使用して、これらの正規化された値を可視化した。各用量点について、3つの複製ウェルを使用し、2週間後に実験を1回繰り返した（各用量点について合計6つの値）。PANC0403およびSNU213細胞株におけるドキシサイクリン処理でのVPS4A抑制を通じて細胞生存率の50%阻害に達するように、アッセイの6日間のタイミングを最適化した。3日目にドキシサイクリンを新しくして、実験中に厳密なVPS4A抑制を維持した。

【０２７３】

VPS4AおよびVPS4B依存性スコアの相関分析

Broad Instituteの公開された19Q3依存性マップからの622細胞株にわたるCRISPR

VPS4AまたはVPS4B依存性スコアについて、Broad Instituteの19Q3 Dependency Map/CCLEリリースからの遺伝子発現、コピー数、プロテオミクスおよび他のCRISPR依存性スコアとの相関分析を行った。ピアソン相関は、cor.test関数を使用してRで行った。次いで、R中のp.adjust関数のベンジャミーニ・ホッホベルク法を使用してp値を偽発見について補正し、q値を－log10正規化した。GraphPad Prism v8.3.0を使用して、結果をプロットした。結果のいくつかを遺伝子セット濃縮分析のために使用した。この目的のために、上位の有意に（5％FDR）相関する遺伝子の記号をMetascape（metascape.org、2019-08-14更新）にアップロードし、GO、KEGGおよびReactome遺伝子セットを取り込むことによってHomo Sapiensについて分析した。

【０２７４】

多重線形モデルのために、表記された遺伝子についてのRNAseqによって決定されたmRNA発現値とともに、VPS4AおよびVPS4BのCRISPR依存性スコアを10個の等しいサイズの細胞株群へとビン分割した。次に、内蔵lm関数を使用して、指定された特徴を使用して、多重線形モデルをRで訓練した。この目的のために、モデルは、まず、ビンの9個に対して訓練され、次いで最後のビンを予測するために利用された。この過程を10回繰り返して、10個すべてのビンを予測し（10分割交差検証）、次いで、すべての予測スコアを収集し、ピアソン相関を使用して実際の観察値との相関分析を行った。GraphPad Prism v8.3.0を使用して、4パラメータ多重線形モデルの結果をプロットし、モデルの各々について統計値を抽出し、単純なRスクリプトを使用して表に保存した。

【０２７５】

（表４）CRISPR-SpCas9およびRNAi分析における腫瘍抑制遺伝子コピー喪失と相関した遺伝子依存性。

ID	ランク	対	Dep_遺伝子	Chr_Dep	KB_dep	TSG_遺伝子	Chr_TSG	KB_TSG
1	1	VPS4A-SMAD4	VPS4A	16q	69311.38	SMAD4	18q	51030.21
2	1	CHMP4B-SMAD4	CHMP4B	20q	33811.3	SMAD4	18q	51030.21
3	1	GRHL2-SMAD4	GRHL2	8q	101492.44	SMAD4	18q	51030.21
4	1	TUBB4B-SMAD4	TUBB4B	9q	137241.26	SMAD4	18q	51030.21
5	1	KRAS-SMAD4	KRAS	12p	25204.79	SMAD4	18q	51030.21
6	1	KLF5-SMAD4	KLF5	13q	73058.79	SMAD4	18q	51030.21
7	1	GRK2-SMAD4	GRK2	11q	67266.4	SMAD4	18q	51030.21
8	1	EGFR-SMAD4	EGFR	7p	55019.03	SMAD4	18q	51030.21
9	1	EP300-SMAD4	EP300	22q	41092.61	SMAD4	18q	51030.21
10	1	PRKAR1A-SMAD4	PRKAR1A	17q	68512.38	SMAD4	18q	51030.21
11	1	ITGA3-SMAD4	ITGA3	17q	50055.97	SMAD4	18q	51030.21
12	1	IRF4-SMAD4	IRF4	6p	391.74	SMAD4	18q	51030.21
13	1	SCAP-SMAD4	SCAP	3p	47413.69	SMAD4	18q	51030.21
14	1	ACSL5-SMAD4	ACSL5	10q	112375.27	SMAD4	18q	51030.21
15	1	UPF1-SMAD4	UPF1	19p	18831.94	SMAD4	18q	51030.21
16	1	RAPGEF1-SMAD4	RAPGEF1	9q	131576.77	SMAD4	18q	51030.21
17	1	RAB6A-SMAD4	RAB6A	11q	73675.64	SMAD4	18q	51030.21
18	1	TTC24-	TTC24	1q	156581.37	SMAD4	18q	51030.21

		SMAD4						
19	1	JUNB-SMAD4	JUNB	19p	12791.5	SMAD4	18q	51030.21
20	1	COPS4-SMAD4	COPS4	4q	83035.09	SMAD4	18q	51030.21
21	1	SREBF1-SMAD4	SREBF1	17p	17811.35	SMAD4	18q	51030.21
22	1	METAP1-SMAD4	METAP1	4q	98995.64	SMAD4	18q	51030.21
23	1	EED-SMAD4	EED	11q	86244.38	SMAD4	18q	51030.21
24	1	PRAG1-SMAD4	PRAG1	8p	8317.74	SMAD4	18q	51030.21
25	1	RPS21-SMAD4	RPS21	20q	62387.07	SMAD4	18q	51030.21
26	1	PKP3-SMAD4	PKP3	11p	394.18	SMAD4	18q	51030.21
27	1	GMNN-SMAD4	GMNN	6p	24774.93	SMAD4	18q	51030.21
28	1	LMO7-SMAD4	LMO7	13q	75760.66	SMAD4	18q	51030.21
29	1	AKAP9-SMAD4	AKAP9	7q	91940.88	SMAD4	18q	51030.21
30	1	ULK3-SMAD4	ULK3	15q	74836.12	SMAD4	18q	51030.21
31	1	LIMS1-SMAD4	LIMS1	2q	108588.3	SMAD4	18q	51030.21
32	1	UBE2Z-SMAD4	UBE2Z	17q	48908.37	SMAD4	18q	51030.21
33	1	CSNK1D-SMAD4	CSNK1D	17q	82242.66	SMAD4	18q	51030.21
34	1	COPS7A-SMAD4	COPS7A	12p	6723.98	SMAD4	18q	51030.21
35	1	PSMD6-SMAD4	PSMD6	3p	64010.55	SMAD4	18q	51030.21
36	1	RPS27A-SMAD4	RPS27A	2p	55232.41	SMAD4	18q	51030.21
37	2	WDR77-CDKN2B	WDR77	1p	111439.89	CDKN2B	9p	22002.9
38	2	PRMT5-CDKN2B	PRMT5	14q	22920.51	CDKN2B	9p	22002.9
39	2	KIF2C-CDKN2B	KIF2C	1p	44739.82	CDKN2B	9p	22002.9
40	2	CCND1-CDKN2B	CCND1	11q	69641.11	CDKN2B	9p	22002.9
41	2	CCNE1-CDKN2B	CCNE1	19q	29811.99	CDKN2B	9p	22002.9
42	2	NFE2L2-CDKN2B	NFE2L2	2q	177230.3	CDKN2B	9p	22002.9
43	2	CDK6-CDKN2B	CDK6	7q	92604.92	CDKN2B	9p	22002.9
44	2	MARCH5-	MARCH5	10q	92291.16	CDKN2B	9p	22002.9

		CDKN2B						
45	2	EZH2-CDKN2B	EZH2	7q	148807.37	CDKN2B	9p	22002.9
46	2	CDKN1A-CDKN2B	CDKN1A	6p	36676.49	CDKN2B	9p	22002.9
47	2	EFTUD2-CDKN2B	EFTUD2	17q	44850.29	CDKN2B	9p	22002.9
48	2	ORC6-CDKN2B	ORC6	16q	46689.65	CDKN2B	9p	22002.9
49	2	SMARCD1-CDKN2B	SMARCD1	12q	50085.2	CDKN2B	9p	22002.9
50	2	WWTR1-CDKN2B	WWTR1	3q	149517.23	CDKN2B	9p	22002.9
51	2	SKP2-CDKN2B	SKP2	5p	36152.04	CDKN2B	9p	22002.9
52	2	KEAP1-CDKN2B	KEAP1	19p	10486.12	CDKN2B	9p	22002.9
53	2	GYPA-CDKN2B	GYPA	4q	144109.3	CDKN2B	9p	22002.9
54	2	SNRPC-CDKN2B	SNRPC	6p	34757.09	CDKN2B	9p	22002.9
55	2	MSI2-CDKN2B	MSI2	17q	57257.01	CDKN2B	9p	22002.9
56	2	RBL1-CDKN2B	RBL1	20q	37003.57	CDKN2B	9p	22002.9
57	2	ORC1-CDKN2B	ORC1	1p	52372.83	CDKN2B	9p	22002.9
58	2	CDC6-CDKN2B	CDC6	17q	40287.89	CDKN2B	9p	22002.9
59	2	PRSS42-CDKN2B	PRSS42	3p	46830.4	CDKN2B	9p	22002.9
60	2	IPO9-CDKN2B	IPO9	1q	201829.16	CDKN2B	9p	22002.9
61	2	BCOR-CDKN2B	BCOR	Xp	40051.25	CDKN2B	9p	22002.9
62	2	MYBL2-CDKN2B	MYBL2	20q	43667.02	CDKN2B	9p	22002.9
63	2	SDHA-CDKN2B	SDHA	5p	218.22	CDKN2B	9p	22002.9
64	2	TP53BP1-CDKN2B	TP53BP1	15q	43403.06	CDKN2B	9p	22002.9
65	2	CDK2-CDKN2B	CDK2	12q	55966.77	CDKN2B	9p	22002.9
66	2	RING1-CDKN2B	RING1	6p	33208.51	CDKN2B	9p	22002.9
67	2	SUZ12-CDKN2B	SUZ12	17q	31937.01	CDKN2B	9p	22002.9

68	2	LMO2-CDKN2B	LMO2	11p	33858.58	CDKN2B	9p	22002.9
69	3	WDR77-CDKN2A	WDR77	1p	111439.89	CDKN2A	9p	21967.75
70	3	CCND1-CDKN2A	CCND1	11q	69641.11	CDKN2A	9p	21967.75
71	3	PRMT5-CDKN2A	PRMT5	14q	22920.51	CDKN2A	9p	21967.75
72	3	CCNE1-CDKN2A	CCNE1	19q	29811.99	CDKN2A	9p	21967.75
73	3	CDK6-CDKN2A	CDK6	7q	92604.92	CDKN2A	9p	21967.75
74	3	KIF2C-CDKN2A	KIF2C	1p	44739.82	CDKN2A	9p	21967.75
75	3	EZH2-CDKN2A	EZH2	7q	148807.37	CDKN2A	9p	21967.75
76	3	CDKN1A-CDKN2A	CDKN1A	6p	36676.49	CDKN2A	9p	21967.75
77	3	WWTR1-CDKN2A	WWTR1	3q	149517.23	CDKN2A	9p	21967.75
78	3	NFE2L2-CDKN2A	NFE2L2	2q	177230.3	CDKN2A	9p	21967.75
79	3	ORC1-CDKN2A	ORC1	1p	52372.83	CDKN2A	9p	21967.75
80	3	SKP2-CDKN2A	SKP2	5p	36152.04	CDKN2A	9p	21967.75
81	3	RBL1-CDKN2A	RBL1	20q	37003.57	CDKN2A	9p	21967.75
82	3	MARCH5-CDKN2A	MARCH5	10q	92291.16	CDKN2A	9p	21967.75
83	3	ORC6-CDKN2A	ORC6	16q	46689.65	CDKN2A	9p	21967.75
84	3	MYBL2-CDKN2A	MYBL2	20q	43667.02	CDKN2A	9p	21967.75
85	3	PPP1R15B-CDKN2A	PPP1R15B	1q	204403.36	CDKN2A	9p	21967.75
86	3	BMI1-CDKN2A	BMI1	10p	22321.21	CDKN2A	9p	21967.75
87	3	PRSS42-CDKN2A	PRSS42	3p	46830.4	CDKN2A	9p	21967.75
88	3	RING1-CDKN2A	RING1	6p	33208.51	CDKN2A	9p	21967.75
89	3	CDK2-CDKN2A	CDK2	12q	55966.77	CDKN2A	9p	21967.75
90	3	SUZ12-CDKN2A	SUZ12	17q	31937.01	CDKN2A	9p	21967.75
91	3	SNRPC-	SNRPC	6p	34757.09	CDKN2A	9p	21967.75

		CDKN2A						
92	3	GRPEL1-CDKN2A	GRPEL1	4p	7058.9	CDKN2A	9p	21967.75
93	3	TRRAP-CDKN2A	TRRAP	7q	98878.49	CDKN2A	9p	21967.75
94	3	EAF1-CDKN2A	EAF1	3p	15427.56	CDKN2A	9p	21967.75
95	4	ARF1-BAP1	ARF1	1q	228082.66	BAP1	3p	52401
96	4	AIFM1-BAP1	AIFM1	Xq	130129.36	BAP1	3p	52401
97	4	RPS15A-BAP1	RPS15A	16p	18782.96	BAP1	3p	52401
98	4	EDF1-BAP1	EDF1	9q	136862.67	BAP1	3p	52401
99	4	FUBP1-BAP1	FUBP1	1p	77948.4	BAP1	3p	52401
100	4	EGFR-BAP1	EGFR	7p	55019.03	BAP1	3p	52401
101	4	ERBB3-BAP1	ERBB3	12q	56080.03	BAP1	3p	52401
102	4	RPS27A-BAP1	RPS27A	2p	55232.41	BAP1	3p	52401
103	4	CIAPIN1-BAP1	CIAPIN1	16q	57428.17	BAP1	3p	52401
104	4	CBFB-BAP1	CBFB	16q	67029.15	BAP1	3p	52401
105	4	SEM1-BAP1	SEM1	7q	96688.77	BAP1	3p	52401
106	4	GRK2-BAP1	GRK2	11q	67266.4	BAP1	3p	52401
107	4	PHF2-BAP1	PHF2	9q	93576.63	BAP1	3p	52401
108	4	UBE2H-BAP1	UBE2H	7q	129830.73	BAP1	3p	52401
109	4	RPL18A-BAP1	RPL18A	19p	17859.88	BAP1	3p	52401
110	4	KIF2A-BAP1	KIF2A	5q	62306.16	BAP1	3p	52401
111	5	AIFM1-PBRM1	AIFM1	Xq	130129.36	PBRM1	3p	52545.39
112	5	ARF1-PBRM1	ARF1	1q	228082.66	PBRM1	3p	52545.39
113	5	RPS15A-PBRM1	RPS15A	16p	18782.96	PBRM1	3p	52545.39
114	5	EDF1-PBRM1	EDF1	9q	136862.67	PBRM1	3p	52545.39
115	5	FUBP1-PBRM1	FUBP1	1p	77948.4	PBRM1	3p	52545.39
116	5	ERBB2-PBRM1	ERBB2	17q	39699.98	PBRM1	3p	52545.39
117	5	EGFR-PBRM1	EGFR	7p	55019.03	PBRM1	3p	52545.39
118	5	RPS27A-PBRM1	RPS27A	2p	55232.41	PBRM1	3p	52545.39
119	5	SEM1-PBRM1	SEM1	7q	96688.77	PBRM1	3p	52545.39
120	5	CBFB-PBRM1	CBFB	16q	67029.15	PBRM1	3p	52545.39
121	5	ERBB3-PBRM1	ERBB3	12q	56080.03	PBRM1	3p	52545.39
122	5	GRK2-PBRM1	GRK2	11q	67266.4	PBRM1	3p	52545.39
123	5	RPL18A-PBRM1	RPL18A	19p	17859.88	PBRM1	3p	52545.39
124	5	KIF2A-PBRM1	KIF2A	5q	62306.16	PBRM1	3p	52545.39

125	6	AIFM1-RHOA	AIFM1	Xq	130129.36	RHOA	3p	49359.14
126	6	EGFR-RHOA	EGFR	7p	55019.03	RHOA	3p	49359.14
127	6	EDF1-RHOA	EDF1	9q	136862.67	RHOA	3p	49359.14
128	6	RPS15A-RHOA	RPS15A	16p	18782.96	RHOA	3p	49359.14
129	6	CIAPIN1-RHOA	CIAPIN1	16q	57428.17	RHOA	3p	49359.14
130	6	FUBP1-RHOA	FUBP1	1p	77948.4	RHOA	3p	49359.14
131	6	GRK2-RHOA	GRK2	11q	67266.4	RHOA	3p	49359.14
132	6	ADAR-RHOA	ADAR	1q	154582.06	RHOA	3p	49359.14
133	6	ESR1-RHOA	ESR1	6q	151809.11	RHOA	3p	49359.14
134	6	PHF2-RHOA	PHF2	9q	93576.63	RHOA	3p	49359.14
135	6	PCM1-RHOA	PCM1	8p	17922.86	RHOA	3p	49359.14
136	6	CBFB-RHOA	CBFB	16q	67029.15	RHOA	3p	49359.14
137	6	FBXO11-RHOA	FBXO11	2p	47806.92	RHOA	3p	49359.14
138	7	ITGAV-PDGFRB	ITGAV	2q	186590.06	PDGFRB	5q	150113.84
139	7	MED1-PDGFRB	MED1	17q	39404.29	PDGFRB	5q	150113.84
140	7	MYBL2-PDGFRB	MYBL2	20q	43667.02	PDGFRB	5q	150113.84
141	7	WWTR1-PDGFRB	WWTR1	3q	149517.23	PDGFRB	5q	150113.84
142	7	MED12-PDGFRB	MED12	Xq	71118.56	PDGFRB	5q	150113.84
143	7	PPP2R1A-PDGFRB	PPP2R1A	19q	52189.8	PDGFRB	5q	150113.84
144	7	FERMT2-PDGFRB	FERMT2	14q	52857.27	PDGFRB	5q	150113.84
145	7	RUNX1-PDGFRB	RUNX1	21q	34787.8	PDGFRB	5q	150113.84
146	7	PTK2-PDGFRB	PTK2	8q	140658.38	PDGFRB	5q	150113.84
147	7	ZFP36L1-PDGFRB	ZFP36L1	14q	68787.66	PDGFRB	5q	150113.84
148	7	TLN1-PDGFRB	TLN1	9p	35697.34	PDGFRB	5q	150113.84
149	7	MED16-PDGFRB	MED16	19p	867.96	PDGFRB	5q	150113.84
150	8	AIFM1-SETD2	AIFM1	Xq	130129.36	SETD2	3p	47016.41
151	8	ARF1-SETD2	ARF1	1q	228082.66	SETD2	3p	47016.41
152	8	EGFR-SETD2	EGFR	7p	55019.03	SETD2	3p	47016.41
153	8	EDF1-SETD2	EDF1	9q	136862.67	SETD2	3p	47016.41
154	8	CIAPIN1-SETD2	CIAPIN1	16q	57428.17	SETD2	3p	47016.41

155	8	RPS15A-SETD2	RPS15A	16p	18782.96	SETD2	3p	47016.41
156	8	FUBP1-SETD2	FUBP1	1p	77948.4	SETD2	3p	47016.41
157	8	ADAR-SETD2	ADAR	1q	154582.06	SETD2	3p	47016.41
158	8	GRK2-SETD2	GRK2	11q	67266.4	SETD2	3p	47016.41
159	8	CBFB-SETD2	CBFB	16q	67029.15	SETD2	3p	47016.41
160	8	ESR1-SETD2	ESR1	6q	151809.11	SETD2	3p	47016.41
161	8	GAB1-SETD2	GAB1	4q	143336.83	SETD2	3p	47016.41
162	9	MYT1-CDC73	MYT1	20q	64164.47	CDC73	1q	193121.96
163	9	NPAT-CDC73	NPAT	11q	108157.39	CDC73	1q	193121.96
164	9	TEAD1-CDC73	TEAD1	11p	12674.42	CDC73	1q	193121.96
165	9	OR5M10-CDC73	OR5M10	11q	56576.77	CDC73	1q	193121.96
166	9	RPL22-CDC73	RPL22	1p	6185.02	CDC73	1q	193121.96
167	9	SMARCE1-CDC73	SMARCE1	17q	40627.73	CDC73	1q	193121.96
168	9	ZMYND11-CDC73	ZMYND11	10p	134.48	CDC73	1q	193121.96
169	9	SFPQ-CDC73	SFPQ	1p	35183.6	CDC73	1q	193121.96
170	9	MIB1-CDC73	MIB1	18q	21741.33	CDC73	1q	193121.96
171	9	SOD2-CDC73	SOD2	6q	159679.06	CDC73	1q	193121.96
172	9	ZFC3H1-CDC73	ZFC3H1	12q	71609.6	CDC73	1q	193121.96
173	10	BIRC6-DICER1	BIRC6	2p	32357.03	DICER1	14q	95086.23
174	10	RPL36A-DICER1	RPL36A	Xq	101390.89	DICER1	14q	95086.23
175	10	MTA2-DICER1	MTA2	11q	62593.2	DICER1	14q	95086.23
176	10	MTOR-DICER1	MTOR	1p	11106.53	DICER1	14q	95086.23
177	10	UBA6-DICER1	UBA6	4q	67615.76	DICER1	14q	95086.23
178	10	HSP90AB1-DICER1	HSP90AB1	6p	44246.96	DICER1	14q	95086.23
179	10	SH2D2A-DICER1	SH2D2A	1q	156806.24	DICER1	14q	95086.23
180	10	AHCYL1-DICER1	AHCYL1	1p	109984.77	DICER1	14q	95086.23
181	10	EXOC2-DICER1	EXOC2	6p	485.14	DICER1	14q	95086.23
182	10	POLDIP3-DICER1	POLDIP3	22q	42583.72	DICER1	14q	95086.23
183	10	RBBP7-DICER1	RBBP7	Xp	16844.65	DICER1	14q	95086.23
184	11	ITGAV-APC	ITGAV	2q	186590.06	APC	5q	112737.86
185	11	RAB1A-APC	RAB1A	2p	65086.85	APC	5q	112737.86
186	11	DDX21-APC	DDX21	10q	68956.12	APC	5q	112737.86

187	11	ZFP36-APC	ZFP36	19q	39406.85	APC	5q	112737.86
188	11	PTK2-APC	PTK2	8q	140658.38	APC	5q	112737.86
189	11	RAC1-APC	RAC1	7p	6374.5	APC	5q	112737.86
190	11	PLXNA1-APC	PLXNA1	3q	126988.59	APC	5q	112737.86
191	11	TLN1-APC	TLN1	9p	35697.34	APC	5q	112737.86
192	11	AMOTL2-APC	AMOTL2	3q	134355.35	APC	5q	112737.86
193	11	MYBL2-APC	MYBL2	20q	43667.02	APC	5q	112737.86
194	12	DDX39B-KEAP1	DDX39B	6p	31530.22	KEAP1	19p	10486.12
195	12	FUBP1-KEAP1	FUBP1	1p	77948.4	KEAP1	19p	10486.12
196	12	MYB-KEAP1	MYB	6q	135181.32	KEAP1	19p	10486.12
197	12	PRKAR1A-KEAP1	PRKAR1A	17q	68512.38	KEAP1	19p	10486.12
198	12	GCLC-KEAP1	GCLC	6p	53497.34	KEAP1	19p	10486.12
199	12	GNG5-KEAP1	GNG5	1p	84498.32	KEAP1	19p	10486.12
200	12	CBFB-KEAP1	CBFB	16q	67029.15	KEAP1	19p	10486.12
201	12	STK17B-KEAP1	STK17B	2q	196133.58	KEAP1	19p	10486.12
202	12	NFE2L2-KEAP1	NFE2L2	2q	177230.3	KEAP1	19p	10486.12
203	12	LMO2-KEAP1	LMO2	11p	33858.58	KEAP1	19p	10486.12
204	13	TRA2B-PMS2	TRA2B	3q	185914.57	PMS2	7p	5970.93
205	13	WDR1-PMS2	WDR1	4p	10074.34	PMS2	7p	5970.93
206	13	ZC3H18-PMS2	ZC3H18	16q	88570.38	PMS2	7p	5970.93
207	13	MED26-PMS2	MED26	19p	16574.91	PMS2	7p	5970.93
208	13	H2AFZ-PMS2	H2AFZ	4q	99948.09	PMS2	7p	5970.93
209	13	SRRT-PMS2	SRRT	7q	100875.08	PMS2	7p	5970.93
210	13	BIRC6-PMS2	BIRC6	2p	32357.03	PMS2	7p	5970.93
211	13	NCKAP1-PMS2	NCKAP1	2q	182924.85	PMS2	7p	5970.93
212	13	ACTG1-PMS2	ACTG1	17q	81509.97	PMS2	7p	5970.93
213	13	POLR2J-PMS2	POLR2J	7q	102473.1	PMS2	7p	5970.93
214	14	NPAT-MDM4	NPAT	11q	108157.39	MDM4	1q	204516.38
215	14	RPL22-MDM4	RPL22	1p	6185.02	MDM4	1q	204516.38
216	14	MYT1-MDM4	MYT1	20q	64164.47	MDM4	1q	204516.38
217	14	TEAD1-MDM4	TEAD1	11p	12674.42	MDM4	1q	204516.38
218	14	TRPS1-MDM4	TRPS1	8q	115408.5	MDM4	1q	204516.38
219	14	TBP-MDM4	TBP	6q	170554.33	MDM4	1q	204516.38
220	14	SF1-MDM4	SF1	11q	64764.6	MDM4	1q	204516.38
221	14	SMARCE1-MDM4	SMARCE1	17q	40627.73	MDM4	1q	204516.38
222	14	ZMYND11-MDM4	ZMYND11	10p	134.48	MDM4	1q	204516.38
223	15	RPAP3-PPP6C	RPAP3	12q	47661.93	PPP6C	9q	125146.57
224	15	TUBB-PPP6C	TUBB	6p	30720.2	PPP6C	9q	125146.57

225	15	USP5-PPP6C	USP5	12p	6852.13	PPP6C	9q	125146.57
226	15	RRM1-PPP6C	RRM1	11p	4116.08	PPP6C	9q	125146.57
227	15	VCP-PPP6C	VCP	9p	35056.07	PPP6C	9q	125146.57
228	15	DCPS-PPP6C	DCPS	11q	126303.75	PPP6C	9q	125146.57
229	15	PSMA1-PPP6C	PSMA1	11p	14504.88	PPP6C	9q	125146.57
230	15	PCDHB13-PPP6C	PCDHB13	5q	141213.92	PPP6C	9q	125146.57
231	16	TUBB-TSC1	TUBB	6p	30720.2	TSC1	9q	132891.35
232	16	VCP-TSC1	VCP	9p	35056.07	TSC1	9q	132891.35
233	16	DCPS-TSC1	DCPS	11q	126303.75	TSC1	9q	132891.35
234	16	ATR-TSC1	ATR	3q	142449.24	TSC1	9q	132891.35
235	16	EGFR-TSC1	EGFR	7p	55019.03	TSC1	9q	132891.35
236	16	METTL1-TSC1	METTL1	12q	57768.57	TSC1	9q	132891.35
237	16	RPAP3-TSC1	RPAP3	12q	47661.93	TSC1	9q	132891.35
238	16	TM9SF2-TSC1	TM9SF2	13q	99501.37	TSC1	9q	132891.35
239	17	ESR1-BRIP1	ESR1	6q	151809.11	BRIP1	17q	61679.19
240	17	ZMYM2-BRIP1	ZMYM2	13q	19958.67	BRIP1	17q	61679.19
241	17	GATA3-BRIP1	GATA3	10p	8054.7	BRIP1	17q	61679.19
242	17	FOXA1-BRIP1	FOXA1	14q	37589.55	BRIP1	17q	61679.19
243	17	RPL27A-BRIP1	RPL27A	11p	8682.45	BRIP1	17q	61679.19
244	17	SAFB-BRIP1	SAFB	19p	5623.04	BRIP1	17q	61679.19
245	17	SF3B4-BRIP1	SF3B4	1q	149923.32	BRIP1	17q	61679.19
246	18	MED1-TP53	MED1	17q	39404.29	TP53	17p	7668.4
247	18	MED10-TP53	MED10	5p	6371.93	TP53	17p	7668.4
248	18	KIF2C-TP53	KIF2C	1p	44739.82	TP53	17p	7668.4
249	18	CHD4-TP53	CHD4	12p	6570.08	TP53	17p	7668.4
250	18	METAP2-TP53	METAP2	12q	95474.05	TP53	17p	7668.4
251	18	IGF1R-TP53	IGF1R	15q	98648.54	TP53	17p	7668.4
252	18	MYBL2-TP53	MYBL2	20q	43667.02	TP53	17p	7668.4
253	19	DDX39B-SMARCA4	DDX39B	6p	31530.22	SMARCA4	19p	10960.92
254	19	PRKAR1A-SMARCA4	PRKAR1A	17q	68512.38	SMARCA4	19p	10960.92
255	19	FUBP1-SMARCA4	FUBP1	1p	77948.4	SMARCA4	19p	10960.92
256	19	MYB-SMARCA4	MYB	6q	135181.32	SMARCA4	19p	10960.92
257	19	CD33-SMARCA4	CD33	19q	51225.08	SMARCA4	19p	10960.92
258	19	GCLC-SMARCA4	GCLC	6p	53497.34	SMARCA4	19p	10960.92
259	20	FUBP1-STK11	FUBP1	1p	77948.4	STK11	19p	1205.8
260	20	DDX39B-	DDX39B	6p	31530.22	STK11	19p	1205.8

