

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4981134号

(P4981134)

(45) 発行日 平成24年7月18日(2012.7.18)

(24) 登録日 平成24年4月27日(2012.4.27)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 G
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
C 1 2 N 9/12 (2006.01)	C 1 2 N 9/12
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A
請求項の数 3 (全 29 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2009-526409 (P2009-526409)	(73) 特許権者	000001270
(86) (22) 出願日	平成20年7月30日 (2008.7.30)		コニカミノルタホールディングス株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2008/063701		東京都千代田区丸の内一丁目6番1号
(87) 国際公開番号	W02009/020028	(73) 特許権者	503028352
(87) 国際公開日	平成21年2月12日 (2009.2.12)		黒田 雅彦
審査請求日	平成23年7月11日 (2011.7.11)		東京都杉並区荻窪3-15-11
(31) 優先権主張番号	特願2007-203189 (P2007-203189)	(74) 代理人	110000671
(32) 優先日	平成19年8月3日 (2007.8.3)		八田国際特許業務法人
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	黒田 雅彦
			東京都杉並区南荻窪1-7-11
		(72) 発明者	高梨 正勝
			神奈川県伊勢原市高森4-18-62
		(72) 発明者	松林 純
			東京都墨田区向島1-6-1-203
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 乳癌細胞におけるGタンパク質共役型受容体キナーゼ4遺伝子発現量の定量および抑制

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

乳癌細胞において、細胞増殖を阻害または細胞死を誘導し、以下の同じ番号を有するセンス鎖およびアンチセンス鎖に3'末端のオーバーハングを付加した二本鎖RNAからなることを特徴とするGRK4遺伝子特異的siRNA（低分子干渉RNA）。

(センス鎖028) C A A A A A A G C C U U U G A G G A A

(アンチセンス鎖028) U U C C U C A A A G G C U U U U U U G

(センス鎖029) A A A A A A G C C U U U G A G G A A U

(アンチセンス鎖029) A U U C C U C A A A G G C U U U U U U

(センス鎖070) G G A C A G A G G G U U C G A G G A A

(アンチセンス鎖070) U U C C U C G A A C C C U C U G U C C

(センス鎖071) A C A G A G G G U U C G A G G A A G A

(アンチセンス鎖071) U C U U C C U C G A A C C C U C U G U

(センス鎖077) G G G A C A U U C U C C A U U C A A A

(アンチセンス鎖077) U U U G A A U G G A G A A U G U C C C

(センス鎖078) G G A C A U U C U C C A U U C A A A A

(アンチセンス鎖078) U U U U G A A U G G A G A A U G U C C

【請求項2】

前記siRNAが、以下の同じ番号を有するセンス鎖およびアンチセンス鎖に3'末端のオーバーハングを付加した二本鎖RNAからなることを特徴とする、請求項1に記載の

G R K 4 遺伝子特異的 s i R N A (低分子干渉 R N A)。

(センス鎖 0 2 8) C A A A A A G C C U U G A G G A A

(アンチセンス鎖 0 2 8) U U C C U C A A A G G C U U U U U U G

(センス鎖 0 7 0) G G A C A G A G G G U U C G A G G A A

(アンチセンス鎖 0 7 0) U U C C U C G A A C C C U C U G U C C

(センス鎖 0 7 8) G G A C A U U C U C C A U U C A A A A

(アンチセンス鎖 0 7 8) U U U U G A A U G G A G A A U G U C C

【請求項 3】

少なくとも G R K 4 遺伝子、G R K 4 m R N A、または G R K 4 を作用標的とする物質を含む乳癌治療用薬剤を製造するための請求項 1 または 2 に記載の G R K 4 遺伝子特異的 s i R N A の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、G タンパク質共役型受容体キナーゼ 4 (G R K 4) 遺伝子発現量の定量法および抑制法に関する。さらに詳しくは、G R K 4 遺伝子発現量を定量リアルタイム P C R により定量し、s i R N A により抑制することに関する。

【背景技術】

【0002】

乳癌は、ほとんどの文明諸国の女性に最もみられる悪性疾患であり、浸潤性乳癌に進展することは、女性の生涯を通じて 1 0 % を超えるリスクがある (非特許文献 1 : Krupnick JG, Benovic JL: The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation, Annu Rev Pharmacol Toxicol 1998, 38:289-319)。浸潤性乳癌は、相互に関連し合う、複雑な複数の増殖経路により維持されている混成的な疾患である。ヒト乳癌の古典的な分類として、治療目的のために 2 つの異なる範疇に分けられている: 1 つはホルモンが関係しており、他方はホルモンが関わっていない。最近の広範な研究から、浸潤性乳癌の 1 5 ~ 2 0 % において H E R - 2 / n e u 遺伝子が増幅され、過剰に発現されており (非特許文献 2 : Weiss ER, Raman D, Shirakawa S, Ducceschi MH, Bert ram PT, Wong F, Kraft TW, Osawa S: The cloning of GRK7, a candidate cone opsin kinase, from cone- and rod-dominant mammalian retinas, Mol Vis 1998, 4:27)、上皮増殖因子受容体 (E G F R) が乳癌の 0 ~ 1 4 % では増幅されていたことが明らかにされた (非特許文献 3 : Pi M, Oakley RH, Gesty-Palmer D, Cruickshank RD, Spurney RF, L uttrell LM, Quarles LD: Beta-arrestin- and G protein receptor kinase-mediated calcium-sensing receptor desensitization, Mol Endocrinol 2005, 19:1078-1087) (非特許文献 4 : Sallese M, Mariggio S, Collodel G, Moretti E, Piomboni P, Baccetti B, De Blasi A: G protein-coupled receptor kinase GRK4. Molecular analysis of the four isoforms and ultrastructural localization in spermatozoa and germinal cells, J Biol Chem 1997, 272:10188-10195)。さらに現在のところ、トラスツズマブ (ハーセプチン) が、H E R - 2 / n e u が過剰発現している腫瘍の治療のために最初に認可された薬剤である。標的化治療およびホルモン療法はいずれも乳癌患者の生存に対しかなり著しい影響を与えたが、転移性の疾患治療は、今なお対症的のままであり、またアジュバント療法は、最適の結果を保証するものではない。

20

30

40

【0003】

G タンパク質共役型受容体キナーゼ (G-protein-coupled receptor kinase、本願では G R K または G P K とともに称する) は、活性化された G タンパク質共役型受容体 (非特許文献 5 : Spyrtos F, Delarue JC, Andrieu C, Lidereau R, Champeme MH, Hacene K, Brunet M: Epidermal growth factor receptors and prognosis in primary breast cancer, Breast Cancer Res Treat 1990, 17:83-89) の 3 番目の細胞質ループもしくはテイルをリン酸化することにより、相応の脱感作を開始する (非特許文献 5 : Spyrtos F, Delarue JC, Andrieu C, Lidereau R, Champeme MH, Hacene K, Brunet M: Epidermal growth fac

50

tor receptors and prognosis in primary breast cancer, Breast Cancer Res Treat 1990, 17:83-89) (非特許文献6: Ro J, North SM, Gallick GE, Hortobagyi GN, Gutterm an JU, Blick M: Amplified and overexpressed epidermal growth factor receptor gene in uncultured primary human breast carcinoma, Cancer Res 1988, 48:161-164)。
これにより細胞が細胞外のシグナルの変化に適応することを可能にする。G R Kはセリン／スレオニンに特異なプロテインキナーゼであり、7個のイソ型からなり、3つのファミリーに分割される(非特許文献7: Virlon B, Firsov D, Cheval L, Reiter E, Troispoux C, Guillou F, Elalouf JM: Rat G protein-coupled receptor kinase GRK4: identification, functional expression, and differential tissue distribution of two splice variants, Endocrinology 1998, 139:2784-2795)。

10

【0004】

G R K 1 および G R K 7 は、ロドプシンキナーゼ／視覚ファミリーからなり、例外なくレチナで発現しており、桿状体および錐体においてオプシンの脱感作に参加している(非特許文献8: Sallèse M, Salvatore L, D'Urbano E, Sala G, Storto M, Launey T, Nicoletti F, Knopfel T, De Blasi A: The G-protein-coupled receptor kinase GRK4 mediates homologous desensitization of metabotropic glutamate receptor 1, Faseb J 2000, 14:2569-2580) (非特許文献9: Perroy J, Adam L, Qanbar R, Chenier S, Bouvier M: Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4, Embo J 2003, 22:3816-3824) (非特許文献10: Oikawa K, Ohbayashi T, Kiyono T, Nishi H, Isaka K, Umezawa A, Kuroda M, Mukai K: Expression of a novel human gene, human wings apart-like (hWAPL), is associated with cervical carcinogenesis and tumor progression, Cancer Res 2004, 64:3545-3549)。

20

【0005】

G R K 2 および G R K 3 は、もともとはβ-アドレナリン受容体を調節しているとして同定され、A R K ファミリーを構成する。G R K 4 ファミリーは、G R K 4、G R K 5 および G R K 6 からなる。G R K-仲介リン酸化は該受容体／Gタンパク質相互作用を低下させ、リン酸化されたG P C R にアレスチン (a r r e s t i n) 結合を開始させることが示されてきた(非特許文献11: Rankin ML, Marinec PS, Cabrera DM, Wang Z, Jose PA, Sibley DR: The D1 dopamine receptor is constitutively phosphorylated by G protein-coupled receptor kinase 4, Mol Pharmacol 2006, 69:759-769)。G R K 2、3、5 および 6 は哺乳類組織中に極めて広範に分布して存在するが、対照的に G R K 4 は、圧倒的に精巣(非特許文献12: Miller WE, Lefkowitz RJ: Expanding roles for beta-arrestins as scaffolds and adapters in GPCR signaling and trafficking, Curr Opin Cell Biol 2001, 13:139-145)に見出され、これより少ないがプルキニエ細胞および腎臓(非特許文献13: Lefkowitz RJ, Shenoy SK: Transduction of receptor signals by beta-arrestins, Science 2005, 308:512-517) (非特許文献14: Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG, Lefkowitz RJ: Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes, Science 1999, 283:655-661)にも見出されている。最近、G R K の発現様式および G R K の調節の機構に関する理解は進んでいるにもかかわらず、それらの特異性および機能的な役割については余り知られていない。

30

40

【発明の開示】

【0006】

本発明者らは、G R K 4 がヒト乳癌細胞において高度に発現されていることを初めて発見し、さらに研究を進めたところ、G R K 4 を過剰発現しているN I H 3 T 3細胞が癌化する活性を示し、G R K 4 s i R N A がヒト乳癌細胞の増殖を抑制することも見出した。加えてG R K 4 はβ-アレスチンと相互作用をしており、細胞外シグナルに調節されるキナーゼ (E x t r a c e l l u l a r S i g n a l - R e g u l a t e d K i n a s e : E R K) 1 / 2 経路を活性化させることの知見を得た。本発明者らはこれらの知見

50

に基づき、G R K 4 によるヒト乳癌の診断、治療に関わる本発明を完成した。

【0007】

本発明者らは、上記の問題を解決すべく鋭意検討した結果、ある特定の配列を有するプライマーセットを使用した場合に定量リアルタイムPCRによる遺伝子の増幅効率が高く、またある特定の配列を有する siRNA が G R K 4 タンパク質の発現を有意に抑制することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明は以下に記載した事項により特定される。

【0009】

PCR用のGタンパク質共役型受容体キナーゼ4（G R K 4）遺伝子に特異的なプライマーセットであることを特徴とし、該プライマーセットが、以下の配列またはその配列アナログを有する。

【0010】

5' - G G G A C T G A A G G A G G A G A A C C - 3'

5' - T T T G T T A C G G G T T G C C T T T C - 3'

また、乳癌細胞において、G R K 4 mRNA の発現量を、前記プライマーセットを使用し、定量リアルタイムPCR法により決定することができる。

【0011】

乳癌細胞において、G R K 4 遺伝子、H E R - 2 / n e u 遺伝子、および／または E G F R 遺伝子の発現プロファイルを作成するためのキットであり、少なくとも

