(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2004 年3 月4 日 (04.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/018679 A1

(51) 国際特許分類[7]: C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18, C12Q 1/68, G01N 33/53

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010676

(22) 国際出願日: 2003 年8 月22 日 (22.08.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-244249 2002 年8 月23 日 (23.08.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市本町４丁目１番８号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 島田 英昭 (SHIMADA,Hideaki) [JP/JP]; 〒272-0812 千葉県 市川市 若宮 1－１３－６ Chiba (JP). 朝長 毅 (TOMONAGA,Takeshi) [JP/JP]; 〒260-0033 千葉県 千葉市 中央区春日２－５－１０ 西千葉ヒルズ春日４０５号 Chiba (JP). 松下 一之 (MATSUSHITA,Kazuyuki) [JP/JP]; 〒260-0851 千葉県 千葉市 中央区矢作町５４０－３６ Chiba (JP). 落合 武徳 (OCHIAI,Takenori) [JP/JP]; 〒260-0034 千葉県 千葉市 中央区汐見が丘７－１５ Chiba (JP). 野村 文夫 (NOMURA,Fumio) [JP/JP]; 〒264-0033 千葉県 千葉市 若葉区都賀の台１－２０－１１ Chiba (JP).

(74) 代理人: 山本 秀策, 外(YAMAMOTO,Shusaku et al.); 〒540-6015 大阪府 大阪市 中央区城見一丁目2番27号 クリスタルタワー15階 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (CH, DE, FR, GB).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD AND KIT FOR DIAGNOSING CANCER

(54) 発明の名称: 癌診断のための方法およびキット

(57) Abstract: It is intended to provide novel antigen peptides which are efficacious in diagnosing cancer, antibodies against these antigen peptides, and a method of diagnosing cancer (for example, rectum cancer or colon cancer) using the same. More specifically speaking, a human cancer antigen peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2, 4 or the like; and a cancer diagnosis method which comprises examining whether or not an antibody binding to the above antigen peptide exists in a subject serum specimen. An antibody binding to the above antigen peptide; a cancer diagnosis method which comprises examining whether or not an antigen peptide binding to the above antibody exists in a subject biological specimen; and methods relating thereto.

(57) 要約: 本発明は、癌の診断に有効な複数の新規抗原ペプチドと、この抗原ペプチドに対する抗体、これらを用いた癌（例えば、直腸癌または結腸癌）診断方法を提供する。より詳細には、配列番号２または４などのアミノ酸配列を有するヒト癌抗原ペプチドと、被験体の血清中に、前記の抗原ペプチドと結合する抗体が存在するか否かを試験する癌診断方法。前記の抗原ペプチドと結合する抗体と、被験体の生体試料中に、その抗体と結合する抗原ペプチドが存在するか否か試験する癌診断方法ならびに関連方法が提供される。

WO 2004/018679 A1

明細書

癌診断のための方法およびキット

技術分野

本願の発明は、癌の分野に関する。より詳細には、本発明は、癌の診断のための方法およびキットに関する。本発明はさらに詳細には、ヒト大腸癌の抗原ペプチドと、大腸癌診断方法に関し、ヒト大腸癌細胞で発現する新規２種の抗原ペプチドと、これらペプチドの１種類以上を用いて大腸癌を高精度で診断する方法に関する。

背景技術

種々の癌に関し、種々のマーカーを用いて診断が行われているが、確定診断を行うことはかなり難しいとされる。

例えば、癌のうち代表的な例である大腸癌（直腸癌および結腸癌）は、加齢と共に増加し、60 歳代をピークとする悪性腫瘍である。リンパ行性、血行性、腹膜播種性などの転移を生じ、特に血行性転移によっては肝臓癌に進行することが多い。

他の悪性腫瘍と同様に、大腸癌に対する対策としては癌腫の早期発見が最も重要な課題である。特に大腸上部に発生した癌は自覚症状に乏しいため、発見時には病状が進行している危険性が高い。従来、大腸癌に対しては、主に便潜血反応によるスクリーニングと、CEA あるいは CA19-9 等の血清マーカーによる診断、並びに治療経過の診断が行われている。しかしながら、これらの方法はいずれも進行癌では陽性率が高いものの、早期癌では陽性率が極めて低く、正確な診断が困難であった。

悪性腫瘍の簡便かつ確実な早期診断を可能とする方法として、癌組織特異的タンパク質マーカーを用いた分子生物学的診断方法が提案されている。この方法は大がかりな設備を必要とせず、被験体への負担も少ないため、自覚症状のない多くの被験体に対しても広範囲に実施することが可能である。例えば、特開平 7-51065 号公報には、糖タンパク質 39 の腫瘍マーカーとしての利用が開示されている。しかし、特開平 7-51065 号公報に記載される糖タンパク質は、実際に腫瘍マーカーとして使用されることは記載されておらず、したがって、その精度が高いとはいえない。また、確定診断に使用できるとも記載されていない。

このように、診断精度をさらに向上させるためには、より多くの、しかも精度の高い抗原タンパク質マーカーを準備し、それらを組合せて使用することが不可欠である。

本願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、癌（例えば、大腸癌）の診断に有効な新規抗原ペプチドを提供することを課題としている。

また本願の発明は、前記の抗原ペプチドに対する抗体と、それらを用いた癌診断方法を提供することを課題としている。

発明の要旨

本発明は、ＦＩＲとＣＥＮＰ-Ａとが、予想外に癌の指標として使用することができることを発見したことによって達成された。また、本発明は、ＦＩＲにおいて正常型およびその数種の改変体が存在しており、それらの識別により癌の確定診断を行うことができることが判明したことによってより優れた効果を達成する。

従って、本発明は、以下を提供する。

1．　（a）配列番号１に記載の塩基配列もしくはその相補体またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

（b）配列番号２に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

（c）配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

（d）（a）～（c）のいずれか１つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

（e）（a）～（c）のいずれか１つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも７０％である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

を含む、核酸分子。

２．少なくとも８の連続するヌクレオチド長を有する、請求項１に記載の核酸分子。

３．前記生物学的活性は、ＦＢＰに結合する能力である、請求項１に記載の核酸分子。

４．前記ＦＢＰに結合する能力は、配列番号２における３７２位～４４２位に記載される配列によって規定される、請求項３に記載の核酸分子。

５．請求項１に記載の核酸分子に対して特異的な因子。

６．前記因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される、請求項５に記載の因子。

７．前記因子は、少なくとも８の連続するヌクレオチド長を有する核酸分子である、請求項６に記載の因子。

８．前記因子は、核酸分子であり、プライマーとして使用される、請求項５に記載の因子。

９．前記因子は、プローブとして使用される、請求項５に記載の因子。

１０．前記因子は、標識されているかまたは標識され得る、請求項５に記載の因子。

１１．前記標識は、蛍光、リン光、化学発光、放射能、酵素基質反応および抗原抗体反応からなる群より選択される技法を利用する、請求項１０に記載の因子。

１２．配列番号１で示される配列またはその相補体を含む、請求項１に記載の核酸分子。

１３．（ａ）配列番号１またはその相補体において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列；または

（ｂ）配列番号１１、１３および１５からなる群より選択される少なくとも１つの配列もしくはその相補体、または該少なくとも１つの配列もしくはその相補体において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列、