		STK11						
261	20	SMARCA2-STK11	SMARCA2	9p	2015.22	STK11	19p	1205.8
262	20	POT1-STK11	POT1	7q	124822.39	STK11	19p	1205.8
263	20	CDC40-STK11	CDC40	6q	110180.42	STK11	19p	1205.8
264	20	PPM1D-STK11	PPM1D	17q	60600.18	STK11	19p	1205.8
265	21	CUL4B-DIS3	CUL4B	Xq	120524.59	DIS3	13q	72755.4
266	21	PPP2R1A-DIS3	PPP2R1A	19q	52189.8	DIS3	13q	72755.4
267	21	ITGAV-DIS3	ITGAV	2q	186590.06	DIS3	13q	72755.4
268	21	NAA10-DIS3	NAA10	Xq	153929.83	DIS3	13q	72755.4
269	21	WWTR1-DIS3	WWTR1	3q	149517.23	DIS3	13q	72755.4
270	22	MED1-MAP2K4	MED1	17q	39404.29	MAP2K4	17p	12020.82
271	22	MED10-MAP2K4	MED10	5p	6371.93	MAP2K4	17p	12020.82
272	22	METAP2-MAP2K4	METAP2	12q	95474.05	MAP2K4	17p	12020.82
273	22	KIF2C-MAP2K4	KIF2C	1p	44739.82	MAP2K4	17p	12020.82
274	22	SAMD4B-MAP2K4	SAMD4B	19q	39342.46	MAP2K4	17p	12020.82
275	23	DDX39B-MEF2B	DDX39B	6p	31530.22	MEF2B	19p	19145.57
276	23	PRKAR1A-MEF2B	PRKAR1A	17q	68512.38	MEF2B	19p	19145.57
277	23	SRSF11-MEF2B	SRSF11	1p	70205.68	MEF2B	19p	19145.57
278	23	MEIS3-MEF2B	MEIS3	19q	47403.12	MEF2B	19p	19145.57
279	23	FUBP1-MEF2B	FUBP1	1p	77948.4	MEF2B	19p	19145.57
280	24	PPP6C-PTPRT	PPP6C	9q	125146.57	PTPRT	20q	42072.75
281	24	SBDS-PTPRT	SBDS	7q	66987.68	PTPRT	20q	42072.75
282	24	CMA1-PTPRT	CMA1	14q	24505.36	PTPRT	20q	42072.75
283	24	UFC1-PTPRT	UFC1	1q	161153.74	PTPRT	20q	42072.75
284	24	SNRPB-PTPRT	SNRPB	20p	2461.64	PTPRT	20q	42072.75
285	25	CBFB-RUNX1	CBFB	16q	67029.15	RUNX1	21q	34787.8
286	25	RAB6A-RUNX1	RAB6A	11q	73675.64	RUNX1	21q	34787.8
287	25	WDR92-RUNX1	WDR92	2p	68130.15	RUNX1	21q	34787.8
288	25	SDHAF3-RUNX1	SDHAF3	7q	97116.59	RUNX1	21q	34787.8
289	25	NFAT5-RUNX1	NFAT5	16q	69565.97	RUNX1	21q	34787.8
290	26	PPP2R1A-ATM	PPP2R1A	19q	52189.8	ATM	11q	108223.53
291	26	WWTR1-ATM	WWTR1	3q	149517.23	ATM	11q	108223.53

292	26	CSTF3-ATM	CSTF3	11p	33084.58	ATM	11q	108223.53
293	26	MDM2-ATM	MDM2	12q	68808.17	ATM	11q	108223.53
294	27	WWTR1-BRCA2	WWTR1	3q	149517.23	BRCA2	13q	32315.48
295	27	MYBL2-BRCA2	MYBL2	20q	43667.02	BRCA2	13q	32315.48
296	27	NAA15-BRCA2	NAA15	4q	139301.47	BRCA2	13q	32315.48
297	27	MED12-BRCA2	MED12	Xq	71118.56	BRCA2	13q	32315.48
298	28	WWTR1-LATS2	WWTR1	3q	149517.23	LATS2	13q	20973.04
299	28	NAA15-LATS2	NAA15	4q	139301.47	LATS2	13q	20973.04
300	28	NR4A3-LATS2	NR4A3	9q	99821.86	LATS2	13q	20973.04
301	28	NONO-LATS2	NONO	Xq	71283.19	LATS2	13q	20973.04
302	29	CCND1-PTPRD	CCND1	11q	69641.11	PTPRD	9p	8314.25
303	29	SIRPD-PTPRD	SIRPD	20p	1534.25	PTPRD	9p	8314.25
304	29	ARF4-PTPRD	ARF4	3p	57571.36	PTPRD	9p	8314.25
305	29	DYRK1A-PTPRD	DYRK1A	21q	37420.3	PTPRD	9p	8314.25
306	30	VPS4B-CDH1	VPS4B	18q	63389.19	CDH1	16q	68737.29
307	30	MNT-CDH1	MNT	17p	2384.06	CDH1	16q	68737.29
308	30	MED8-CDH1	MED8	1p	43383.91	CDH1	16q	68737.29
309	31	MAGOH-CDKN1B	MAGOH	1p	53226.89	CDKN1B	12p	12717.27
310	31	GSK3B-CDKN1B	GSK3B	3q	119821.96	CDKN1B	12p	12717.27
311	31	YME1L1-CDKN1B	YME1L1	10p	27110.11	CDKN1B	12p	12717.27
312	32	CDK2-KNSTRN	CDK2	12q	55966.77	KNSTRN	15q	40382.72
313	32	SKP2-KNSTRN	SKP2	5p	36152.04	KNSTRN	15q	40382.72
314	32	RBBP4-KNSTRN	RBBP4	1p	32651.15	KNSTRN	15q	40382.72
315	33	CSTF3-MEN1	CSTF3	11p	33084.58	MEN1	11q	64803.51
316	33	RAB1A-MEN1	RAB1A	2p	65086.85	MEN1	11q	64803.51
317	33	HNRNPD-MEN1	HNRNPD	4q	82353.31	MEN1	11q	64803.51
318	34	FBXW11-PTEN	FBXW11	5q	171861.55	PTEN	10q	87863.44
319	34	PIK3CB-PTEN	PIK3CB	3q	138652.7	PTEN	10q	87863.44
320	34	BRAF-PTEN	BRAF	7q	140732.56	PTEN	10q	87863.44
321	35	SNRPB2-BRCA1	SNRPB2	20p	16729.96	BRCA1	17q	43044.3

322	35	SPDEF-BRCA1	SPDEF	6p	34537.8	BRCA1	17q	43044.3
323	36	PPP2R1A-CBL	PPP2R1A	19q	52189.8	CBL	11q	119206.28
324	36	WWTR1-CBL	WWTR1	3q	149517.23	CBL	11q	119206.28
325	37	DDX5-CHEK2	DDX5	17q	64498.25	CHEK2	22q	28687.74
326	37	ELMSAN1-CHEK2	ELMSAN1	14q	73715.12	CHEK2	22q	28687.74
327	38	PRIM1-FBXW7	PRIM1	12q	56731.58	FBXW7	4q	152321.26
328	38	GLE1-FBXW7	GLE1	9q	128504.69	FBXW7	4q	152321.26
329	39	GRPEL1-PIK3R1	GRPEL1	4p	7058.9	PIK3R1	5q	68288.42
330	39	RPL30-PIK3R1	RPL30	8q	98041.71	PIK3R1	5q	68288.42
331	40	ATP6AP1-TSC2	ATP6AP1	Xq	154428.63	TSC2	16p	2048.2
332	40	PCBP1-TSC2	PCBP1	2p	70087.45	TSC2	16p	2048.2
333	41	ARID1B-EPCAM	ARID1B	6q	156777.93	EPCAM	2p	47369.15
334	42	COPB2-FAT1	COPB2	3q	139357.59	FAT1	4q	186587.78
335	43	CDK6-RBM10	CDK6	7q	92604.92	RBM10	Xp	47145.22
336	44	ACTB-SRSF2	ACTB	7p	5527.15	SRSF2	17q	76734.12
337	45	AIFM1-VHL	AIFM1	Xq	130129.36	VHL	3p	10141.64

【０２７６】

（表４）（続き）

ID	ピアソン_r_CRISPR	P_値_CRISPR	P_調整済_BH_CRISPR	-Log(q値_CRISPR)
1	0.340726124	1.99E-18	5.92E-13	12.22762695
2	-0.305793654	5.66E-15	5.60E-10	9.251440728
3	0.27396377	3.32E-12	1.34E-07	6.87162696
4	0.234989116	2.82E-09	3.44E-05	4.462896383
5	0.228756095	7.48E-09	7.10E-05	4.149041515
6	0.210904485	1.05E-07	0.000538013	3.269207161
7	0.209356941	1.31E-07	0.000643521	3.191436961
8	0.208733417	1.43E-07	0.000690966	3.160543335
9	-0.206339433	1.99E-07	0.000887539	3.051812769
10	-0.203993771	2.75E-07	0.00112701	2.948072339
11	0.202346169	3.45E-07	0.00133491	2.874548035
12	-0.197292089	6.79E-07	0.002207088	2.656180337
13	0.194116561	1.03E-06	0.002989131	2.524455099
14	-0.187655319	2.36E-06	0.005369054	2.270102215
15	0.180687696	5.57E-06	0.009578729	2.018692132
16	0.178247872	7.48E-06	0.011710341	1.931430445
17	0.176929388	8.75E-06	0.013171258	1.880372733
18	0.176286784	9.44E-06	0.013794658	1.860289059
19	0.174614531	1.15E-05	0.015315092	1.814880377

20	0.171157318	1.72E-05	0.020065148	1.697557638
21	0.164890423	3.49E-05	0.030111185	1.521272146
22	0.162898546	4.34E-05	0.033484936	1.475150524
23	-0.162596654	4.49E-05	0.033946191	1.469208943
24	-0.160075116	5.90E-05	0.038803357	1.411130703
25	-0.153111717	0.000123173	0.0558895	1.252669778
26	-0.150663595	0.000158338	0.063585566	1.19664146
27	0.149893231	0.000171225	0.065909055	1.181054915
28	-0.149757362	0.000173597	0.066278305	1.17862861
29	-0.149376964	0.000180405	0.067365987	1.171559321
30	-0.149327564	0.000181307	0.067491181	1.170752973
31	0.147174361	0.000225004	0.074249801	1.129304704
32	0.146613055	0.000237918	0.076400157	1.116905747
33	0.146139025	0.000249361	0.078214533	1.106712546
34	0.145925843	0.000254674	0.079018575	1.102270806
35	0.144101709	0.000304658	0.085572462	1.067665974
36	-0.142871517	0.00034339	0.089394249	1.048690422
37	0.258367363	5.65E-11	1.80E-06	5.745594914
38	0.221394252	2.29E-08	0.000174104	3.759190459
39	0.217915015	3.82E-08	0.000257144	3.589824148
40	0.215224455	5.66E-08	0.000350145	3.455751742
41	-0.209518821	1.28E-07	0.000632522	3.19892406
42	0.203980137	2.76E-07	0.00112701	2.948072339
43	0.201893714	3.66E-07	0.001383346	2.859069235
44	-0.195401905	8.71E-07	0.002647674	2.577135452
45	-0.19459518	9.67E-07	0.002835971	2.547298194
46	-0.191201582	1.50E-06	0.003911158	2.407694637
47	-0.187288634	2.47E-06	0.005551501	2.255589542
48	-0.186802408	2.62E-06	0.005798314	2.23669828
49	-0.176363355	9.36E-06	0.013737736	1.862084824
50	0.175909043	9.87E-06	0.014111329	1.850432096
51	-0.170317659	1.89E-05	0.021258408	1.672469253
52	-0.168810217	2.25E-05	0.023550064	1.628007906
53	0.167386024	2.64E-05	0.025866861	1.58725627
54	-0.166836597	2.81E-05	0.027038191	1.568022374
55	0.163429558	4.10E-05	0.032661932	1.485958128
56	0.16304416	4.28E-05	0.033313781	1.477376068
57	-0.161644491	4.98E-05	0.035748532	1.446741792
58	-0.15871151	6.84E-05	0.041952128	1.377246006
59	0.158334082	7.12E-05	0.042684958	1.369725145
60	0.158250205	7.18E-05	0.042717413	1.369395061
61	-0.163812832	7.28E-05	0.042918696	1.367353485
62	-0.1544012	0.000107746	0.05243735	1.280359264
63	-0.151934777	0.000139046	0.059338738	1.226661696

64	-0.148537654	0.00019632	0.069920757	1.155393876
65	-0.147539457	0.00021696	0.072975081	1.136825417
66	-0.14378794	0.000314129	0.086449143	1.063239305
67	-0.143409255	0.000325926	0.087585801	1.057566296
68	0.142950342	0.000340776	0.089150727	1.049875111
69	0.23955577	1.36E-09	2.16E-05	4.665859599
70	0.235241822	2.71E-09	3.40E-05	4.468263709
71	0.219547514	3.01E-08	0.000212646	3.672342698
72	-0.214356129	6.41E-08	0.000381055	3.41901202
73	0.213481121	7.27E-08	0.00041075	3.38642225
74	0.213429156	7.33E-08	0.00041075	3.38642225
75	-0.207088933	1.80E-07	0.000820331	3.086011113
76	-0.201856373	3.68E-07	0.001384498	2.85870779
77	0.191230303	1.50E-06	0.0039082	2.40802321
78	0.173960745	1.24E-05	0.016196336	1.790583233
79	-0.173618932	1.29E-05	0.016636373	1.778941341
80	-0.167910294	2.49E-05	0.024819477	1.605207376
81	0.166536691	2.90E-05	0.027399758	1.562253279
82	-0.166108598	3.04E-05	0.028209598	1.549603109
83	-0.163970454	3.86E-05	0.031753502	1.498208373
84	-0.159237829	6.46E-05	0.040432188	1.393272751
85	-0.158258678	7.17E-05	0.042717413	1.369395061
86	-0.156020904	9.09E-05	0.048204501	1.31691241
87	0.151568607	0.000144364	0.060533916	1.21800123
88	-0.147110829	0.000226432	0.07440571	1.128393736
89	-0.147071185	0.000227328	0.074484938	1.127931539
90	-0.146714097	0.000235544	0.075856261	1.120008568
91	-0.146013043	0.000252488	0.078669132	1.104195639
92	-0.145408733	0.000268003	0.081417241	1.089283621
93	-0.145350942	0.000269532	0.081609605	1.088258724
94	0.14505219	0.00027757	0.082374561	1.084206887
95	0.254300945	1.15E-10	3.01E-06	5.521347953
96	0.242101744	3.40E-09	3.98E-05	4.39988336
97	-0.219949887	2.83E-08	0.000204984	3.688279312
98	0.197746325	6.39E-07	0.002124642	2.672714146
99	0.194172893	1.02E-06	0.002986733	2.524803581
100	0.181508696	5.04E-06	0.008991606	2.046162725
101	0.17632932	9.40E-06	0.013770521	1.861049622
102	-0.172650603	1.45E-05	0.017945124	1.746053527
103	-0.168784459	2.25E-05	0.023591235	1.627249318
104	-0.166618748	2.88E-05	0.027293367	1.563942886
105	-0.158264643	7.17E-05	0.042717413	1.369395061
106	0.148644696	0.000194219	0.069466009	1.15822765
107	0.146919977	0.000230773	0.075134643	1.12415977

108	0.145305451	0.000270742	0.081609605	1.088258724
109	-0.143582555	0.000320477	0.087008579	1.060437926
110	-0.141936834	0.000375838	0.093420328	1.029558613
111	0.258759599	2.42E-10	5.27E-06	5.278601277
112	0.24687396	4.06E-10	8.23E-06	5.08460256
113	-0.217847099	3.86E-08	0.000257144	3.589824148
114	0.204281277	2.65E-07	0.001101652	2.957955706
115	0.191945109	1.36E-06	0.003677361	2.434463771
116	0.177204544	8.47E-06	0.012855981	1.890894791
117	0.176075169	9.68E-06	0.014006565	1.853668345
118	-0.166671766	2.86E-05	0.02726982	1.56431773
119	-0.164975511	3.45E-05	0.03005907	1.522024458
120	-0.164812065	3.52E-05	0.030227537	1.519597241
121	0.164706677	3.56E-05	0.030407796	1.517015063
122	0.14931028	0.000181623	0.067491181	1.170752973
123	-0.144566069	0.00029113	0.084175004	1.074816853
124	-0.143865723	0.000311756	0.086172646	1.064630573
125	0.248195902	1.32E-09	2.14E-05	4.669375082
126	0.225097862	1.31E-08	0.000110109	3.958175272
127	0.214783921	6.03E-08	0.000363088	3.439988536
128	-0.20422229	2.67E-07	0.001105435	2.956466955
129	-0.204115694	2.71E-07	0.001116515	2.952135621
130	0.192399728	1.29E-06	0.00356051	2.448487801
131	0.174602916	1.15E-05	0.015315092	1.814880377
132	0.166430289	2.94E-05	0.027611112	1.558916095
133	0.162435282	4.57E-05	0.034245789	1.465392822
134	0.16104016	5.32E-05	0.036690038	1.43545184
135	0.159431533	6.33E-05	0.040078637	1.397087055
136	-0.153243719	0.000121503	0.055666925	1.254402772
137	0.140357842	0.000437227	0.099990678	1.000040488
138	-0.206217554	2.03E-07	0.000893715	3.048800898
139	0.185195339	3.20E-06	0.006735104	2.171655724
140	0.17776086	7.93E-06	0.012238845	1.912259566
141	-0.168891995	2.23E-05	0.023446144	1.629928564
142	0.17461963	2.31E-05	0.023887261	1.621833648
143	-0.16317412	4.21E-05	0.033117852	1.479937843
144	-0.161502476	5.06E-05	0.035937918	1.44444709
145	0.158332715	7.12E-05	0.042684958	1.369725145
146	-0.155236683	9.87E-05	0.050032369	1.300748934
147	-0.152053494	0.000137362	0.058876261	1.230059779
148	-0.149339214	0.000181094	0.067491181	1.170752973
149	0.14043608	0.000433978	0.099798795	1.000874701
150	0.270751511	3.21E-11	1.06E-06	5.974555014
151	0.241000426	1.07E-09	1.82E-05	4.740466478

152	0.23707364	2.02E-09	2.73E-05	4.56350689
153	0.225256459	1.28E-08	0.000109799	3.959403133
154	-0.21700415	4.37E-08	0.000284144	3.546460919
155	-0.200356238	4.51E-07	0.001611824	2.792682283
156	0.19400965	1.04E-06	0.003021194	2.519821458
157	0.176762888	8.92E-06	0.013366494	1.873982502
158	0.17481665	1.12E-05	0.015088425	1.821356084
159	-0.153896759	0.000113551	0.053565677	1.271113403
160	0.151960847	0.000138674	0.059253258	1.227287766
161	0.150564982	0.000159936	0.063938825	1.194235352
162	-0.186189555	2.83E-06	0.006183747	2.208748314
163	-0.183377635	4.01E-06	0.007772682	2.109429097
164	0.168254981	2.39E-05	0.024355222	1.613407902
165	-0.1639382	3.87E-05	0.031753502	1.498208373
166	0.153973922	0.000112644	0.053387093	1.272563724
167	-0.153706616	0.000115814	0.054085517	1.266919017
168	-0.151905957	0.000139458	0.059397336	1.226233036
169	-0.14795324	0.000208169	0.071899405	1.143274705
170	-0.143031198	0.000338115	0.088850176	1.051341706
171	-0.141830536	0.000379705	0.093883736	1.027409635
172	0.140717091	0.000422491	0.098556139	1.006316316
173	-0.208466886	1.48E-07	0.000709551	3.149016539
174	0.211914562	2.53E-07	0.001067476	2.971641685
175	0.190962189	1.55E-06	0.003974946	2.400668813
176	0.179211321	6.66E-06	0.010812097	1.966090057
177	-0.169875913	1.99E-05	0.022053505	1.656522383
178	0.166315334	2.98E-05	0.027851022	1.555158865
179	0.155693026	9.41E-05	0.048686467	1.312591742
180	0.154737769	0.000104029	0.051471962	1.288429274
181	0.151218011	0.000149634	0.061692389	1.209768411
182	-0.144978827	0.000279578	0.082603979	1.082999034
183	-0.147443206	0.000362726	0.091930524	1.036540264
184	-0.172495056	1.47E-05	0.018195619	1.740033169
185	-0.170746889	1.80E-05	0.02070813	1.68385911
186	-0.170475374	1.86E-05	0.021037121	1.677013694
187	-0.161458008	5.08E-05	0.035937918	1.44444709
188	-0.160714468	5.51E-05	0.037514103	1.425805431
189	-0.158411777	7.06E-05	0.042584214	1.370751366
190	0.146460459	0.000241547	0.077065583	1.113139534
191	-0.145314899	0.00027049	0.081609605	1.088258724
192	0.145086508	0.000276636	0.082340267	1.084387731
193	0.141609987	0.000387845	0.094811493	1.023139013
194	0.295115774	5.25E-14	3.90E-09	8.408780831
195	0.229871218	6.30E-09	6.28E-05	4.202144412

196	-0.187267361	2.47E-06	0.00555234	2.255523937
197	-0.178633887	7.14E-06	0.011389797	1.943484001
198	-0.170127828	1.93E-05	0.021620785	1.665128551
199	-0.160561255	5.60E-05	0.03788062	1.421582916
200	-0.157322302	7.93E-05	0.044559893	1.351055864
201	-0.151495802	0.000145444	0.060738836	1.216533532
202	0.144270108	0.000299685	0.08515673	1.069781023
203	-0.143356055	0.000327616	0.087784748	1.056580932
204	0.239058716	1.47E-09	2.24E-05	4.649005664
205	-0.219492479	3.03E-08	0.000212694	3.672244571
206	0.169730739	2.02E-05	0.022283325	1.652020005
207	-0.158831883	6.75E-05	0.041578975	1.381126216
208	0.156513288	8.63E-05	0.046971039	1.328169833
209	0.154986598	0.000101359	0.050828392	1.293893633
210	-0.153468077	0.000118714	0.054841751	1.260888687
211	-0.144147644	0.000303294	0.085462398	1.068224923
212	0.14346853	0.000324052	0.087451566	1.058232409
213	0.141771635	0.000381863	0.094052014	1.026631898
214	-0.184315477	3.57E-06	0.007201821	2.142557677
215	0.183230554	4.09E-06	0.007846354	2.105332106
216	-0.173819762	1.26E-05	0.016393215	1.785335865
217	0.164574287	3.61E-05	0.030562908	1.514805325
218	-0.149508334	0.000178026	0.066960003	1.174184534
219	-0.149260244	0.000182543	0.067578698	1.170190182
220	-0.148090075	0.000205336	0.071352844	1.146588713
221	-0.14640334	0.000242919	0.077309443	1.111767455
222	-0.142931589	0.000341396	0.089161847	1.049820945
223	-0.230570762	5.65E-09	5.92E-05	4.227429948
224	0.16293877	4.32E-05	0.033424313	1.475937507
225	0.158176564	7.24E-05	0.042853834	1.368010321
226	0.152220087	0.00013503	0.058269467	1.234558955
227	0.149686802	0.000174841	0.066536334	1.176941133
228	-0.146898473	0.000231267	0.075267972	1.123389785
229	0.143106233	0.000335662	0.088758902	1.051788078
230	0.143005818	0.000338948	0.088960902	1.050800823
231	0.238844	1.52E-09	2.24E-05	4.649005664
232	0.191753955	1.40E-06	0.003719351	2.429532849
233	-0.176898761	8.78E-06	0.01317475	1.880257629
234	0.173575175	1.30E-05	0.016673277	1.777979026
235	-0.1627599	4.41E-05	0.033706038	1.4722923
236	-0.157032706	8.17E-05	0.045302192	1.343880788
237	-0.155905494	9.20E-05	0.048345939	1.315639997
238	-0.143935738	0.000309634	0.085848399	1.066267801
239	-0.225178978	1.29E-08	0.000109799	3.959403133

240	-0.183085649	4.16E-06	0.007928647	2.100800908
241	-0.158346894	7.11E-05	0.042677868	1.369797288
242	-0.157803054	7.53E-05	0.043647918	1.360036468
243	-0.156395467	8.74E-05	0.047150032	1.326518011
244	-0.150240164	0.000165304	0.064805801	1.188386119
245	0.146785905	0.000233869	0.075426136	1.12247814
246	0.307341503	4.07E-15	4.53E-10	9.343890947
247	0.200762795	4.27E-07	0.001571833	2.803593646
248	-0.179139173	6.72E-06	0.010866736	1.963900874
249	0.165821995	3.14E-05	0.028675647	1.542486769
250	-0.159581124	6.23E-05	0.039891783	1.399116549
251	0.158578332	6.93E-05	0.042291523	1.37374667
252	0.14849055	0.000197251	0.070112263	1.154206013
253	0.303197223	9.81E-15	8.75E-10	9.058222606
254	-0.200096371	4.67E-07	0.001657624	2.780513967
255	0.199662186	4.95E-07	0.001729488	2.762082472
256	-0.151448197	0.000146154	0.060887589	1.21547122
257	0.148875976	0.000189752	0.068743127	1.162770717
258	-0.148263827	0.000201791	0.070961667	1.148976188
259	0.239795405	1.30E-09	2.14E-05	4.669375082
260	0.186244071	2.81E-06	0.006171054	2.209640626
261	0.150547892	0.000160214	0.063992678	1.193869715
262	-0.145151745	0.000274867	0.082137057	1.085460862
263	0.144221642	0.000301109	0.085339145	1.068851713
264	-0.143046023	0.000337629	0.088821686	1.051480986
265	0.221604878	6.77E-08	0.000394025	3.404475942
266	0.202622788	3.32E-07	0.001302636	2.885177059
267	0.154108739	0.000111076	0.053072744	1.275128458
268	-0.147129363	0.000373488	0.093095743	1.031070177
269	0.140532842	0.00042999	0.099293012	1.003081315
270	0.277109519	1.83E-12	8.59E-08	7.066103401
271	0.150686964	0.000157962	0.063491676	1.197283211
272	-0.148246638	0.000202139	0.07103052	1.148555008
273	-0.142993232	0.000339362	0.089021916	1.050503063
274	0.141362298	0.00039718	0.095604989	1.019519443
275	0.311407504	1.69E-15	2.51E-10	9.600252274
276	-0.211047103	1.03E-07	0.000533374	3.272968303
277	-0.190644758	1.61E-06	0.004092625	2.387997996
278	0.163513236	4.06E-05	0.032495278	1.488179741
279	0.162558639	4.51E-05	0.034029262	1.468147469
280	-0.178465591	7.29E-06	0.011469504	1.940455362
281	-0.160206236	5.82E-05	0.038715255	1.412117878
282	0.147007197	0.00022878	0.074731354	1.126497149
283	-0.141218936	0.000402679	0.096226753	1.016704171

284	0.141169901	0.000404576	0.096367902	1.016067595
285	-0.207645886	1.66E-07	0.000770957	3.112969926
286	0.206937034	1.83E-07	0.000833567	3.079059696
287	0.180975836	5.38E-06	0.009348363	2.029264414
288	0.144526534	0.000292259	0.084296193	1.074192038
289	-0.141689227	0.000384901	0.094513088	1.024508047
290	0.308346467	3.28E-15	4.17E-10	9.379592156
291	0.16875776	2.26E-05	0.023635024	1.626443943
292	0.155480748	9.62E-05	0.04937657	1.306479083
293	0.144150788	0.000303201	0.085462398	1.068224923
294	0.168869942	2.23E-05	0.023446144	1.629928564
295	-0.164925152	3.47E-05	0.03005907	1.522024458
296	0.158651962	6.88E-05	0.042133042	1.375377182
297	-0.158767293	0.000121501	0.055666925	1.254402772
298	0.196593802	7.44E-07	0.002377095	2.623953434
299	0.192083002	1.34E-06	0.003652269	2.437437295
300	-0.155138764	9.98E-05	0.050308831	1.298355772
301	0.158507534	0.000124694	0.056118853	1.250891212
302	0.229997444	6.18E-09	6.28E-05	4.202144412
303	-0.164066218	3.82E-05	0.031637721	1.499794809
304	0.15944999	6.32E-05	0.04002771	1.397639254
305	-0.144035603	0.000306631	0.085709109	1.066973021
306	0.283460558	5.39E-13	3.20E-08	7.494777984
307	0.148112879	0.000204867	0.071320175	1.146787599
308	-0.143640788	0.000318665	0.086869013	1.061135114
309	0.387646532	8.30E-24	7.39E-18	17.13108438
310	-0.155903482	9.21E-05	0.048345939	1.315639997
311	0.143118752	0.000335255	0.088701716	1.052067977
312	0.189164807	1.95E-06	0.004700855	2.327823177
313	0.158603858	6.91E-05	0.042250959	1.374163425
314	-0.155172344	9.94E-05	0.050233079	1.299010199
315	0.212579552	8.28E-08	0.000447019	3.349673672
316	0.184992989	3.29E-06	0.006826014	2.16583284
317	-0.15789999	7.45E-05	0.043499145	1.361519276
318	0.225451183	1.24E-08	0.000108452	3.964763339
319	0.159290966	6.42E-05	0.04028984	1.394804458
320	0.151941395	0.000138951	0.059329407	1.22672999
321	0.213004659	7.79E-08	0.000428436	3.368114206
322	0.166465419	2.93E-05	0.027531795	1.560165476
323	0.282334844	6.71E-13	3.63E-08	7.440443257
324	0.154679414	0.000104665	0.051569259	1.287609105
325	0.205030213	2.39E-07	0.001012836	2.994460739
326	0.140462297	0.000432894	0.09965242	1.001512148
327	-0.163383412	4.12E-05	0.032740241	1.484918128

328	-0.148287671	0.000201309	0.070876077	1.149500329
329	0.149773652	0.000173311	0.066254245	1.178786293
330	-0.141173214	0.000404447	0.096367902	1.016067595
331	0.17701165	1.78E-05	0.020522186	1.687776384
332	-0.141498912	0.000392006	0.09515622	1.021562819
333	0.171133689	1.72E-05	0.020067193	1.697513367
334	-0.146111188	0.000250049	0.078347513	1.105974785
335	0.163290175	4.16E-05	0.03293063	1.482399965
336	0.186144973	2.85E-06	0.006193548	2.208060526
337	0.247238709	1.54E-09	2.24E-05	4.649005664