(i) G R K 4 遺伝子、H E R - 2 / n e u 遺伝子および E G F R 遺伝子のうち、少なくとも1つに特異的なプライマーセット、および

(ii) 定量リアルタイムPCR用の試薬類を含むことを特徴とする。

【0012】

また、上記キットは、マイクロアレイ化されていてもよい。

【0013】

G R K 4 α 遺伝子、G R K 4 β 遺伝子、G R K 4 γ 遺伝子および G R K 4 δ 遺伝子からなる G R K 4 遺伝子サブファミリーの発現パターンにおいて、それらのバリエーションに特異的な抗体を用いる免疫分析により、乳癌検出、乳癌の病態判別、増殖のステータスもしくは亢進の可能性、または再発可能性を診断、評価または予見するためのデータを提供する乳癌検査方法であることを特徴とする。

【0014】

乳癌細胞において、細胞増殖を阻害または細胞死を誘導するための G R K 4 遺伝子特異的 siRNA （低分子干渉RNA）であることを特徴とする。

【0015】

上記 G R K 4 遺伝子特異的 siRNA が、以下の同じ番号を有するセンス鎖およびアンチセンス鎖に3'末端のオーバーハングを付加した二本鎖RNAからなることを特徴とする。

【0016】

(センス鎖001) U C G A G A A C A U C G U G G C C A A

(アンチセンス鎖001) U U G G C C A C G A U G U U C U C G A

(センス鎖002) G C U G A A A G C G C G U C A A G G A

(アンチセンス鎖002) U C C U U G A C G C G C U U U C A G C

(センス鎖003) G A A A G C G C G U C A A G G A G G A

(アンチセンス鎖003) U C C U C C U U G A C G C G C U U U C

(センス鎖004) U C A A G G A G G A U A U G G C A A A

(アンチセンス鎖004) U U U G C C A U A U C C U C C U U G A

(センス鎖005) A G G A G G A U A U G G C A A A A A A

(アンチセンス鎖005) U U U U U U G C C A U A U C C U C C U

10

20

30

40

50

(センス鎖006)	AAAAAGUGGUCGUAGUAAA	
(アンチセンス鎖006)	UUUACUACGACCACUUUUU	
(センス鎖007)	AAAAAGUGGUCGUAGUAAA	
(アンチセンス鎖007)	UUUUACUACGACCACUUUUU	
(センス鎖008)	AAAAAUGGAAGGAGAUACU	
(アンチセンス鎖008)	AGUAUCUCCUUC CAUUUUU	
(センス鎖009)	GGAAGGAGAUACUGACACU	
(アンチセンス鎖009)	AGUGUCAGUAUCUCCUUC	
(センス鎖010)	CAGCCAGUGCAGUGAGCUU	
(アンチセンス鎖010)	AAGCUCACUGCACUGGCUG	10
(センス鎖011)	UGAAAAGGAUUUAUAGCAGU	
(アンチセンス鎖011)	ACUGCUAUAAUCCUUUUCA	
(センス鎖012)	GAAAAGGAUUUAUAGCAGUC	
(アンチセンス鎖012)	GACUGCUAUAAUCCUUUUC	
(センス鎖013)	CAAGCAACCGAUAGGAAGA	
(アンチセンス鎖013)	UCUUC CUAU CGGUUGCUUG	
(センス鎖014)	CUAAAGAGGCACA UUGAAU	
(アンチセンス鎖014)	AUUC AAUGUGCCUCUUUAG	
(センス鎖015)	CAGAAUAUGAAGUUGCCGA	
(アンチセンス鎖015)	UCGGCAACUUC AU AUUCUG	20
(センス鎖016)	GAUGAGGACCGAAGUGAUU	
(アンチセンス鎖016)	AAUCACUUCGGUCCUCAUC	
(センス鎖017)	GGACCGAAGUGAUUGUGGA	
(アンチセンス鎖017)	UCCACA AUCA CUUCGGUCC	
(センス鎖018)	CCGAAGUGAUUGUGGACUG	
(アンチセンス鎖018)	CAGUCCACA AUCA CUUCGG	
(センス鎖019)	GGACUGUCA AU CUUAGAU	
(アンチセンス鎖019)	UAUCUAAGAUUGACAGUCC	
(センス鎖020)	AGAAAUACCUCCAGAUUU	
(アンチセンス鎖020)	AACAUCUGGAGGU AUUUCU	30
(センス鎖021)	CUCCAGAUUGUUGUACAGA	
(アンチセンス鎖021)	UCUGUCACAACAUCUGGAG	
(センス鎖022)	GAAUGUAGAUUGGGACUGA	
(アンチセンス鎖022)	UCAGUCCCA AU CUACAUC	
(センス鎖023)	GAUUGGGACUGAAGGAGGA	
(アンチセンス鎖023)	UCCUCCUUCAGUCCCAAU	
(センス鎖024)	GAGGAGAACCCUUC CAAAA	
(アンチセンス鎖024)	UUUUGGAAGGGUUCUCCUC	
(センス鎖025)	AGGAGAACCCUUC CAAAAA	
(アンチセンス鎖025)	UUUUUGGAAGGGUUCUCCU	40
(センス鎖026)	GGAGAACCCUUC CAAAAA	
(アンチセンス鎖026)	UUUUUUGGAAGGGUUCUCC	
(センス鎖027)	CAAAAAAAGCCUUGAGGA	
(アンチセンス鎖027)	UCCUCA AAGGC UUUUUUGG	
(センス鎖028)	CAAAAAAAGCCUUGAGGAA	
(アンチセンス鎖028)	UUCCUCA AAGGC UUUUUUG	
(センス鎖029)	AAAAAAGCCUUGAGGAAU	
(アンチセンス鎖029)	AUUCCUCA AAGGC UUUUUU	
(センス鎖030)	GAGGA AUGUACUAGAGUUG	
(アンチセンス鎖030)	CAACUCUAGUACA UUCUC	50

(センス鎖031)	GUACUAGAGUUGCCCAUAA	
(アンチセンス鎖031)	UUAUGGGCAACUCUAGUAC	
(センス鎖032)	GGGAACCAUUUGAAGAAUA	
(アンチセンス鎖032)	UAUUCUUCAAAUGGUUCCC	
(センス鎖033)	CAAUGGAAAUUGGCUGGAAA	
(アンチセンス鎖033)	UUUCCAGCCAUUUCCAUUG	
(センス鎖034)	GGAAAUGGCUGGAAAGGCA	
(アンチセンス鎖034)	UGCCUUUCCAGCCAUUUCC	
(センス鎖035)	GAAAUGGCUGGAAAGGCAA	
(アンチセンス鎖035)	UUGCCUUUCCAGCCAUUUC	10
(センス鎖036)	CUGGAAAGGCAACCCGUAA	
(アンチセンス鎖036)	UUACGGGUUGCCUUUCCAG	
(センス鎖037)	CAAAGAACACAUUUAGACA	
(アンチセンス鎖037)	UGUCUAAAUUGUGUUCUUUG	
(センス鎖038)	AUUACAGAGUUCUAGGAAA	
(アンチセンス鎖038)	UUUCCUAGAACUCUGUAAU	
(センス鎖039)	UUACAGAGUUCUAGGAAAA	
(アンチセンス鎖039)	UUUUCUAGAACUCUGUAA	
(センス鎖040)	AGGAAAAGGCGGAUUUGGA	
(アンチセンス鎖040)	UCCAAAUCGCGCCUUUCCU	20
(センス鎖041)	GAAAAGGCGGAUUUGGAGA	
(アンチセンス鎖041)	UCUCCAAAUCGCGCCUUUUC	
(センス鎖042)	AGGCGGAUUUGGAGAGGUU	
(アンチセンス鎖042)	AACCUUCUCCAAAUCGCGCU	
(センス鎖043)	AGUGCGAGCCACAGGAAAA	
(アンチセンス鎖043)	UUUUCUUGUGGCUCGCACU	
(センス鎖044)	GAAAAAUGUAUGCCUGCAA	
(アンチセンス鎖044)	UUGCAGGCAUACAUUUUUC	
(センス鎖045)	CUGCAAAAAGCUACAAAAA	
(アンチセンス鎖045)	UUUUUGUAGCUUUUUGCAG	30
(センス鎖046)	AGAAUAAAGAGAGGAAAG	
(アンチセンス鎖046)	CUUUCUUCUUCUUUAUUCU	
(センス鎖047)	UAAAGAGAGAGGAAAGGUGA	
(アンチセンス鎖047)	UCACCUUUCUUCUUCUUUA	
(センス鎖048)	AAAGAGAGAGGAAAGGUGAA	
(アンチセンス鎖048)	UUCACCUUUCUUCUUCUUU	
(センス鎖049)	AGAGGAAAGGUGAAGCUAU	
(アンチセンス鎖049)	AUAGCUUCACCUUUCCUCU	
(センス鎖050)	GAGGAAAGGUGAAGCUAUG	
(アンチセンス鎖050)	CAUAGCUUCACCUUUCCUC	40
(センス鎖051)	GCUCUAAAUGAGAAAAGAA	
(アンチセンス鎖051)	UUCUUUUCUCAUUUAGAGC	
(センス鎖052)	GAGAAAAGAAUUCUGGAGA	
(アンチセンス鎖052)	UCUCCAGAAUUCUUUUCUC	
(センス鎖053)	AGAAAAGAAUUCUGGAGAA	
(アンチセンス鎖053)	UUCUCCAGAAUUCUUUUCU	
(センス鎖054)	GAAAAGAAUUCUGGAGAAA	
(アンチセンス鎖054)	UUUCUCCAGAAUUCUUUUC	
(センス鎖055)	AAAGAAUUCUGGAGAAAGU	
(アンチセンス鎖055)	ACUUUCUCCAGAAUUCUUU	50

(センス鎖056)	UGGAGAAAGUGCAAAGUAG	
(アンチセンス鎖056)	CUACUUUGCACUUUCUCCA	
(センス鎖057)	GGAGAAAGUGCAAAGUAGA	
(アンチセンス鎖057)	UCUACUUUGCACUUUCUCC	
(センス鎖058)	GAGAAAGUGCAAAGUAGAU	
(アンチセンス鎖058)	AUCUACUUUGCACUUUCUC	
(センス鎖059)	CAAAGUAGAUUCGUAGUUA	
(アンチセンス鎖059)	UAACUACGAAUCUACUUUG	
(センス鎖060)	GUAGAUUCGUAGUUAGUUU	
(アンチセンス鎖060)	AAACUAAACUACGAAUCUAC	10
(センス鎖061)	CCAAAGAUGCCUUGUGCUU	
(アンチセンス鎖061)	AAGCACAAAGGCAUCUUUGG	
(センス鎖062)	ACAUUUACAACCUGGGCAA	
(アンチセンス鎖062)	UUGCCCAGGUUGUAAAUGU	
(センス鎖063)	UGGAAGAUUUACAGAGGGA	
(アンチセンス鎖063)	UCCCUCUGUAAAUCUCCA	
(センス鎖064)	GAAGAUUUACAGAGGGAAA	
(アンチセンス鎖064)	UUUCCCUCUGUAAAUCUUC	
(センス鎖065)	GGAAAGAAUUGUAUACAGA	
(アンチセンス鎖065)	UCUGUAUACA AUUCUUUCC	20
(センス鎖066)	ACAGAGACUUGAAGCCUGA	
(アンチセンス鎖066)	UCAGGCUUC AAGUCUCUGU	
(センス鎖067)	ACUUGAAGCCUGAGAAUAU	
(アンチセンス鎖067)	AUAUUCUCAGGCUUCAAGU	
(センス鎖068)	CAGAGAUCCCAGAAAGGACA	
(アンチセンス鎖068)	UGUCCUUCUGGGAUCUCUG	
(センス鎖069)	CCAGAAAGGACAGAGGGUUC	
(アンチセンス鎖069)	GAACCCUCUGUCCUUCUGG	
(センス鎖070)	GGACAGAGGGUUCGAGGAA	
(アンチセンス鎖070)	UUCUCGAACCCUCUGUCC	30
(センス鎖071)	ACAGAGGGUUCGAGGAAGA	
(アンチセンス鎖071)	UCUUCUCGAACCCUCUGU	
(センス鎖072)	UCGAGGAAGAGUUGGAACA	
(アンチセンス鎖072)	UGUUCCAACUCUUCUCGA	
(センス鎖073)	GAGUUGGAACAGUCGGCUA	
(アンチセンス鎖073)	UAGCCGACUGUUC CAACUC	
(センス鎖074)	CUACAUGGCACCUGAAGUU	
(アンチセンス鎖074)	AACUUCAGGUGCCAUGUAG	
(センス鎖075)	CACCUGAAGUUGUCAAUAA	
(アンチセンス鎖075)	UUAUUGACAACUUCAGGUG	40
(センス鎖076)	AUGAAAUGAUUCAGGGACA	
(アンチセンス鎖076)	UGUCCCUGAAAUCAUUUCAU	
(センス鎖077)	GGGACAUUCUCCA UUCAAA	
(アンチセンス鎖077)	UUUGAAUGGAGAAUGUCCC	
(センス鎖078)	GGACA UUCUCCA UUCAAAA	
(アンチセンス鎖078)	UUUUGAAUGGAGAAUGUCC	
(センス鎖079)	AAGAGAAAGUCAAAUGGGA	
(アンチセンス鎖079)	UCCCAU UUGACUUUCUCUU	
(センス鎖080)	UCAA AUGGGAGGAGGUCGA	
(アンチセンス鎖080)	UCGACCUC CUC CCAUUUGA	50