を含む、請求項１に記載の核酸分子。

１４．前記改変は、置換；配列番号１の３６９位と３７０位との間もしくは配列番号１５の１７６位と１７７位との間への付加；あるいは配列番号１の３６９位までもしくは配列番号１１の３０５位までまたは配列番号１３もしくは配列番号１５の１７６位までにおける欠失；あるいはそれらの組合せである、請求項１３に記載の核酸分子。

１５．前記改変は、配列番号１の５’末端から約４００塩基までの範囲内に存在する、請求項１３に記載の核酸分子。

１６．前記改変は、配列番号１における約１５０位～約３６０位の範囲内における改変である、請求項１３に記載の核酸分子。

１７．前記改変は、配列番号１において、コードするアミノ酸の非保存的置換を含む、請求項１３に記載の核酸分子。

１８．配列番号１１、１３、１５、１７、１９および２１からなる群より選択される配列を含む、請求項１３に記載の核酸分子。

１９．請求項１２に記載の核酸分子に対して特異的な因子。

２０．請求項１３に記載の核酸分子には特異的に反応しない、請求項１９に記載の因子。

２１．前記因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される、請求項１９に記載の因子。

２２．前記因子は、少なくとも８の連続するヌクレオチド長を有する核酸分子である、請求項１９に記載の因子。

２３．前記因子は、核酸分子であり、プライマーとして使用される、請求項１９に記載の因子。

２４．前記因子は、プローブとして使用される、請求項１９に記載の因子。

２５．前記因子は、標識されているかまたは標識され得る、請求項１９に記載の因子。

２６．前記標識は、蛍光、リン光、化学発光、放射能、酵素基質反応および抗原抗体反応からなる群より選択される技法を利用する、請求項２５に記載の因子。

２７．請求項１３に記載の核酸分子に対して特異的な因子。

２８．請求項１２に記載の核酸分子には特異的に反応しない、請求項２７に記載の因子。

２９．前記因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される、請求項２７に記載の因子。

３０．前記因子は、少なくとも８の連続するヌクレオチド長を有する核酸分子である、請求項２７に記載の因子。

３１．前記因子は、核酸分子であり、プライマーとして使用される、請求項２７に記載の因子。

３２．前記因子は、プローブとして使用される、請求項２７に記載の因子。

３３．前記因子は、標識されているかまたは標識され得る、請求項２７に記載の因子。

３４．前記標識は、蛍光、リン光、化学発光、放射能、酵素基質反応および抗原抗体反応からなる群より選択される技法を利用する、請求項３３に記載の因子。

３５．A）請求項１に記載の第一核酸分子に対して特異的な第一の因子；および

B）該第一の因子に起因するシグナルを用いて該第一核酸分子の発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該第一核酸分子の発現量に比較して対象の被験体の対象部分における該第一核酸分子の発現が高い場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、手段、

を備える、癌診断キット。

３６．前記癌は、ｃ-ｍｙｃ高発現癌を含む、請求項３５に記載のキット。

３７．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項３５に記載のキット。

３８．癌診断方法であって、

A）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

B）該試料中における、請求項１に記載の第一核酸分子の存在量を測定する工程；

C）該第一核酸分子の存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料における該第一核酸分子の量が増加している場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、工程、

を包含する、方法。

３９．Ａ）請求項１２に記載の第二核酸分子に対して特異的な第二の因子；

Ｂ）該第二の因子に起因するシグナルを用いて該第二核酸分子の発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該第二核酸分子の発現量と、対象の被験体の対象部分における該第二核酸分子の発現量とが異なる場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、手段、

を備える、癌診断キット。

４０．前記癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌を含む、請求項３９に記載のキット。

４１．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項３９に記載のキット。

４２．癌診断方法であって、

Ａ）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

Ｂ）該試料中において、請求項１２に記載の第二核酸分子の存在量を測定する工程；

Ｃ）該第二核酸分子の存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、両者が異なる場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、工程、

を包含する、方法。

４３．Ａ）請求項１３に記載の第三核酸分子に対して特異的な第三の因子；

Ｂ）該第三の因子に起因するシグナルを用いて該第三核酸分子の発現量を測定するための手段であって、対象の被験体の対象部分において該第三核酸分子が検出される場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、手段、

を備える、癌診断キット。

４４．前記対象の被験体の対象部分における前記核酸分子の検出は、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該核酸分子の発現

量に比較して対象の被験体の対象部分における該核酸分子の発現が高いことを検出することである、請求項４３に記載のキット。

４５．前記癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌を含む、請求項４３に記載のキット。

４６．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項４３に記載のキット。

４７．癌診断方法であって、

Ａ）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

Ｂ）該試料中において、請求項１３に記載の第三核酸分子を検出する工程；

Ｃ）該第三核酸分子が検出される場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、工程、

を包含する、方法。

４８．前記Ｃ）工程は、前記第三核酸分子の存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、前記対象の被験体の対象部分からの試料における該核酸分子の量が増加している場合、該対象の被験体は癌患者であると確定することである、請求項４７に記載の方法。

４９．Ａ）請求項１２に記載の第二核酸分子に対して特異的な第二の因子；

Ｂ）請求項１３に記載の第三核酸分子に対して特異的な第三の因子；

Ｃ）該第二の因子および該第三の因子に起因するシグナルを識別可能に検知して、該第二核酸分子と該第三核酸分子のそれぞれの発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該第二核酸分子の発現に比較して対象の被験体の対象部分における該第二核酸分子の発現が高く、かつ、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該第三核酸分子の発現に比較して対象の被験体の対象部分における該第三核酸分子の発現が高い場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、手段、

を備える、癌診断キット。

５０．前記Ｃ）手段は、前記第二核酸分子と前記第三核酸分子との相対存在比を比較する手段を包含する、請求項４９に記載のキット。

５１．前記癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌を含む、請求項４９に記載のキット。

５２．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項４９に記載のキット。

５３．前記第二の因子は請求項１３に記載の核酸分子に特異的に反応しないか、前記第三の因子は請求項１２に記載の核酸分子に特異的に反応しないか、またはその両方である、請求項４９に記載のキット。

５４．前記第二の因子と、前記第三の因子とは、識別可能に標識されているかまたは標識され得る、請求項４９に記載のキット。

５５．前記第二の因子と、前記第三の因子とを、識別可能に標識する因子をさらに含む、請求項４９に記載のキット。

５６．癌診断方法であって、

Ａ）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

Ｂ）該試料中において、請求項１２に記載の第二核酸分子および請求項１３に記載の第三核酸分子の存在量を測定する工程；

Ｃ）該第二核酸分子の存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料における該第二核酸分子の発現量が変動しており、かつ、該第三核酸分子の存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料における該第三核酸分子の発現量が増加している場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する工程、

を包含する、方法。

５７．Ａ）請求項１に記載の第一核酸分子に対して特異的な第一の因子；

Ｂ）請求項１３に記載の第三核酸分子に対して特異的な第三の因子；

C）該第一の因子および該第三の因子に起因するシグナルを識別可能に検知して、該第一核酸分子と該第三核酸分子のそれぞれの発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該第一核酸分子の発現量における該第三核酸分子の発現量の割合が、対象の被験体の対象部分における該第一核酸分子の発現量における該第三核酸分子の発現量の割合よりも高い場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、手段、