【０２７７】

（表４）（続き）

ID	ピアソン_r_RNAi	P_値_RNAi	P_調整済_BH_RNAi	-Log(q値_RNAi)
1	0.146885577	0.000662059	0.062152192	1.206543553
2	-0.205170786	0.000577094	0.058355548	1.233917845
3	0.172047261	8.70E-05	0.022157456	1.654480104
4	0.166496317	0.000147199	0.029073964	1.536495751
5	0.171928581	7.51E-06	0.00536186	2.270684538
6	0.126772671	0.001015796	0.07693937	1.113851374
7	0.14281313	0.000210582	0.034793251	1.458504986
8	0.131250356	0.000653735	0.061785203	1.20911552
9	-0.136567235	0.000396624	0.048307035	1.315989617
10	-0.167797497	1.25E-05	0.00713101	2.146848976
11	0.12934233	0.000784205	0.06774776	1.169105057
12	-0.186764629	1.15E-06	0.001508484	2.821459367
13	0.130056475	0.000746363	0.066162071	1.179390908
14	-0.180867893	3.65E-05	0.013425679	1.872063727
15	0.171177441	9.46E-05	0.023242181	1.633723123
16	0.12350647	0.001370526	0.088453204	1.053286432
17	0.154118366	6.10E-05	0.018171137	1.740617897
18	-0.229382074	7.43E-06	0.005324801	2.273696627
19	0.259944736	8.57E-12	1.50E-07	6.824292619
20	0.156003591	0.000215998	0.035269649	1.452598864
21	0.123872918	0.001325697	0.087067268	1.060145084
22	0.169634044	0.000109585	0.025011635	1.60185792
23	-0.165209175	1.75E-05	0.008648353	2.063066567
24	-0.150306215	9.75E-05	0.023645144	1.626258031
25	-0.152770888	0.000281545	0.040344255	1.394218297
26	-0.171586685	4.61E-05	0.015266662	1.816255918
27	0.133710913	0.001444798	0.090741388	1.042194583
28	-0.134934131	0.000466016	0.052279018	1.281672576
29	0.136031113	0.000418265	0.049603949	1.304483748
30	-0.148915127	0.000109297	0.024993655	1.602170231

31	-0.167900206	1.31E-05	0.007339882	2.134310939
32	0.172188306	7.39E-06	0.005313421	2.274625756
33	0.125048412	0.001211339	0.083408359	1.078790426
34	0.139901318	0.000920862	0.073272717	1.135057705
35	0.199626987	0.000380194	0.047281588	1.325307943
36	-0.128810208	0.000824674	0.069420558	1.158511899
37	0.32823565	2.87E-18	2.62E-13	12.5821316
38	0.431394941	1.06E-31	4.37E-26	25.35913251
39	0.157022178	4.46E-05	0.014991312	1.824160363
40	0.136463427	0.000392749	0.048186635	1.317073399
41	-0.146130946	0.000148842	0.029187993	1.534795764
42	0.185014574	1.45E-06	0.001777244	2.750253057
43	0.127948526	0.000894327	0.07225136	1.141153976
44	-0.144816589	0.000170927	0.031129333	1.506830191
45	-0.248640663	6.95E-11	8.40E-07	6.075922048
46	-0.131995015	0.000620122	0.060278006	1.21984112
47	-0.138078033	0.001684108	0.09773713	1.009940419
48	-0.176529524	2.75E-05	0.011318856	1.946197484
49	-0.173019207	3.79E-05	0.013713391	1.862855153
50	0.125754725	0.001116025	0.08041676	1.094653431
51	-0.194365057	4.06E-07	0.000735919	3.133169752
52	-0.175828673	2.81E-05	0.011483339	1.939931807
53	-0.225515853	5.68E-05	0.017363395	1.760365348
54	-0.171893898	8.83E-05	0.022362355	1.650482453
55	0.140546839	0.000271486	0.039621431	1.402069845
56	0.141564056	0.000239507	0.037243267	1.428952226
57	-0.278736363	2.04E-11	2.95E-07	6.530699282
58	-0.144015164	0.000644635	0.061354157	1.212156004
59	0.166898358	1.47E-05	0.007817563	2.106928614
60	0.157262881	0.000250242	0.038064066	1.419484821
61	-0.137607611	0.000357576	0.045792584	1.33920485
62	-0.194801043	3.82E-07	0.000704886	3.15188108
63	-0.137732018	0.000353154	0.045438833	1.342572833
64	-0.17435937	5.73E-06	0.004521519	2.344715608
65	-0.240817874	2.62E-10	2.66E-06	5.575293109
66	-0.225729929	3.45E-09	2.01E-05	4.69611448
67	-0.246858064	1.65E-10	1.75E-06	5.756762992
68	-0.130005131	0.000763905	0.066882072	1.174690278
69	0.345057571	3.85E-20	1.06E-14	13.97646035
70	0.14236622	0.000215776	0.035251028	1.452828217
71	0.453005617	3.67E-35	3.01E-29	28.52074825
72	-0.148856036	0.000111309	0.025202078	1.598563652
73	0.13995921	0.000276248	0.039947536	1.398510005
74	0.145061401	0.000164721	0.030600196	1.514275795

75	-0.239371332	3.58E-10	3.51E-06	5.455264699
76	-0.147330357	0.000131055	0.027442011	1.561584068
77	0.13598122	0.000420334	0.049686523	1.30376139
78	0.157105637	4.48E-05	0.015006243	1.82372802
79	-0.28133337	1.31E-11	2.03E-07	6.693511957
80	-0.172334925	7.37E-06	0.005312442	2.274705822
81	0.130037733	0.000747693	0.066229879	1.178946035
82	-0.148559644	0.000114911	0.025594478	1.591853725
83	-0.183126962	1.34E-05	0.007435432	2.128693784
84	-0.168523409	1.18E-05	0.006890666	2.161738822
85	-0.191470189	1.21E-05	0.007012268	2.154141475
86	-0.132688495	0.000574492	0.058200843	1.235070725
87	0.160500943	3.12E-05	0.012167657	1.91479305
88	-0.214303305	2.12E-08	8.50E-05	4.070747359
89	-0.234819265	7.38E-10	6.19E-06	5.208260716
90	-0.274402689	1.00E-12	2.22E-08	7.653648154
91	-0.146643759	0.000844289	0.070213528	1.153579207
92	-0.19289561	0.000600699	0.05934231	1.226635554
93	-0.196565997	2.86E-07	0.000569012	3.244878632
94	0.132413063	0.001720513	0.098833942	1.005093883
95	0.13525022	0.000451761	0.051490256	1.288274949
96	0.167009808	1.45E-05	0.007778483	2.109105086
97	-0.158216233	4.05E-05	0.01421938	1.847119343
98	0.135633505	0.00043502	0.050603598	1.295818604
99	0.211440243	3.37E-08	0.000117706	3.929201265
100	0.145210865	0.000160326	0.03032331	1.518223387
101	0.131684552	0.000632928	0.060796236	1.21612331
102	-0.126622974	0.001012164	0.076809373	1.114585779
103	0.183858199	0.001084371	0.079438585	1.099968499
104	-0.168021158	1.61E-05	0.008215311	2.085376013
105	-0.160599037	3.00E-05	0.011906785	1.924205496
106	0.133155022	0.000554376	0.057195937	1.242634823
107	0.146387283	0.00014486	0.02884857	1.539875713
108	0.125045205	0.001191198	0.082851418	1.081700055
109	-0.184022905	0.001073016	0.079028895	1.10221409
110	-0.143053188	0.000906088	0.072788837	1.137935222
111	0.186612476	1.22E-06	0.001574654	2.802814793
112	0.140488413	0.000267356	0.039386899	1.404648215
113	-0.164621893	1.93E-05	0.009120928	2.039960964
114	0.128609726	0.000855666	0.070695423	1.150608701
115	0.213475821	2.47E-08	9.56E-05	4.019589456
116	0.12315717	0.001391297	0.089080613	1.050216805
117	0.149988083	9.62E-05	0.023452465	1.629811498
118	-0.137485497	0.000354654	0.045546212	1.341547738

119	-0.153135206	6.98E-05	0.019644879	1.706750637
120	-0.149230794	0.00013097	0.02743129	1.561753774
121	0.124040773	0.001294696	0.086019109	1.06540506
122	0.149308419	0.000106016	0.024633893	1.608466948
123	-0.18384364	0.00108538	0.079473139	1.099779633
124	-0.143373602	0.000882027	0.071712598	1.144404541
125	0.149526781	0.000106057	0.024633893	1.608466948
126	0.14936757	0.000102853	0.024284632	1.614668478
127	0.154592369	5.94E-05	0.017907637	1.746961729
128	-0.181416915	2.41E-06	0.002517691	2.598997539
129	0.202782649	0.000305227	0.042128787	1.37542105
130	0.209944639	4.22E-08	0.00013492	3.869922583
131	0.194407816	4.03E-07	0.000734785	3.13383944
132	0.140093681	0.000278314	0.040101323	1.396841296
133	0.137185062	0.000365478	0.046313755	1.334290004
134	0.126782996	0.001014824	0.076921857	1.113950241
135	0.151900648	0.000316908	0.042926232	1.367277233
136	-0.157468157	5.38E-05	0.016823893	1.774073505
137	0.144831245	0.000170665	0.031117098	1.507000908
138	-0.210225615	4.05E-08	0.000131963	3.879546537
139	0.127130423	0.000982593	0.075662392	1.121119935
140	0.174446378	5.67E-06	0.004489765	2.347776389
141	-0.127505505	0.00094886	0.074354064	1.128695291
142	0.145483026	0.000159371	0.030200315	1.519988533
143	-0.160033834	3.21E-05	0.012335544	1.908841686
144	-0.143383896	0.000630074	0.060639385	1.217245212
145	0.125532678	0.001139067	0.081109687	1.090927275
146	-0.186266398	1.27E-06	0.001621798	2.790003196
147	-0.134085952	0.000506365	0.054569677	1.263048614
148	-0.15996082	0.00014789	0.029115963	1.535868836
149	0.129492021	0.00078737	0.067862243	1.168371791
150	0.178807116	3.37E-06	0.003177062	2.497974317
151	0.121903039	0.001583559	0.094751243	1.023415086
152	0.168435089	1.15E-05	0.006804692	2.167191557
153	0.153994332	6.35E-05	0.018548728	1.731685878
154	0.188417189	0.000807652	0.068643441	1.163400952
155	-0.18317727	1.91E-06	0.002136991	2.670197367
156	0.229195222	2.01E-09	1.31E-05	4.882665718
157	0.138835268	0.000316118	0.042873704	1.367808992
158	0.172682922	7.06E-06	0.005142361	2.28883743
159	-0.168736817	1.48E-05	0.007838531	2.105765317
160	0.12129975	0.001644588	0.096589739	1.015069008
161	0.129215732	0.000793663	0.068114011	1.166763545
162	0.204811597	9.08E-08	0.000246944	3.607402189

163	-0.143511377	0.00065151	0.061693677	1.209759348
164	0.18691761	1.12E-06	0.001489772	2.826880312
165	0.321267839	7.90E-14	2.82E-09	8.549472545
166	0.131001933	0.000694905	0.063896051	1.194525979
167	-0.135785552	0.00042854	0.050238914	1.298959759
168	-0.225512893	3.68E-09	2.07E-05	4.684241088
169	-0.18314228	1.86E-06	0.002098925	2.678003108
170	-0.200750977	1.71E-07	0.000402867	3.394838118
171	-0.124957336	0.001200826	0.083129684	1.08024387
172	0.225991168	5.47E-05	0.016965286	1.770438825
173	-0.162468398	2.38E-05	0.010418328	1.982201973
174	0.290017777	1.76E-07	0.000406712	3.390713341
175	0.127723184	0.000929777	0.073606324	1.13308487
176	0.120634131	0.001745212	0.09942708	1.002495317
177	-0.15062837	9.42E-05	0.023176082	1.634959977
178	0.167633665	1.35E-05	0.007455552	2.127520193
179	-0.136270197	0.001251725	0.084799157	1.071608467
180	0.124378152	0.001287667	0.085799894	1.066513248
181	-0.154857366	5.77E-05	0.017572987	1.755154421
182	-0.142212478	0.000224057	0.035907636	1.444813191
183	-0.121450334	0.001648989	0.096758301	1.014311766
184	-0.164931119	1.81E-05	0.008799263	2.055553718
185	-0.137835315	0.001097578	0.079836667	1.097797602
186	-0.131482942	0.000651388	0.061693677	1.209759348
187	0.126008318	0.001080844	0.079335824	1.100530662
188	-0.157079483	4.61E-05	0.015265721	1.816282676
189	-0.160767283	2.94E-05	0.011786538	1.928613751
190	0.162050884	2.61E-05	0.01094119	1.960935426
191	-0.14294822	0.000707744	0.06455439	1.19007422
192	0.181261029	0.00127867	0.085577179	1.067642036
193	0.170481118	9.26E-06	0.006052306	2.21807914
194	0.258502679	1.21E-11	1.99E-07	6.702098059
195	0.276363757	3.41E-13	8.90E-09	8.05042931
196	-0.140435407	0.000268803	0.039433672	1.404132779
197	-0.209843425	4.09E-08	0.000132933	3.876367369
198	-0.173945211	6.23E-06	0.004708488	2.327118576
199	-0.131636054	0.000641889	0.061270203	1.212750678
200	-0.180331867	3.59E-06	0.003324837	2.478229647
201	-0.126103154	0.001099629	0.07989392	1.097486268
202	0.141777972	0.000234303	0.036829065	1.433809304
203	-0.160608898	3.08E-05	0.01206874	1.918338081
204	0.222992731	5.53E-09	2.93E-05	4.533215724
205	-0.273869484	6.53E-08	0.00019014	3.720927283
206	0.159660665	0.00027494	0.039870551	1.399347765

207	-0.165132024	1.74E-05	0.008628216	2.064079016
208	0.163982534	2.02E-05	0.009368586	2.028325949
209	0.197224104	6.51E-06	0.004855894	2.313730788
210	-0.169574242	1.02E-05	0.006342314	2.197752276
211	-0.166725193	7.58E-05	0.020543806	1.687319098
212	0.134489089	0.000482058	0.053193049	1.274145113
213	0.15715858	4.57E-05	0.015195022	1.818298662
214	-0.15995683	0.000141963	0.028601455	1.543611871
215	0.148480994	0.000118658	0.026023936	1.584627011
216	0.214505686	2.10E-08	8.50E-05	4.070747359
217	0.186325283	1.22E-06	0.001574683	2.802806951
218	-0.122001503	0.001569647	0.09437397	1.025147777
219	-0.142930829	0.000208033	0.034601574	1.460904141
220	-0.165820261	0.000156754	0.029917649	1.524072536
221	-0.135628235	0.000435246	0.050603598	1.295818604
222	-0.229239371	1.99E-09	1.31E-05	4.882665718
223	-0.137962807	0.001085826	0.07947435	1.099773013
224	0.143599349	0.00019409	0.033295416	1.477615551
225	0.130035406	0.000734251	0.065690775	1.182495612
226	0.163704637	2.15E-05	0.009739927	2.01144429
227	0.189917314	7.78E-07	0.001160774	2.935252452
228	0.166724498	0.0001441	0.028775537	1.540976569
229	0.154249695	0.000443038	0.051032678	1.292151638
230	0.170518213	0.000100746	0.024042734	1.619016145
231	0.219468104	9.69E-09	4.63E-05	4.334365319
232	0.139276861	0.000308729	0.042405475	1.372578069
233	0.195281623	8.05E-06	0.005549064	2.255780256
234	0.139000319	0.000304489	0.042062243	1.376107569
235	-0.141201788	0.000243288	0.037533044	1.425586208
236	0.150552277	0.000345759	0.044909234	1.347664348
237	-0.1460043	0.000540698	0.05649081	1.248022199
238	-0.134317403	0.000504805	0.054518599	1.263455309
239	-0.162079407	2.46E-05	0.010595787	1.974866792
240	-0.164389629	9.58E-05	0.023418895	1.630433607
241	-0.188187514	9.48E-07	0.001335378	2.874395918
242	-0.219696821	9.35E-09	4.50E-05	4.346903561
243	-0.196326585	0.000476672	0.052920075	1.276379546
244	-0.135084996	0.000450188	0.051423668	1.288836951
245	0.155825859	5.31E-05	0.016698409	1.777324909
246	0.212014567	3.08E-08	0.000110192	3.957848508
247	0.17863675	3.24E-05	0.012434547	1.905370032
248	-0.164831934	1.80E-05	0.008792833	2.055871173
249	0.141404038	0.000243471	0.037539875	1.42550718
250	-0.146446403	0.000147309	0.029077374	1.536444819

251	0.148830526	0.000108996	0.024967314	1.602628175
252	0.144738245	0.000172336	0.031241269	1.505271334
253	0.260487808	8.31E-12	1.48E-07	6.828588142
254	-0.237172812	4.93E-10	4.51E-06	5.34629499
255	0.273606569	5.96E-13	1.48E-08	7.82881682
256	-0.129272694	0.00080386	0.068510528	1.164242685
257	-0.130197558	0.000736428	0.065792375	1.181824434
258	-0.152614229	7.58E-05	0.020543806	1.687319098
259	0.276903472	3.06E-13	8.67E-09	8.062140935
260	0.162849474	2.38E-05	0.010411441	1.982489148
261	0.164171325	1.98E-05	0.009257844	2.033490147
262	-0.140381951	0.000270271	0.039507293	1.403322732
263	0.21716391	1.39E-08	6.29E-05	4.201565083
264	-0.123458084	0.001365134	0.088286071	1.05410781
265	0.180822076	3.67E-05	0.013463783	1.870832884
266	0.177079665	4.06E-06	0.003598493	2.443879372
267	0.153364304	6.81E-05	0.01934571	1.713415316
268	-0.157585636	4.24E-05	0.014567987	1.836600443
269	0.124437687	0.001259245	0.085025059	1.070453058
270	0.203928714	1.03E-07	0.000272117	3.565243838
271	0.162244323	0.000163939	0.030558601	1.514866526
272	-0.124078691	0.001323181	0.087018039	1.06039071
273	-0.128509743	0.000856021	0.070695849	1.150606086
274	0.125679155	0.001104633	0.08005217	1.096626892
275	0.298178536	3.66E-15	1.67E-10	9.777069594
276	-0.195734205	3.22E-07	0.00061989	3.207685433
277	-0.156420377	4.84E-05	0.015787411	1.801689096
278	-0.204243608	2.97E-06	0.002891896	2.538817283
279	0.226756066	3.00E-09	1.80E-05	4.744696179
280	-0.213143812	2.72E-08	0.000101686	3.992737814
281	-0.19055326	5.82E-06	0.004542825	2.342674005
282	0.144618858	0.000997371	0.07637454	1.117051394
283	-0.149070977	0.000108764	0.024948874	1.602949057
284	0.130938489	0.000699119	0.064100446	1.19313895
285	-0.247014572	1.61E-10	1.74E-06	5.75935369
286	0.149340999	0.000103149	0.024287483	1.614617485
287	0.124512854	0.001250636	0.084771176	1.071751793
288	-0.157637852	0.000177642	0.031827504	1.497197416
289	-0.132737792	0.000577239	0.058357884	1.233900461
290	0.255082021	2.14E-11	3.03E-07	6.519258058
291	0.130069857	0.000745416	0.06613514	1.179567723
292	0.144894447	0.000975128	0.075399762	1.122630024
293	0.125892174	0.001083106	0.079402578	1.100165399
294	0.145716664	0.000155496	0.029782028	1.526045738

295	-0.214743903	2.03E-08	8.38E-05	4.07696038
296	0.123351551	0.001389893	0.089046265	1.050384293
297	-0.228620739	2.21E-09	1.39E-05	4.858331956
298	0.181692228	2.24E-06	0.002391393	2.621349022
299	0.144373702	0.000179037	0.031945157	1.495594973
300	-0.138929289	0.000313136	0.042698657	1.369585785
301	0.122393002	0.001515437	0.092688152	1.032975776
302	0.193226478	4.57E-07	0.000797523	3.098256702
303	-0.127029762	0.000991833	0.076085171	1.118699981
304	0.124411831	0.001262219	0.085101311	1.070063748
305	-0.132811708	0.000573126	0.058138132	1.235538924
306	0.151232116	8.60E-05	0.021996582	1.657644799
307	-0.140566189	0.000265245	0.039226751	1.406417662
308	-0.149246425	0.000104209	0.024380584	1.612955902
309	0.349042378	3.36E-16	2.12E-11	10.67350396
310	-0.12383057	0.001353286	0.087879541	1.056112221
311	0.158013714	4.15E-05	0.014413474	1.841231334
312	0.123959912	0.00129337	0.08597973	1.065603924
313	0.151202754	8.63E-05	0.022041807	1.656752797
314	-0.126327829	0.001058527	0.078501301	1.105123148
315	0.176560443	5.61E-05	0.017235731	1.76357028
316	0.15333247	0.000277527	0.040062009	1.397267276
317	-0.139793857	0.000293026	0.041170846	1.385410211
318	0.137188288	0.000372861	0.046788465	1.329861203
319	0.121420676	0.001640071	0.096460226	1.015651726
320	0.142182407	0.000219916	0.035500129	1.449770074
321	0.17052418	9.21E-06	0.006036554	2.219210932
322	0.164835457	0.000171719	0.031201848	1.505819684
323	0.306088916	5.62E-16	3.08E-11	10.5118654
324	0.123323462	0.001393432	0.089123821	1.0500062
325	0.238167148	4.41E-10	4.12E-06	5.385057427
326	0.188847764	0.001561292	0.094127425	1.026283824
327	-0.135048409	0.001743747	0.099404161	1.002595437
328	-0.159060971	0.000290088	0.040933129	1.387925053
329	0.192030541	0.000636378	0.061006337	1.214625049
330	-0.26661177	1.71E-06	0.00198434	2.702383912
331	0.147346344	0.000130832	0.027417186	1.561977121
332	-0.151141655	0.000578702	0.058386963	1.233684117
333	0.126273986	0.001063811	0.078683935	1.104113931
334	-0.123655379	0.001352143	0.087846989	1.056273118
335	0.151920662	7.79E-05	0.020827293	1.68136717
336	0.142680233	0.000211171	0.034841523	1.457902865
337	0.188366863	9.60E-07	0.001340589	2.872704397

【０２７８】

（表５）合成致死性分析において使用された50のヒト腫瘍抑制遺伝子のリスト。各腫瘍抑制因子に関して、10,712のTCGA Pan-Cancer Atlas（Taylor et al. Cancer Cell, 33 (4): 676-689, 2018）腫瘍患者試料にわたって、閾値処理されたコピー喪失の頻度が含まれている。

ヒト遺伝子	**Entrez ID**	染色体	キロベース	部分的な またはより強い 喪失を有する TCGA試料	ホモ接合性 喪失を有する TCGA試料
APC	324	5q22.2	112737.86	25.9%	0.80%
ATM	472	11q22.3	108223.53	26.0%	0.76%
BAP1	8314	3p21.1	52401	31.7%	0.72%
BCL2L11	10018	2q13	111120.91	9.2%	0.14%
BRCA1	672	17q21.31	43044.3	17.4%	0.29%
BRCA2	675	13q13.1	32315.48	31.0%	0.71%
BRIP1	83990	17q23.2	61679.19	11.0%	0.07%
CBL	867	11q23.3	119206.28	26.2%	0.59%
CDC73	79577	1q31.2	193121.96	6.2%	0.17%
CDH1	999	16q22.1	68737.29	27.3%	0.68%
CDKN1B	1027	12p13.1	12717.27	13.2%	0.58%
CDKN2A	1029	9p21.3	21967.75	38.9%	13.03%
CDKN2B	1030	9p21.3	22002.9	38.7%	12.56%
CHEK2	11200	22q12.1	28687.74	27.9%	0.38%
DICER1	23405	14q32.13	95086.23	24.5%	0.35%
DIS3	22894	13q21.33	72755.4	29.8%	0.74%
EPCAM	4072	2p21	47369.15	7.4%	0.08%
ERCC4	2072	16p13.12	13920.16	13.8%	0.02%
FAT1	2195	4q35.2	186587.78	31.7%	2.12%
FBXW7	55294	4q31.3	152321.26	29.4%	0.60%
KEAP1	9817	19p13.2	10486.12	18.1%	0.16%
KNSTRN	90417	15q15.1	40382.72	26.9%	0.68%
LATS2	26524	13q12.11	20973.04	30.0%	0.51%
MAP2K4	6416	17p12	12020.82	36.7%	1.05%
MDM4	4194	1q32.1	204516.38	5.6%	0.03%
MEF2B	4207	19p13.11	19145.57	15.4%	0.14%
MEN1	4221	11q13.1	64803.51	15.3%	0.10%
NF1	4763	17q11.2	31094.93	18.5%	1.05%
PBRM1	55193	3p21.1	52545.39	31.8%	0.66%
PDGFRB	5159	5q32	150113.84	22.4%	0.13%
PIK3R1	5295	5q13.1	68288.42	27.4%	0.81%
PMS1	5378	2q32.2	189784.09	10.4%	0.11%
PMS2	5395	7p22.1	5970.93	7.2%	0.16%
PPP6C	5537	9q33.3	125146.57	23.6%	0.14%
PTEN	5728	10q23.31	87863.44	31.5%	4.35%
PTPN11	5781	12q24.13	112418.9	13.1%	0.07%
PTPRD	5789	9p24.1-p23	8314.25	34.8%	3.85%
PTPRT	11122	20q12-q13.11	42072.75	4.4%	0.15%

RBM10	8241	Xp11.3	47145.22	19.2%	0.49%
RHOA	387	3p21.31	49359.14	31.6%	0.62%
RUNX1	861	21q22.12	34787.8	22.1%	0.50%
SETD2	29072	3p21.31	47016.41	31.3%	0.58%
SMAD4	4089	18q21.2	51030.21	33.2%	1.56%
SMARCA4	6597	19p13.2	10960.92	18.1%	0.31%
SRSF2	6427	17q25.1	76734.12	11.2%	0.09%
STK11	6794	19p13.3	1205.8	26.3%	0.77%
TP53	7157	17p13.1	7668.4	38.1%	1.17%
TSC1	7248	9q34.13	132891.35	24.4%	0.38%
TSC2	7249	16p13.3	2048.2	16.3%	0.22%
VHL	7428	3p25.3	10141.64	26.9%	0.30%

【０２７９】

その他の態様

上記の説明から、様々な用途および条件に採用するために本明細書に記載されている発明に対して変形および修正を施し得ることは明らかであろう。このような態様も、以下の特許請求の範囲の範囲内である。

【０２８０】

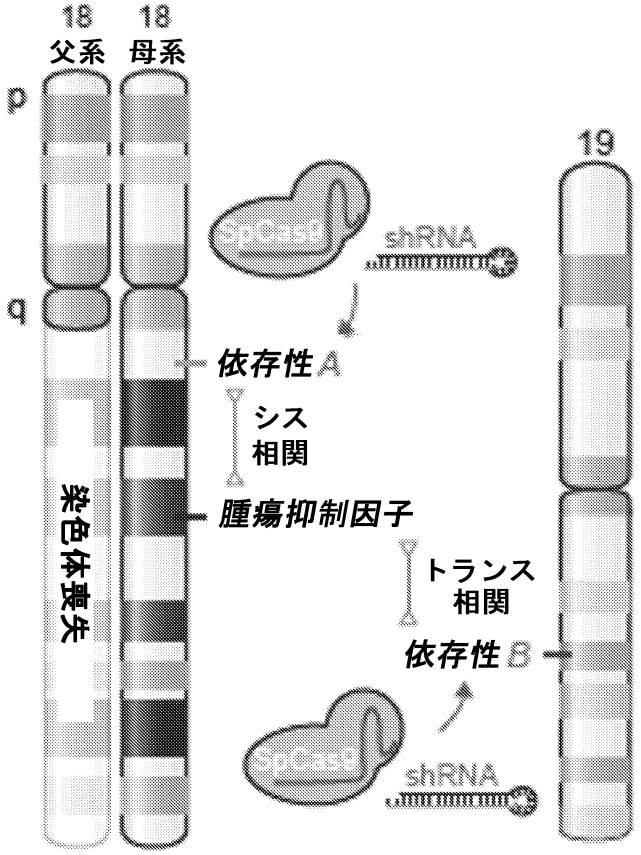
本明細書における変数の任意の定義における要素の一覧の記載は、任意の単一の要素または列挙された要素の組み合わせ（またはサブコンビネーション）としてのその変数の定義を含む。本明細書での態様の記載は、その態様を任意の単一の態様として含み、または任意の他の態様もしくはその一部と組み合わせて含む。

【０２８１】

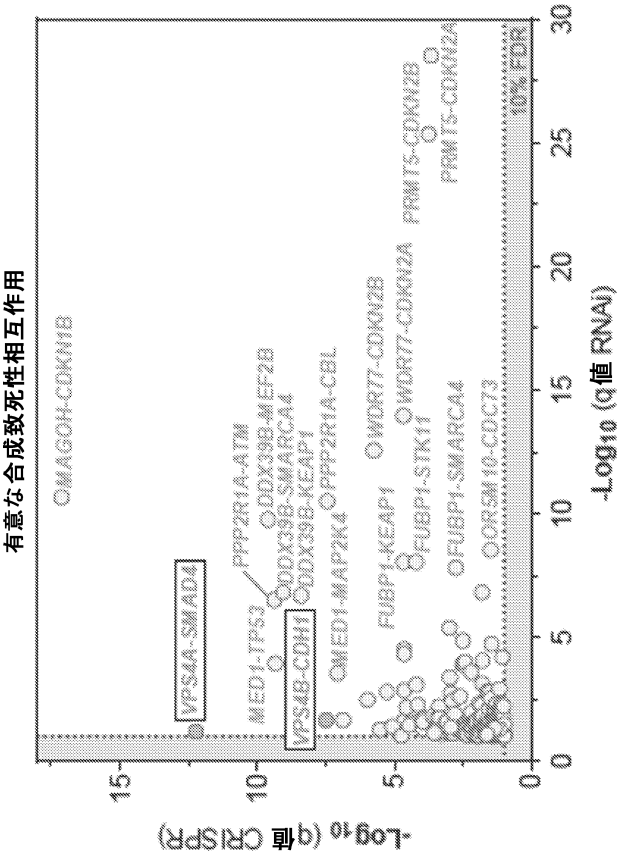
本明細書で言及されるすべての特許および刊行物は、あたかも各独立した特許および刊行物が参照により組み入れられることが具体的かつ個別的に示されているのと同程度に、参照により本明細書に組み入れられる。