(センス鎖081) GGGAGGAGGUUCGAUCAAAG
 (アンチセンス鎖081) CUUUGAUCGACCUCCUCCC
 (センス鎖082) CGAUCAAAGAAUCAAGAAU
 (アンチセンス鎖082) AUUCUUGAUUUCUUUGAUCG
 (センス鎖083) GAUCAAAGAAUCAAGAAUG
 (アンチセンス鎖083) CAUUCUUGAUUUCUUUGAUC
 (センス鎖084) AGAAUGAUACCGAGGAGUA
 (アンチセンス鎖084) UACUCCUCGGUAUCAUUCU
 (センス鎖085) AGGAGUAUUCUGAGAGUU
 (アンチセンス鎖085) AACUUCUCAGAAUACUCCU
 (センス鎖086) UGAGAGGUUUUCAGAGGAU
 (アンチセンス鎖086) AUCCUCUGAAAACUUCUCA
 (センス鎖087) GGAUGUUACUCACCAAGAA
 (アンチセンス鎖087) UUCUUGGUGAGUAACAUC
 (センス鎖088) UCAGGAGGCGUGGAGGCAAA
 (アンチセンス鎖088) UUUGCCUCCAGCCUCCUGA
 (センス鎖089) GUAAGGACGUCUCCUGGAUAU
 (アンチセンス鎖089) AUAUCCAGGACGUCUCCUAC
 (センス鎖090) CCGCAGAUGAAGACUUCUA
 (アンチセンス鎖090) UAGAAGUCUUCAUUCGCGG
 (センス鎖091) CAGAAUGAGAUGAUCGAU
 (アンチセンス鎖091) AUUCGAUCAUCUCAUUCUG
 (センス鎖092) UCAACAAAAGUGAAAGUGA
 (アンチセンス鎖092) UCACUUCACUUCUUUGUGA
 (センス鎖093) CAACAAAAGUGAAAGUGAG
 (アンチセンス鎖093) CUCACUUCACUUCUUUGUG
 (センス鎖094) CAAAAGUGAAAGUGAGGAA
 (アンチセンス鎖094) UUCUUCACUUCUUCACUUCU
 (センス鎖095) GUGAAAGUGAGGAAGCUUU
 (アンチセンス鎖095) AAAGCUUCUCCUACUUCAC
 (センス鎖096) GUGAGGAAGCUUUGCCAUU
 (アンチセンス鎖096) AAUGGCAAGCUUCUCCUAC
 (センス鎖097) CAUUAGAUUCUAGACAAGAA
 (アンチセンス鎖097) UUCUUGUCUAGAUCUAAUG
 (センス鎖098) AGAAGGAAGUGGAACCCAA
 (アンチセンス鎖098) UUGGGUUCACUUCUCCUUCU
 (センス鎖099) GGAAGUGGAACCCAAAGCAA
 (アンチセンス鎖099) UUGCUCUGGGUUCACUUC
 (センス鎖100) CAGGAAGGAGCAUGUGUUA
 (アンチセンス鎖100) UAACACAUGCUCUCCUUCUG

10

20

30

40

また、上記GRK4遺伝子特異的siRNAが、少なくともGRK4遺伝子、GPK4 mRNA、またはGPK4を作用標的とする物質を含む乳癌治療用薬剤を製造するために使用されることを特徴とする。

【0017】

さらに、GRK4タンパク質および／またはGRK4遺伝子を標的分子とする乳癌の分子標的治療方法であることを特徴とする。

【0018】

本発明は、乳癌細胞において、ある特定の配列を有するプライマーセットを使用した場合に定量リアルタイムPCRによる遺伝子の増幅効率に優れ、またGRK4タンパク質の発現を有意に抑制するある特定の配列を有するsiRNAを提供することができる。

50

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

以下、本発明の実施の形態を詳細に説明する。

【0020】

本発明のプライマーセットは、PCR用のGタンパク質共役型受容体キナーゼ4（GRK4）遺伝子に特異的なプライマーセットであり、好ましくはそのプライマーセットが、以下の配列またはその配列アナログを有する。

【0021】

5' - GGGACTGAAGGAGGAGAACCC - 3'

5' - TTTGTTACGGGTTCCTTTTC - 3'

10

PCRは、その種類を問わないが、Gタンパク質共役型受容体キナーゼ4（GRK4）遺伝子またはそのDNAの増幅に使用される。

【0022】

上記配列のアナログ（analogue）とは、上記提示の配列の類似配列であり、かつ、PCRでの増幅においてプライマー機能を発揮する塩基配列である。一例としてのヒトGRK4の塩基配列（図8）において具体的に検索されるが、cDNA完全長、好ましくは選択的スプライシングの影響を受けない領域、より好ましくは高度に保存された領域、もっとも好ましくは1077～1235塩基の領域の塩基配列から選ばれる配列が望ましい。特に上記の塩基配列を有するプライマーが増幅効率上、最適であると考えられる。

【0023】

20

上記プライマーセットまたはその配列アナログは、特に乳癌細胞において、GRK4 mRNAの発現量を、前記プライマーセットを使用し、定量リアルタイムPCR法により決定する場合に好適に使用することができる。このプライマーセットを使用する定量リアルタイムPCR法は、乳癌組織で発現が亢進しているGRK4タンパク質をコードするGRK4 mRNAの発現量、あるいはこのGRK4 mRNAとともに、他の発癌遺伝子のmRNA発現量を併せて調べることにより発現プロファイルを作成するための有力な手法として本発明では利用される。

【0024】

〔Gタンパク質共役型受容体キナーゼ4（GRK4）〕

Gタンパク質共役型受容体キナーゼ（GPK）は、セリン／スレオニンに特異的なプロテインキナーゼであり、7個のイソ型からなり、3つのファミリーに分割される。また、GRK4のサブファミリーは、GRK4 α 、 β 、 γ および δ と名づけられた4つの選択的スプライシングバリエーション（引用文献17、20および29）を有する（図2のA）。

30

【0025】

さらに、GRK4は、圧倒的に精巣（Miller WE, Lefkowitz RJ: Expanding roles for beta-arrestins as scaffolds and adapters in GPCR signaling and trafficking, Curr Opin Cell Biol 2001, 13:139-145）に見出され、これより少ないがプルキニエ細胞および腎臓（Lefkowitz RJ, Shenoy SK: Transduction of receptor signals by beta-arrestins, Science 2005, 308:512-517）（Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG, Lefkowitz RJ: Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes, Science 1999, 283:655-661）にも見出されている。

40

【0026】

〔乳癌〕

なお、本明細書において「乳癌」は、終末乳管から発生する乳管癌および小葉から発生する小葉癌の両方を含む。ここで「癌」は「悪性腫瘍」をいうが、単に「腫瘍」と言及することもある。また、「悪性転換」と「癌化」とは同義のように使用することもある。

【0027】

被験者からの腫瘍組織は通常、生検（バイオプシー）によって得られる。その詳細は後述する。冷凍保存されていた腫瘍の試料を10%の中性緩衝化ホルマリン中において固定

50

し、通常どおりに処理し、パラフィン中に包埋した。組織学的診断を原発腫瘍の1から4の原断面を精査することによって確認した。すべての腫瘍を組織型について同時に見直し、この臨床データを知らされていない熟練病理学者2人によって格付けした。もっとも代表的なブロックを、免疫組織化学的アッセイ用に、新しく5 μmの厚さに切った切片から選んだ。この研究において使用した腫瘍の試料を表1にまとめた。これらの試料より、mRNAを抽出し、リアルタイムPCR法を行うことにより乳癌の発症、増殖に関わる遺伝子発現が測定される。

【0028】

【表1】

GRK4の発現と患者の特徴との相関					「強陽性」／「弱陽性」 対「陰性」の P値	
年齢	全78例 (n=78)	GRK4の 強陽性 (n=30)	GRK4の 弱陽性 (n=26)	GRK4 陰性 (n=22)		
40歳以下	6	2	1	3		
40歳を超える	72	28	25	19		
組織型						
乳管	68	24	25	19		
小葉	7	5	1	1		
粘液	2	1	0	1		
延髄	1	0	0	1		
組織学的グレード						
I+II	42	11	16	15		
III	26	13	9	4		
非浸潤性	10	6	1	3		
腫瘍の大きさ						
2cm以下	36	11	14	11		
2cmを超える	42	19	12	11		
リンパ管転移						
陽性	33	18	7	8		
陰性	43	12	18	13		
不明	2	0	1	1		
ERステータス						
陽性(3+, 2+)	43	16	18	9		
陰性(1+, 0)	34	14	7	13		
不明	1	0	1	0		
HER-2/neuステータス						
陽性(3+, 2+)	20	10	7	3		
陰性(1+, 0)	51	18	18	15		
不明	7	2	1	4		

【0029】

〔乳癌に関係する遺伝子の発現〕

試料として乳癌細胞と正常な乳房細胞とから別々にmRNAを抽出し、このmRNAを別々の蛍光色素により標識し、cDNA（mRNAと相補的な塩基配列を有するDNA）を合成する。これら標識化されたcDNAを混合し、ガラス板上にスポットして固定化されたDNAと結合させる操作（ハイブリダイゼーション）を用いて、遺伝子の発現量の比を検出する。

【0030】

乳癌切除検体（乳管癌10例および小葉癌3例）よりRNAを抽出し、症例ごとにマイクロアレイを用い2万遺伝子の遺伝子発現プロファイルを解析した。その結果により乳癌の腫瘍形成、増殖に関わる遺伝子の検索が可能となる。

【0031】

〔定量リアルタイムPCR法〕

本発明の定量リアルタイムPCR法は、リアルタイムPCRとRT-PCR（逆転写PCR）とを組み合わせ、mRNAの定量に使用される実験法である。これにより、細胞内のある時点での遺伝子の発現量を定量することができる。ここで、リアルタイムPCRとは、定量PCRの一つであって、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による増幅を経時的（リアルタイム）に測定することにより、増幅率に基づいて鋳型DNAを定量することができる実験法をいう。この定量は、蛍光色素を用いて行なわれ、二種類の方法がある。1）二本鎖DNAに特異的に挿入（インターカレート）して蛍光を発する色素（SYBER Green）を用いる方法と、2）鋳型DNAの配列に特異的なオリゴヌクレオチドに蛍光色素を結合させたものをプローブとして用いる方法である。本発明では上記1）の方法を用いたが、これに限定されるものではない。

【0032】

具体的には、最初の鎖であるcDNAを、オリゴ（dT）₁₇プライマーとM-MLV逆転写酵素（Invitrogen、カールスバッド、カリフォルニア州）により全RNA 1μgから合成した。リアルタイムPCR法を、Takara Ex Taq R-PCRバージョン2.1（Takara Bio社、滋賀、日本）、ROX Reference Dye（Stratagene）およびSYBER Green I（Cambrex、ワシントンDC）とともにMx3005P QPCR系（Stratagene、ラ・ホヤ、カリフォルニア州）を使用し実行した。本発明者らは、GRK4特異的プライマーとして5'-GGGACTGAAGGAGGAGAACCC-3'および5'-TTTGTTACGGGTTCCTTTC-3'を、HER-2/neu特異的プライマーとして5'-TGGAGAACCCCGAGTACTTG-3'および5'-TAGGTGTCCTTTTGAAGGTG-3'を、およびEGFR特異的プライマーとして5'-CCAAGCCATATGACGGAATC-3'および5'-ACTATCTGCGTCTATCATCC-3'を使用した。β-アクチン特異的プライマーは、既に記載されている（Oikawaら 2004, Cancer Res.）。反応混合物を95℃で30秒間変性させ、次に95℃で10秒間、60℃で30秒間PCRの50サイクルに供した。GRK4、Her2/neuおよびEGFRのmRNAレベルをβ-アクチンのシグナルに対して標準化した。本発明者らは、mRNAレベルを決定するためにこれらの実験を二重に行った。