を備える、癌診断キット。

５８．前記C）手段は、前記第三核酸分子との相対存在比または絶対存在量を比較する手段を包含する、請求項５７に記載のキット。

５９．前記癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌を含む、請求項５７に記載のキット。

６０．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項５７に記載のキット。

６１．前記第一の因子は請求項１３に記載の核酸分子に特異的に反応しないか、または該第一の因子は請求項１３に記載の核酸分子および請求項１２に記載の核酸分子の両方に特異的に反応する、請求項５７に記載のキット。

６２．前記第一の因子と、前記第三の因子とは、識別可能に標識されているかまたは標識され得る、請求項５７に記載のキット。

６３．前記第一の因子と、前記第三の因子とを、識別可能に標識する因子をさらに含む、請求項５７に記載のキット。

６４．癌診断方法であって、

A）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

B）該試料中において、請求項１に記載の第一核酸分子および請求項１３に記載の第三核酸分子の存在量を測定する工程；

C）該第一核酸分子と該第三核酸分子のそれぞれの発現量を測定する工程であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該第一核酸分子の発現量における該第三核酸分子の発現量の割合が、対象の被

験体の対象部分における該第一核酸分子の発現量における該第三核酸分子の発現量の割合よりも高い場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、工程、を包含する、方法。

６５．（ａ）配列番号１に記載の塩基配列もしくはその相補体またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

（ｂ）配列番号２に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

（ｃ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

（ｄ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

（ｅ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも７０％である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

を含む、核酸分子の、癌の診断剤の製造のための使用。

６６．　（ａ）配列番号２に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；

（ｂ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；

（ｃ）配列番号１に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；

（ｄ）配列番号２に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または

（ｅ）（ａ）～（ｄ）のいずれか１つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも７０％であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

を含む、ポリペプチド。

６７．少なくとも３の連続するアミノ酸長を有する、請求項６６に記載のポリペプチド。

６８．前記生物学的活性は、ＦＢＰに結合する能力である、請求項６６に記載のポリペプチド。

６９．前記ＦＢＰに結合する能力は、配列番号２における３７２位～４４２位に記載される配列によって規定される、請求項６８に記載のポリペプチド。

７０．ポリペプチドは、標識されているかまたは標識され得る、請求項６６に記載のポリペプチド。

７１．請求項６６に記載のポリペプチドに対して特異的な因子。

７２．前記因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される、請求項７１に記載の因子。

７３．前記因子は、抗体またはその誘導体である、請求項７１に記載の因子。

７４．前記因子は、プローブとして使用される、請求項７１に記載の因子。

７５．前記因子は、標識されているかまたは標識され得る、請求項７１に記載の因子。

７６．前記標識は、蛍光、リン光、化学発光、放射能、酵素基質反応および抗原抗体反応からなる群より選択される技法を利用する、請求項７５に記載の因子。

７７．配列番号２で示される配列を含む、請求項６６に記載のポリペプチド。

７８．（ａ）配列番号２において、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含むアミノ酸配列；

（ｂ）配列番号１２、１４および１６からなる群より選択される少なくとも１つの配列、または該少なくとも１つの配列において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列、

を含む、請求項６６に記載のポリペプチド。

７９．前記改変は、置換；配列番号２の１０２位と１０３位との間もしくは配列番号１６の５９位と６０位との間への付加；あるいは配列番号２もしくは配列番号１２の１０２位までまたは配列番号１４もしくは配列番号１６の５９位までにおける欠失；あるいはそれらの組合せである、請求項７８に記載のポリペプチド。

８０．前記改変は、配列番号２のＮ末端から約１３５アミノ酸までの範囲内に存在する、請求項７８に記載のポリペプチド。

８１．前記改変は、配列番号２における約５０位～約１２０位の範囲内における改変である、請求項７８に記載のポリペプチド。

８２．前記改変は、配列番号２における非保存的置換を含む、請求項７８に記載のポリペプチド。

８３．配列番号１２、１４、１６、１８、２０および２２からなる群より選択される配列を含む、請求項７８に記載のポリペプチド。

８４．請求項７７に記載のポリペプチドに対して特異的な因子。

８５．請求項７８に記載のポリペプチドに対して特異的に反応しない、請求項８４に記載の因子。

８６．前記因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される、請求項８４に記載の因子。

８７．前記因子は、抗体またはその誘導体である、請求項８４に記載の因子。

８８．前記因子は、プローブとして使用される、請求項８４に記載の因子。

８９．前記因子は、標識されているかまたは標識され得る、請求項８４に記載の因子。

９０．前記標識は、蛍光、リン光、化学発光、放射能、酵素基質反応および抗原抗体反応からなる群より選択される技法を利用する、請求項８９に記載の因子。

９１．請求項７８に記載のポリペプチドに対して特異的な因子。

９２．請求項７７に記載のポリペプチドに対して特異的に反応しない、請求項９１に記載の因子。

９３．前記因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される、請求項９１に記載の因子。

９４．前記因子は、抗体またはその誘導体である、請求項９１に記載の因子。

９５．前記因子は、プローブとして使用される、請求項９１に記載の因子。

９６．前記因子は、標識されているかまたは標識され得る、請求項９１に記載の因子。

９７．前記標識は、蛍光、リン光、化学発光、放射能、酵素基質反応および抗原抗体反応からなる群より選択される技法を利用する、請求項９６に記載の因子。

９８．Ａ）請求項６６に記載のＡポリペプチドに対して特異的なＡ因子；および

Ｂ）該Ａ因子に起因するシグナルを用いて該Ａポリペプチドの発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該Ａポリペプチドの発現量に比較して対象の被験体の対象部分における該Ａポリペプチドの発現が高い場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、手段、

を備える、癌診断キット。

９９．前記癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌を含む、請求項９８に記載のキット。

１００．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項９８に記載のキット。

１０１．癌診断方法であって、

Ａ）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

Ｂ）該試料中において、請求項６６に記載のＡポリペプチドの存在量を測定する工程；

Ｃ）該Ａポリペプチドの存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料における該Ａポリペプチドの量が増加している場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、工程、

を包含する、方法。

１０２．Ａ）請求項７７に記載のＢポリペプチドに対して特異的なＢ因子；および

Ｂ）該Ｂ因子に起因するシグナルを用いて該Ｂポリペプチドの発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該Ｂポリペプチドの発現量と、対象の被験体の対象部分における該Ｂポリペプチドの発現量とが異なる場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、手段、

を備える、癌診断キット。

１０３．前記癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌を含む、請求項１０２に記載のキット。

１０４．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項１０２に記載のキット。

１０５．癌診断方法であって、

Ａ）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

Ｂ）該試料中において、請求項７７に記載のＣポリペプチドの存在量を測定する工程；

C）該Cポリペプチドの存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、両者が異なる場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、工程、を包含する、方法。

１０６．A）請求項７８に記載のポリペプチドに対して特異的なC因子；および

B）該C因子に起因するシグナルを用いて該Cポリペプチドの発現量を測定するための手段であって、対象の被験体の対象部分において該Cポリペプチドが検出される場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、手段、

を備える、癌診断キット。

１０７．対象の被験体の対象部分における前記Cポリペプチドの検出は、前記癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該ポリペプチドの発現量に比較して対象の被験体の対象部分における該ポリペプチドの発現が高いことを検出することである、請求項１０６に記載のキット。