【図面】

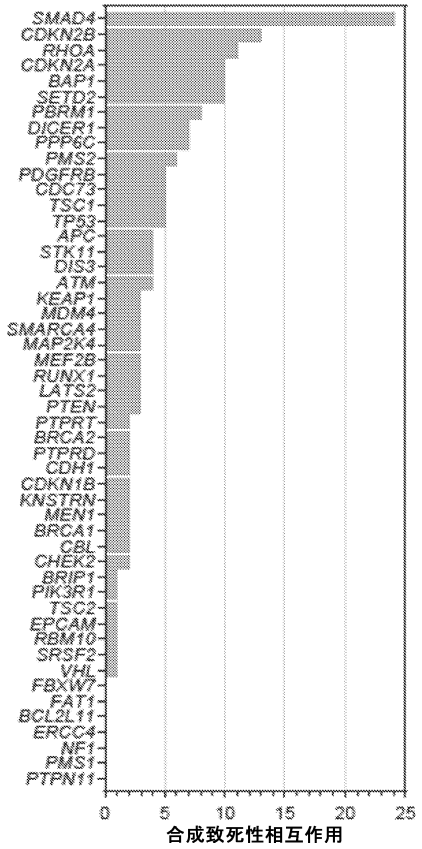
【図１Ａ】



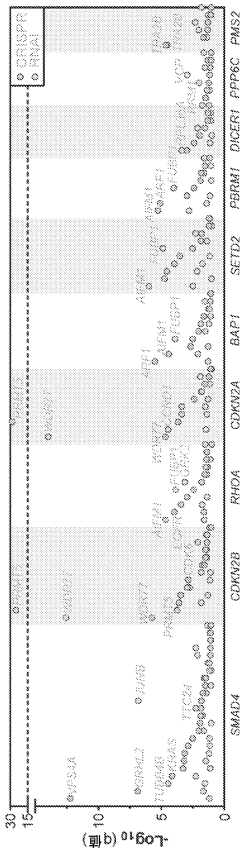
【図１Ｂ】



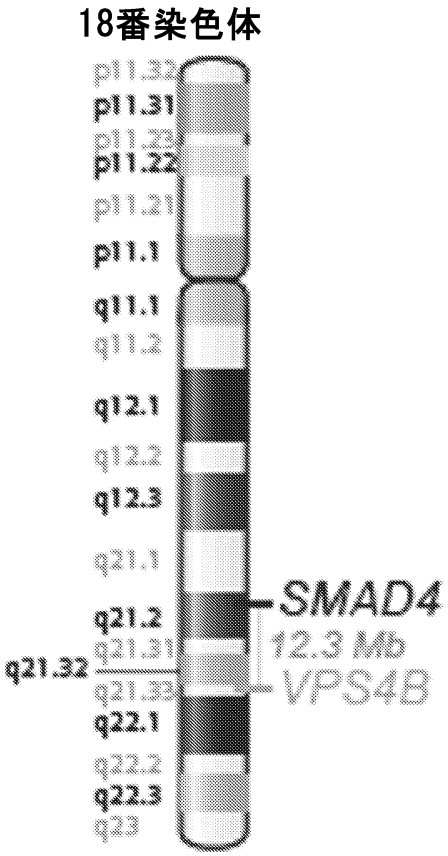
【図１Ｃ】



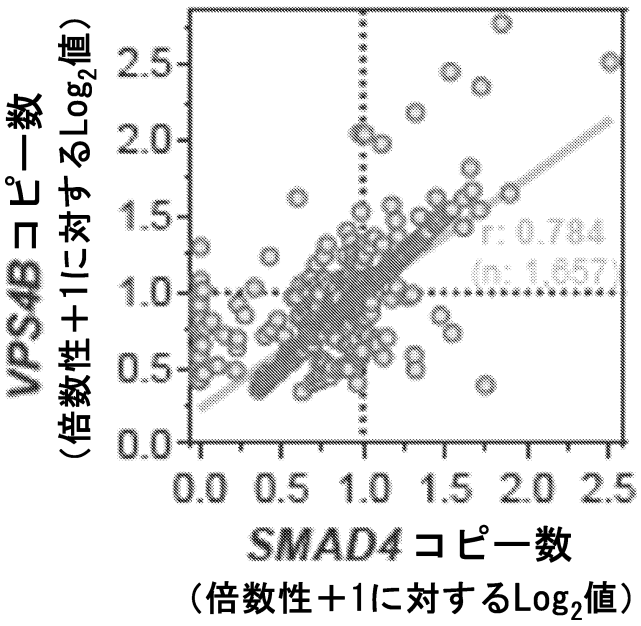
【図１Ｄ】



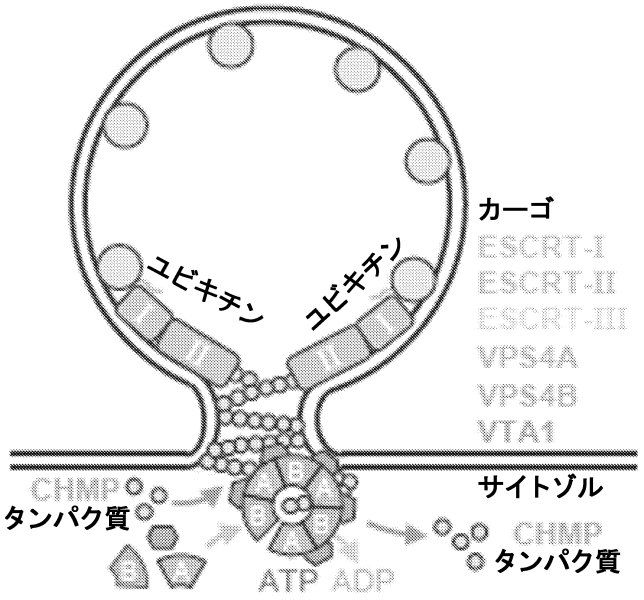
【図１Ｅ】



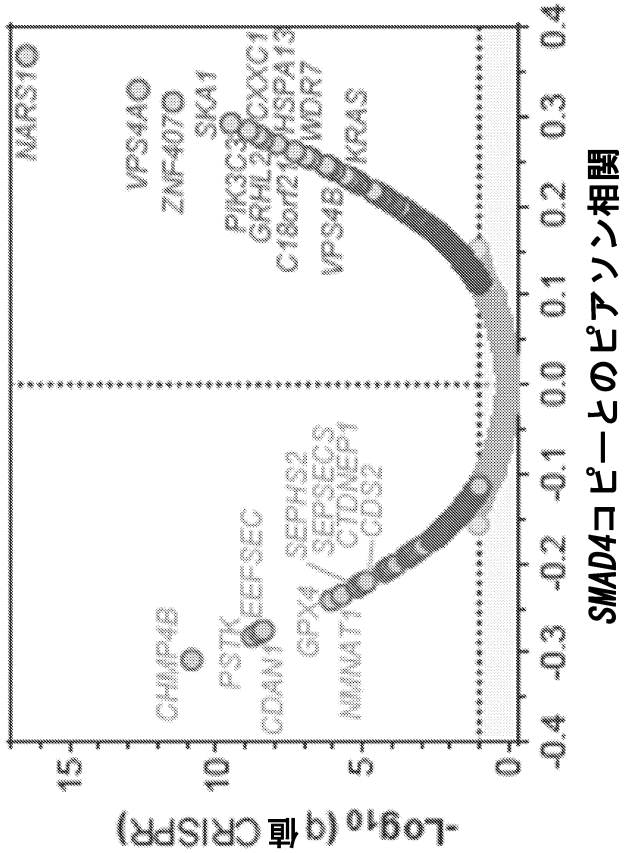
【図１Ｆ】



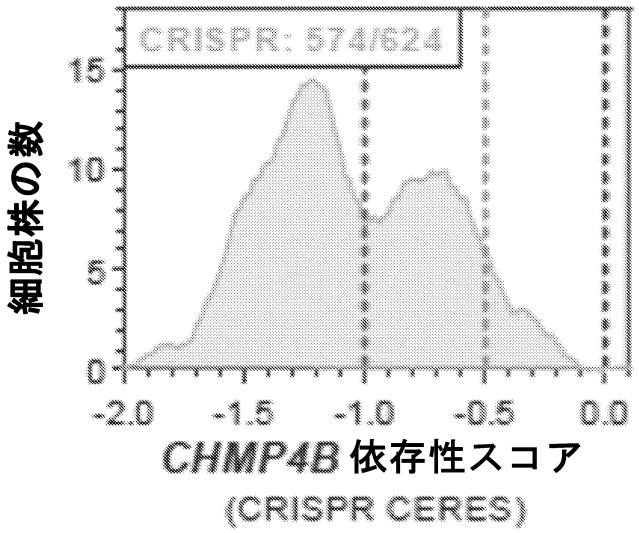
【図１Ｇ】



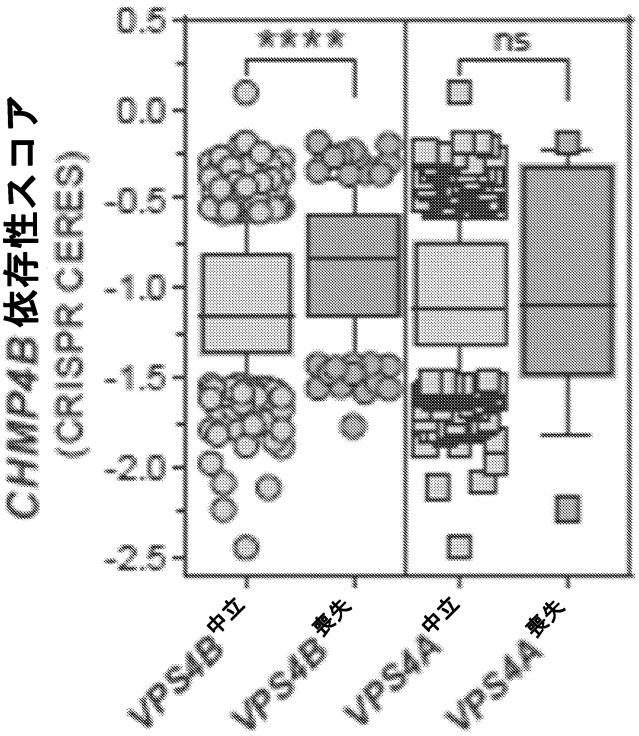
【図１Ｈ】



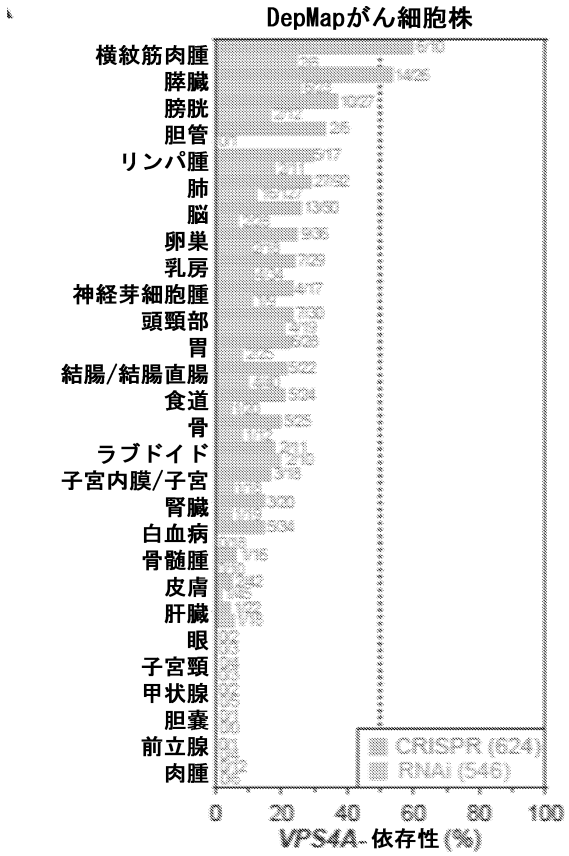
【図１Ｉ】



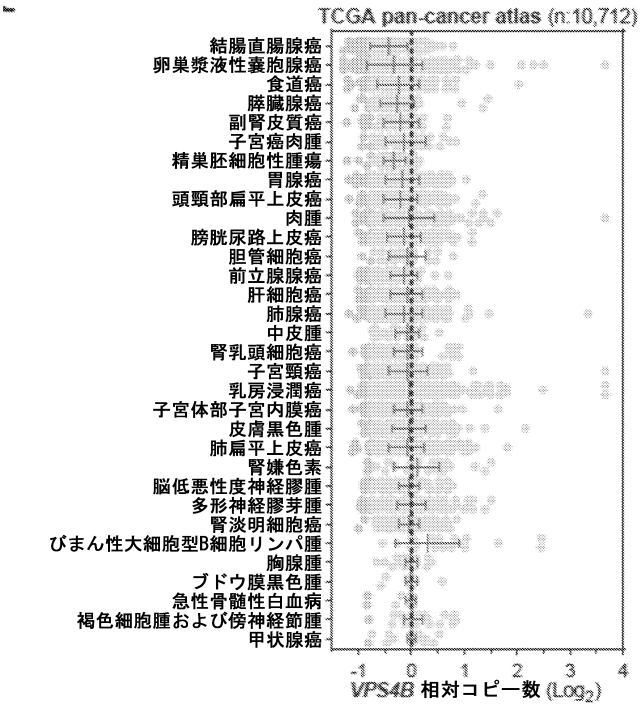
【図１Ｊ】



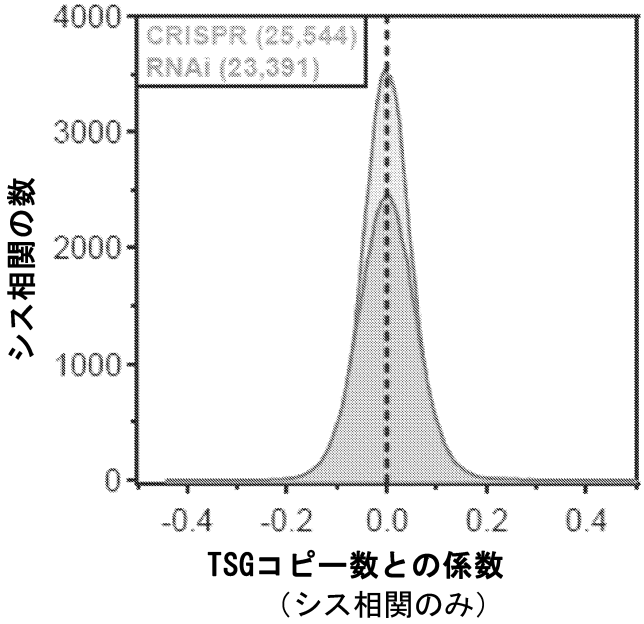
【図１Ｋ】



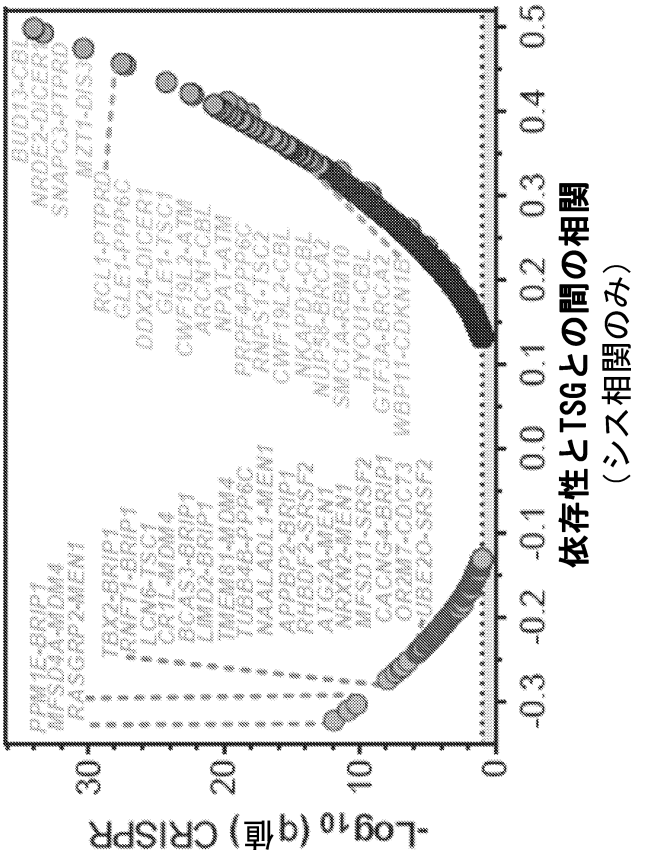
【図１Ｌ】



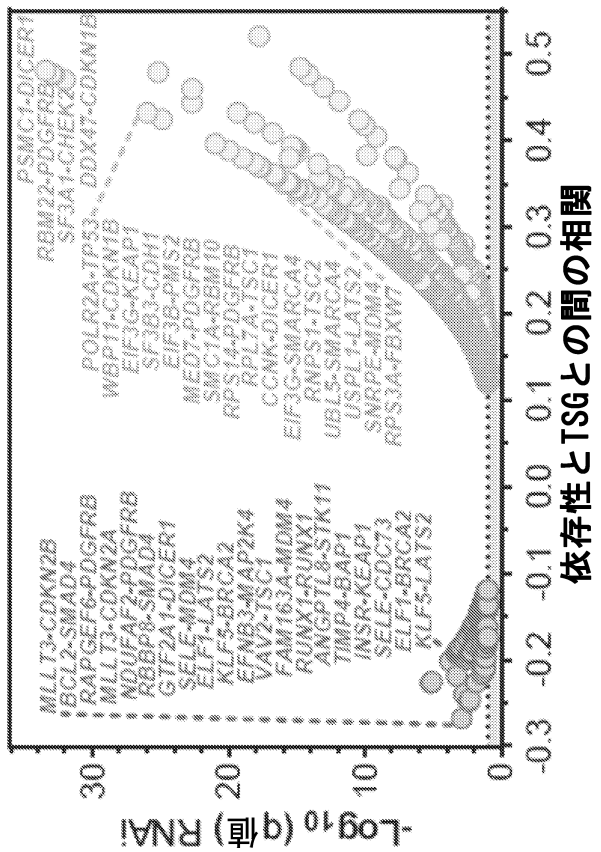
【図１．１Ａ】



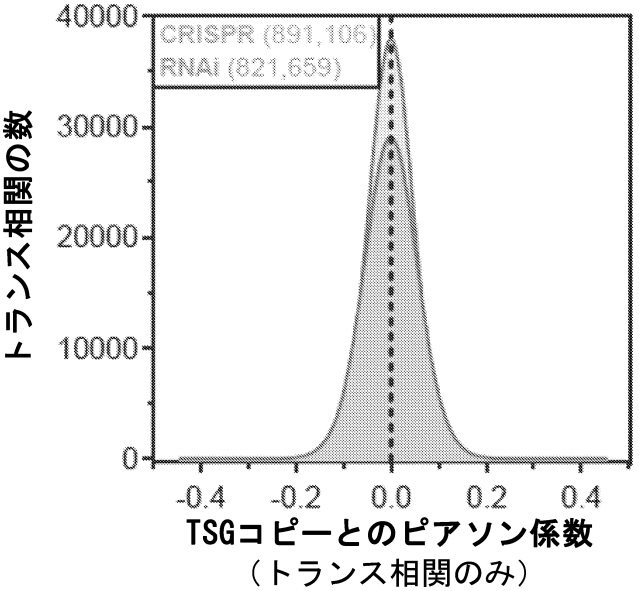
【図１．１Ｂ】



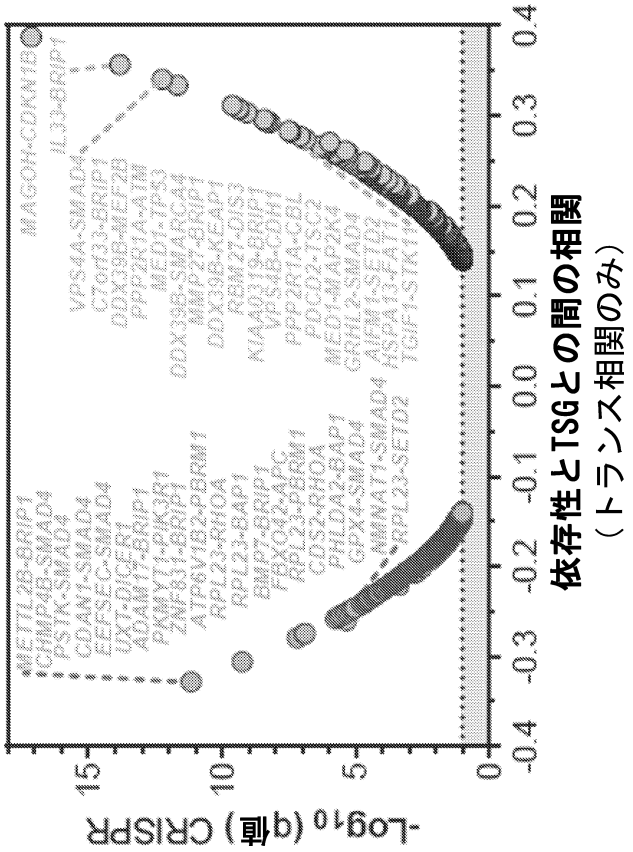
【図１．１Ｃ】



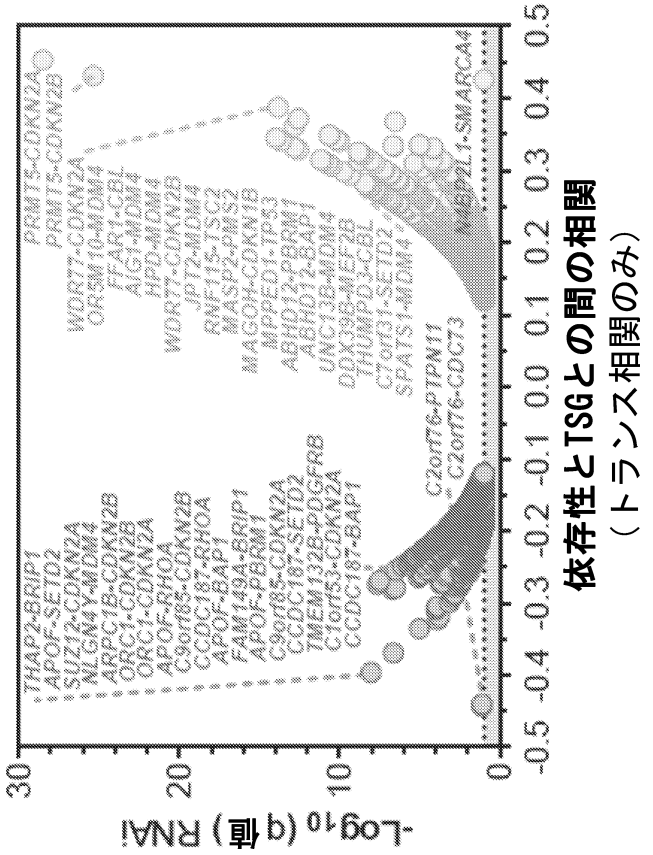
【図１．１Ｄ】



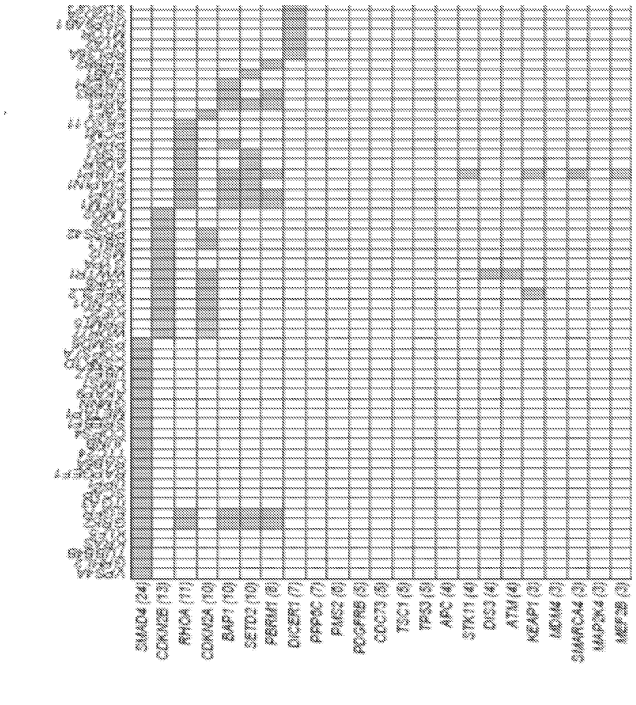
【図１．１Ｅ】



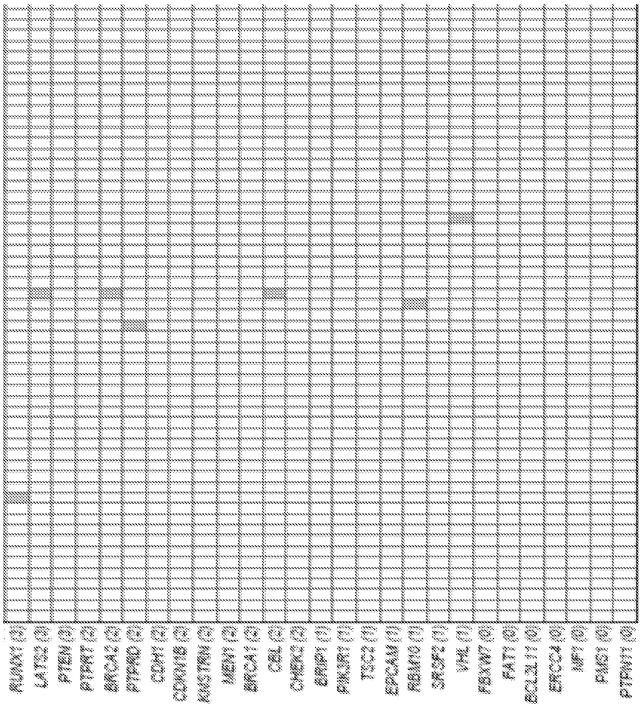
【図１．１Ｆ】



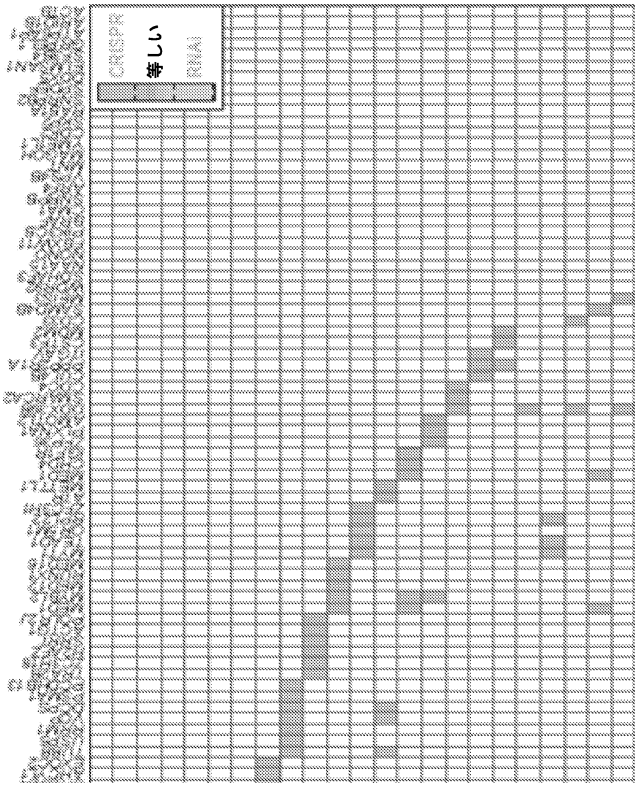
【図１．１Ｇ－１】



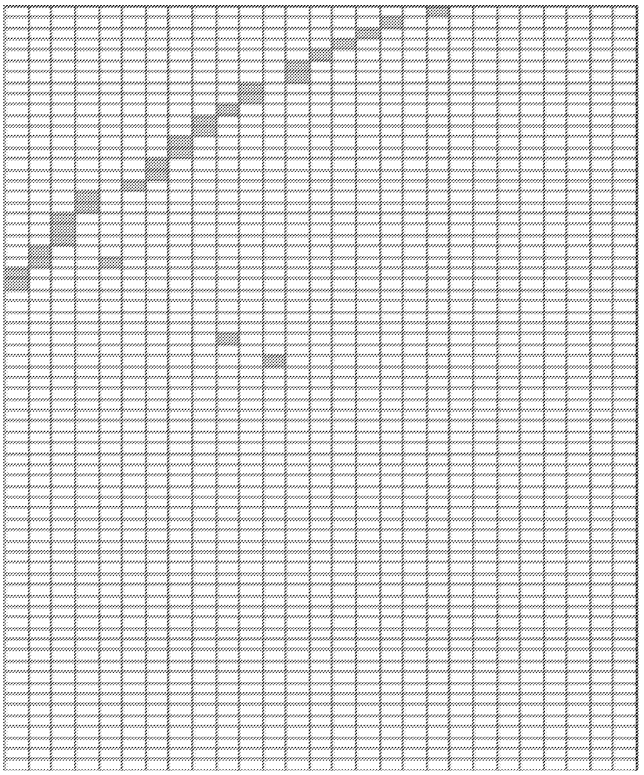
【図１．１Ｇ－２】



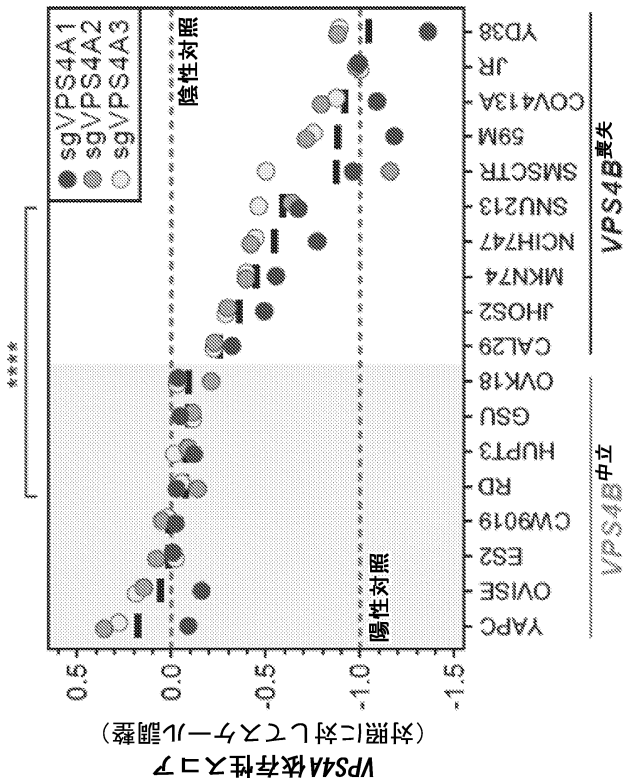
【図１．１Ｇ－３】



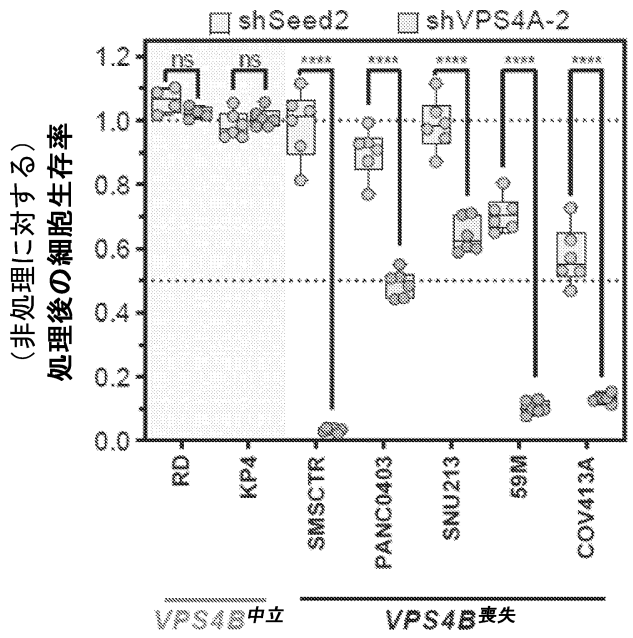
【図１．１Ｇ－４】



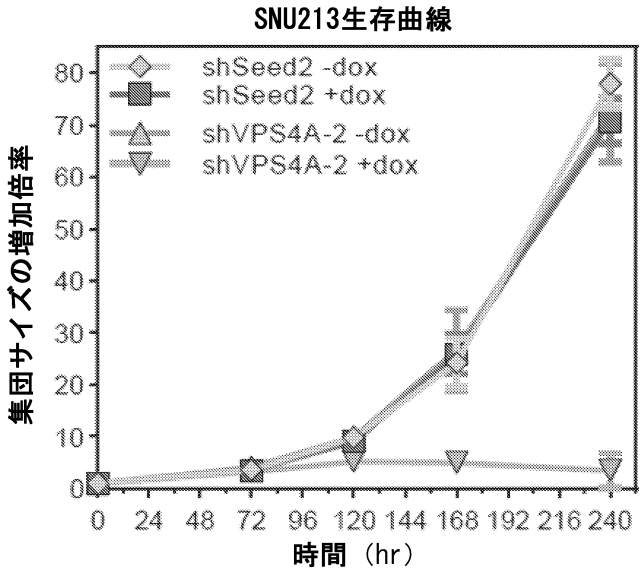
【図２Ａ】



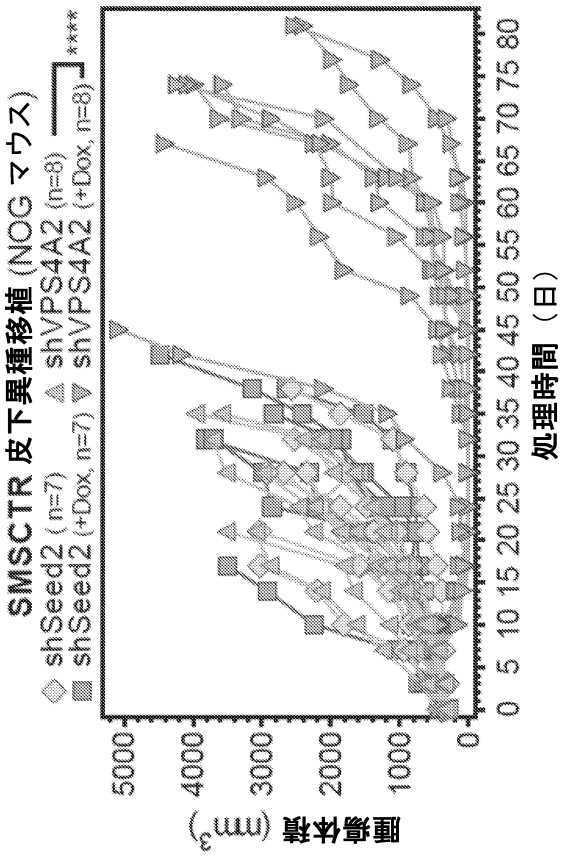
【図２Ｂ】



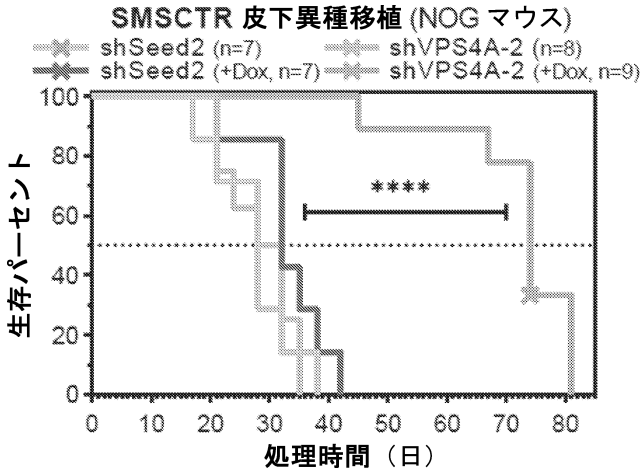
【図２Ｃ】



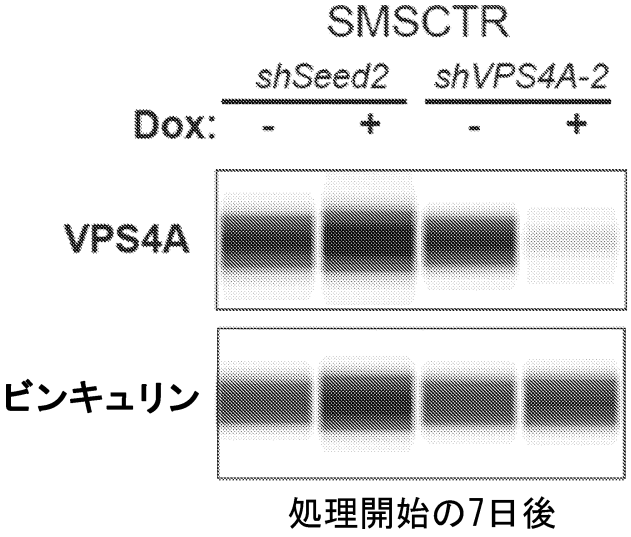
【図２Ｄ】



【図２Ｅ】

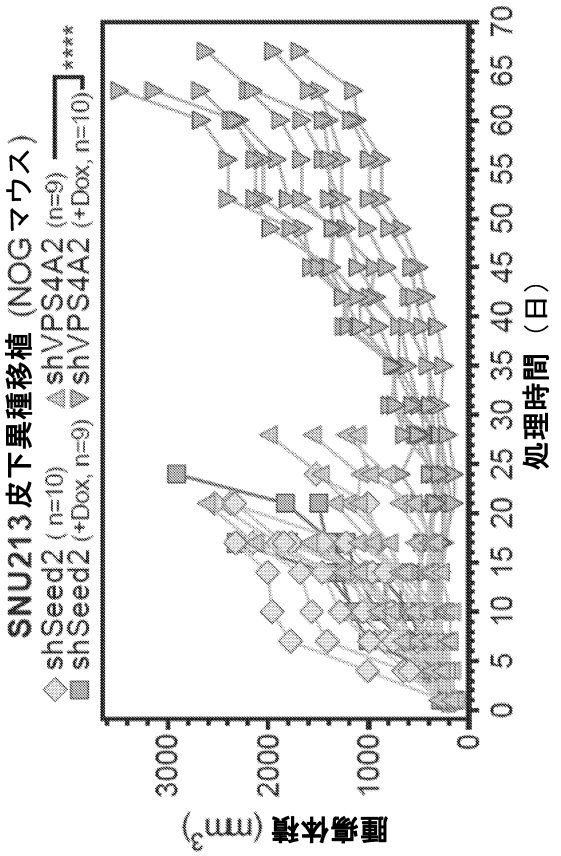


【図２Ｆ】

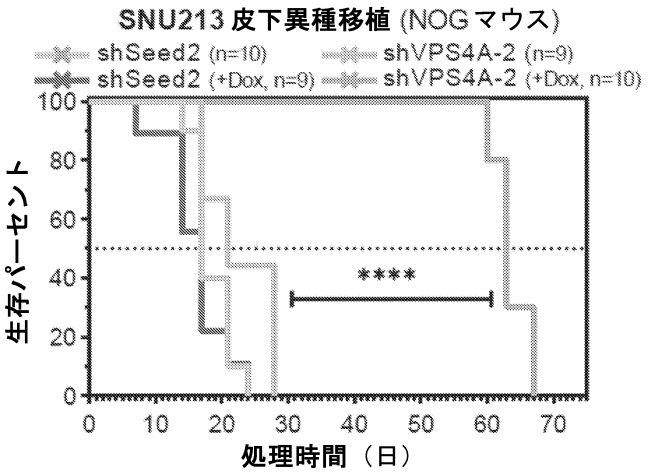


処理開始の7日後

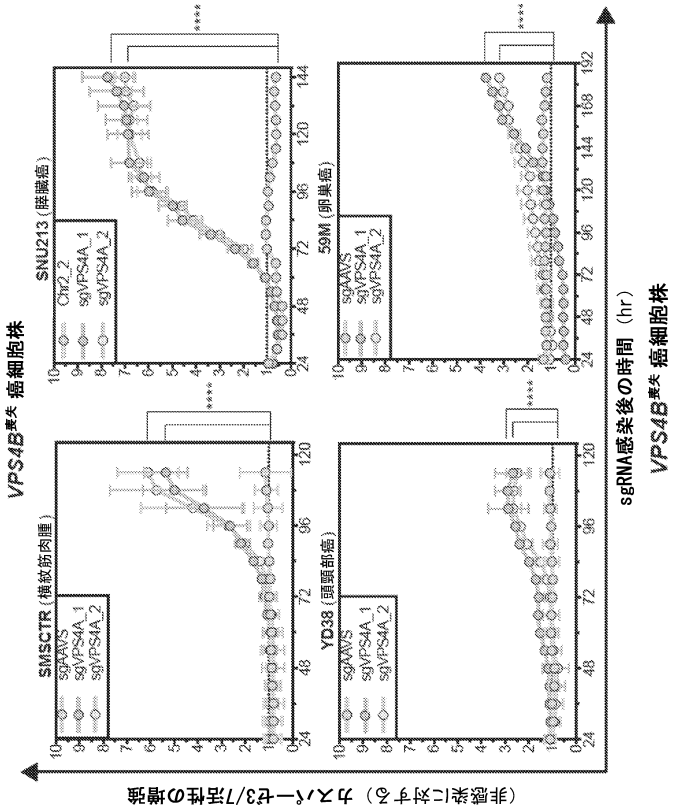
【図２Ｇ】



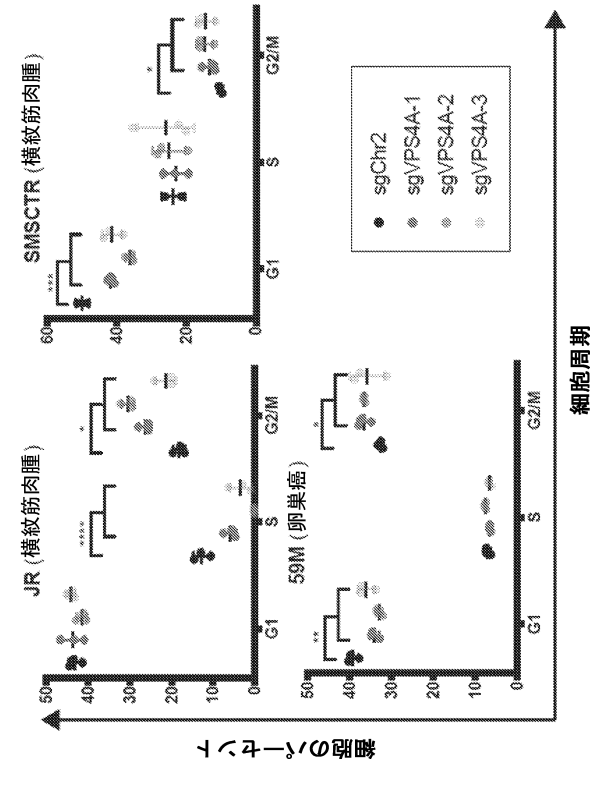
【図２Ｈ】



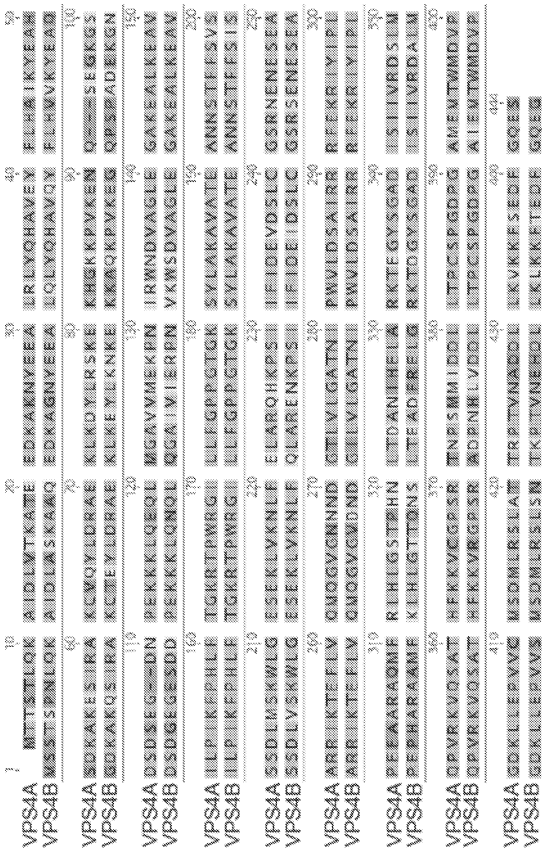
【図２Ｉ】



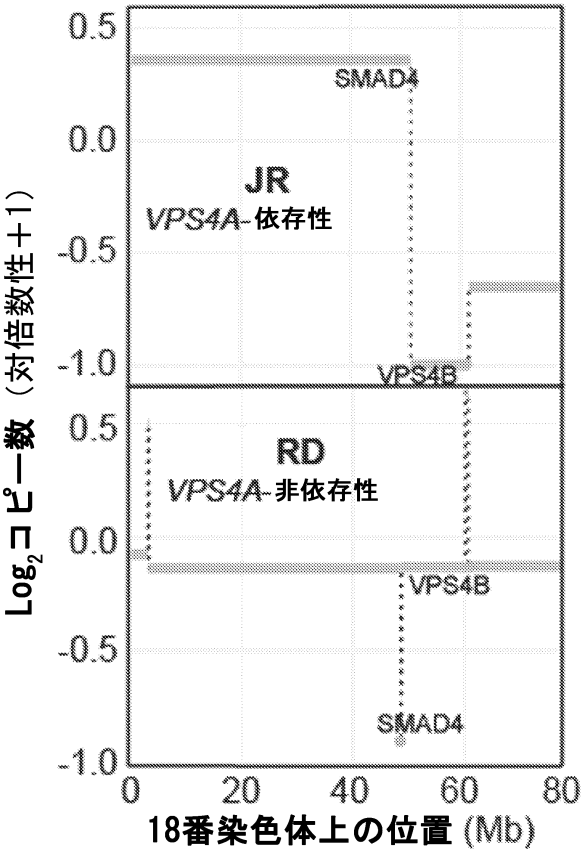
【図２Ｊ】



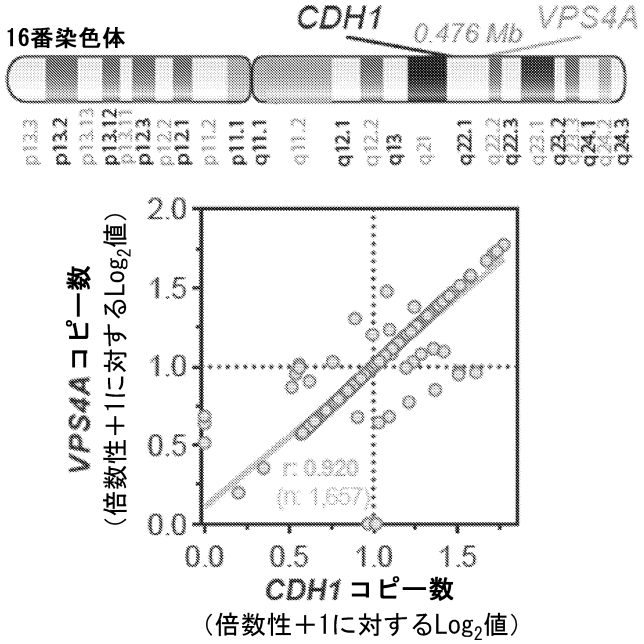
【図２．２Ａ】



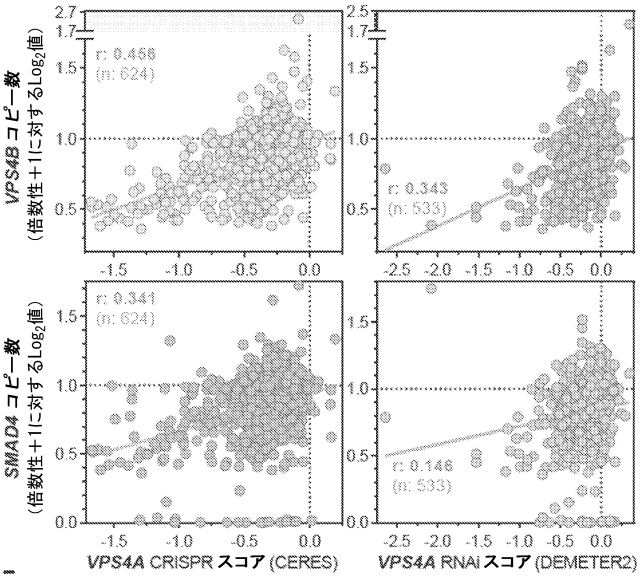
【図２．２Ｂ】



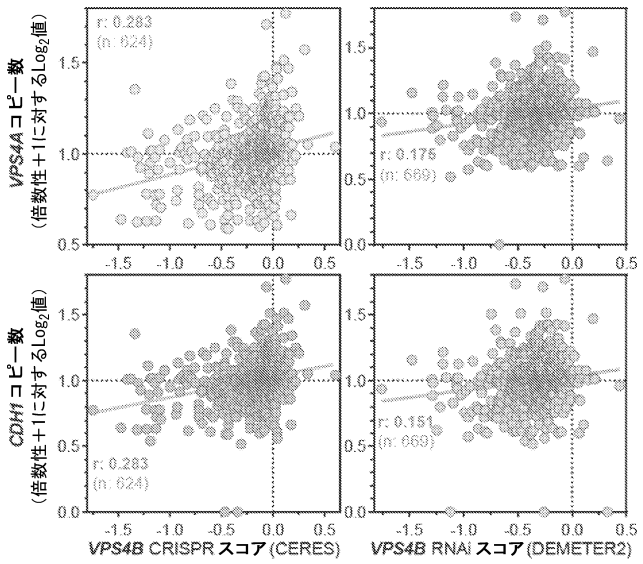
【図２．２Ｃ】



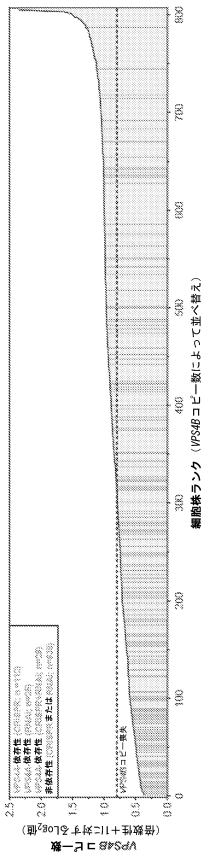
【図２．２Ｄ－１】



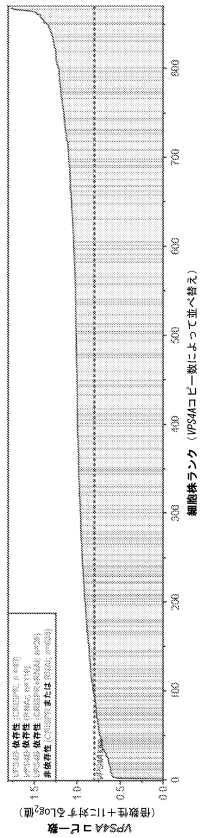
【図２．２Ｄ－２】



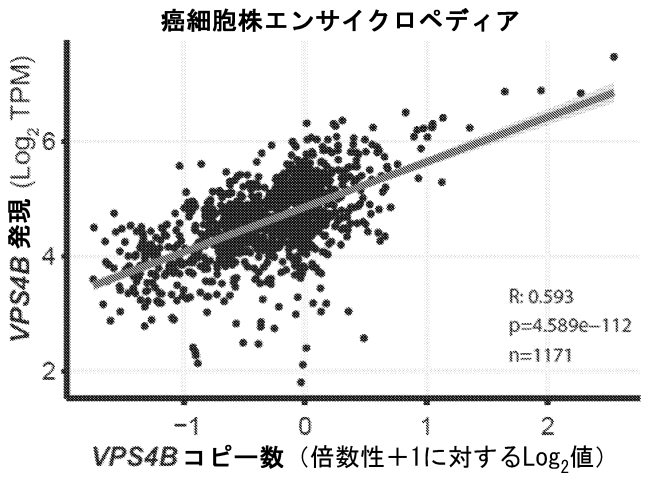
【図２．２Ｅ】



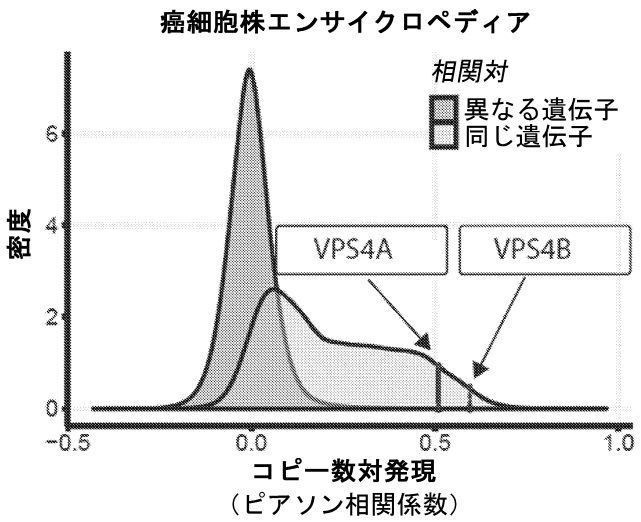
【図２．２Ｆ】



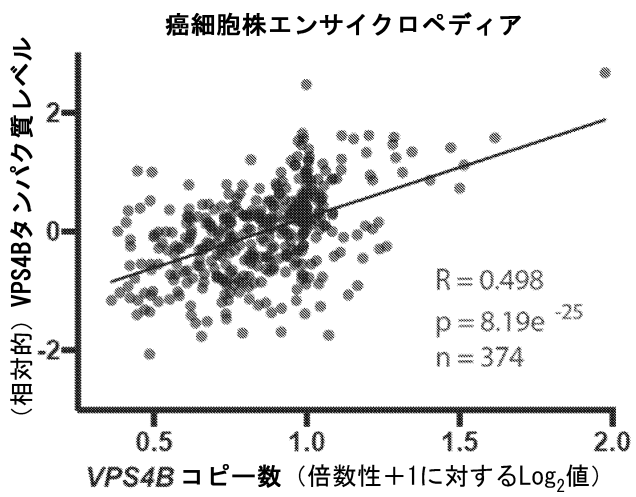
【図３Ａ】



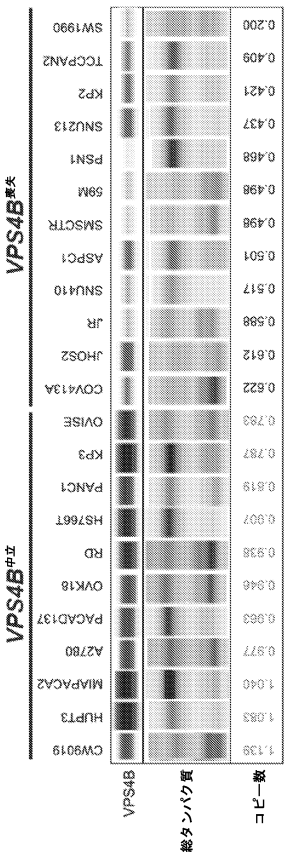
【図３Ｂ】



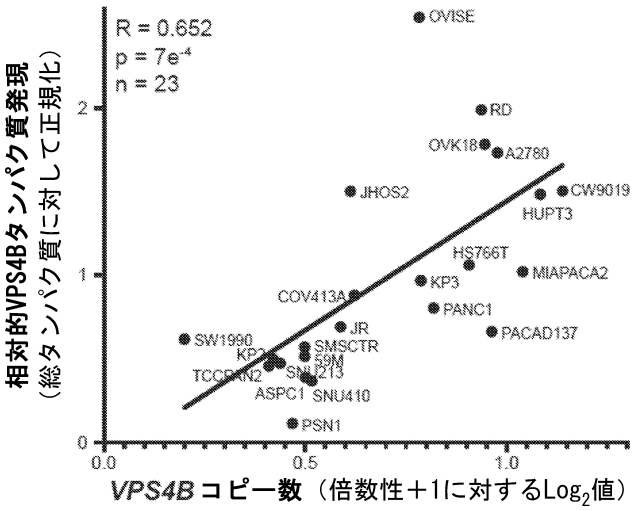