【0033】

なおマイクロアレイとは、数万～数十万に区切られたガラス板またはシリコン基盤の上に、DNAの部分配列を高密度に配置し固定したものである。これにより、数万～数十万の遺伝子発現を一度に調べることが可能である。

【0034】

本発明のキットは、乳癌細胞において、GRK4遺伝子、HER-2/neu遺伝子、および/またはEGFR遺伝子の発現プロファイルを作成するためのキットであり、少なくとも

(i) GRK4遺伝子、HER-2/neu遺伝子およびEGFR遺伝子のうち、少なくとも1つに特異的なプライマーセット、および

10

20

30

40

50

(i i) 定量リアルタイム P C R 用の試薬類を含むことを特徴としている。

【 0 0 3 5 】

そのキットは、G R K 4 遺伝子単独の発現を調べるためのキットでもよく、この遺伝子のほかにH E R - 2 / n e u 遺伝子、および／またはE G F R 遺伝子の発現をも測定して発現プロファイルを作成するためのキットであってもよい。具体的には、そのキットには、検体を溶解するための溶解液、各種器材または資材、試薬および／または遺伝子増幅を実施するためのプライマー類、試薬を含むものである。これらの試薬の中には、各種酵素類、緩衝液、洗浄液、溶解液なども含まれる。キット要素として、さらに多数検体の同時処理ができるマイクロタイタープレート、D N A 増幅用具などの必要な器材一式、使用説明書などを含んでもよい。

10

【 0 0 3 6 】

本発明のハイスループットな態様は、マイクロアレイ化されているか、あるいは上記キットの中に、マイクロリアクタ形態のもの、具体的にはチップ形状の器材（例えば発現プロファイル作成用マイクロアレイ）を含んでもよい。このような構成では、チップから得られる信号についての数値化されたものを取り込み、ファイルを作成し、コンピュータ上の所定のディレクトリに保存する形態を採用するシステムが好ましい。数値データを統計的に処理し、乳癌検出、乳癌の病態判別、増殖のステータスもしくは亢進の可能性を診断、評価または予見するためのデータを提供する。そのためのデータ処理は、必要な補正、正規化を経て、統計的解析を可能とする好適なソフトウェアを使用して行われる。

20

【 0 0 3 7 】

〔検査方法〕

本発明の検査方法は、G R K 4 α 遺伝子、G R K 4 β 遺伝子、G R K 4 γ 遺伝子およびG R K 4 δ 遺伝子からなるG R K 4 遺伝子サブファミリーの発現パターンにおいて、それらのバリエーションに特異的な抗体を用いる免疫分析により、乳癌検出、乳癌の病態判別、増殖のステータスもしくは亢進の可能性、または再発可能性を診断、評価または予見するためのデータを提供する乳癌検査方法であることを特徴とする。

【 0 0 3 8 】

〔乳癌検査法〕

一般的な乳癌のスクリーニング検査としては、問診、触診、軟X線乳房撮影（マンモグラフィー）、超音波検査等が実施され、臨床的に疑いが生じると、生検が実施され組織学的診断により癌を判別する。以下の乳癌検出および病態判別、増殖のステータスもしくは亢進の可能性、ならびに再発可能性における診断、評価または予見するために、G R K 4 のm R N A の発現量とG R K 4 に特異的な抗体を用いる免疫分析とのデータが有効である。

30

【 0 0 3 9 】

〔乳癌検出〕

診察やスクリーニング検査で乳房にしこりなどの異常が見つかった場合は、さらに検査を行う必要がある。マンモグラフィ検査以外の方法で異常が見つかった場合には、まずマンモグラフィ検査を行う。

40

【 0 0 4 0 】

充実性のしこりの場合は嚢胞よりも癌の可能性が高いため、生検を行う。吸引生検といい、注射器を使用ししこりから細胞を吸引する方法がよく行われる。また、組織の一部を切除する方法（切開生検）や、しこり全体を摘出する方法（切除生検）も行なうことがある。

【 0 0 4 1 】

生検では、採取した組織を顕微鏡で観察して癌細胞の有無を確認する。癌細胞が検出された場合は試料をさらに分析し、癌細胞の特性、たとえばエストロゲンあるいはプロゲステロン受容体の有無、H E R - 2 / n e u 受容体の数、癌細胞の増殖速度などを調べる。これらの情報は癌が転移する速度を予測し、より有効な治療法を選ぶのに役立つ。

50

【0042】

癌が転移しているかどうかを診断するため、胸部X線検査と肝機能を調べる血液検査を行う。腫瘍が大きい場合、あるいはリンパ節が腫れている場合は、全身の骨のX線撮影（骨スキャン）を実施することもある。

【0043】

〔病態判別〕

乳癌の病期（ステージ）は一般に、非浸潤癌（上皮内癌）、局所浸潤癌、領域浸潤癌、遠隔転移癌（転移癌）という名称または、数字でステージ0～IVとして表現する。

【0044】

非浸潤癌（上皮内癌）は、局所にとどまっている癌という意味であり、最も初期の癌に相当する。乳房内で著しく大きくなっていることもあるが、周囲の組織への浸潤や体内の他の部位への転移は起こしていない。通常はマンモグラフィ検査で発見される。

【0045】

局所浸潤癌は、周囲の組織に浸潤しているものの乳房内にとどまっている癌をいう。

【0046】

領域浸潤癌は、胸壁やリンパ節など乳房周囲の組織にも浸潤している癌をいう。

【0047】

遠隔転移癌（転移癌）は、乳房から体内の別の部位に転移した癌をいう。

【0048】

また、乳癌は、癌細胞が最初に発生した組織の種類と、病巣の広がりによって分類される。乳管で発生した癌を乳管癌といい、乳癌のおよそ90%はこのタイプである。乳腺で発生した癌は小葉癌という。脂肪組織や結合組織から発生したものは肉腫というが、乳房の癌ではまれなタイプである。

【0049】

非浸潤性乳管癌は、乳管内に限局した癌である。この癌は乳房周囲の組織には浸潤していないが、乳管に沿って広がり、乳房内でかなり大きくなることもある。この癌は乳癌の20～30%を占める。

【0050】

非浸潤性小葉癌は、乳腺の内部で増殖する。両側の乳房の複数の部位に生じることも多い。非浸潤性小葉癌は乳癌の1～2%を占める。

【0051】

浸潤性乳管癌は、乳管内で発生するが、管壁を越えて周囲の乳腺組織に浸潤した癌である。乳房以外の部位にも転移することがあり、乳癌の65～80%を占めている。

【0052】

浸潤性小葉癌は、乳腺内で発生して周囲の乳腺組織に浸潤し、さらに乳房以外の部位にも転移する癌である。この癌は乳癌の10～15%を占めている。

【0053】

他に、乳癌全体のおよそ1%を占める炎症性乳癌、および乳頭のパジェット病が知られ、さらに発生頻度が低い乳管由来の浸潤性癌として、髄様癌、管状癌、粘液癌（膠様癌）などがある。

【0054】

〔増殖のステータスもしくは亢進の可能性〕

乳癌の病期（ステージ）は腫瘍のサイズ、リンパ節への浸潤の有無、癌細胞の遠隔転移により決定される。ステージは、具体的に以下の0～IVに分類される。

【0055】

ステージ0：腫瘍が乳管または乳腺に限局し、周囲の乳腺組織への浸潤がない（上皮内癌、非浸潤癌）。

【0056】

ステージI：腫瘍の直径が2cm未満で、乳房外への転移がない。

【0057】

10

20

30

40

50

ステージ I I : 腫瘍の直径が 2 ~ 5 c m で、腫瘍と同じ側の腋（片側または両側）のリンパ節に転移がみられる。

【 0 0 5 8 】

ステージ I I I : 腫瘍の直径が 5 c m を超え、リンパ節への転移があり、周囲の組織への癒着やリンパ節内の癒着がみられる。あるいは腫瘍の大きさに拘わらず皮膚、胸壁、乳房より下流の胸部リンパ節への転移がみられる。

【 0 0 5 9 】

ステージ I V : 腫瘍の大きさに拘わらず、乳房から離れた肺や骨などの臓器や組織、あるいは乳房から離れた部位のリンパ節への転移がみられる。

【 0 0 6 0 】

上記遺伝子群の発現プロファイルを作成するか、あるいは発現の調節を調べることに基づいて高感度・高精度な乳癌の早期検出・診断を行うことができる。乳癌に係する遺伝子の発現プロファイルを調べることにより、乳癌細胞の増殖、病態などに関する情報が得られることの裏づけとなる知見および実験的証拠は、下記に示す本発明者らの研究により積み上げられている。

【 0 0 6 1 】

このようにして乳癌の診断、すなわち、乳癌の検出、乳癌の病態、増殖亢進もしくは転移を評価するためのデータ、さらに予後不良病型への進展を早期検出するデータを得ることができる。特に、それに基づき、患者に病態に関する必要な情報を提供し、経過観察の際に適切に指導して自己管理に役立てることとなる。

【 0 0 6 2 】

〔 G R K 4 遺伝子に基づく乳癌の遺伝子治療〕

本発明の s i R N A （低分子干渉 R N A）は、乳癌細胞において、細胞増殖を阻害または細胞死を誘導するための G R K 4 遺伝子特異的 s i R N A であることを特徴とする。すなわち本発明の s i R N A は、遺伝子の発現を配列特異的に抑制することができる約 1 0 ~ 3 0 ヌクレオチド長の二本鎖 R N A 分子をいう。したがって、G R K 4 遺伝子に基づく乳癌遺伝子治療は、乳癌細胞において、G R K 4 遺伝子特異的 s i R N A を利用し、G R K 4 遺伝子の発現を R N A 干渉によって阻止することに基づく。

【 0 0 6 3 】

本発明の G R K 4 遺伝子特異的 s i R N A は、以下の表 2 に示されている同じ番号を有するセンス鎖およびアンチセンス鎖に、3' 末端のオーバーハングを付加した二本鎖 R N A からなることを特徴とする。なお、表 2 「 G e n e 」 の欄は、G R K 4 遺伝子における s i R N A の標的塩基の番号を示し、「 C D S 」 の欄は、G R K 4 タンパク質のアミノ酸をコードする配列（ C D S ）における s i R N A の標的塩基の番号を示す。

【 0 0 6 4 】

10

20

30

【表 2-1】

Cand#	gene	CDS	Candidate
#1	463	8	UCGAGAACCAUCGUGGCCAA
			UUGGCCACGAUGUUCUGA
#2	491	36	GCUGAAAGCGGCUCAAGGA
			UCCUUGACGGCUUUCAGC
#3	494	39	GAAAGCGCGUCAAGGAGGA
			UCCUCCUUGACGGCGUUC
#4	503	48	UCAAGGAGGAUUGGCAAA
			UUUGCCAUAUCCUCCUGA
#5	506	51	AGGAGGAUAUGGCAAAAA
			UUUUUUGCCAUAUCCUCCU
#6	521	66	AAAAAGUGGUCGUAGUAAA
			UUUACUACGACCACUUUU
#7	522	67	AAAAGUGGUCGUAGUAAA
			UUUUACUACGACCACUUUU
#8	538	83	AAAAAUGGAAGGAGAUACU
			AGUUAUCCUUCUUAUUUU
#9	544	89	GGAAGGAGAUACUGACACU
			AGUGUCAGUAUCUCCUCC
#10	572	117	CAGCCAGUGCAGUGAGCUU
			AAGCUCACUGCACUGGCUG
#11	602	147	UGAAAAGGAUUAUAGCAGU
			ACUGCUAUAUCCUUUUCA
#12	603	148	GAAAAGGAUUAUAGCAGUC
			GACUGCUAUAUCCUUUUC
#13	629	174	CAAGCAACCGAUAGGAAGA
			UCUUCCUAUCGGUUGCUUG
#14	684	229	CUAAAGAGGCACAUUGAAU
			AUUCAAUGUGCCUUCUUAG
#15	718	263	CAGAAUAUGAAGUUGCCGA
			UCGGCAACUUAUAUUCUG
#16	738	283	GAUGAGGACCGAAGUGAUU
			AAUCACUUCGGUCCUUAUC
#17	743	288	GGACCGAAGUGAUUGUGGA
			UCCACAAUCACUUCGGUCC
#18	746	291	CCGAAGUGAUUGUGGACUG
			CAGUCCACAAUCACUUCGG
#19	759	304	GGACUGUCAAUUCUAGAUU
			UAUCUAAGAUUGACAGUCC