１０８．前記癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌を含む、請求項１０６に記載のキット。

１０９．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項１０６に記載のキット。

１１０．癌診断方法であって、

A）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

B）該試料中において、請求項７８に記載のCポリペプチドを検出する工程；

C）該Cポリペプチドが検出される場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、工程、

を包含する、方法。

１１１．前記C）工程は、前記Cポリペプチドの存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料における該ポリペプ

チドの量が増加している場合、該対象の被験体は癌患者であると確定することである、請求項１１０に記載の方法。

１１２．Ａ）請求項７７に記載のＢポリペプチドに対して特異的なＢ因子；

Ｂ）請求項７８に記載のＣポリペプチドに対して特異的なＣ因子；

Ｃ）該Ｂ因子および該Ｃ因子に起因するシグナルを識別可能に検知して、該Ｂポリペプチドと該Ｃポリペプチドのそれぞれの発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該Ｂポリペプチドの発現に比較して対象の被験体の対象部分における該Ｂポリペプチドの発現が高く、かつ、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該Ｃポリペプチドの発現に比較して対象の被験体の対象部分における該Ｃポリペプチドの発現が高い場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、手段、

を備える、癌診断キット。

１１３．前記Ｃ）手段は、前記Ｂポリペプチドと前記Ｃポリペプチドとの相対存在比を比較する手段を包含する、請求項１１２に記載のキット。

１１４．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項１１２に記載のキット。

１１５．前記癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌を含む、請求項１１２に記載のキット。

１１６．前記Ｂ因子は請求項７８に記載の核酸分子に特異的に反応しないか、前記Ｃ因子は請求項７７に記載の核酸分子に特異的に反応しないか、またはその両方である、請求項１１２に記載のキット。

１１７．前記Ｂ因子と、前記Ｃ因子とは、識別可能に標識されているかまたは標識され得る、請求項１１２に記載のキット。

１１８．前記Ｂ因子と、前記Ｃ因子とを、識別可能に標識する因子をさらに含む、請求項１１２に記載のキット。

１１９．癌診断方法であって、

Ａ）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

B）該試料中において、請求項７７に記載のＢポリペプチドおよび請求項７８に記載のＣポリペプチドの存在量を測定する工程；

C）該Ｂポリペプチドの存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一ポリペプチドの存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料における該Ｂポリペプチドの発現量が増加しており、かつ、該Ｃポリペプチドの存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一ポリペプチドの存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料における該Ｃポリペプチドの発現量が増加している場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、工程、

を包含する、方法。

１２０．A）請求項６６に記載のＡポリペプチドに対して特異的なＡ因子；

B）請求項７８に記載のＣポリペプチドに対して特異的なＣ因子；

C）該Ａ因子および該Ｃ因子に起因するシグナルを識別可能に検知して、該Ａポリペプチドと該Ｃポリペプチドのそれぞれの発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該Ａポリペプチドの発現量における該Ｃポリペプチドの発現量の割合が、対象の被験体の対象部分における該Ａポリペプチドの発現量における該Ｃポリペプチドの発現量の割合よりも高い場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、手段、

を備える、癌診断キット。

１２１．前記C）手段は、前記Ａポリペプチドと前記Ｃポリペプチドとの相対存在比または絶対存在量を比較する手段を包含する、請求項１２０に記載のキット。

１２２．前記癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌を含む、請求項１２０に記載のキット。

１２３．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項１２０に記載のキット。

１２４．前記第Ａ因子は請求項７８に記載のポリペプチドに特異的に反応しないか、または請求項７７に記載のポリペプチドおよび請求項７８に記載のポリペプチドに特異的に反応する、請求項１２０に記載のキット。

１２５．前記第Ａ因子と、前記Ｃ因子とは、識別可能に標識されているかまたは標識され得る、請求項１２０に記載のキット。

１２６．前記Ａ因子と、前記Ｃ因子とを、識別可能に標識する因子をさらに含む、請求項１２０に記載のキット。

１２７．癌診断方法であって、

Ａ）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

Ｂ）該試料中において、請求項６６に記載のＡポリペプチドおよび請求項７８に記載のＣポリペプチドの存在量を測定する工程；

Ｃ）該Ａポリペプチドと該Ｃポリペプチドのそれぞれの発現量を測定する工程であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該Ａポリペプチドの発現量における該Ｃポリペプチドの発現量の割合が、対象の被験体の対象部分における該Ａポリペプチドの発現量における該Ｃポリペプチドの発現量の割合よりも高い場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、工程、

を包含する、方法。

１２８．（ａ）配列番号２に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；

（ｂ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；

（ｃ）配列番号１に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；

（ｄ）配列番号２に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または

（ｅ）（ａ）～（ｄ）のいずれか１つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも７０％であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

を含む、ポリペプチドの、癌の診断剤の製造のための使用。

１２９．　（ａ）配列番号３に記載の塩基配列もしくはその相補体またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

（ｂ）配列番号４に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

（ｃ）配列番号４に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

（ｄ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

（ｅ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも７０％である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

を含む、核酸分子。

１３０．少なくとも８の連続するヌクレオチド長を有する、請求項１２９に記載の核酸分子。

１３１．前記生物学的活性は、セントロメアクロマチンへの結合である、請求項１２９に記載の核酸分子。

１３２．請求項１２９に記載の核酸分子に対して特異的な因子。

１３３．前記因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される、請求項１３２に記載の因子。

１３４．前記因子は、少なくとも８の連続するヌクレオチド長を有する核酸分子である、請求項１３２に記載の因子。

１３５．前記因子は、核酸分子であり、プライマーとして使用される、請求項１３２に記載の因子。

１３６．前記因子は、プローブとして使用される、請求項１３２に記載の因子。

１３７．前記因子は、標識されているかまたは標識され得る、請求項１３２に記載の因子。

１３８．前記標識は、蛍光、リン光、化学発光、放射能、酵素基質反応および抗原抗体反応からなる群より選択される技法を利用する、請求項１３７に記載の因子。

１３９．Ａ）請求項１２９に記載の核酸分子に対して特異的な因子；および

Ｂ）該因子に起因するシグナルを用いて該核酸分子の発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該核酸分子の発現量に比較して対象の被験体の対象部分における該核酸分子の発現が高い場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、手段、

を備える、癌診断キット。

１４０．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項１３９に記載のキット。

１４１．癌診断方法であって、

Ａ）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

Ｂ）該試料中において、請求項１２８に記載の核酸分子の存在量を測定する工程；

Ｃ）該核酸分子の存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、該対象の

被験体の対象部分からの試料における該核酸分子の量が増加している場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、工程、

を包含する、方法。

１４２．（ａ）配列番号３に記載の塩基配列もしくはその相補体またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

（ｂ）配列番号４に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

（ｃ）配列番号４に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

（ｄ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

（ｅ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも７０％である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

を含む、核酸分子の、癌の診断剤の製造のための使用。

１４３．　（ａ）配列番号４に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；

（ｂ）配列番号４に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；

（ｃ）配列番号３に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；

（ｄ）配列番号４に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または

（ｅ）（ａ）～（ｄ）のいずれか１つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも７０％であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