【図３Ｃ】



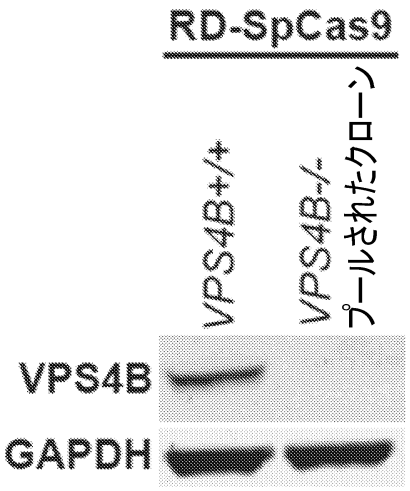
【図３Ｄ】



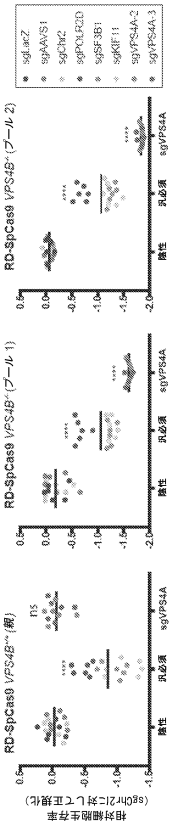
【図３Ｅ】



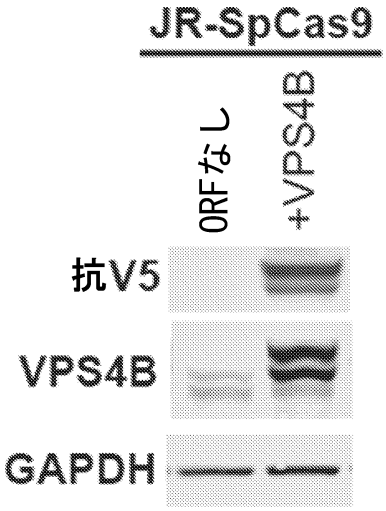
【図３Ｆ】



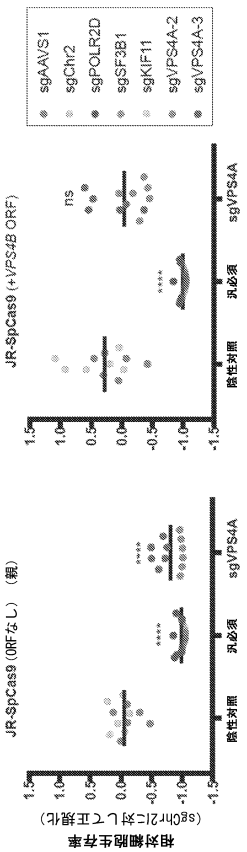
【図３Ｇ】



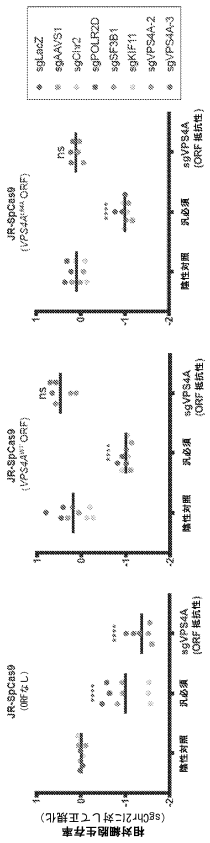
【図３Ｈ】



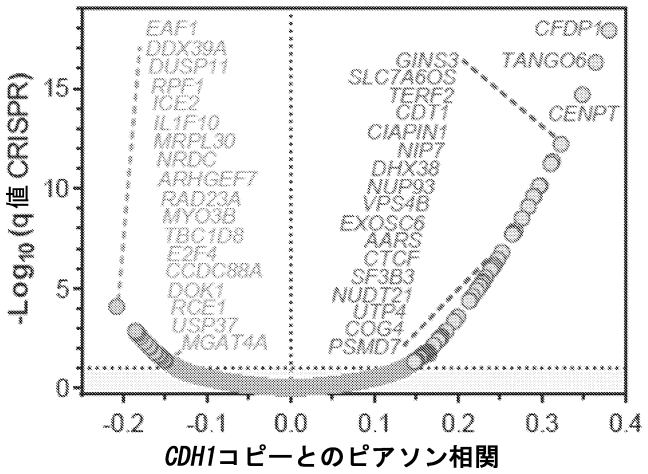
【図３Ｉ】



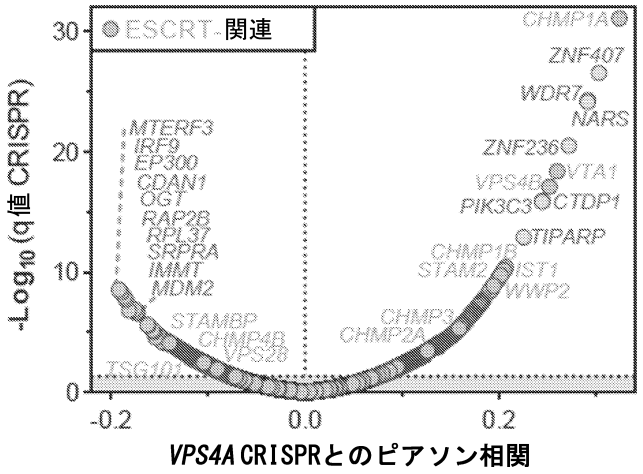
【図３Ｊ】



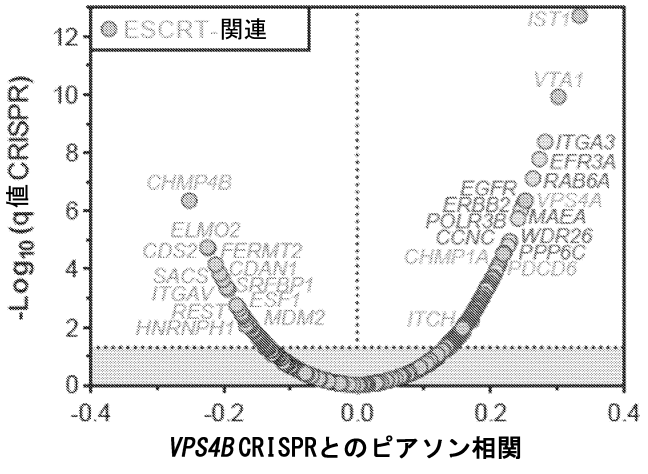
【図３．３Ａ】



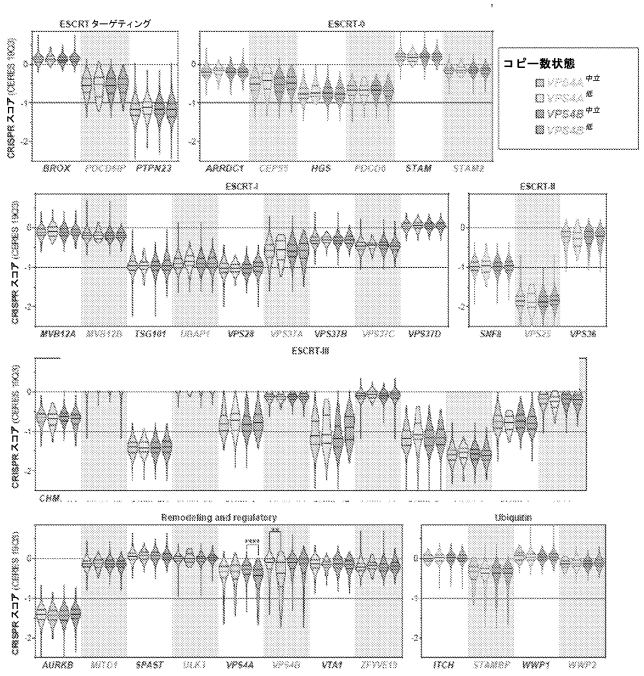
【図３．３Ｂ】



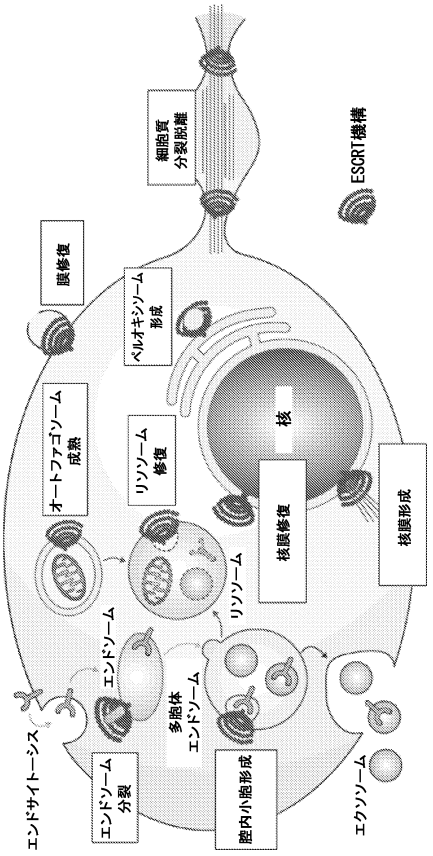
【図３．３Ｃ】



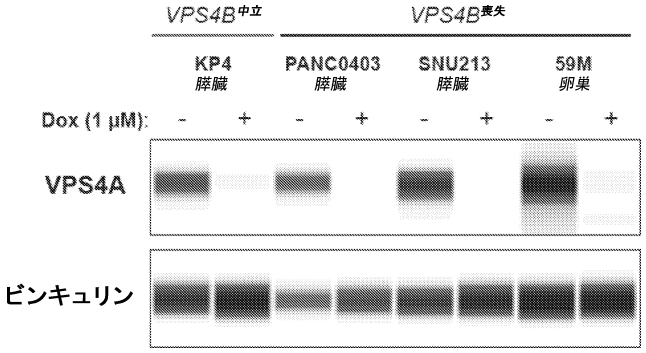
【図３．３Ｄ】



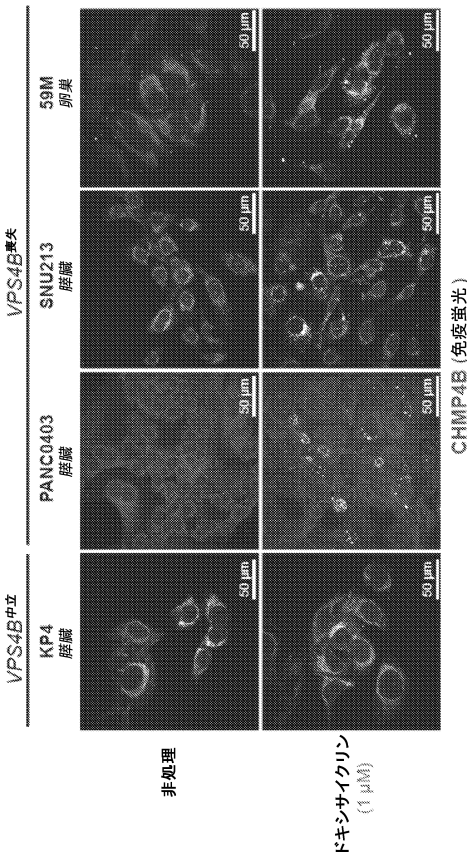
【図４Ａ】



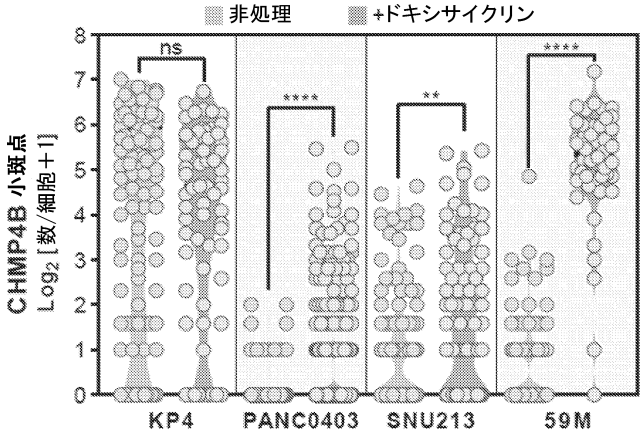
【図４Ｂ】



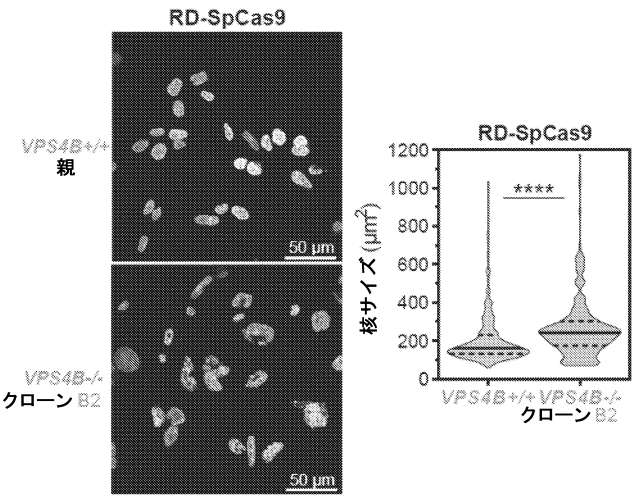
【図４Ｃ】



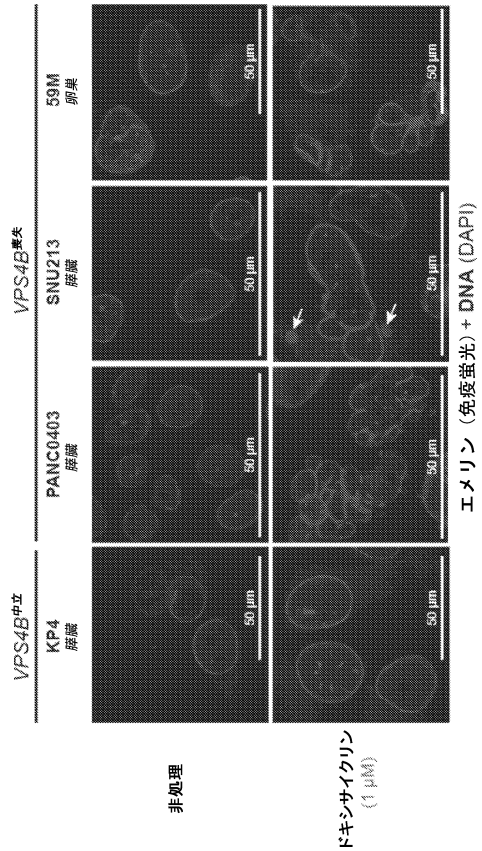
【図４Ｄ】



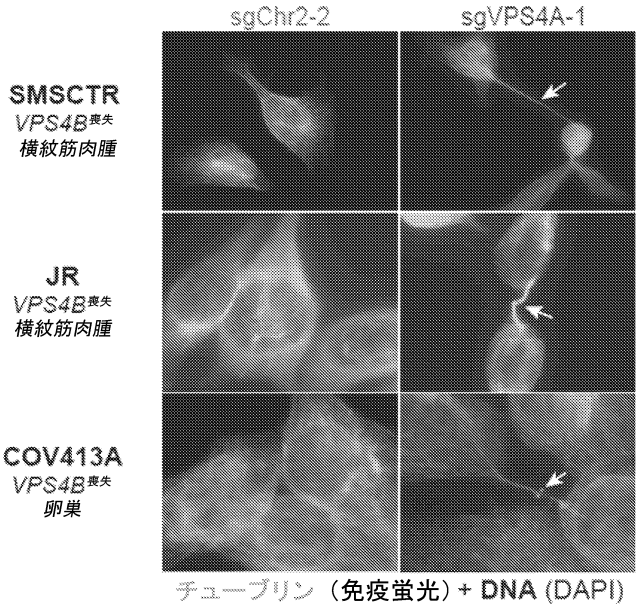
【図４Ｅ】



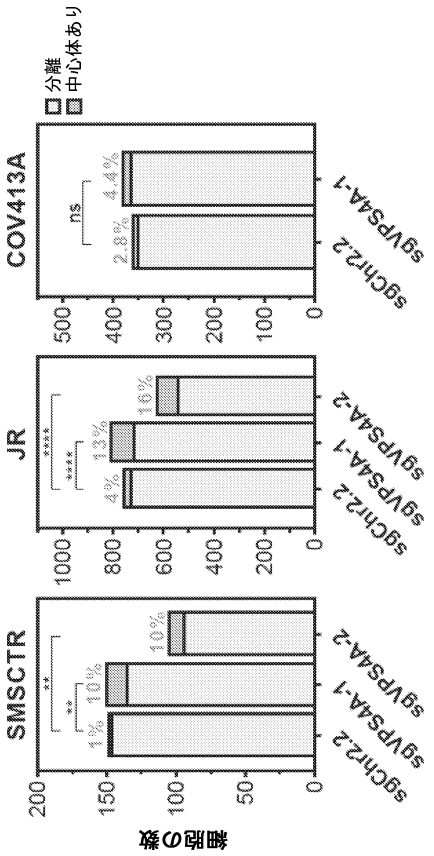
【図４Ｆ】



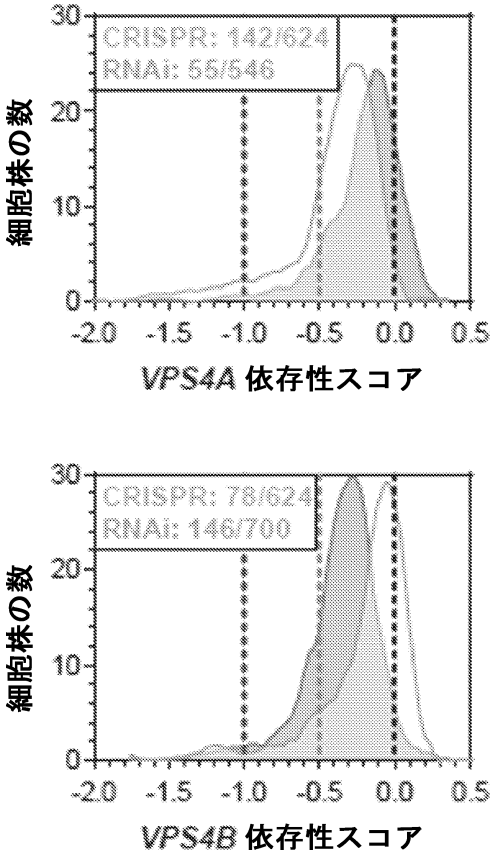
【図４Ｇ】



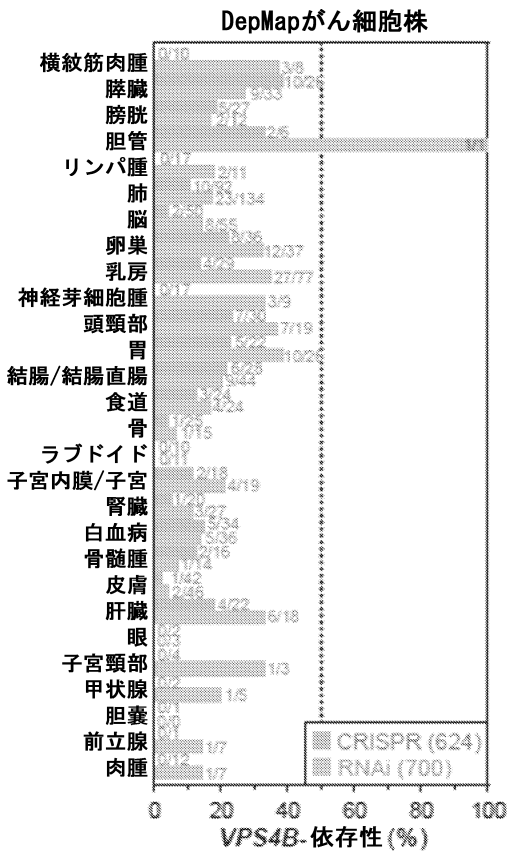
【図４Ｈ】



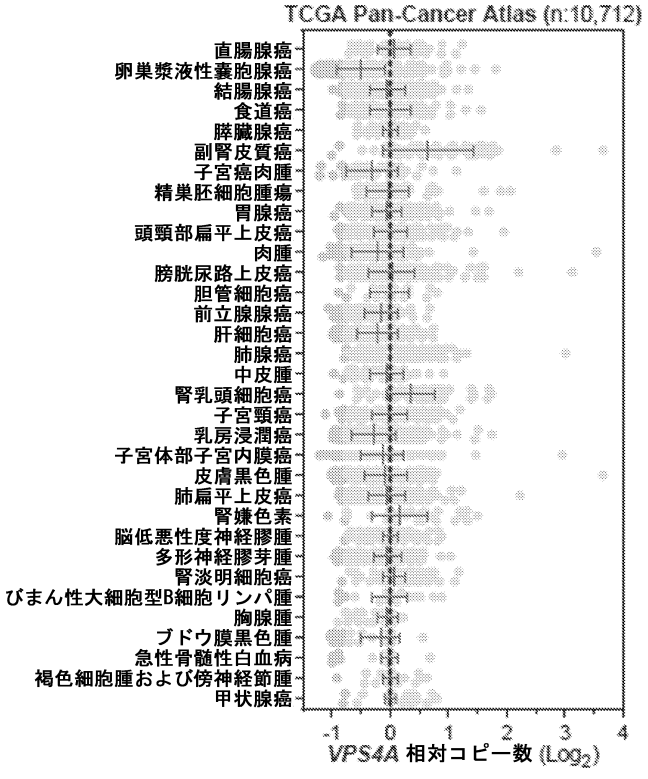
【図４．４Ａ】



【図４．４Ｂ】



【図４．４Ｃ】



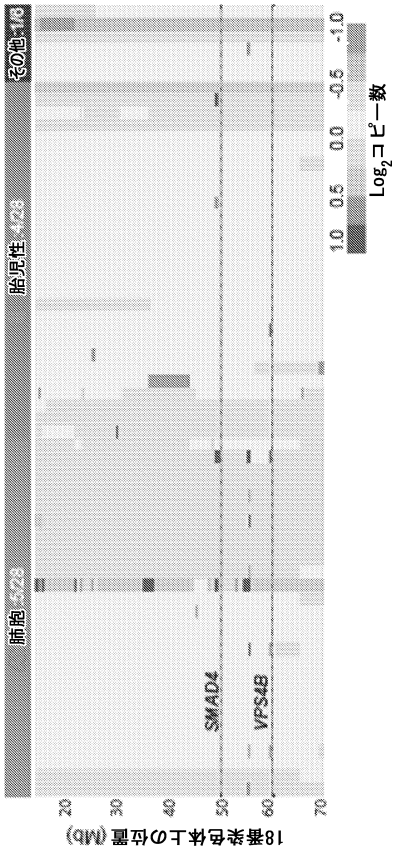
【図４．４Ｄ】

【図４．４Ｅ】

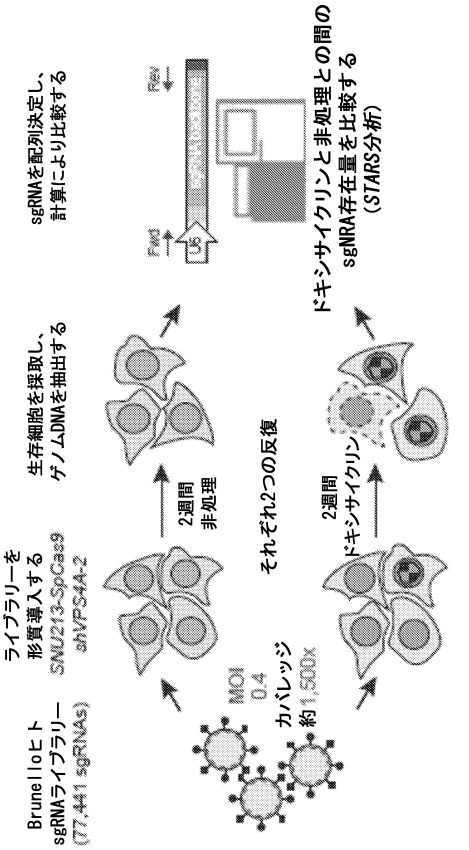
【図４．４Ｆ】

【図４．４Ｇ】

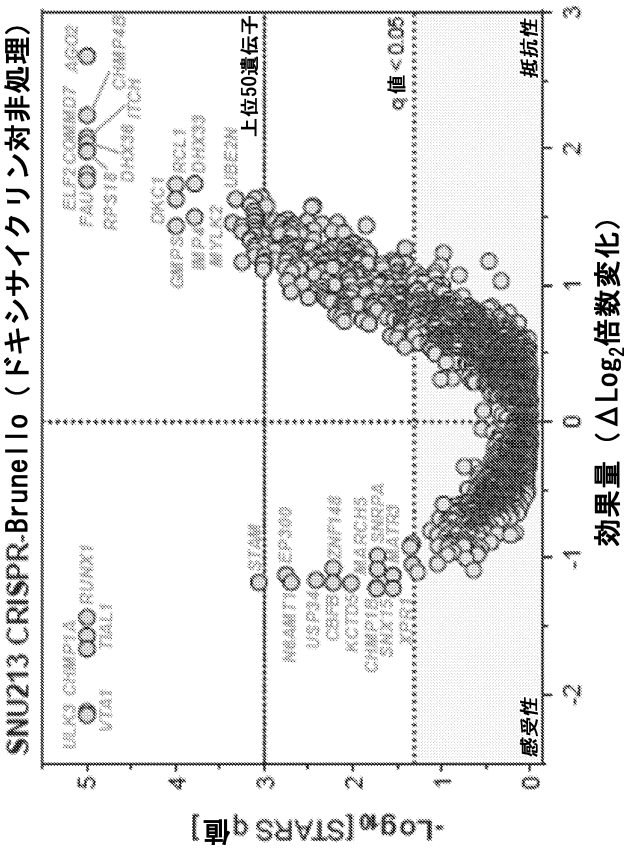
【図４．４Ｈ】



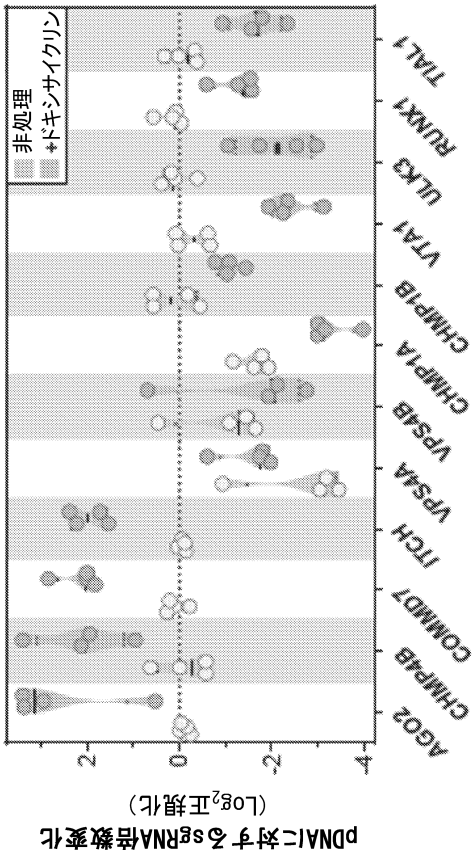
【図５Ａ】



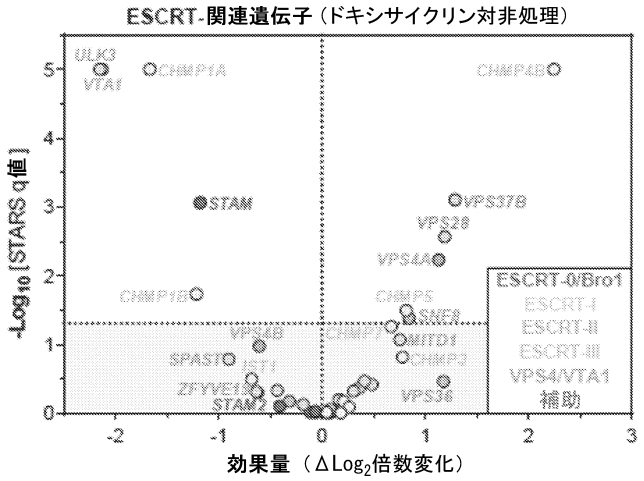
【図５Ｂ】



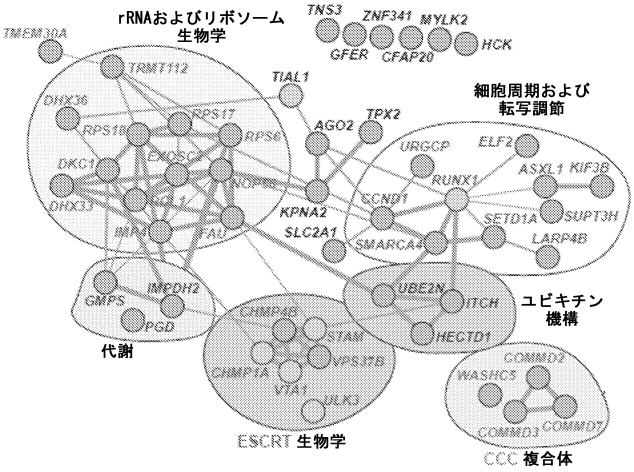
【図５Ｃ】



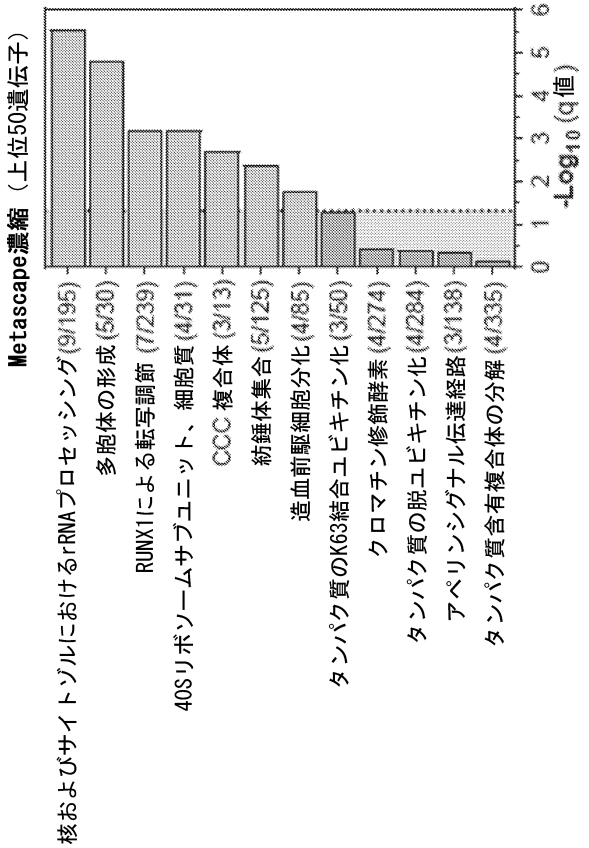
【図５Ｄ】



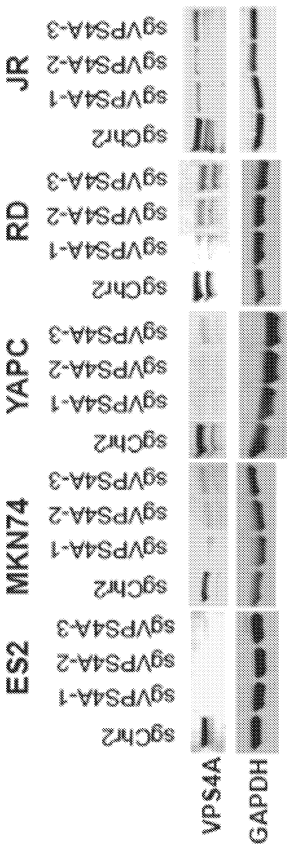
【図５Ｅ】



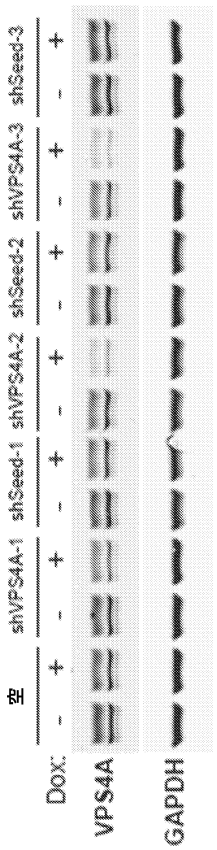
【図５Ｆ】



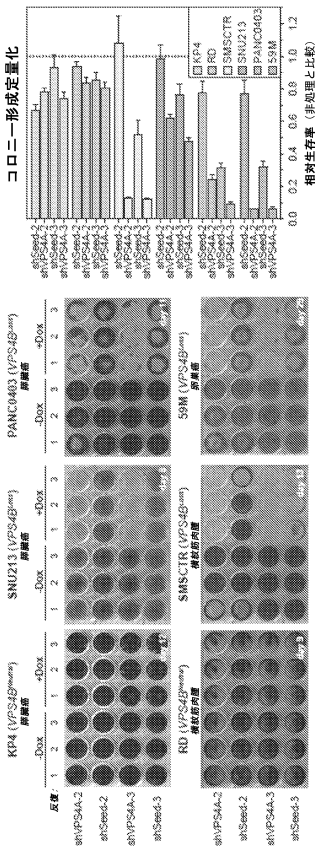
【図５．５Ａ】



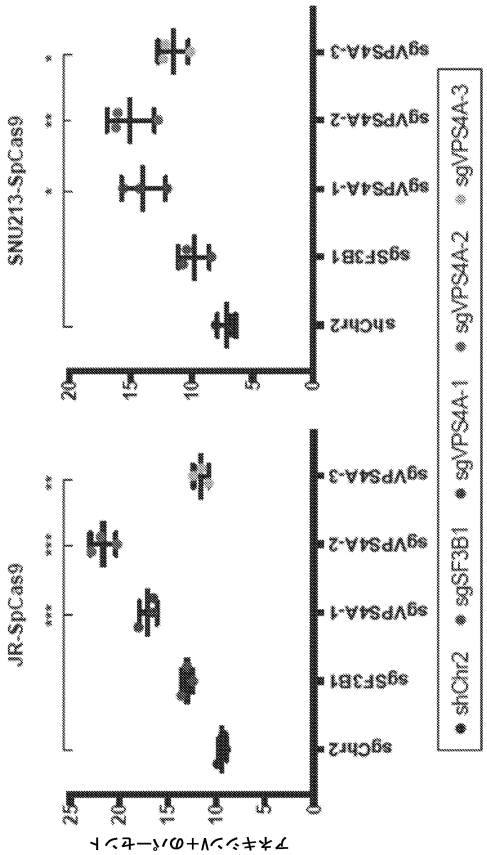
【図５．５Ｂ】



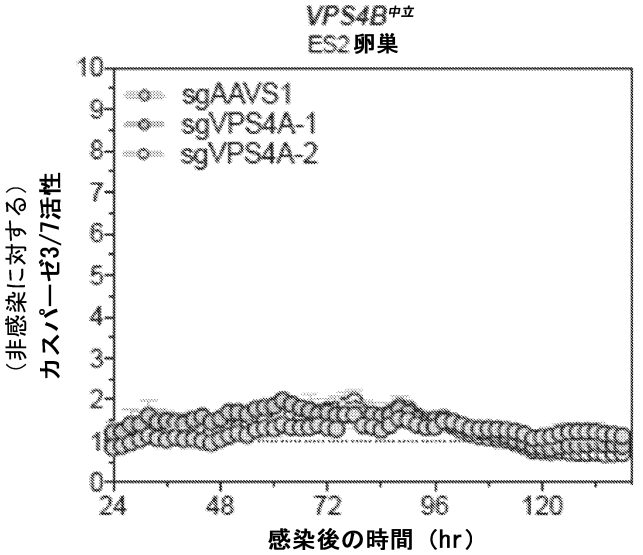
【図５．５Ｃ】



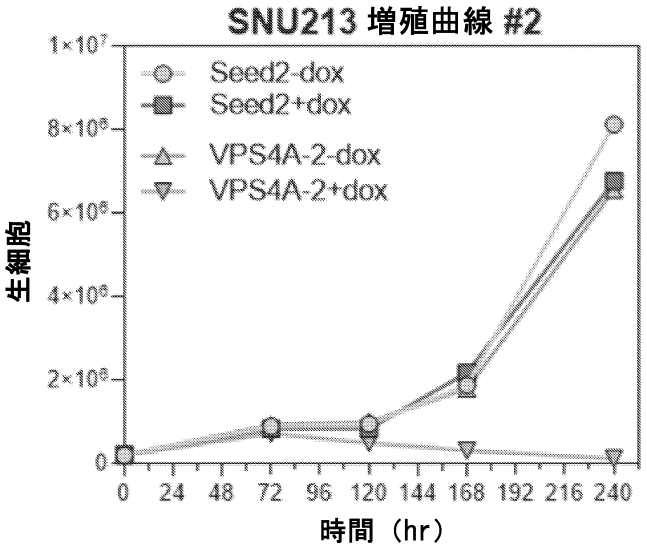
【図５．５Ｄ】



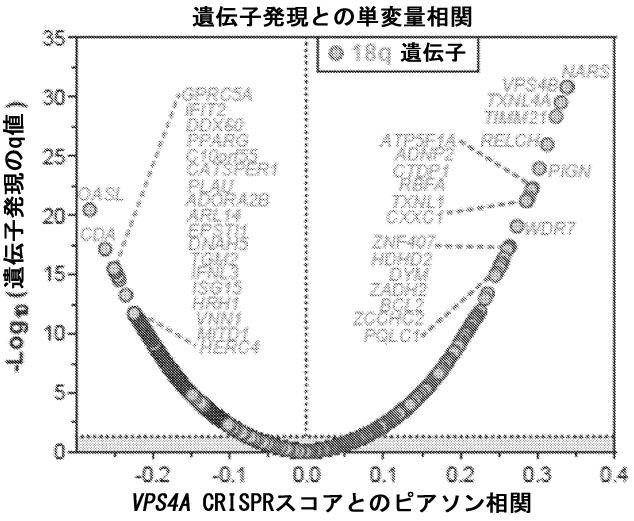
【図５．５Ｅ】



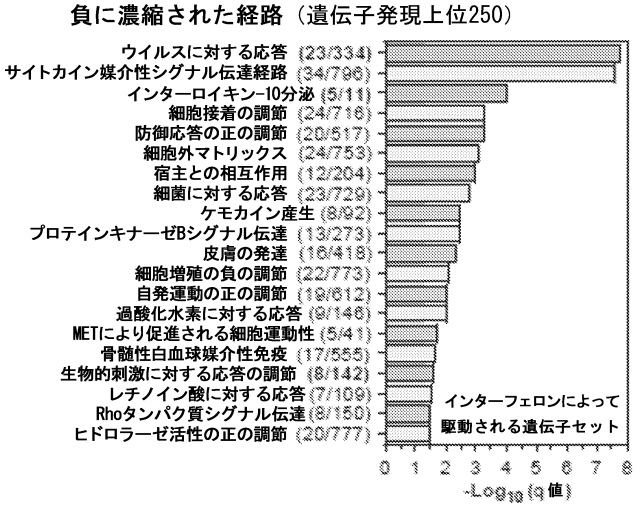
【図５．５Ｆ】



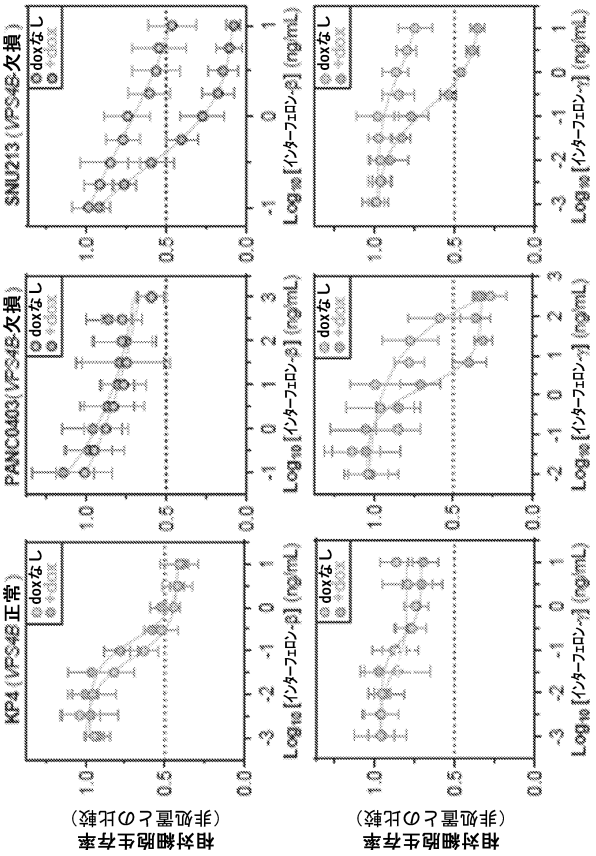
【図６Ａ】



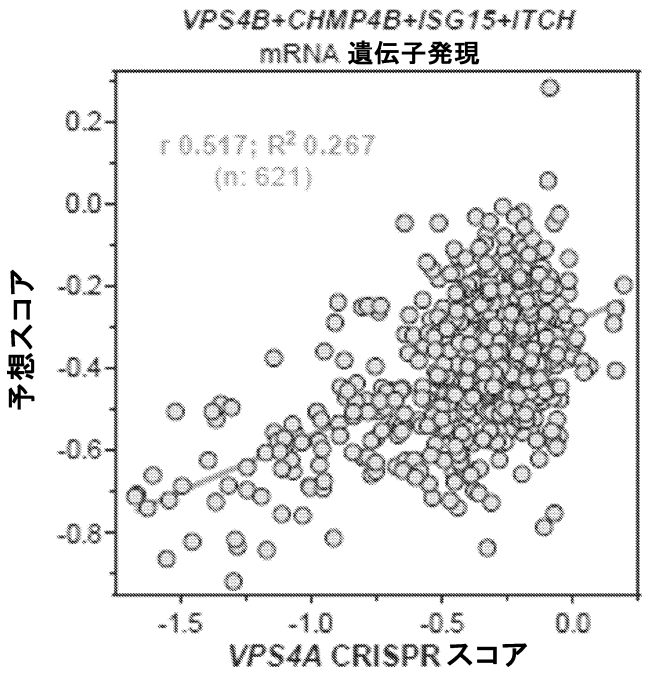
【図６Ｂ】



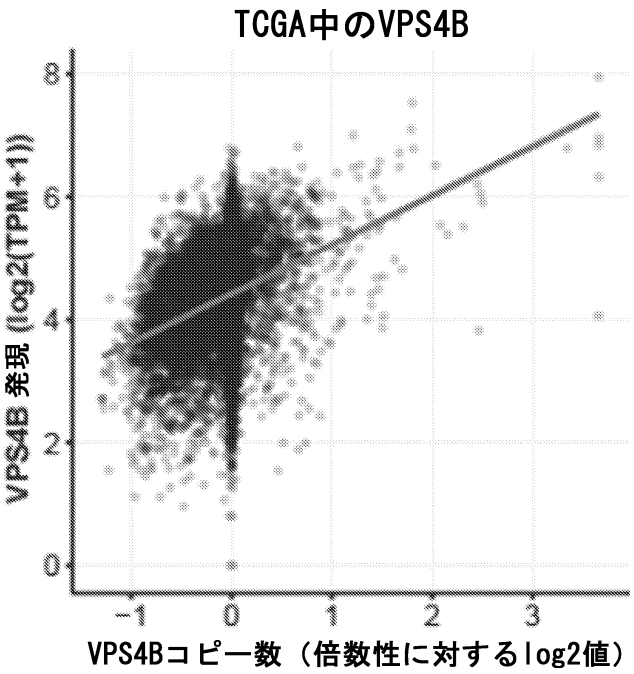
【図６Ｃ】



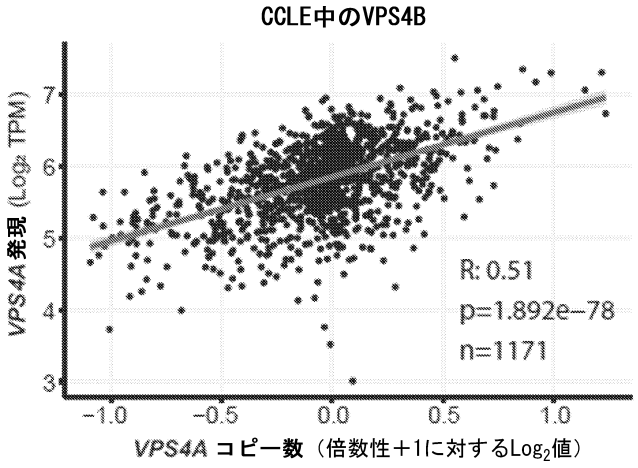
【図６Ｄ】



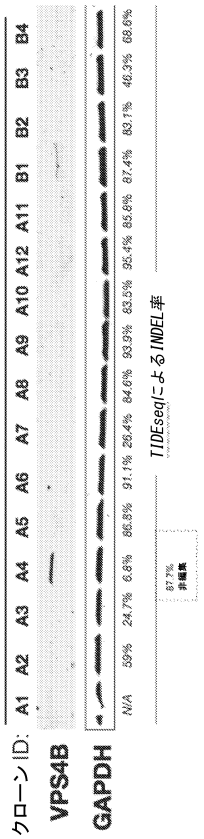
【図６．６Ａ】



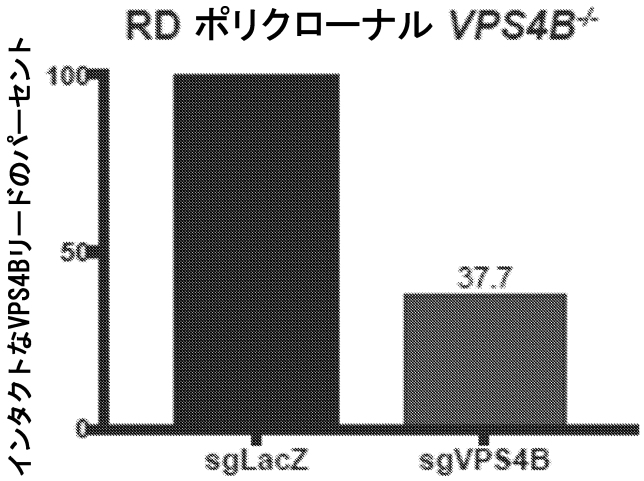
【図６．６Ｂ】