#20	812	357	AGAAAUACCUCAGAUUUU
			AACAUCUGGAGGUUUUCU
#21	820	365	CUCCAGAUUGUGACAGA
			UCUGUCACAACAUUGGAG
#22	837	382	GAAUGUAGAUUGGGACUGA
			UCAGUCCCAAUUCACAUUC
#23	844	389	GAUUGGGACUGAAGGAGGA
			UCCUCCUUCAGUCCCAUUC
#24	858	403	GAGGAGAACCCUCCAAAA
			UUUUGGAAGGGUUCUCCUC
#25	859	404	AGGAGAACCCUCCAAAA
			UUUUUGGAAGGGUUCUCCU
#26	860	405	GGAGAACCCUCCAAAA
			UUUUUUGGAAGGGUUCUCC
#27	871	416	CCAAAAAGCCUUUGAGGA
			UCCUCAAGGCCUUUUUUGG
#28	872	417	CAAAAAAGCCUUUGAGGAA
			UUCCUCAAAGGCCUUUUUUG
#29	873	418	AAAAAAGCCUUUGAGGAU
			AUCCUCAAGGCCUUUUUU
#30	885	430	GAGGAUGUACUAGAGUUG
			CAACUCUAGUACAUUCCUC
#31	892	437	GUACUAGAGUUGCCAUAA
			UUAUGGGCAACUCUAGUAC
#32	922	467	GGGAACCAUUUGAAGAAUA
			UAUUCUCAAUUGGUUCCC
#33	972	517	CAAUGGAAUUGGCUGGAA
			UUUCCAGCCAUUCCAUUG
#34	976	521	GGAAUUGGCUGGAAAGGCA
			UGCCUUUCCAGCCAUUCC
#35	977	522	GAAUUGGCUGGAAAGGCAA
			UUGCCUUUCCAGCCAUUUC
#36	984	529	CUGGAAAGGCAACCCGUAA
			UUACGGGUUGCCUUUCCAG
#37	1003	548	CAAAGAACACAUUUAGACA
			UGUCUAAAUGUGUUCUUUG
#38	1021	566	AUUACAGAGUUCUAGGAAA
			UUUCCUAGAACUCUGUAU
#39	1022	567	UUACAGAGUUCUAGGAAA

10

20

30

【0065】

【表 2-2】

			UUUCCUAGAACUCUGUAA
#40	1034	579	AGGAAAAGGCGGAUUUGGA
			UCCAAAUCCGCCUUUUCCU
#41	1036	581	GAAAAGGCGGAUUUGGAGA
			UCUCCAAAUCCGCCUUUUC
#42	1040	585	AGGCGGAUUUGGAGAGGUU
			AACCUCUCCAAAUCCGCCU
#43	1070	615	AGUGCGAGCCACAGGAAAA
			UUUCCUGUGGCUCGSCACU
#44	1084	629	GAAAAAUGUAUGCCUGCAA
			UUGCAGGCAUACAUUUUUC
#45	1097	642	CUGCAAAAAGCUACAAAAA
			UUUUUGUAGCUUUUUGCAG
#46	1119	664	AGAAUAAAGAGAGGAAAG
			CUUUCUCUUCUUUAUUCU
#47	1123	668	UAAAGAAGAGGAAAGGUGA
			UCACCUUCCUCUUCUUUA
#48	1124	669	AAAGAAGAGGAAAGGUGAA
			UUCACCUUCCUCUUCUUU
#49	1129	674	AGAGGAAAGGUGAAGCUAU
			AUAGCUUACCUUUCUCU
#50	1130	675	GAGGAAAGGUGAAGCUAUG
			CAUAGCUUACCUUUCUCU
#51	1149	694	GCUCUAAAUGAGAAAAGAA
			UUCUUUUCUCAUUUAGAGC
#52	1158	703	GAGAAAAGAAUUCUGGAGA
			UCUCCAGAAUUCUUUCUC
#53	1159	704	AGAAAAGAAUUCUGGAGAA
			UUCUCCAGAAUUCUUUCU
#54	1160	705	GAAAAGAAUUCUGGAGAAA
			UUUCUCCAGAAUUCUUUUC
#55	1162	707	AAAGAAUUCUGGAGAAAGU
			ACUUUCUCCAGAAUUCUUU
#56	1171	716	UGGAGAAAGUGCAAAGUAG
			CUACUUUGCACUUUCUCA
#57	1172	717	GGAGAAAGUGCAAAGUAGA
			UCUACUUUGCACUUUCUCC
#58	1173	718	GAGAAAGUGCAAAGUAGAU
			AUCUACUUUGCACUUUCUC
#59	1182	727	CAAAGUAGAUUCGUAGUUA
			UAACUACGAAUCUACUUUG
#60	1186	731	GUAGAUUCGUAGUUAGUUU

			AAACUAAACUACGAAUCUAC
#61	1222	767	CCAAAGAUCCUUGUGCUU
			AAGCACAAGGCAUCUUUGG
#62	1279	824	ACAUUUACAACCUGGGCAA
			UUGCCCAGGUUGUAAAUGU
#63	1354	899	UGGAAGAUUUACAGAGGGA
			UCCUCUGUAAAUCUCCA
#64	1356	901	GAAGAUUUACAGAGGGA
			UUUCCUCUGUAAAUCUUC
#65	1370	915	GGAAAGAAUUGUAUACAGA
			UCUGUAUACA AUUCUUUCC
#66	1384	929	ACAGAGACUUGAAGCCUGA
			UCAGGCUUCAAGUCUCUGU
#67	1390	935	ACUUGAAGCCUGAGAAUUAU
			AUAUUCUCAGGCUUCAAGU
#68	1459	1004	CAGAGAUCCAGAGGACA
			UGUCCUUCUGGGAUUCUCUG
#69	1467	1012	CCAGAAGGACAGAGGGUUC
			GAACCCUCUGUCCUUCUGG
#70	1473	1018	GGACAGAGGGUUCGAGGAA
			UUCUCCGAACCCUCUGUCC
#71	1475	1020	ACAGAGGGUUCGAGGAAGA
			UCUUCUCUGAACCUCUGU
#72	1484	1029	UCGAGGAAGAGUUGGAACA
			UGUUCCAACUCUCCUCGA
#73	1492	1037	GAGUUGGAACAGUCGGCUA
			UAGCCGACUGUCCAAUCUC
#74	1508	1053	CUACAUUGGCACCUAGAUU
			AACUUCAGGUGCAUGUAG
#75	1516	1061	CACCUGAAGUUGUCAUUA
			UUAUUGACAACUUCAGGUG
#76	1585	1130	AUGAAAUGAUUCAGGGACA
			UGUCCUUGAUAUUAUUAU
#77	1598	1143	GGGACAUUCUCCAUUCAAA
			UUUGAAUGGAGAAUGUCCC
#78	1599	1144	GGACAUUCUCCAUUCAAA
			UUUUGAAUGGAGAAUGUCC
#79	1624	1169	AAGAGAAAGUCAAAUGGGA
			UCCCAUUUGACUUUCUCUU
#80	1633	1178	UCAAUUGGGAGGAGGUCGA
			UCGACCUCUCCCAUUAUGA
#81	1639	1184	GGGAGGAGGUGCAUCAAAG

10

20

30

40

【0066】

【表 2 - 3】

			CUUUGAUCGACCUCUCCC
#82	1649	1194	CGAUCAAAGAAUCAAGAAU
			AUUCUUGAUUCUUGAUCG
#83	1650	1195	GAUCAAGAAUCAAGAAUG
			CAUUCUUGAUUCUUGAUC
#84	1663	1206	AGAAUGAUACCGAGGAGUA
			UACUCCUCGGUAUCAUUCU
#85	1675	1220	AGGAGUAUUCUGAGAAGUU
			AACUUCUCAGAAUACUCCU
#86	1685	1230	UGAGAAGUUUUCAGAGGAU
			AUCCUCUGAAAACUUCUCA
#87	1720	1265	GGAUGUUACUCACCAAGAA
			UUCUUGGUGAGUAACAUC
#88	1816	1361	UCAGGAGGCUGGAGGCAAA
			UUUGCCUCCAGCCUCCUGA
#89	1879	1424	GUAAGGACGUCCGGAUUAU
			AUAUCCAGGACGUCCUAC
#90	1936	1481	CCGCAGAUGAAGACUUCUA
			UAGAAGUCUUCUUCUGCGG
#91	1992	1537	CAGAAUGAGAUGAUCGAU
			AUUCGAUCAUCUCAUUCUG
#92	2029	1574	UCAACAAAAGUGAAAGUGA
			UCACUUUCACUUUUGUUGA
#93	2030	1575	CAACAAAAGUGAAAGUGAG
			CUCACUUUCACUUUUGUUG
#94	2033	1578	CAAAAGUGAAAGUGAGGAA
			UUCUCACUUUCACUUUUG
#95	2038	1583	GUGAAAGUGAGGAAGCUUU
			AAAGCUUCCUCACUUUCAC
#96	2044	1589	GUGAGGAAGCUUUGCCAUI
			AAUGGCAAAGCUUCCUCAC
#97	2059	1604	CAUUAGAUCUAGACAAGAA
			UUCUUGUCUAGAUCAAUG
#98	2164	1709	AGAAGGAAGUGGAACCCAA
			UUGGGUCCACUCCUUCU
#99	2168	1713	GGAAGUGGAACCCAAGCAA
			UUGCUUGGGUCCACUCC
#100	2229		CAGGAAGGAGCAUGUGUUA
			UAACACAUGCUCUUCUCCUG
Cand#	Position	Candidate	

10

20

30

【0067】

40

上記 3' 末端のオーバーハングとは、5' 末端から 19 塩基が相補的な配列である 2 本の RNA 鎖が対合して二本鎖を形成したとき、19 塩基対の両端から突出する 3' 末端の 2 塩基の部分という。前記 3' 末端オーバーハングの 2 塩基の配列は、特に制限されないが、TT（ーチミン・チミン）、AU（ーアデニン・ウラシル）、AG（ーアデニン・グアニン）等があげられる。また、siRNA のセンス鎖とアンチセンス鎖におけるオーバーハング部分が、同じ塩基配列でも、異なる塩基配列でもよい。例えば、センス鎖のオーバーハングが AG、アンチセンス鎖のオーバーハングが AU でもよいし、センス鎖のオーバーハングが AU、アンチセンス鎖のオーバーハングが AG でもよい。

【0068】

なお、前記 3' オーバーハングの 2 塩基の配列は、これに制限されず、RNA 干渉効果

50

に実質的に影響を及ぼさない範囲であれば、任意の天然核酸塩基（アデニン、グアニン、チミン、シトシン、ウラシル）、並びに、天然及び人工の公知の修飾塩基であってもよい。

【0069】

また、前記3'末端オーバーハング部分のヌクレオチドは、通常、リボヌクレオチドを使用できるがこれに制限されず、RNA干渉効果に実質的に影響を及ぼさない範囲であれば、デオキシリボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、その他の公知のヌクレオチド類似体を使用してもよい。さらに、本発明において、前記二本鎖siRNAは、必要に応じて、前記3'末端オーバーハングに代えて、5'末端オーバーハングとしてもよい。

【0070】

siRNAは、例えば、インビトロで化学的又は酵素的に合成してもよく、また、インビボで合成してもよく、特に制限されないが、従来公知の方法により化学合成して製造することが好ましい。合成siRNAであれば、例えば、濃度調節が容易であり、また、コンタミネーションの防止が容易であるため、安全性においても利点がある。例えば、配列番号1に示す配列を含むオーバーハング二本鎖siRNAを製造する場合、まず、配列番号1の配列の3'末端に2塩基のオーバーハングを加えたRNA鎖と、前記配列番号1の配列と相補的な配列の3'末端に2塩基のオーバーハングを加えたRNA鎖とをそれぞれ化学合成する。次に、前記2本のRNA鎖が対合する条件で対合させ、オーバーハング二本鎖siRNAを得る。使用に際しては、必要に応じて、従来公知の方法により適宜精製することが好ましい。