を含む、ポリペプチド。

１４４．少なくとも３の連続するアミノ酸長を有する、請求項１４２に記載のポリペプチド。

１４５．前記生物学的活性は、セントロメアクロマチンへの結合である、請求項１４２に記載のポリペプチド。

１４６．前記ポリペプチドは、標識されているかまたは標識され得る、請求項１４２に記載のポリペプチド。

１４７．請求項１４２に記載のポリペプチドに対して特異的な因子。

１４８．前記因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される、請求項１４７に記載の因子。

１４９．前記因子は、抗体またはその誘導体である、請求項１４７に記載の因子。

１５０．前記因子は、プローブとして使用される、請求項１４７に記載の因子。

１５１．前記因子は、標識されているかまたは標識され得る、請求項１４７に記載の因子。

１５２．前記標識は、蛍光、リン光、化学発光、放射能、酵素基質反応および抗原抗体反応からなる群より選択される技法を利用する、請求項１５１に記載の因子。

１５３．Ａ）請求項１４３に記載のポリペプチドに対して特異的な因子；および

B）該因子に起因するシグナルを用いて該ポリペプチドの発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該ポリペプチドの発現量に比較して対象の被験体の対象部分における該ポリペプチドの発現が高い場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、手段、

を備える、癌診断キット。

１５４．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項１５３に記載のキット。

１５５．癌診断方法であって、

A）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

B）該試料中において、請求項１４２に記載のポリペプチドの存在量を測定する工程；

C）該ポリペプチドの存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料における該ポリペプチドの量が増加している場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、工程、

を包含する、方法。

１５６．（a）配列番号４に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；

（b）配列番号４に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；

（c）配列番号３に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；

（d）配列番号４に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；

または

（ｅ）（ａ）～（ｄ）のいずれか１つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも７０％であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

を含む、ポリペプチドの、癌の診断剤の製造のための使用。

本願はまた、上記課題を解決するために、以下の(S1)～(S26)の発明を提供する。

(S1)配列番号 2 のアミノ酸配列を有するヒト大腸癌抗原ペプチド。

(S2)配列番号 4 のアミノ酸配列を有するヒト大腸癌抗原ペプチド。

(S3)上記発明（S1)のペプチドをコードする遺伝子 DNA から転写された mRNA。

(S4)上記発明（S2)のペプチドをコードする遺伝子 DNA から転写された mRNA。

(S5)上記発明（S3)の mRNA を鋳型として合成され、配列番号 1 の塩基配列またはその一部連続配列からなる DNA 断片。

(S6)上記発明（S4)の mRNA を鋳型として合成され、配列番号 3 の塩基配列またはその一部連続配列からなる DNA 断片。

(S7)上記発明（S5)の DNA 断片を保有する組換え発現ベクター。

(S8)上記発明（S6)の DNA 断片を保有する組換え発現ベクター。

(S9)上記発明（S7)の組換え発現ベクターによる形質転換細胞。

(S10)上記発明（S8)の組換え発現ベクターによる形質転換細胞。

(S11)上記発明（S1)の抗原ペプチドと結合する抗体。

(S12)上記発明（S2)の抗原ペプチドと結合する抗体。

(S13)上記発明（S1)の抗原ペプチドと結合する標識抗体。

(S14)上記発明（S2)の抗原ペプチドと結合する標識抗体。

(S15)被験体の血清中に、上記発明（S1)および／または（S2)の抗原ペプチドと結合する抗体が存在するか否かを試験し、血清中にその抗体が存在する被験

体を大腸癌患者または大腸癌ハイリスク者と判定することを特徴とするヒト大腸癌診断方法。

(S16)抗原ペプチドを固定化したプレート上において被験体血清の抗体と抗原ペプチドとの結合を試験する上記発明(S15)の診断方法。

(S17)被験体の生体試料に、上記発明(S11)および／または(S12)の抗体、もしくは上記発明(S13)および／または(S14)の標識抗体と結合する抗原ペプチドが存在するか否かを試験し、試料中にその抗原ペプチドが存在する被験体を大腸癌患者または大腸癌ハイリスク者と判定することを特徴とするヒト大腸癌診断方法。

(S18)抗体を固定化したプレート上において、抗体と抗原ペプチドの結合を試験する上記発明(S17)の診断方法。

(S19)被験体の生体試料に、上記発明(S3)および／または(S4)の mRNA が存在するか否かを試験し、試料中にその mRNA が存在する被験体を大腸癌患者または大腸癌ハイリスク者と判定することを特徴とするヒト大腸癌診断方法。

(S20)少なくとも以下の要素：(a)上記発明(S1)および／または(S2)の抗原ペプチド；および(b)血清中抗体に特異的に結合する標識抗体からなることを特徴とする大腸癌診断キット。

(S21)少なくとも以下の要素：(a)上記発明(S1)および／または(S2)の抗原ペプチドを固定化したプレート；および(b)　血清中抗体に特異的に結合する標識抗体からなることを特徴とする大腸癌診断キット。

(S22)少なくとも、上記発明(S13)および／または(S14)の標識抗体を含むことを特徴とする大腸癌診断キット。

(S23)少なくとも以下の要素：(a)上記発明(S11)および／または(S12)の抗体；および(b)上記(a)の抗体と同一の抗原ペプチドと結合する上記発明(S13)および／または(S14)の標識抗体からなることを特徴とする大腸癌診断キット。

(S24)少なくとも以下の要素：(a)上記発明（S11)および／または（S12)の抗体を固定化したプレート；および(b)上記（a)のプレートに固定化した抗体と同一の抗原ペプチドと結合する上記発明（S13)および／または（S14)の標識抗体からなることを特徴とする大腸癌診断キット。

(S25)上記発明（S3)のmRNAをPCR増幅するためのプライマーセット。

(S26)上記発明（S4)のmRNAをPCR増幅するためのプライマーセット。

1つの局面において、本発明者らは、大腸癌患者の手術標本の正常部および癌部から本人の了解を得てタンパク質およびmRNAを抽出し、それらを解析することによって、大腸癌細胞において特異的に発現し、従来は腫瘍マーカーとしての機能が知られていなかった２種の抗原ペプチドを見出した。

本願の発明は、以上のとおりの新規抗原ペプチド（配列番号２、４など）と、それらをコードする遺伝子DNAから転写されたmRNA、およびそれらのmRNAから合成されたDNA断片（cDNA：配列番号１、３など）を基礎とするものである。なお、本発明は、配列番号１－４などにそれぞれ示した塩基配列およびアミノ酸配列については、１以上の塩基の付加、欠失、他の塩基への置換、あるいはこれらの塩基変異に基づく１以上のアミノ酸残基の付加、欠失および他のアミノ酸への置換をも包含するものである。

また、「血清中抗体」とは、特定の実施形態において、癌患者（例えば、大腸癌患者）の血清中に存在し、発明(S1)(S2)の抗原ペプチドと結合する抗体IgGを意味する。また、発明(S11)(S12)の「抗体」および発明(S13)(S14)の「標識抗体」は、発明(S1)(S2)の抗原ペプチドを免疫原として作成されたポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を意味する。

以下に、本発明の好ましい実施形態を示すが、当業者は本発明の説明および当該分野における周知慣用技術からその実施形態などを適宜実施することができ、本発明が奏する作用および効果を容易に理解することが認識されるべきである。