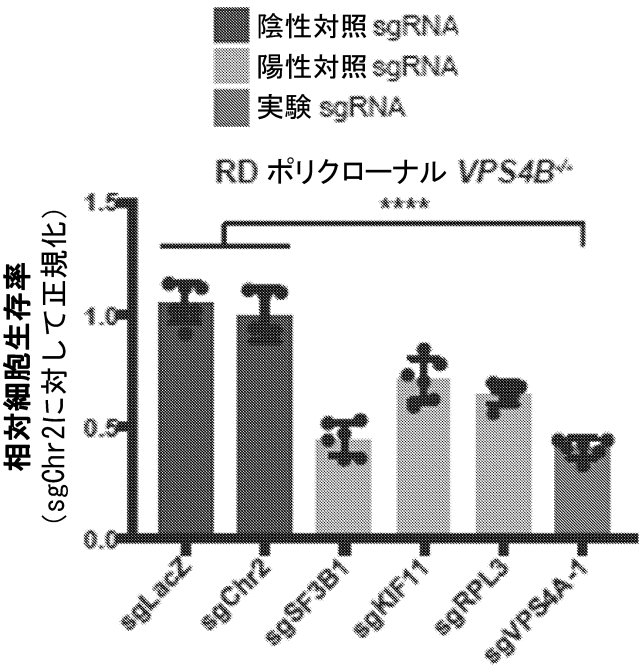
【図６．６Ｃ】



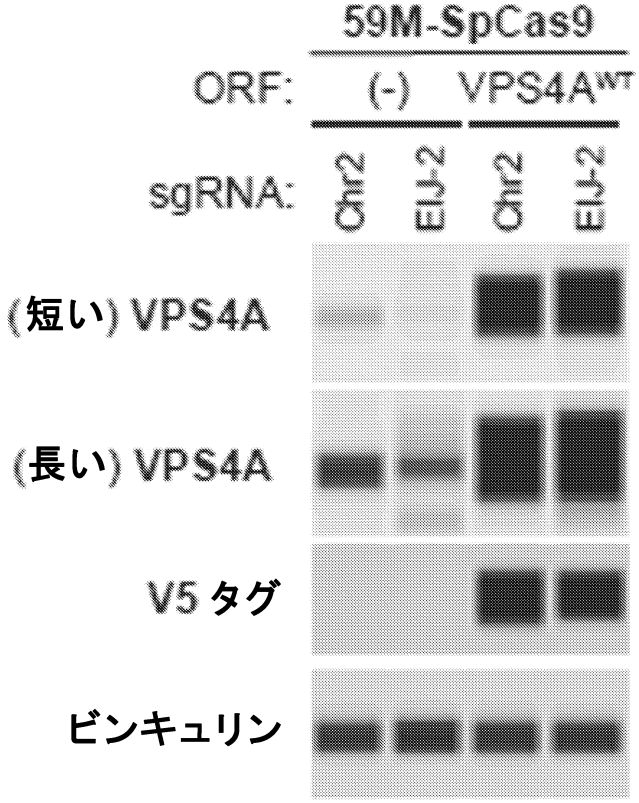
【図６．６Ｄ】



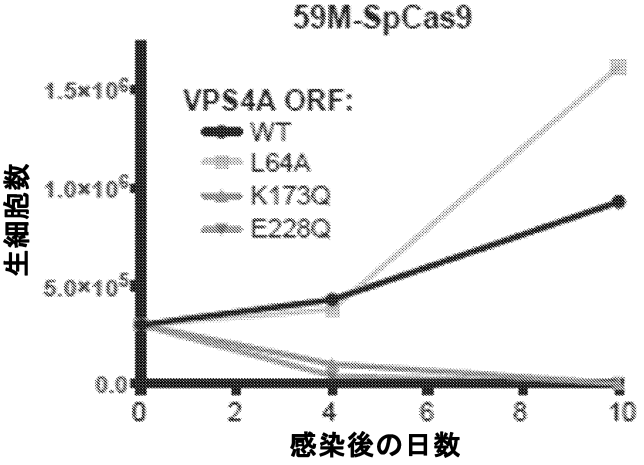
【図６．６Ｅ】



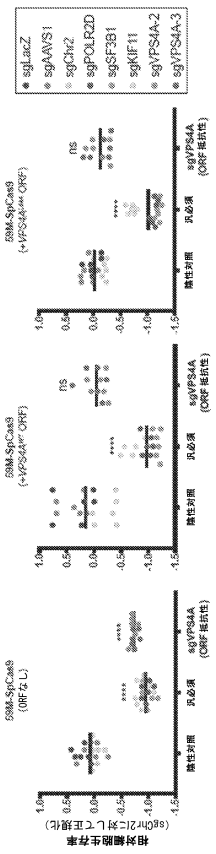
【図６．６Ｆ】



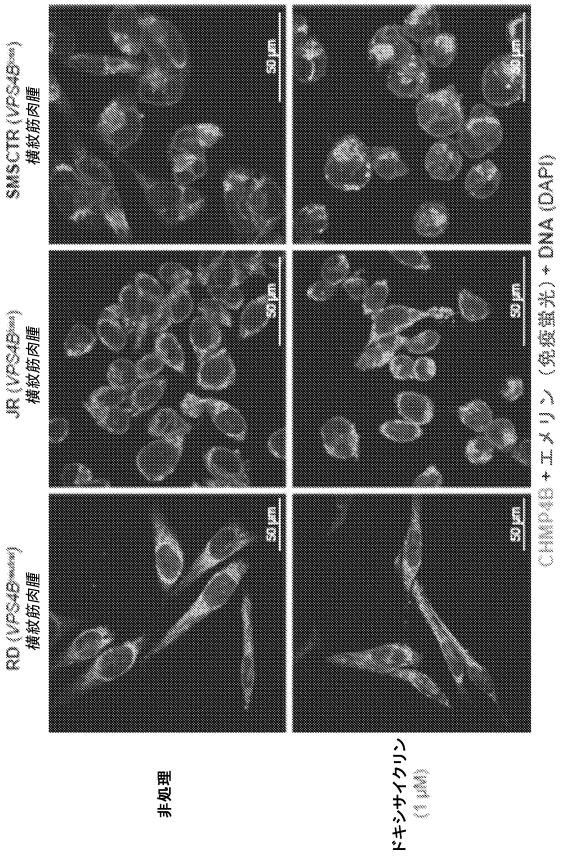
【図６．６Ｇ】



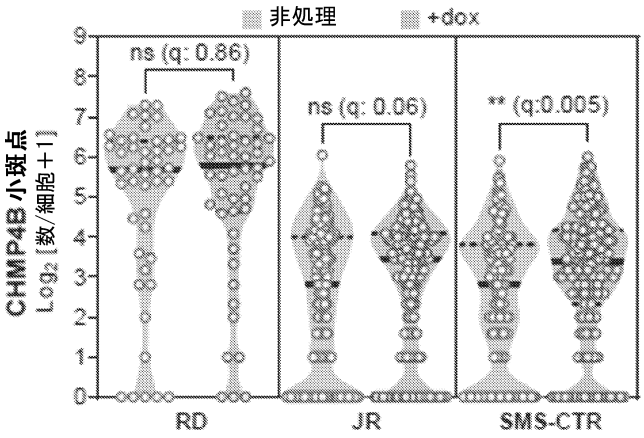
【図６．６Ｈ】



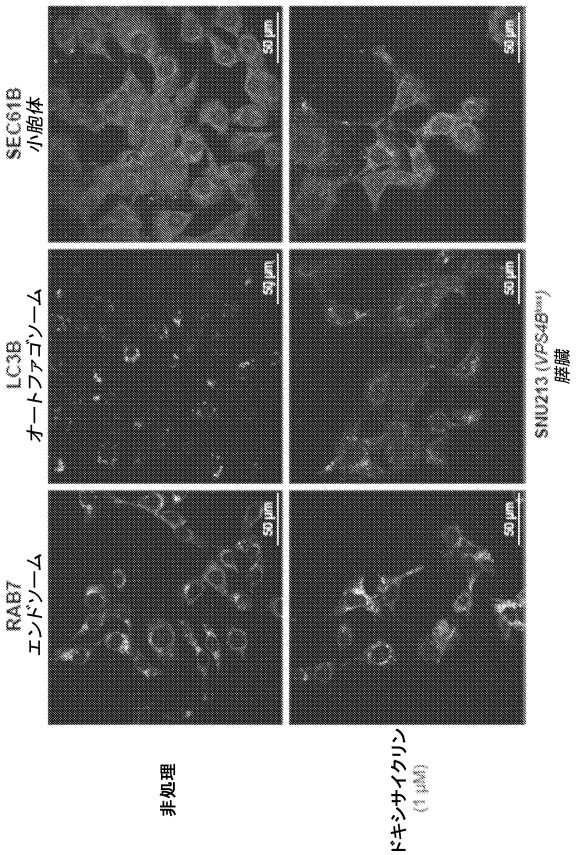
【図７Ａ】



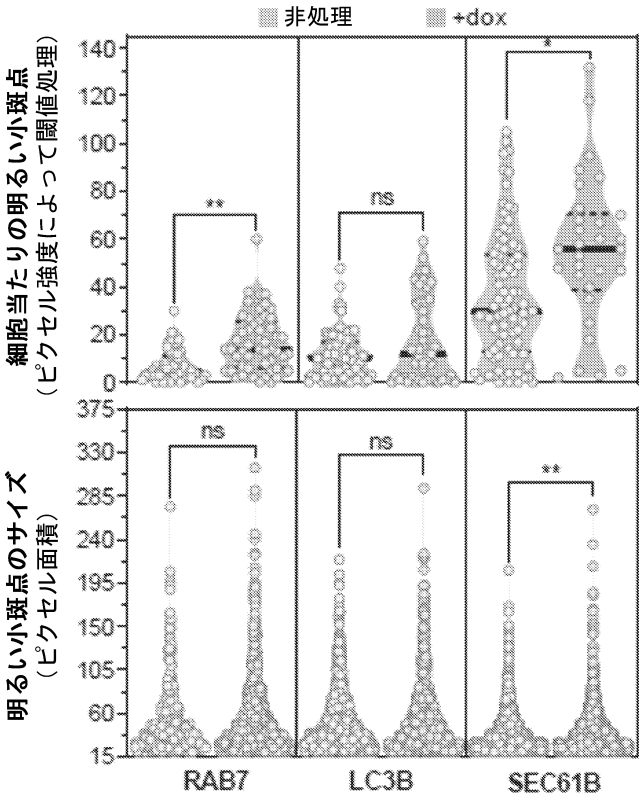
【図７Ｂ】



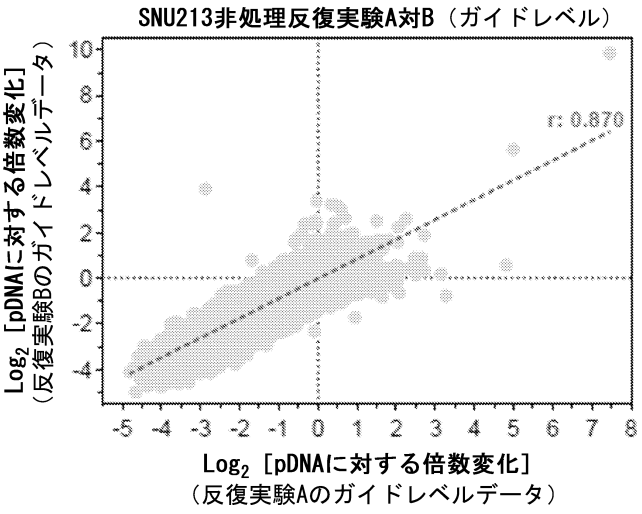
【図７Ｃ】



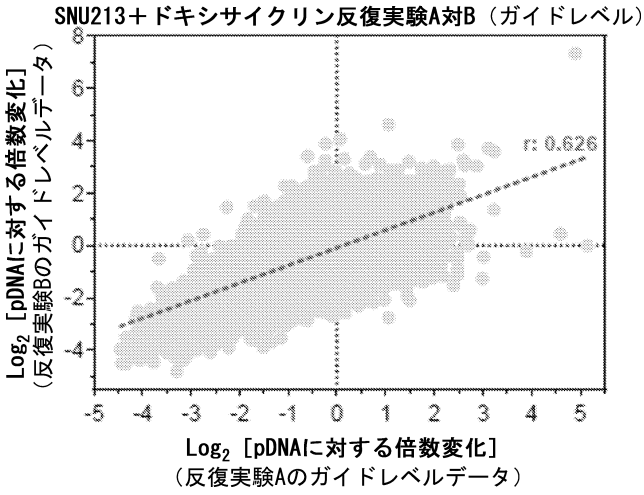
【図７Ｄ】



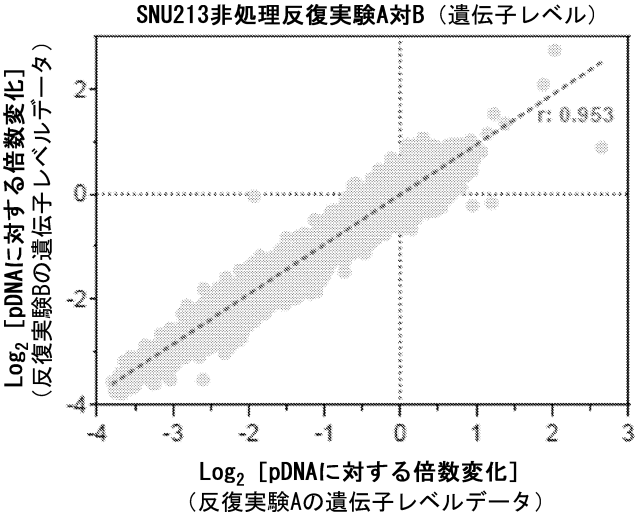
【図８Ａ】



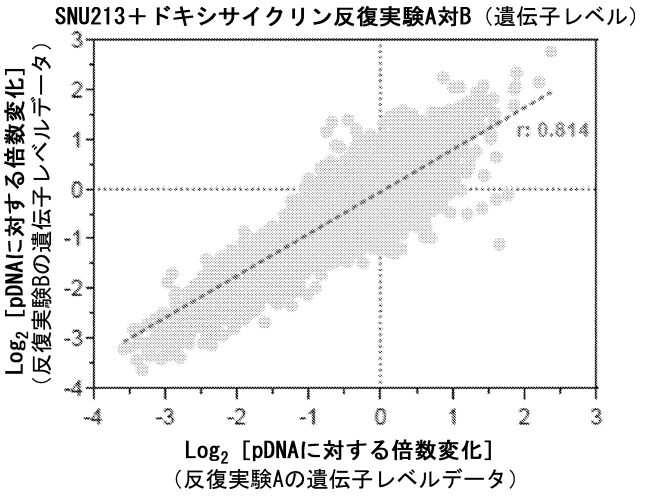
【図８Ｂ】



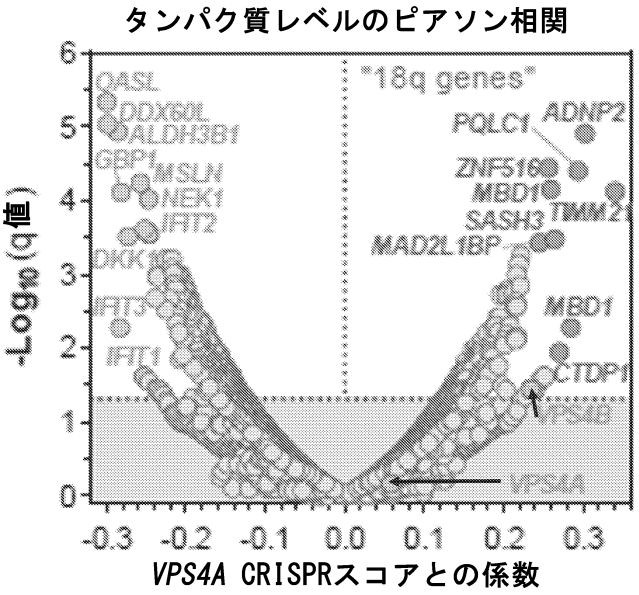
【図８Ｃ】



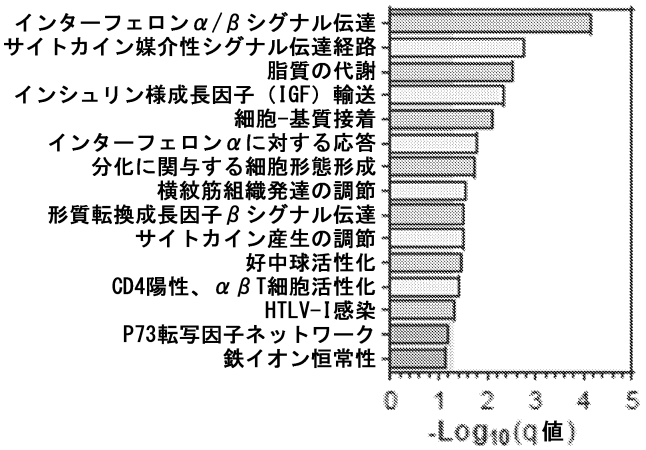
【図８Ｄ】



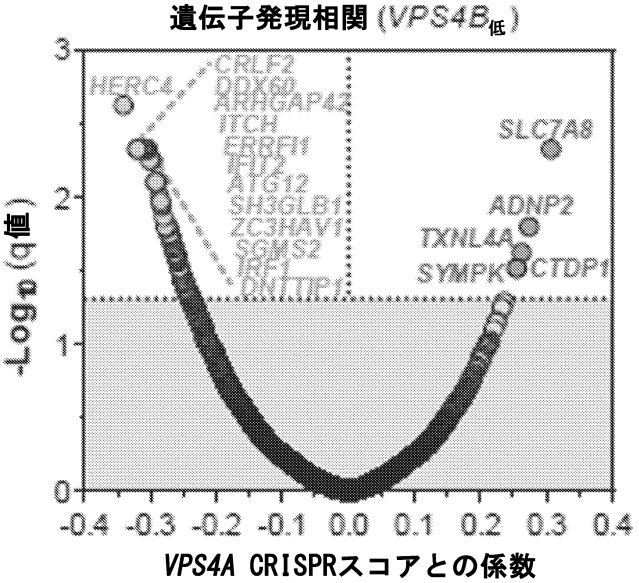
【図９Ａ】



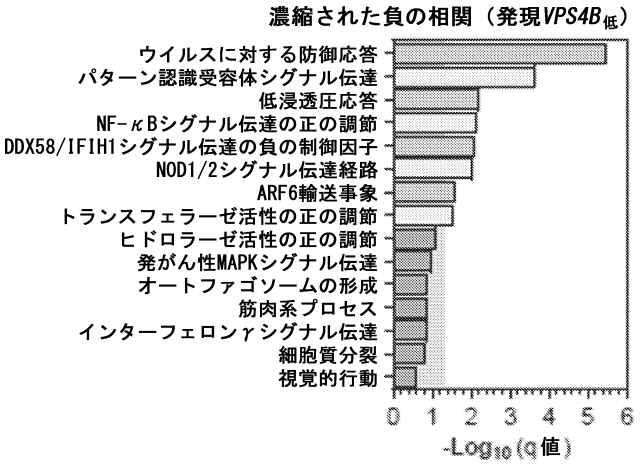
【図９Ｂ】



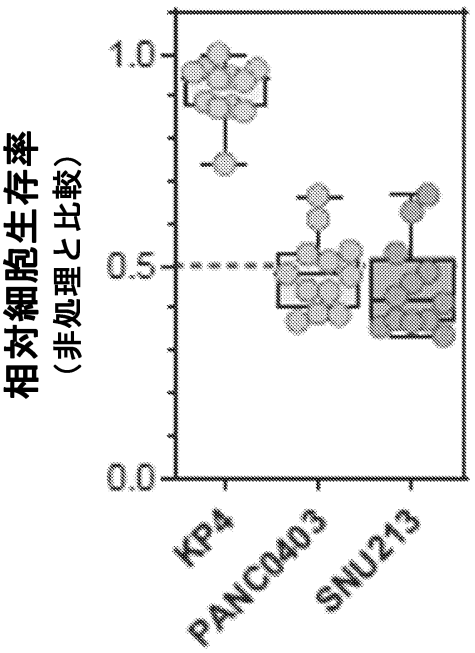
【図９Ｃ】



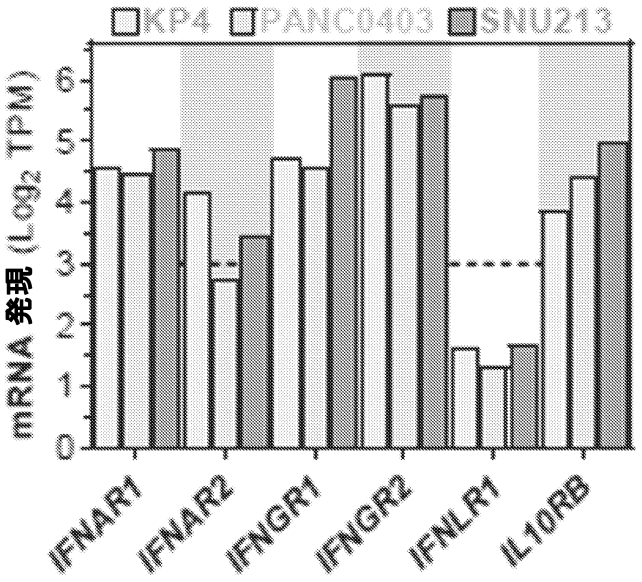
【図９Ｄ】



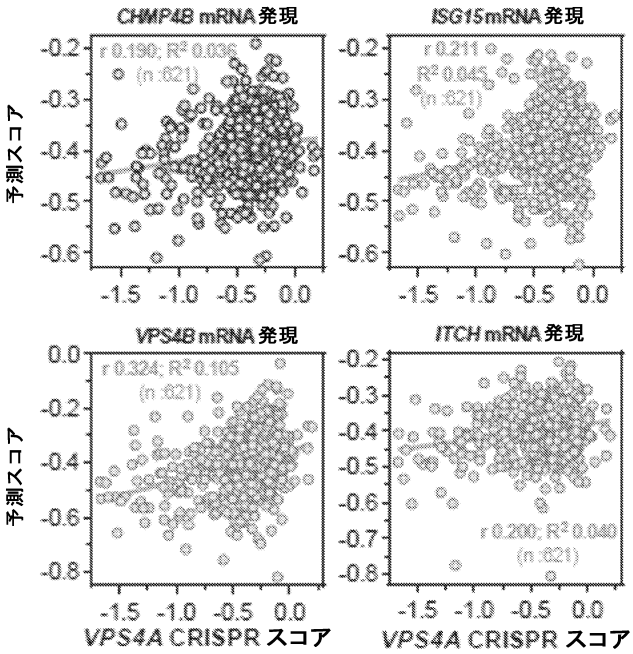
【図９Ｅ】



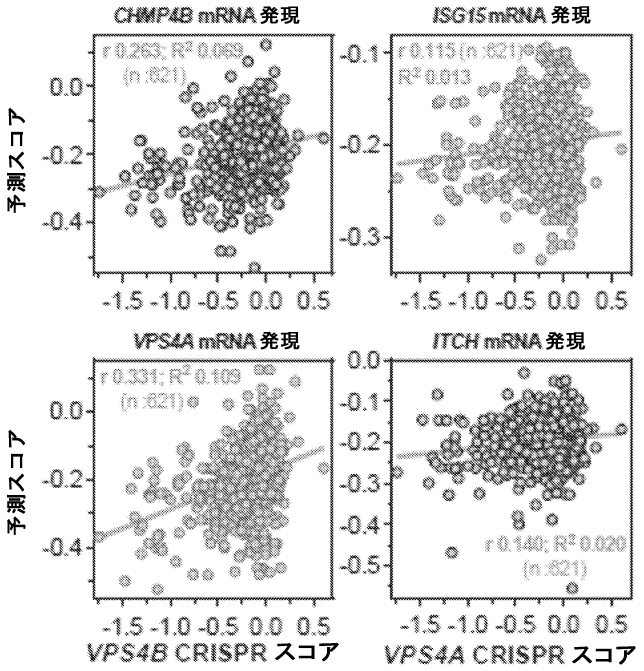
【図９Ｆ】



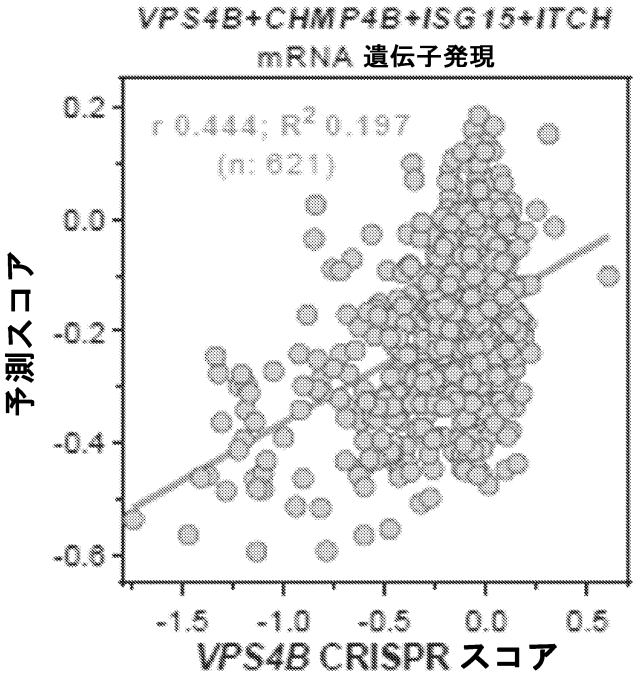
【図９Ｇ】



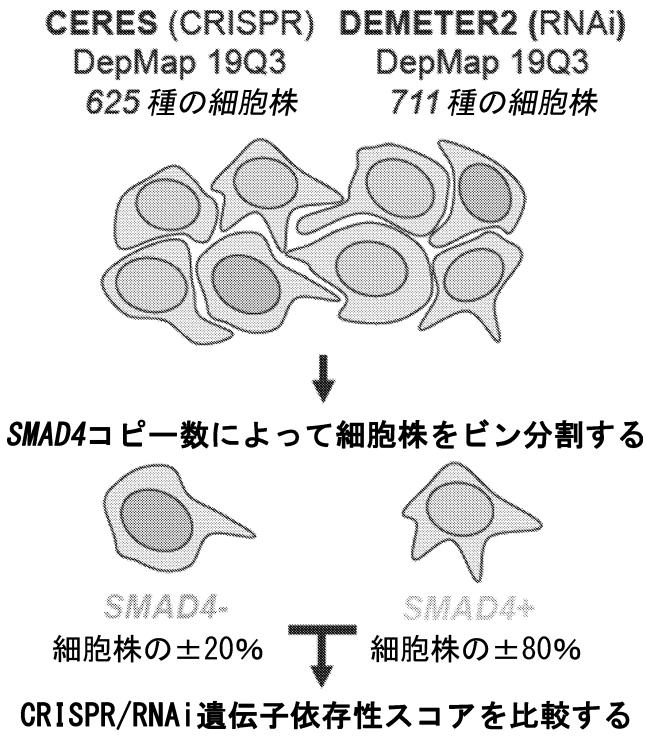
【図９Ｈ】



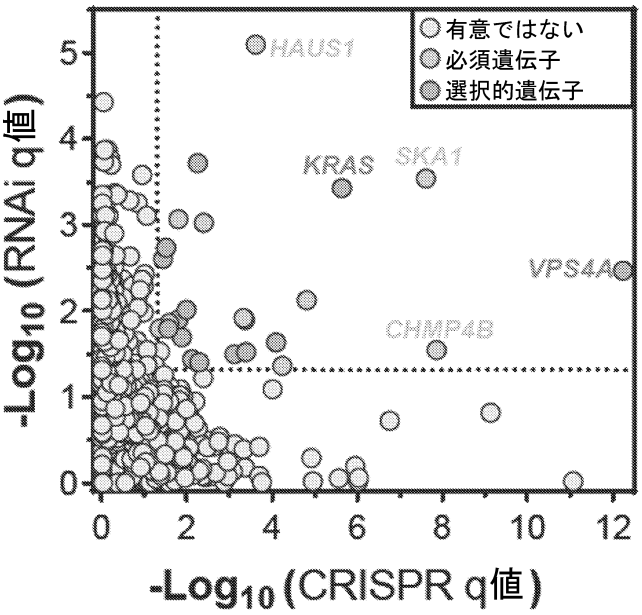
【図９Ｉ】



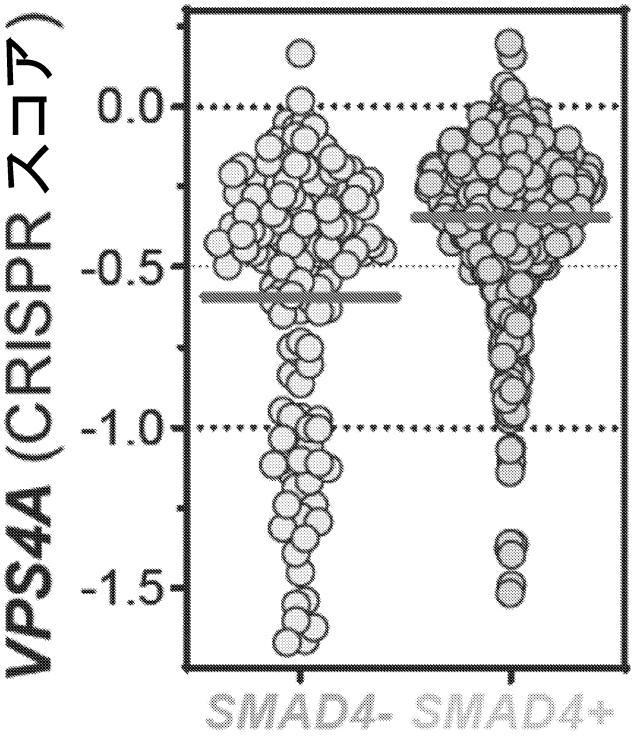
【図１０Ａ】



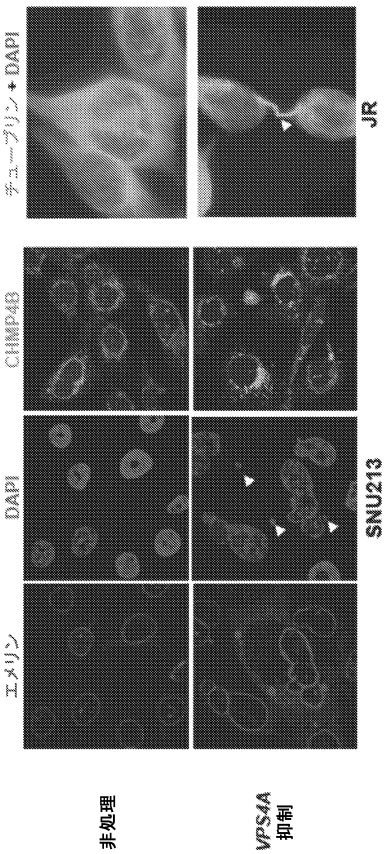
【図１０Ｂ】



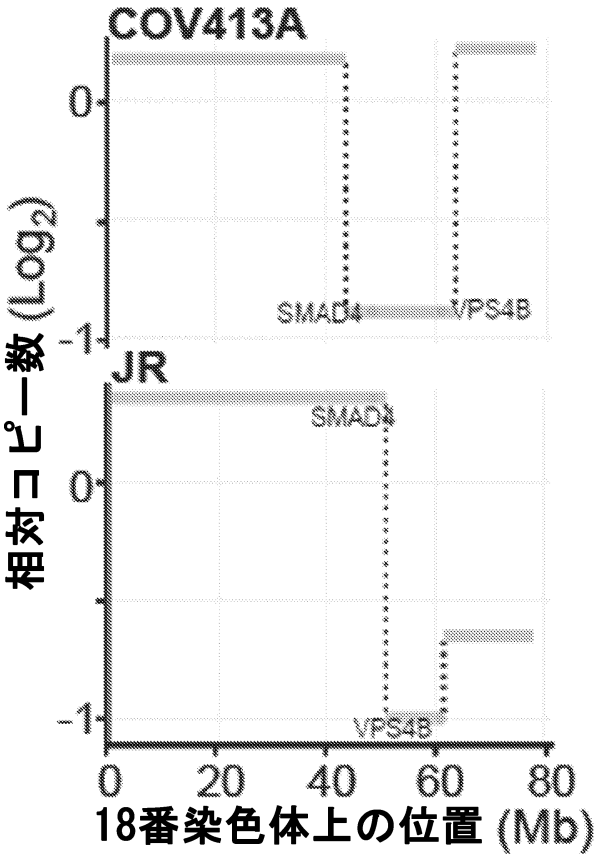
【図１０Ｃ】



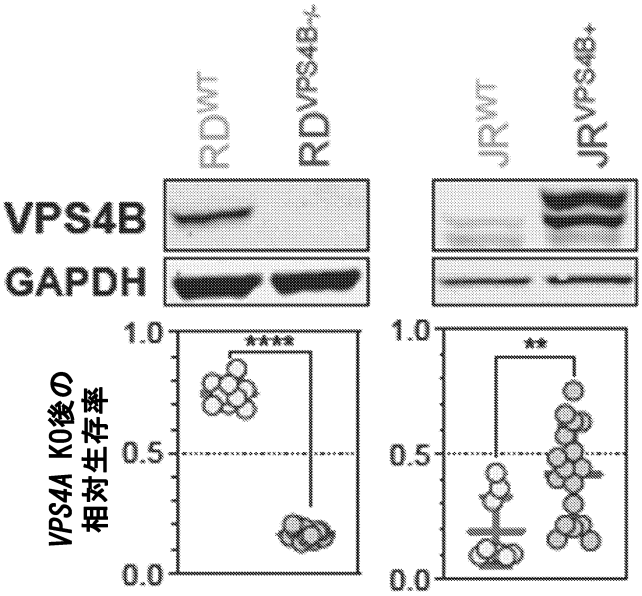
【図１１】



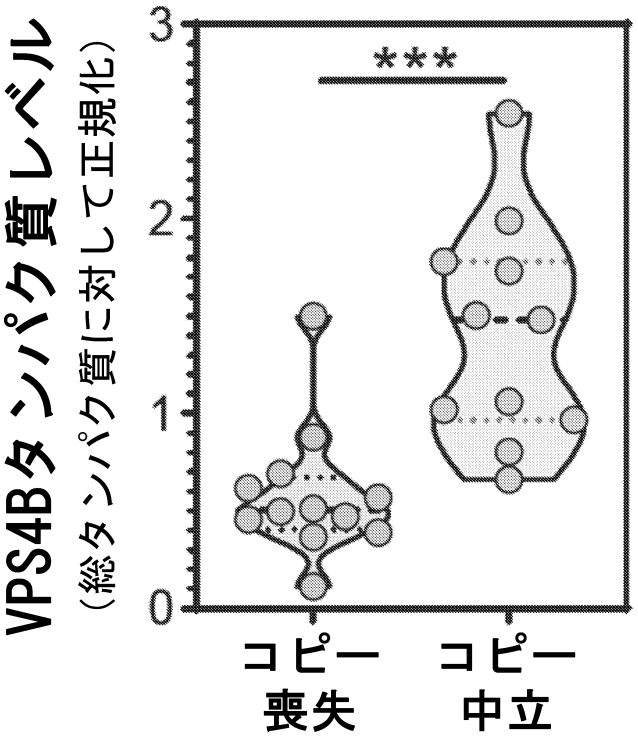
【図１２Ａ】



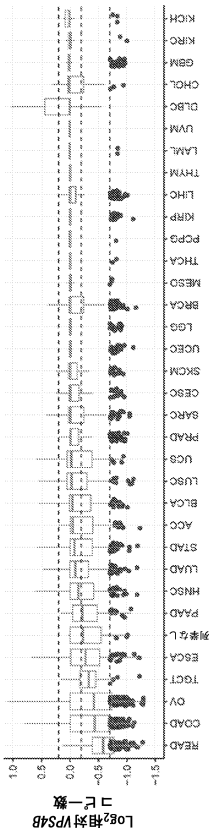
【図１２Ｂ】



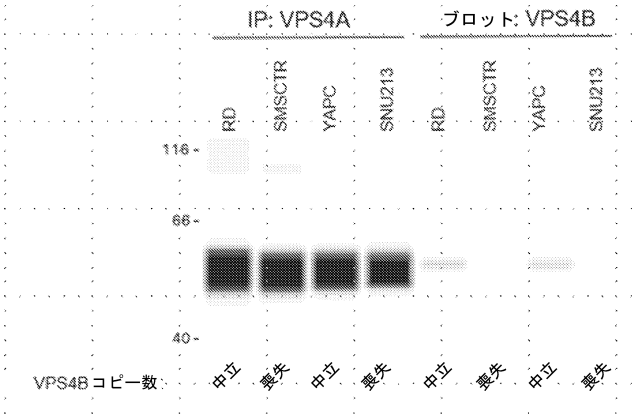
【図１２Ｃ】



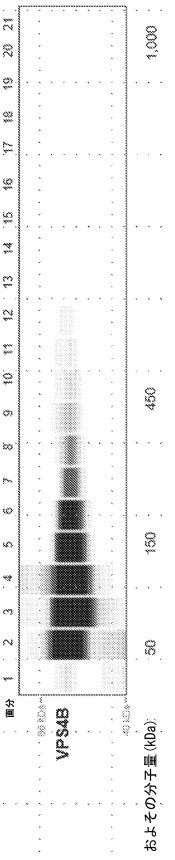
【図１２Ｄ】



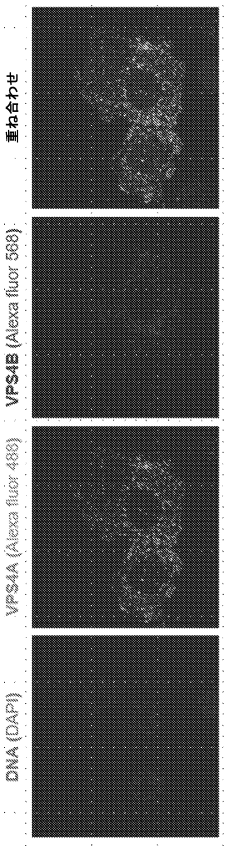
【図１３Ａ】



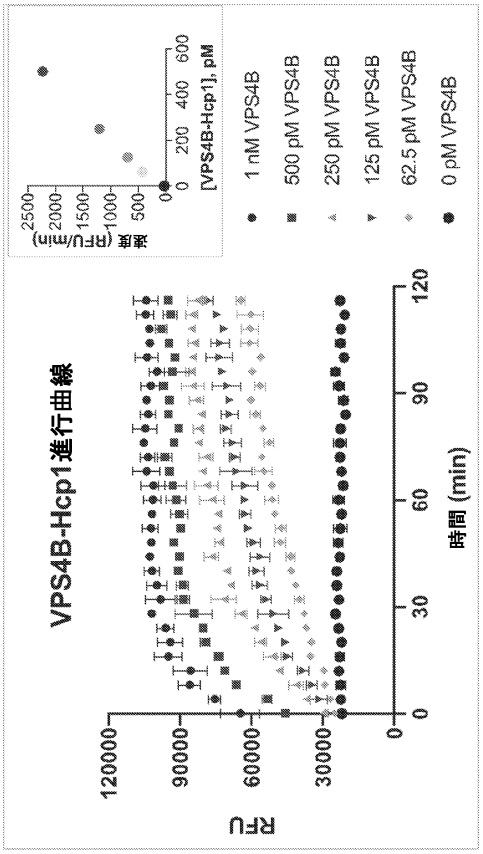
【図１３Ｂ】



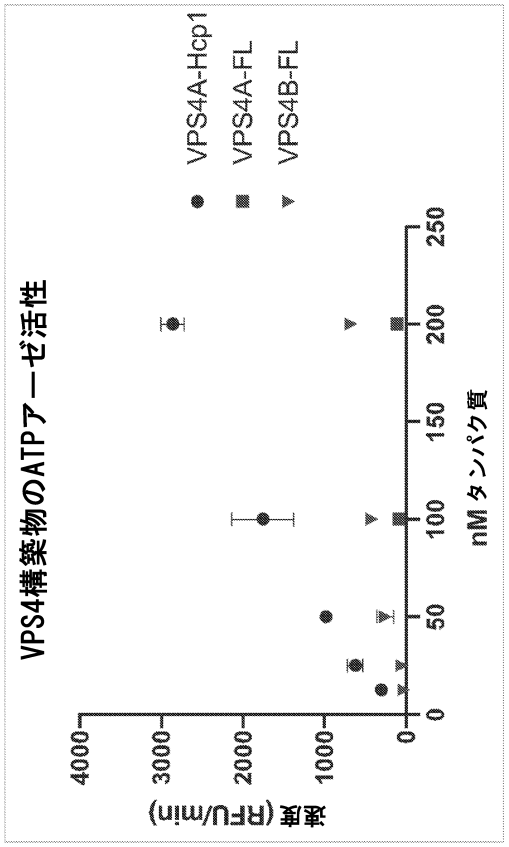
【図１３Ｃ】



【図１４Ａ】



【図１４Ｂ】



【手続補正書】
【提出日】令和５年２月７日(２０２３.２.７)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】
20235302340000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/035976

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K38/00 A61K31/403 A61K31/404 A61P35/00 C07K16/18
C12N9/22 C12N15/113 C12Q1/68 G01N33/50
ADD.
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)