【0071】

本発明において、GRK4遺伝子を標的とするアンチセンスは、特に制限されず、GRK4遺伝子の塩基配列に対して、相補的な塩基配列を有し、かつ、GRK4遺伝子発現を阻害するものであればよい。アンチセンスは、前述のように、例えば、mRNAへのスプライシングを阻害してもよいし、GRK4タンパク質への翻訳を阻害してもよい。このようなアンチセンスの長さは、特に制限されないが、例えば、10～40塩基が好ましく、より好ましくは17～30塩基、さらに好ましくは20～30塩基である。

【0072】

また、本発明のGRK4遺伝子特異的siRNAは、単独で使用してもよいし、2種以上組み合わせて使用してもよい。単独で使用するよりも2種以上組み合わせて使用する方が、RNA干渉効果が高いことがある。

【0073】

本発明に係るGRK4遺伝子特異的siRNAの検索の方法は、特に限定されない。好ましい検索方法として、具体的には次のようにして行われる。MCF-7およびHMC1-8を、60mm培養ディッシュにおいてメーカーの推奨方法にしたがいHiPerFect (Qiagen) 試薬12μlとともにヒトGRK4 (B-Bridge International社、マウンテンビュー、カリフォルニア州) と特異的なsiTriofull Setの50nMをトランスフェクトする。トランスフェクション後、この細胞を培養し、トリパンブルー溶液 (Sigma) により処理し、24時間毎にエリスロメーター (erythrometer) により数える。この細胞から調製した全RNAを、ウェスタンブロット法に供する。ネガティブコントロールのsiRNA (AUCGCGCGGAUAGUACGUAdTdT) (B-Bridge International社が合成した) もまた、ネガティブコントロール用の細胞にトランスフェクトする。

【0074】

また本発明として、上記GRK4遺伝子特異的siRNAが、少なくともGRK4遺伝子、GPK4 mRNA、またはGPK4を作用標的とする物質を含む乳癌治療用薬剤を製造するために使用される方法も含まれる。

【0075】

さらに、本発明はGRK4タンパク質および／またはGRK4遺伝子を標的分子とする乳癌の分子標的治療方法であることを特徴とする。

【0076】

産業上の利用可能性

GRKに特異的な抗体を用いる免疫分析により、乳癌検出、乳癌の病態判別、増殖のステータスもしくは亢進の可能性、または再発可能性を診断、評価または予見するためのデータを提供する乳癌検査方法、およびGRK4遺伝子特異的s i R N Aを使用した、少なくともGRK4遺伝子、G P K 4 mRNA、またはG P K 4を作用標的とする物質を含む乳癌治療用薬剤に利用可能である。

【実施例】

【0077】

以下に、本発明をさらに具体的に説明するが、これらの実施例は本発明の範囲を限定する意図で掲げるものではない。以下の実施例において、使用材料はこの発明の範囲内の好適例にすぎない。また、以下の実施例中で用いる装置名および、使用材料の濃度、使用量、処理時間、処理温度等の数値的条件、処理方法等は、この発明の範囲内の好適例にすぎない。なお、以下の説明をいくつかの図を参照して行うがこれら図はこの発明を理解できる程度に概略的に示してあるにすぎない。

【0078】

〔免疫組織化学〕

免疫組織化学的アッセイを、V e n t a n a H X S y s t e m B e n c h m a r k (V e n t a n a M e d i c a l S y s t e m) によりホルマリン固定してパラフィン包埋した切片に行なった。抗ヒトGRK4 α および β に特異的な単クローン抗体 (V e n t a n a、ツーソン、アリゾナ州) および抗小胞体 (E R) 抗体 (V e n t a n a、ツーソン、アリゾナ州) をそれぞれ使用した。H E R - 2 / n e u ステータスを、D a k o H e r c e p t T e s t (D a k o J a p a n、京都、日本) を使用し免疫組織化学的アッセイにより決定し、D a k o 採点システムにより採点した。2+または3+のスコアを有する試料を、H E R - 2 / n e u 陽性に見なした。細胞の1%が核染色を示した場合、本発明者らはE R 陽性に見なした。GRK4染色の強度を、以下の基準を使用し評価した：強陽性 (2+)、50%以上の腫瘍細胞における暗褐色染色が、膜と細胞質とを完全に覆い隠す；弱陽性 (1+)、よりいくらか低い度合いの茶色の染色が、腫瘍細胞の膜および細胞質において感知できる；陰性 (0として採点した)、腫瘍細胞において感知できる染色がない。

【0079】

〔細胞培養〕

N I H 3 T 3 を仔牛血清 (B S) を10%補完したダルベッコ変法イーグル培地 (D M E M) (S i g m a) 中において培養し、M C F - 7、H M C 1 - 8 およびM R K n u - 1 を、ウシ胎児血清 (F B S) を10%補完したR P M I 1 6 4 0 (S i g m a) 中において培養し、GRK4発現ベクターによるトランスフェクションのためのM C F - 7 細胞を、木炭／デキストラン処理したウシ胎児血清 (H y c l o n e、ローガン、ユタ州) を5%含有するR P M I 1 6 4 0 培地中において維持した。細胞を5%の二酸化炭素雰囲気下において37℃にて維持した。

【0080】

〔GRK4の一過性的発現〕

完全長のGRK4 α 、 β 、 γ および δ の発現ベクターは、既に記載されている (引用文献20)。一過性的なトランスフェクション実験用に、このプラスミド2 μ gを、D o F e c t G T 1 トランスフェクション試薬 (同仁化学研究所) を使用しメーカーの推奨方法にしたがい、N I H 3 T 3 細胞にトランスフェクトした。

【0081】

〔形質転換のインビトロ法〕

足場依存的増殖を研究するために、GRK4を一過性的に発現させた 1.5×10^4 細胞を、仔牛血清を20%含有するDMEMとバクトアガー (b a c t o a g a r) 0.36 (w/v)%との1:1混合物中に懸濁し、バクトアガー0.72 (w/v)%を含む

10

20

30

40

50

同じ培地のクッションの上にプレートした。コロニーを、プレートして2週間後に倒立顕微鏡の下で数えた。

【0082】

〔免疫ブロット法および免疫沈降法〕

細胞を、IP緩衝液（プロテアーゼ阻害剤の混合物とともに、20mM Tris-HCl、pH7.5、100mM NaCl、1mM EDTA、0.5% NP-40、10% グリセロール）中において溶解し、その後その溶解物を、特異的な抗β-アレスチン単クローン抗体（Sigma）またはマウスIgGとともにインキュベートした。この免疫複合体を50%のタンパク質セファロース（Amersham）により反応した。タンパク質抽出物および免疫沈降物を、SDS添加緩衝液中に懸濁した。沸騰後、タンパク質または免疫沈降物の等量（10μg）を15%のSDS-PAGEゲルに泳動し、次に半乾性ブロット法によりImmobilon膜（Millipore）に転写した。この膜を、標準技術を用いて抗体とともにインキュベートした。シグナルをECLプラス（GE Healthcare Bio-Science）により可視化し、LAS-3000ミニ（Fujifilm）により検出した。抗ヒトGRK4（H-70；Santa Cruz Biotechnology、サンタクルーズ、カリフォルニア州）、抗GAPDH（Santa Cruz Biotechnology；sc32233）および抗β-アレスチン（Sigma）単クローン抗体をそれぞれ、1：500、1：1000および1：500に希釈した。GAPDHを添加対照として使用した。

10

【0083】

〔統計分析〕

データを、平均±標準偏差として示した。スチューデントt-検定を、GRK4陽性腫瘍とGRK4陰性腫瘍との間の臨床学的因子を比較するために使用し、有意性をP<0.05に設定した。

20

【0084】

〔実施例1：乳癌に発現するGRK4〕

本発明者らは、定量リアルタイムPCR法により乳癌試料中のGRK4 mRNAの発現を分析した。具体的な実施法を以下に詳述する。

【0085】

最初の鎖であるcDNAを、オリゴ（dT）17プライマーとM-MLV逆転写酵素（Invitrogen、カールスバッド、カリフォルニア州）により全RNA1μgから合成した。リアルタイムPCR法を、Takara Ex Taq R-PCRバージョン2.1（Takara Bio社、滋賀、日本）、ROX Reference Dye（Stratagene）およびSYBER Green I（Cambrex、ワシントンDC）とともにMx3005P QPCR系（Stratagene、ラ・ホヤ、カリフォルニア州）を使用し実行した。本発明者らは、GRK4特異的プライマーとして

30

5'-GGGACTGAAGGAGGAGAACCC-3'および

5'-TTTGTACGGGTTCCTTTTC-3'を、

HER-2/neu特異的プライマーとして

5'-TGGAGAACCCCGAGTACTTG-3'および

5'-TAGGTGTCCTTTGAAGGTG-3'を、

40

およびEGFR特異的プライマーとして

5'-CCAAGCCATATGACGGAATC-3'および

5'-ACTATCTGCGTCTATCATCC-3'を使用した。β-アクチン

特異的プライマーは、既に記載されている（Oikawaら 2004, Cancer Res.）。反応混合物を、95℃で30秒間変性させた後に、50サイクル（95℃で10秒間、60℃で30秒間）のPCRに供した。GRK4、HER-2/neuおよびEGFRのmRNAレベルをβ-アクチンのシグナルに対して標準化した。本発明者らは、mRNAレベルを決定するためにこれらの実験を二重に行った。

【0086】

50

本発明者らは、正常な乳房組織と比較し浸潤性小葉癌および浸潤性乳管癌において G R K 4 mRNA の発現が高いレベルであることを発見した (図 1)。H E R - 2 / n e u および上皮増殖因子受容体 (E G F R) は、遺伝子操作的に増幅され、侵襲性の強い乳癌において過剰発現されている。しかし、G R K 4 の発現パターンは、図 1 に示すように H E R - 2 / n e u および E G F R の発現パターンと異なっていた。

【0087】

〔実施例 2：G R K 4 イソ型の発現〕

G R K 4 のサブファミリーは、G R K 4 α 、 β 、 γ および δ と名づけられた 4 つの選択的スプライシングバリエーション (引用文献 17、20 および 36) を有する (図 2 の A)。G R K 4 のサブファミリーの発現パターンを評価するために、本発明者らは、G R K 4 全 10 イソ型に反応する抗 G R K 4 抗体を使用し、代表的に乳癌、線維腺腫および正常組織の試料のウェスタンブロット法を実行した。本発明者らは、5 つの浸潤性乳管癌 (I D C) ケースのうち 3 つにおいて G R K 4 サブファミリーの発現を確認したが、線維腺腫および正常組織において G R K 4 はほとんど検出不可能であることが分かった (図 2 の B)。興味深いことに、ケース 6 (I D C) は、G R K 4 γ および δ の弱い発現と比較し G R K 4 β がおもに発現し、ケース 7 (I D C) は、G R K 4 β の弱い発現と比較して主に G R K 4 α が発現したことから (図 2 の B)、乳房腫瘍は、G R K 4 サブファミリーの特異的な発現パターンを示さないことが示唆される。

【0088】

次に、本発明者らは免疫組織化学的アッセイを行った。あいにく、ウェスタンブロット法に使用する抗体は、免疫組織化学には適用できない。したがって、本発明者らは、G R K 4 α および β のみに特異的なもう一つの抗体を使用した。言い訳が立つことに、G R K 4 α は完全長バージョンであり、G R K 4 の 4 つのイソ型より他の G R K により高い相同性を有する。G R K 4 α は、他のイソ型ではないが、ドーパミン受容体 (引用文献 32) およびロドプシン (引用文献 20) をリン酸化する。

【0089】

本発明者らは、「陰性」から「強陽性」までに及ぶ組織の試料において G R K 4 α および／または G R K 4 β の発現パターンを分類した (図 1)。調べた 78 ケースのうち、G R K 4 α および／または G R K 4 β は、30 ケース (38.5%; 点数 2+) において強く染色され、26 ケース (33.3%; 点数 1+) において弱く染色され、そして 22 ケース (28.2%; 点数 0) において染色されなかった (詳細は表 1 に示す)。乳房腫瘍組織の免疫組織化学的アッセイによって、G R K 4 α および β に対する陽性染色が癌細胞に特異的であるように見え、正常な乳管上皮細胞においてほとんど検出されなかった (図 3)。ほとんどのケースにおいて、G R K 4 α および β は、腫瘍細胞の細胞質に局在し、原形質膜に局在するケースはほとんどなかった (図 3)。さらに、本発明者らは、G R K 4 発現の生物学的、臨床病理学的意義を評価した。表 1 に示したように、本発明者らはリンパ節転移 (陽性においてより高い; スチューデント t - 検定により $P < 0.05$) が G R K 4 発現 (点数 1+ ~ 2+) に有意に関与することを発見した。本発明者らはまたヒトの正常な全組織を含む組織マイクロアレイを用いて、ヒトの正常な組織における G R K 4 α および／または β タンパク質の発現を調べ、G R K 4 α および β タンパク質が、小脳プルキニエ細胞、精巣の精上皮細胞および腎臓の尿細管において発現していたことを発見した (データ示さず)。これらの結果は、既出の知見と一致する (引用文献 20, 21 および 22)。