以下、各発明について、実施形態を詳しく説明する。

図面の簡単な説明

図１は、本発明の抗原ペプチド（配列番号２）の癌組織および正常組織における発現を分析したウエスタンブロットの結果である。

図２は、本発明の抗原ペプチドをコードする遺伝子 mRNA の癌組織および正常組織における発現を分析した RT-PCR の結果である。

図３は、本発明の抗原ペプチド（配列番号４）の癌組織および正常組織における発現を分析したウエスタンブロットの結果である。ＣＥＮＰ－Ａタンパク質は、原発性結腸直腸癌において増加していた。総タンパク質溶解物を、腫瘍組織（Ｔ）および近傍の正常組織（Ｎ）の対応する試料から調製した。各々の対からの等量のタンパク質を、７．５％～１５％勾配のポリアクリルアミドゲル上で分離し、いくつかの抗体を用いて免疫ブロットした。Ａ．ＣＥＮＰ－Ａタンパク質を矢印で示す。免疫ブロッティングはまた、ローディングコントロールとしてβ－アクチン抗体を用いて実施した。各バンドの強度を、ＮＩＨ画像により測定し、β－アクチンを用いて正規化した腫瘍組織と正常組織との間の相対的な平均ＣＥＮＰ－Ａタンパク質レベルを、少なくとも３回の実験から算出した。＊は、非特異的なバンドを示す。各腫瘍のデューク分類の段階を示す。Ｂ．ＣＥＮＰ－Ａタンパク質レベルを、ＡＮＡ血清の代わりに抗ＣＥＮＰ－Ａ抗体を用いて検出した。Ｃ．ＡＮＡ血清により検出したＣＥＮＰ－Ｂタンパク質。Ｄ．結腸直腸癌組織におけるＰＣＮＡタンパク質レベル。

図４は、本発明の抗原ペプチドをコードする遺伝子 mRNA の癌組織および正常組織における発現を分析した RT-PCR の結果である。ＣＥＮＰ－Ａ遺伝子は、結腸直腸癌において過剰発現されるが、増幅されない。Ａ．総ＲＮＡを、腫瘍組織（Ｔ）および近傍の正常組織（Ｎ）の対応する試料から調製し、ＲＴ－ＰＣＲを実施した。各バンドの強度をＮＩＨ画像により測定し、ＧＡＰＤＨ　ｍ

ＲＮＡレベルを用いて正規化した腫瘍組織と正常組織との間の相対的な平均ＣＥＮＰ－Ａ　ｍＲＮＡレベルを少なくとも３回の実験から算出した。ほとんどの症例において、腫瘍におけるＣＥＮＰ－Ａ　ｍＲＮＡは、正常組織と比較して増大していた。Ｂ．リアルタイム定量ＲＴ－ＰＣＲによる腫瘍組織と近傍正常組織との間のＣＥＮＰ－Ａ　ｍＲＮＡレベルの比較。Ｃ．リアルタイム定量ＰＣＲによる腫瘍組織および正常組織におけるＣＥＮＰ－Ａ遺伝子コピー数の定量：バー、±ＳＤ。

図５は、抗ＣＥＮＰ－Ａ抗体によるヒト結腸組織の免疫染色を示す。正常結腸上皮（ＡおよびＢ）ならびに結腸癌組織（ＣおよびＤ）を４％パラホルムアルデヒドで固定し、Ｈ＆Ｅ（ＡおよびＣ）または抗ＣＥＮＰ－Ａ抗体（ＢおよびＤ）で染色した。ＣＥＮＰ－Ａ染色は、正常上皮細胞と比較した場合、癌細胞において増大していた。最初の倍率は４０倍である。より高倍率での表示（６３倍）をＢおよびＤに差し込みで示す。

図６は、抗ＣＥＮＰ－Ａ抗体および抗ＣＥＮＰ－Ｂ抗体によるヒト結腸組織の同時免疫染色を示す。Ａ．正常結腸上皮組織および結腸癌組織をアセトンで固定し、抗ＣＥＮＰ－Ａおよび抗ＣＥＮＰ－Ｂ抗体で染色した。矢じりは、ＣＥＮＰ－Ｂと共存しないＣＥＮＰ－Ａを示す。矢印はＣＥＮＰ－Ａと共存しないＣＥＮＰ－Ｂを示す。ＣＥＮＰ－ＡおよびＣＥＮＰ－Ｂの全てが正常細胞において共存したのに対して、ＣＥＮＰ－ＡおよびＣＥＮＰ－Ｂのいくつかのシグナルは腫瘍細胞において共存しない。Ｂ．正常細胞および腫瘍細胞において共存するかまたは共存しないＣＥＮＰ－ＡおよびＣＥＮＰ－Ｂドットの数（％）。少なくとも３００ドットの細胞を、それぞれ計数した。

図７は、ＦＩＲのアミノ末端が、ｃ－ｍｙｃプロモーターからの転写の抑制に重要であることを示す。ＨＡ－ＦＩＲおよびＨＡ－ＦＩＲΔＮ７７を、ＨｅＬａ細胞においてｃ－ｍｙｃプロモーターによって駆動されるＣＡＴレポータープラスミド７５０ｎｇとコトランスフェクトし、そしてＣＡＴ活性を測定し

た。各レーンは、それぞれ、３６ｆｍｏｌのHAベクター単独（レーン１）、１８ｆｍｏｌおよび３６ｆｍｏｌのHA－ＦＩＲ（レーン２、３）、１８ｆｍｏｌおよび３６ｆｍｏｌのHA－ＦＩＲΔＮ７７（レーン４、５）である。下のパネルは、複数の実験における平均ＣＡＴ活性のヒストグラムを示す。レーン２（１８ｆｍｏｌのHA－ＦＩＲ）、３（３６ｆｍｏｌのHA－ＦＩＲ）、４（１８ｆｍｏｌのHA－ＦＩＲΔＮ７７）、および５（３６ｆｍｏｌのHA－ＦＩＲΔＮ７７）の相対的なＣＡＴ活性は、レーン１（３６ｆｍｏｌのHAベクター）と比較して、それぞれ、０．２５、０．１６、０．５２、および０．４３である。

図８Ａは、ＦＩＲが、ｃ－Ｍｙｃを抑制し、そしてそのアミノ末端が抑制に必要であることを示す。１００ｆｍｏｌのHA－ＦＩＲまたはHA－ＦＩＲΔＮ７７を、６ウェルプレート中でＨｅＬａ細胞にトランスフェクトした。細胞を、ｃ－Ｍｙｃ（左、緑色）抗体またはHA（中央、赤）抗体に対して免疫染色した。矢じりおよび矢印は、それぞれ、HA－ＦＩＲおよびHA－ＦＩＲΔＮ７７が発現された細胞を示す。ｃ－Ｍｙｃ発現は、HA－ＦＩＲΔＮ７７発現細胞（矢印）と比較した場合、ほとんどのHA－ＦＩＲ発現細胞（矢じり）において顕著に減少していた。