A61K A61P C12N C07K C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/016772 A2 (NOVARTIS AG [CH]) 24 January 2019 (2019-01-24) page 13, line 4 - line 17; tables 1,2 page 137, line 11 - line 37 -----	1-56
X	SZYMANSKA EWELINA ET AL: "Synthetic lethality between VPS4A and VPS4B triggers an inflammatory response in colorectal cancer.", EMBO MOLECULAR MEDICINE 07 02 2020, vol. 12, no. 2, 7 February 2020 (2020-02-07), page e10812, XP9529602, ISSN: 1757-4684 abstract Discussion ----- -/--	1-56

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family 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 application or patent 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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 August 2021	02/09/2021

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Pilling, Stephen

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/035976

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☐ forming part of the international application as filed:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/035976

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	NEGGERS J ET AL: "Synthetic lethal interaction between the ESCRT paralog enzymes VPS4A and VPS4B in cancers with chromosome 18q or 16q deletion", EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, ELSEVIER, AMSTERDAM NL, vol. 138, 1 October 2020 (2020-10-01), XP086321356, ISSN: 0959-8049, DOI: 10.1016/S0959-8049(20)31088-1 [retrieved on 2020-10-26] abstract -----	1-89
X,P	NEGGERS JASPER E ET AL: "Synthetic Lethal Interaction between the ESCRT Paralog Enzymes VPS4A and VPS4B in Cancers Harboring Loss of Chromosome 18q or 16q.", CELL REPORTS 15 12 2020, vol. 33, no. 11, 15 December 2020 (2020-12-15), page 108493, XP9529596, ISSN: 2211-1247 abstract -----	1-89
X,P	NEGGERS J E ET AL: "VPS4A is a synthetic lethal target in VPS4B-deficient cancers due to co-deletion with SMAD4", CANCER RESEARCH 20200801 AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH INC. NLD, vol. 80, no. 16 SUPPL, 1 August 2020 (2020-08-01), XP9529603, ISSN: 1538-7445 abstract -----	1-89

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2021/035976