【0090】

〔実施例 3：G R K 4 の形質転換活性〕

本発明者らは、乳癌における G R K 4 の高いレベルの発現を観察したので、本発明者らは、G R K 4 の過剰発現が腫瘍成長を促すかどうかを決定するために模索した。本発明者らは、G R K 4 α 、 β 、 γ または δ の発現ベクターをそれぞれ N I H 3 T 3 細胞に一過的にトランスフェクトした (図 4 の A)。次に、本発明者らは、軟寒天コロニー形成法を実行した。本発明者らは、G R K 4 α 、 β 、 γ または δ を過剰発現している細胞が、対照ベ

クターをトランスフェクトした細胞と比較してコロニーの数が増加したことを発見した（図4のB）。これらの結果から、形質転換活性が強くないにも関わらず、GRK4の過剰発現が、腫瘍形成に関与することを示唆する。

【0091】

〔実施例4：乳癌細胞の増殖を抑制するGRK4 siRNA〕

GRK4の高いレベルでの発現が、乳癌細胞の増殖または生存において役割を果たすかどうか評価するために、本発明者らは、GRK4に特異的な21ヌクレオチドの二本鎖siRNA（低分子干渉RNA）の3つの混合物（siTriofullSet）により2つの乳癌細胞MCF-7およびHMC1-8を処理した。使用したsiTriofullSetは、表2に示されるCand#28、70および78の配列を有する。以下、それらの配列に3'末端のオーバーハングを付加した配列を列挙する。

【0092】

（センス鎖028+TT）CAAAAAAGCCUUUGAGGAATT
 （アンチセンス鎖028+TT）UUCUCUCAAAGGCUUUUUUGTT
 （センス鎖070+TT）GGACAGAGGGUUCGAGGAATT
 （アンチセンス鎖070+TT）UUCUCUGAACCCUCUGUCCTT
 （センス鎖078+TT）GGACAUUCUCCAUAUCAAATT
 （アンチセンス鎖078+TT）UUUUGAAUGGAGAAUGUCCTT

その結果、siRNAは、細胞のGRK4発現を減少させ、細胞の増殖を有意に抑制した（図5）。これらのデータから、GRK4発現の正の調節が乳房癌細胞の増殖または生存に関与し、GRK4が、新規の癌治療の標的分子になる可能性があることを示唆した。

【0093】

〔実施例5：乳癌においてβ-アレスチンを経由してMAPキナーゼカスケードを調節するGRK4〕

EGFR、ERBB2およびERBB3またはERを含む、MAPキナーゼのシグナル伝達経路が、乳癌における癌の発生および進行に重要であると報告されている。本発明者らは、GRK4発現が、乳癌細胞においてMAPキナーゼのシグナル伝達を活性化するかどうかを調べた。乳癌細胞株におけるMAPキナーゼが、培地中においてEGFまたはER等の因子によって通常活性化されるので、本発明者らは、MCF-7細胞のプロセッシングが、6ヶ月間その因子が不在のまま増殖することによってMAPキナーゼを不活性化したことを立証した。次に、本発明者らはGRK4またはGRK4の欠損変異体の発現ベクターをMCF-7細胞にトランスフェクションによって導入した。その後、本発明者らは、トランスフェクションから24時間後にERK1/2、c-Junおよびc-Junアミノ末端キナーゼ（JNK）の発現およびリン酸化を調べた。本発明者らは、ERK1/2およびc-Junが、対照ベクター、欠損変異体またはGRK4δの発現ベクターをトランスフェクトした細胞と比較してGRK4α、βまたはγを過剰発現している細胞においてリン酸化されたことを発見した。JNKのリン酸化はGRK4イソ型の一つまたは変異したGRK4を発現している全細胞において検出された（図6のA）。これらの結果は、GRK4が、乳癌細胞においてERKおよびJNKシグナル伝達経路を通してMAPキナーゼを誘導することを示す。GPCRのGRK4によるリン酸化は、GPCRに結合しその内在化を始めるβ-アレスチンをリクルートする。

【0094】

β-アレスチンは、Gタンパク質共役型受容体（GPCR）脱感作を仲介し、アゴニストが占有した受容体との複合体にシグナル伝達分子をリクルートするためのアダプターまたは足場として機能することによりGPCRシグナル伝達に寄与する細胞質タンパク質である（引用文献40、21）。マイトジェン活性化タンパク質および細胞外シグナル伝達調節キナーゼ（MEK）-細胞外調節キナーゼ（ERK）1/2カスケードは、一般的に乳癌において活性化され、EGF-EGFRシグナル伝達経路の重要な成分である。最近の研究から、β-アレスチンがSrc、Raf、Erk、ASK1およびJNK3などの分子と相互作用し、いくつかの経路を調節し、MAPキナーゼを活性化することが示され

た（引用文献24、25および27）。したがって、G R K 4が β -アレスチンのシグナル伝達経路に関わるかどうかを調べるために、本発明者らは、ヒトの乳癌細胞株H M C 1-8およびM R K n u-1を使用し免疫沈降法を実施した。その結果は、 β -アレスチンがG R K 4 α および β と複合体を形成することを示す。したがって、G R K 4は、ヒト乳癌細胞株において β -アレスチンに關与する可能性がある。

【0095】

〔考察〕

G R K類は、光とにおい物質のシグナルを媒介者へ伝達し、ホルモンの作用に関わるだけと考えられてきた。しかしながら本発明者は、G R K 4が乳癌の増殖に関わっていることを初めて明らかにし、G R K 4機能の知られていなかった局面に光を当てたのである。G R K 4は、アゴニストで活性化されたGタンパク質共役型受容体（G P C R）類のシグナル伝達に重要な役割を演じていることから、乳癌においてG R K 4の発現が高いのでG P C Rが何らかの形で乳癌の進展に関わっていると考えるのが自然である。

【0096】

G R K 4バリエーション遺伝子は、それぞれ2つのカセットエクソンとカルボキシル末端を含むため、選択的RNAスプライシングを受ける（図2のA）。G R K 4 δ が、他のG R K 4イソ型と比較して最強の悪性転換活性を示したことは興味深い（図4）。他方、G R K 4 α は、ほとんどE R K 1/2経路のリン酸化活性を有している（図6のA）。腫瘍試料のウェスタンブロットから、G R K 4イソ型の一様でない発現が示された（図2のB）。これらの結果から、G R K 4イソ型のコンビネーション発現は、インビボでG R K 4が誘導する腫瘍発生に重要であることがわかった。

【0097】

乳癌におけるG R K 4の分子的機作およびシグナル伝達の実体は、依然として捉えどころがない。多くのG P C Rについては、アゴニストへの暴露により、応答性の急速かつ劇的な可逆的喪失が起きることが示されてきた（相同的な脱感作）。典型的には、G R K 4はアゴニストにより活性化されたG P C Rをリン酸化し、その機能的共同因子である β -アレスチンとともにG P C Rの相同的な脱感作の端緒とする（引用文献24～26、31）。アンジオテンシンI Iタイプ1A（引用文献28）、ニューロキニン1（引用文献29）およびプロテアーゼ活性化受容体（引用文献30）が活性化されると、 β -アレスチンは、細胞外シグナルで調節されるキナーゼ（E R K）カスケードの成分、R a f-1、M E K 1およびE R K 1/2が該受容体との複合体を形成するための足場を提供し、これがE R K 1/2活性化につながる（引用文献27）。さらに、G R K 5または6の過剰発現は β -アレスチンが仲介するE R K活性化を増強することが報告された（引用文献27）。本発明者らの研究で、G R K 4がこの β -アレスチンと協同し、E R Kシグナル伝達の活性化を誘導することを見出された（図6）。よってG R K 4の異所性発現は、 β -アレスチンが仲介するE R K活性化を助長させ、細胞増殖を亢進させることが想定される。

【0098】

G R K 4発現レベルは、リンパ節転移と関係していた（表1）。このことはヒトの癌におけるG R K 4発現の予後的な意義を示す最初の成果である。癌転移に関してG R K 4の分子的機作の詳細は不明である。最近、 β -アレスチンが腫瘍タンパク質のM d m 2を調節することが報告された（引用文献33）。さらにM d m 2は、E-カドヘリン分解を調節する（引用文献34）。これらのことからG R K 4の異所性発現は、 β -アレスチン・シグナル伝達経路を介してE-カドヘリン分解を調節すると本発明者らは仮説を立てている。この仮説の実証にはさらに研究を進める必要がある。

【0099】

G P C R系は、治療薬剤の開発の主要ターゲットであったし、いわゆるオーファンG P C Rのさらなる同定は、将来の薬学研究と治療の発展の機会を提供する（引用文献33）。最近の分子レベルの技術進歩は、乳癌治療を支える仕組みの理解を向上させている。これらの患者の生存に、分子を標的とする化合物とホルモンを用いる治療は、著しい効果を及ぼした。しかしながら、転移性疾患の治療は依然として対症的のままであり、またアジ

ユバント療法は、最適の結果を保証するものではない。

【0100】

GRK4 siRNAがヒト乳癌細胞の増殖を抑制することが見出された(図5)。GRK4は、GPCR系のシグナル伝達に参加していると考えられているので、GRK4により調節されているオーファンGPCRは、乳癌治療の優れたターゲットになるであろう。GRK4は、実質的に精巣、プルキニエ細胞および腎臓だけで発現しており、これに対してGRK2、3、5および6は、ヒトの正常組織で広範に発現されている。分子標的治療の目標は、正常細胞に対して最少の影響にとどめながら、悪性転換する形質の抑制である。さらにGRK4シグナル伝達の上流部は、既知のHER-2/neuおよびEGFRのシグナル伝達とは異なっているかも知れない(図7)。それゆえ、GRK4は乳癌治療において標的とすべき強力な候補の一つであると期待される。

10

【0101】

[引用文献リスト]

[引用文献17]

Premont RT, Macrae AD, Stoffel RH, Chung N, Pitcher JA, Ambrose C, Inglese J, MacDonald ME, Lefkowitz RJ: Characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK4. Identification of four splice variants, J Biol Chem 1996, 271:6403-6410

[引用文献20]

Miller WE, Lefkowitz RJ: Expanding roles for beta-arrestins as scaffolds and adaptors in GPCR signaling and trafficking, Curr Opin Cell Biol 2001, 13:139-145

20

[引用文献21]

Lefkowitz RJ, Shenoy SK: Transduction of receptor signals by beta-arrestins, Science 2005, 308:512-517

[引用文献22]

Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG, Lefkowitz RJ: Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes, Science 1999, 283:655-661

[引用文献24]

30

DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Dery O, Mullins RD, Bunnett NW: beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2, J Cell Biol 2000, 148:1267-1281

[引用文献25]

Kim J, Ahn S, Ren XR, Whalen EJ, Reiter E, Wei H, Lefkowitz RJ: Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling, Proc Natl Acad Sci U S A 2005, 102:1442-1447

[引用文献26]

Willems JM, Challiss RA, Nahorski SR: Non-visual GRKs: are we seeing the whole picture?, Trends Pharmacol Sci 2003, 24:626-633

40

[引用文献27]

Zeng C, Sanada H, Watanabe H, Eisner GM, Felder RA, Jose PA: Functional genomics of the dopaminergic system in hypertension, Physiol Genomics 2004, 19:233-246

[引用文献28]

Premont RT, Inglese J, Lefkowitz RJ: Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors, FASEB J 1995, 9:175-182

[引用文献29]

Chuang TT, Paolucci L, De Blasi A: Inhibition of G protein-coupled receptor kinase subtypes by Ca²⁺/calmodulin, J Biol Chem 1996, 271:28691-28696

50

[引用文献 3 0]

Wilson CJ, Applebury ML: Arresting G-protein coupled receptor activity, *Curr Biol* 1993, 3:683-686