図８Ｂは、ＦＩＲが、ｃ－Ｍｙｃを抑制し、そしてそのアミノ末端が抑制に必要であることを示す。HA－ＦＩＲまたはHA－ＦＩＲΔＮ７７のトランスフェクションによるｃ－Ｍｙｃ抑制を、フローサイトメトリー分析によって定量した。トランスフェクトした細胞を、ｘ軸に沿って示されるＰＥポジティブ細胞として同定した。ｙ軸に沿ったＦＩＴＣポジティブ細胞は、ｃ－Ｍｙｃ発現を示す。HA－ＦＩＲは、ｃ－Ｍｙｃ発現を抑制するが（左）、HAベクター単独ではｃ－Ｍｙｃ発現を抑制しない（右）。下のパネルは、上のパネル中で囲んだ領域中のｃ－Ｍｙｃ発現のヒストグラムを示す。この囲んだ領域中の

ｃ－Ｍｙｃレベルの平均（Ｇｅｏ－平均）（ＨＡ－ＦＩＲについては４８．４（１６．１）およびＨＡ空ベクターについては８７．０（６７．０））を示す。

図９Ａは、ＦＩＲがアポトーシスを誘導したが、アミノ末端が欠失したＦＩＲはそのアポトーシス活性を消滅させたことを示す。図９Ａは、ＴＵＮＥＬアッセイによるアポトーシス細胞の試験を示す。１５０ｆｍｏｌのＨＡ－ＦＩＲ、ＨＡ－ＦＩＲΔＮ７７、および空ベクタープラスミドを、６ウェルプレート中でＨｅＬａ細胞にトランスフェクトし、そして２４時間後にＴＵＮＥＬアッセイを実行した。上段のパネルは、ＨｅＬａ細胞へのＨＡ－ＦＩＲトランスフェクション後のアポトーシス細胞（矢印）を示す。中段および下段のパネルは、それぞれ、ＨＡ－ＦＩＲΔＮ７７およびＨＡ空ベクターをトランスフェクトした細胞である。

図９Ｂは、ＦＩＲがアポトーシスを誘導したが、アミノ末端が欠失したＦＩＲはそのアポトーシス活性を消滅させたことを示す。図９Ｂは、二色分析によるアポトーシス細胞の定量を示す。細胞を、ｘ軸に沿って示されるＰＩポジティブ細胞およびｙ軸に沿って示されるＦＩＴＣポジティブ細胞として同定した。アポトーシス細胞は、図中に示される各パネルにおいて、上段の囲んだ領域中に示される。ＨＡ－ＦＩＲトランスフェクションにおける１０，０００事象あたりのアポトーシス細胞のパーセンテージは、１６．５％である一方で、ＨＡ－ＦＩＲΔＮ７７、ＨＡ空ベクター、およびＤＮａｓｅ　Ｉ処理細胞（ポジティブコントロール、材料および方法を参照のこと）においては、それぞれ、６．６％、２．０％、および７５．６％である。

図１０Ａは、ＦＩＲが結腸直腸癌組織中で過剰発現されることを示す。総タンパク質溶解物を、対応する腫瘍試料（Ｔ）および近傍の正常上皮組織（Ｎ）から調製した。各対からの等量のタンパク質を、８％ポリアクリルアミドゲルで分離し、抗ＦＩＲ抗体を用いてイムノブロットした。イムノブロッティングをまた、ローディングコントロールとしてβ－アクチン抗体を用いて実行した。

各バンドの強度を、ＮＩＨ画像によって測定し、そしてβ－アクチンで正規化した腫瘍と正常上皮組織との間のＦＩＲタンパク質レベルの相対平均を、図の下に計算した。ＦＩＲ発現は、対応する非腫瘍上皮よりも腫瘍組織においてかなり活性化されている。デュークス分類の段階もまた、図の上部に列挙する。

図１０Ｂは、ＦＩＲが結腸直腸癌組織中で過剰発現されることを示す。総ＲＮＡを、（Ｔ）および（Ｎ）の対応する試料から調製し、そしてＲＴ－ＰＣＲを実行した。（Ｔ）中のＦＩＲ　ｍＲＮＡレベルは、ケース５を除いて、（Ｎ）中のＦＩＲ　ｍＲＮＡレベルよりも高い。ＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡレベルもまた、内部コントロールとして示す。

図１０Ｃは、ＦＩＲが結腸直腸癌組織中で過剰発現されることを示す。図１０Ｃは、定量リアルタイムＰＣＲによって検出した（Ｔ）および（Ｎ）におけるＦＩＲ　ｍＲＮＡ発現のヒストグラムである。（Ｔ）におけるＦＩＲ　ｍＲＮＡ発現は、（Ｎ）におけるＦＩＲ　ｍＲＮＡ発現よりも有意に高い（ｔ検定に対してｐ＜０．００５６；Ｗｉｌｃｏｘｏｎ検定に対してｐ＜０．００８）。

図１０Ｄは、ＦＩＲが結腸直腸癌組織中で過剰発現されることを示す。各結腸直腸癌組織におけるＦＩＲ　ｍＲＮＡおよびｃ－ｍｙｃ　ｍＲＮＡの（Ｔ）／（Ｎ）の発現比は、有意に相関していた。ＦＩＲ発現レベルの平均は、ｃ－ｍｙｃ発現レベルの平均と有意に相関し、明確に、Ｙ＝０．７２＋０．２２Ｘ（ここで、ＹはＦＩＲ発現比（Ｔ／Ｎ）であり、Ｘはｃ－ｍｙｃ発現比（Ｔ／Ｎ）である）である。相関係数は、０．７０であり、ｐ値は、０．００００１９である。