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019016772 A2	24-01-2019	EP 3655004 A2	27-05-2020
		US 2021155932 A1	27-05-2021
		WO 2019016772 A2	24-01-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*15/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	15/00	
Ａ６１Ｐ	*1/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/00	
Ａ６１Ｐ	*1/18 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/18	
Ａ６１Ｐ	*11/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00	
Ａ６１Ｐ	*13/12 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/12	
Ａ６１Ｋ	*38/21 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/21	
Ａ６１Ｋ	*31/713(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/713	
Ａ６１Ｋ	*31/7105(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105	
Ａ６１Ｋ	*31/7088(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088	
Ａ６１Ｐ	*25/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00	
Ａ６１Ｋ	*38/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/02	
Ａ６１Ｋ	*31/404(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/404	
Ａ６１Ｋ	*31/4045(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/4045	

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＲＩＴＯＮ

２．ＰＹＴＨＯＮ

３．ＴＷＥＥＮ

２１５ ボストン ブルックライン アベニュー ４５０ デイナ―ファーバー キャンサー インスティチュート インコーポレイテッド内

(74)代理人 100102978
弁理士 清水 初志

(74)代理人 100102118
弁理士 春名 雅夫

(74)代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433
弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人　100214396
弁理士　塩田 真紀
(74)代理人　100121072
弁理士　川本 和弥
(72)発明者　アギーレ アンドリュー
アメリカ合衆国 ０２２１５ マサチューセッツ州 ボストン ブルックライン アベニュー ４５０ デイナ―ファーバー キャンサー インスティチュート インコーポレイテッド内
(72)発明者　パオレラ ブレントン
アメリカ合衆国 ０２１４２ マサチューセッツ州 ケンブリッジ メイン ストリート ４１５ ザ ブロード インスティテュート インコーポレイテッド内
(72)発明者　バスケス フランシスカ
アメリカ合衆国 ０２１４２ マサチューセッツ州 ケンブリッジ メイン ストリート ４１５ ザ ブロード インスティテュート インコーポレイテッド内
(72)発明者　ネガーズ ジャスパー エドガー
アメリカ合衆国 ０２２１５ マサチューセッツ州 ボストン ブルックライン アベニュー ４５０ デイナ―ファーバー キャンサー インスティチュート インコーポレイテッド内

Ｆターム（参考）　4C084　AA13 AA17 BA03 BA44 DA23 MA13 MA17 MA23 MA31 MA35
MA37 MA52 MA55 MA56 MA58 MA59 MA65 MA66 NA14 ZA021 ZA022
ZA511 ZA512 ZA591 ZA592 ZA661 ZA662 ZA751 ZA752 ZA811 ZA812 ZB261
ZB262
4C086　AA01 AA02 BC13 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA51 ZA59
ZA66 ZA75 ZA81 ZB26