[引用文献 3 1]

Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL, Lefkowitz RJ: Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:2449-2454

[引用文献 3 2]

DeFea KA, Vaughn ZD, O'Bryan EM, Nishijima D, Dery O, Bunnett NW: The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta-arrestin-dependent scaffolding complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:1086-11091

10

[引用文献 3 3]

Wang P, Gao H, Ni Y, Wang B, Wu Y, Ji L, Qin L, Ma L, Pei G: Beta-arrestin 2 functions as a G-protein-coupled receptor-activated regulator of oncoprotein Mdm2, *J Biol Chem* 2003, 278:6363-6370

[引用文献 3 4]

Yang JY, Zong CS, Xia W, Wei Y, Ali-Sayed M, Li Z, Broglio K, Berry DA, Hung MC: MDM2 promotes cell motility and invasiveness by regulating E-cadherin degradation, *Mol Cell Biol* 2006, 26:7269-7282

20

[引用文献 3 6]

Chuang TT, Paolucci L, De Blasi A. Inhibition of G protein-coupled receptor kinase subtypes by Ca²⁺/calmodulin. *J Biol Chem* 1996, 271:28691-28696

[引用文献 4 0]

Attramadal H, Arriza JL, Aoki C, Dawson TM, Codina J, Kwatra MM, et al. Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J Biol Chem* 1992, 267:17882-17890

なお、本出願は、2007年8月3日に出願された日本国特許出願第2007-203189号に基づいており、その開示内容は、参照により全体として引用されている。

30

【図面の簡単な説明】

【0102】

【図1】乳癌および正常な乳房組織におけるGRK4、HER2/neuおよびEGFRのmRNAレベルを明示する定量リアルタイムPCR法。カラムは調べた試料の平均を示す図である。最小のmRNA発現レベルは図中において適宜0.1に設定した；他のmRNAシグナルをこの値に標準化した。バーは標準偏差を示す。

【図2】乳癌組織におけるGRK4タンパク質の構造およびGRK4発現。(A) ヒトGRK4スプライスバリエーションの図。この図は、GRK4 mRNAの選択的スプライシングの結果、4つのGRK4イソ型のアミノ酸配列を示す図である。GRK4のdelDは、GRK4の欠損変異体である。(B) 浸潤性乳管癌(IDC)、線維腺腫(FA)、および正常な乳房(N)からのGRK4タンパク質のウェスタンブロット法。GRK4α、β、γまたはδを過剰発現している細胞もまた対照として示す。

40

【図3】乳癌組織におけるGRK4発現の免疫組織化学的アッセイを示す図である。

【図4】GRK4の形質転換活性を示す図である。(A) GRK4を過剰発現しているNIH3T3細胞からのGRK4タンパク質のウェスタンブロット法。(B) NIH3T3細胞を使用したコロニー形成法。カラムは軟寒天中のコロニー数を表す。バーは、標準偏差を示す。

【図5】GRK4のノックダウンにより乳癌細胞株の増殖が阻害されることを示す図である。(A) MCF-7およびHMC1-8細胞における活性化siRNAによるGRK4転写産物の減少。siRNAをトランスフェクションして48時間後、MCF-7および

50

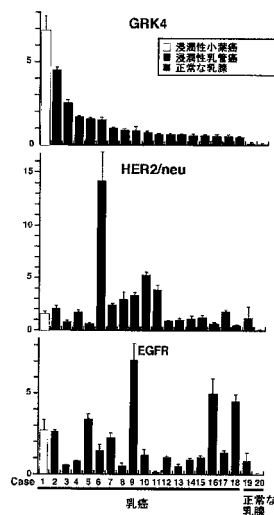
HMC 1-8 細胞を回収した。全RNAを細胞から抽出し、リアルタイムPCR法に供した。GRK 4: GRK 4特異的活性化 siRNA、Cont: siRNAのネガティブコントロール、およびUT: トランスフェクトしない野生型である。データは、図中に適宜1に設定されたMCF-7においてUTのmRNAレベルに標準化した。バーは標準偏差を示す。(B) GRK 4特異的活性化 siRNAは細胞増殖を阻害する。siRNAまたは負の対照 siRNAをトランスフェクトされたMCF-7およびHMC 1-8細胞は、トランスフェクションして24時間後、48時間後および72時間後に回収された。細胞数は、エリスロメーターを使用して数えた。バーは標準偏差を示す。

【図6】GRK 4は β -アレスチンと相互作用し、GRK 4はERK 1/2シグナル伝達経路を活性化したことを示す図である。(A) ERK 1/2シグナル伝達経路におけるGRK 4の過剰発現の効果。MCF-7細胞は、示したようなGRK 4 α 、 β 、 γ または δ をトランスフェクトした。その後細胞を、リン酸化ERK 1/2、全ERK 1/2、リン酸化JNK、全JNK、リン酸化c-Junまたは全c-Jun抗体により分析した。カラムは、リン酸化ERK 1/2および全ERK 1/2およびリン酸化JNKおよび全JNKおよびリン酸化c-Junおよび全c-Junの比を表す。データを、図中適宜1に設定した対照のベクターの比に対して標準化した。(B) HMC 1-8およびMRKn u-1細胞を、GRK 4または β -アレスチン抗体により免疫沈降に供した。IP、免疫沈降; WB、ウェスタンブロット。

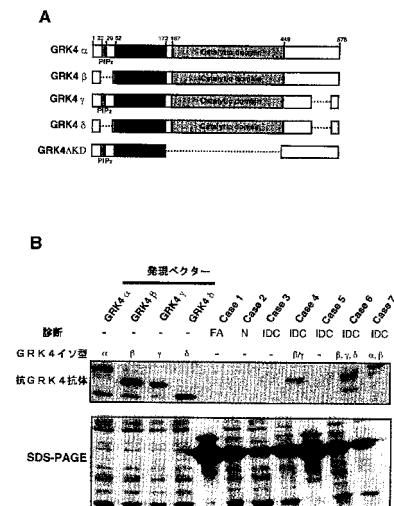
【図7】乳癌の発症に関連したGRK 4のモデルを示す図である。

【図8】ヒトGRK 4遺伝子の塩基配列の一例を示す図である。

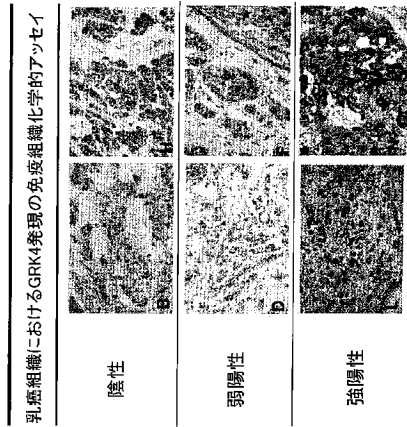
【図 1】



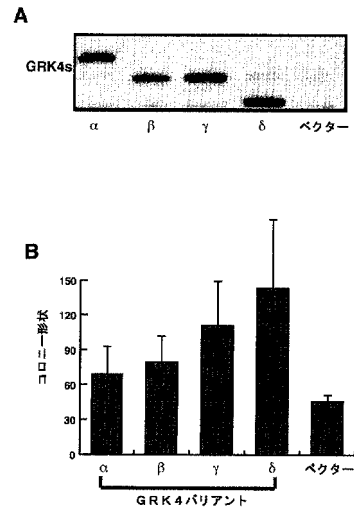
【図 2】



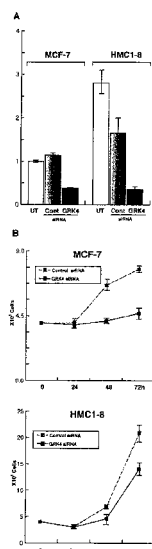
【図 3】



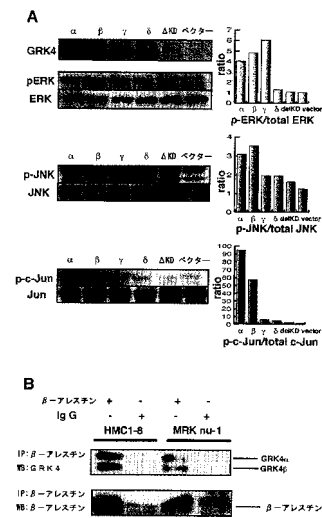
【図 4】



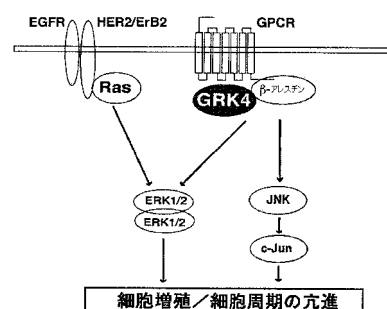
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【図 8】

atgagatgctg aggaatctgt ggcacatctg ctcttgctga aggcctctca agggagatatt	60
ggcgaacaaa gtggtctctag taacaaatctg aaagcatctc tgcacctgac tccctctgcg	120
cagacagctg agcttacaac tccatctga aaacatctaa gcaatctctg tgaacagaa	180
cgaatgaaag ggcctctctt cagctcgtct tcttgatcga aacacatctt aaaggagcga	240
attgaattct tggatctgag ggcacaaatc aaactctgcg atgctgagaa cgaatctgaa	300
tgtggatctt caatctttag tagatctctt aaatcttagt tggagacccc tttaacagaa	360
atactctcag atgttctgac agaatcttaga ttgggactga agagagagaa ccttctcaaa	420
aaagcctctg agcatctaac tagatctgac caatactaac taaggagaga caaatctgaa	480
gaatctcgaag aaagctctaa ttcttctcag ttcttaacaa gcaaatctgt agaaagcga	540
cgcctcaaac agaaacatct tagaatctaa aaactctcag gaaagagagc atttgagaga	600
gttggcgtct gctcaatctgc agcacatgga aaactctag cctgcaaaa cctcaaaaac	660
aaagaaatca agaaacagaa agctctagct atctctctaa atgagaaag aatctgtag	720
aaagctgaac gttagctctg agttatctta gcttaagctt atgaaacaa agatgctctc	780
tgcctgctgc tcaacatctt gaaatctagag gaattctagc tctcaatctt caacctagac	840
aaatccgctt ttgatatgca gaaatcctct ttctactctg cagagctctg ttgctgcttc	900
gaagatctac aaagagaaag aatctctaac agaaatctga agctctgaaa tttctcttt	960
gaatgctcag gcaacatctc gattctcaac ctctgctctg cctgaagcatt cctgaagaga	1020
cagagctctg gaaagaaagt ttggaatctg gactaatctg cctctgaaat tctaaataat	1080
gaagaaatct cgtttatctc cgaatctctag aaatctagc cctctctctt tgaatctgct	1140
cagagaaatt cctcaatcaa aaatacaaa aaataagtaa attgagagaga cgtctctaac	1200
agaaacaaaa atgatactga ggaatctctt gaatgctttt cagagagagc caaatctctc	1260
tgaagagctt taatcaatca gaatctcagc aaatctgctg gctcaagagc cgaagagagc	1320
gttagagctca agcagacac cctatctaac gaatctcaat tcaagagctt aggaagcaac	1380
atgctgaac cctctctctg tctctctct cactgctgtt atgttaagaa cgtctctgaa	1440
atcgaacagct tctcagctgt aaagagagaa taatctgaac cctgaatctt agaatctctt	1500
gctcagcttg ctacagagat ttctctcaac ccttgagaa atgagatctt agaatctctg	1560
tgttctcag aaatcaaaa aaatgagat aggaagctt tgcctctaa tctgaacag	1620
aaatcaacta cctcgtcttc aaacacaaac aaagctctt tctatagact cctcaagaga	1680
agagctctcc taacaaatgtt cctcagctgag aaagaaatag aaacaaaa atgctctg	1740

【配列表】

0004981134000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/02 (2006.01) C 1 2 Q 1/02

(72)発明者 及川 恒輔
東京都国立市東 3-11-25

(72)発明者 田中 正視
福岡県福岡市早良区小田部 5-9-21

審査官 石丸 聡

(56)参考文献 日本癌学会学術総会記事 (2005年) 第64巻, 第285頁, PA2-0624
Hypertension, vol. 47, pages 1131-1139 (2006)
Nuc. Acids Res., vol. 33, pages 4527-4535 (2005)
J. Biol. Chem., vol. 271, pages 6403-6410 (1996)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/113
C12N 9/12
C12Q 1/02
C12N 15/09
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)