図１１は、本発明のＦＩＲの４つの種類の長さの改変体の比較模式図である。

配列の説明

配列番号１：　ＦＩＲ５４２をコードする核酸配列。

配列番号２：　ＦＩＲ５４２のアミノ酸配列。

配列番号３：　ＣＥＮＰ－Ａをコードする核酸配列。

配列番号４：　ＣＥＮＰ－Ａのアミノ酸配列。

配列番号５：　ＦＩＲアミノ酸配列の特異的抗原性ペプチド（配列番号２の31-45アミノ酸配列）。

配列番号６：　ＦＩＲアミノ酸配列の別の特異的抗原性ペプチド（配列番号２の528-542アミノ酸配列）。

配列番号７：　ＦＩＲを同定するためのＰＣＲ順方向プライマー例。

配列番号８：　ＦＩＲを同定するためのＰＣＲ逆方向プライマー例。

配列番号９：　ＣＥＮＰ－Ａを同定するためのＰＣＲ順方向プライマー例。

配列番号１０：　ＣＥＮＰ－Ａを同定するためのＰＣＲ逆方向プライマー例。

配列番号１１：　ＦＩＲ５５９（ＰＵＦ６０とも称される）をコードする核酸配列。

配列番号１２：　ＦＩＲ５５９のアミノ酸配列。

配列番号１３：　ＦＩＲ５１６をコードする核酸配列。

配列番号１４：　ＦＩＲ５１６のアミノ酸配列。

配列番号１５：　ＦＩＲ４９９をコードする核酸配列。

配列番号１６：　ＦＩＲ４９９のアミノ酸配列。

配列番号１７：　ＦＩＲ５４２の変異例の核酸配列（１１８Ｋ）。

配列番号１８：　ＦＩＲ５４２の変異例のアミノ酸配列（１１８Ｋ）。

配列番号１９：　ＦＩＲ５４２の変異例の核酸配列（１Ｋ）。

配列番号２０：　ＦＩＲ５４２の変異例のアミノ酸配列（１Ｋ）。

配列番号２１：　ＦＩＲ５４２の変異例の核酸配列（２８Ｋ）。

配列番号２２：　ＦＩＲ５４２の変異例のアミノ酸配列（２８Ｋ）。

配列番号２３：　コントロール配列順方向プライマー１

配列番号２４：　コントロール配列逆方向プライマー１

配列番号２５：　コントロール配列順方向プライマー２

配列番号２６：　コントロール配列逆方向プライマー２

配列番号２７：　コントロール配列順方向プライマー３

配列番号２８：　コントロール配列逆方向プライマー３

配列番号２９：　ＦＩＲゲノムＤＮＡ順方向プライマー

配列番号３０：　ＦＩＲゲノムＤＮＡ逆方向プライマー

配列番号３１：　ｃ－ｍｙｃ　ＤＮＡ順方向プライマー

配列番号３２：　ｃ－ｍｙｃ　ＤＮＡ逆方向プライマー

配列番号３３：　βアクチン　ＤＮＡ順方向プライマー

配列番号３４：　βアクチン　ＤＮＡ逆方向プライマー

発明の詳細な説明

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞または形容詞（例えば、英語の場合は「ａ」、「ａｎ」、「ｔｈｅ」など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

（ＦＩＲの背景説明）

本明細書において「ＦＩＲ」とは、ＦＢＰ相互作用リプレッサーのことをいい、代表的に、配列番号１および２で特定される因子をいう。ＦＩＲは、以下

のようないきさつで見出された。ＦＩＲの具体的な配列などの形態は、本明細書において以下に詳述される。

ｃ－Ｍｙｃは、細胞の増殖および腫瘍形成に重要な役割を果たす。ｃ－ｍｙｃプロトオンコジーンは、種々の腫瘍中で活性化され、そしてその異所性発現は、細胞の成長、増殖およびトランスフォーメーションを誘導する。逆に、ｃ－Ｍｙｃの過少発現および過剰発現の両方は、アポトーシス細胞死を導き得る（ＦＩＲ参考文献１）。ｃ－Ｍｙｃのダウンレギュレーションは、ヒト白血病細胞においてグルココルチコイド誘導性アポトーシスに必須であり（ＦＩＲ参考文献２～５）、そしてＢ細胞におけるｃ－ｍｙｃの減少は、アポトーシス誘導剤の作用を二倍にする（ＦＩＲ参考文献６～９）。ｃ－ｍｙｃに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた処理は、種々の細胞においてアポトーシスを増強する（ＦＩＲ参考文献１）。一方、ｃ－ｍｙｃ発現の上昇はまた、特定の状況下においてプロアポトーシス（ｐｒｏ－ａｐｏｐｔｏｔｉｃ；すなわちアポトーシスの前段階）であることを証明し得る。ＩＬ－３依存性骨髄性細胞におけるｃ－ｍｙｃの強制発現は、ＩＬ－３欠乏による細胞死を促進させる（ＦＩＲ参考文献１０）。ｃ－Ｍｙｃを過剰発現する血清欠乏Ｒａｔ１線維芽細胞もまた、アポトーシスを引き起こし得る（ＦＩＲ参考文献１１）。これらの観察は、不適切なｃ－Ｍｙｃ発現がアポトーシスと関連するようであることを示し、このことから、腫瘍における細胞増殖および細胞死の明確な説明を得るためには、ＭＹＣ調節の理解が必要である。

ｃ－Ｍｙｃ発現は、厳重に調節され、そして次にｃ－Ｍｙｃは、広範囲かつ多彩な標的遺伝子のセットの発現を改変する。ｃ－ｍｙｃ発現を調節する分子および機構は、完全に列挙されているわけでも、解明されているわけでも、理解されているわけでもない。Ｆａｒ　ＵｐＳｔｒｅａｍ　Ｅｌｅｍｅｎｔ（ＦＵＳＥ）は、ヒトｃ－ｍｙｃ遺伝子の正確な発現のために必要とされる配列である（ＦＩＲ参考文献１２）。ＦＵＳＥは、ｃ－ｍｙｃプロモーターＰ１の１．

５ｋｂ上流に位置し、ＦＵＳＥ結合タンパク質（ＦＢＰ）（ＦＵＳＥ依存様式でｃ－ｍｙｃ発現を刺激する転写因子）に結合する（ＦＩＲ参考文献１３～１５）。酵母ツーハイブリッド分析によって、ＦＢＰはＦＢＰ相互作用リプレッサー（ＦＩＲ）と称される転写阻害活性を有するタンパク質に結合することが、明らかになった。ＦＩＲは、ＦＢＰの中心ＤＮＡ結合ドメインと相互作用する（ＦＩＲ参考文献１６）。近年、ＦＩＲは、ＴＦＩＩＨ／ｐ８９／ＸＰＢヘリカーゼに関与し、プロモーターの離脱を遅延することによって転写を抑制することが見出された。ＸＰＢ患者およびＸＰＤ患者由来の細胞は、ＦＩＲ抑制が欠損し、このことは、ＴＦＩＩＨおける変異がＦＩＲによるｃ－ｍｙｃの調節を減損させ、おそらく腫瘍発生に寄与することを示唆する（ＦＩＲ参考文献１７）。

本発明において、本発明者らは、ＦＩＲの過剰発現がネイティブな（内因性）ｃ－ｍｙｃ発現を抑制し、そしてＨｅＬａ細胞および他の細胞においてアポトーシスを誘導することを示す。ＦＩＲによるｃ－ｍｙｃのこの抑制は、ｃ－ｍｙｃがアップレギュレーションされている結腸直腸癌においては、ＦＩＲの過剰発現にかかわらす無効である。どのようにｃ－ｍｙｃがダウンレギュレートされ、そして発癌および結腸直腸癌においてＦＩＲ抑制を回避するかが記載される。

（要約）

ｃ－Ｍｙｃは、細胞の増殖、分化およびアポトーシスを調節する転写因子である。ｃ－Ｍｙｃ発現のアップレギュレーションおよびダウンレギュレーションの両方が、特定の状況下でアポトーシスを誘導し得る。本発明において、本発明者らは、ｃ－ｍｙｃ遺伝子のリプレッサーであるＦＩＲ（ＦＢＰ相互作用リプレッサー）がＨｅＬａ細胞においてアポトーシスを誘導したことを示す。ＦＩＲのアミノ末端抑制ドメインの欠失によってＦＩＲ駆動性のアポトーシスは起こらなくなり、このことは、細胞死がＦＩＲの転写標的（例えば、ｃ－ｍ

ｙｃ）によって媒介されることを示唆する。結腸直腸腫瘍の評価によって、ＦＩＲ　ｍＲＮＡレベルおよびＦＩＲタンパク質レベルの増加に関わらない、ｃ－ｍｙｃ発現の上昇（結腸直腸癌においてしばしば観察されることであるが）が明らかになった。ＦＩＲ媒介ｃ－ｍｙｃ抑制の排除およびＦＩＲ駆動性アポトーシスに対する耐性は、おそらく、最後に悪性結腸直腸癌となる多段階発癌の重要な工程を表す。

(FIR 参考文献 1)

Thompson, E. B., Ann. Rev. Physiol., 60: 575-600, 1998

(FIR 参考文献 2)

Thulasi, R., Harbor, D. V., and Thompson, E. B., J. Biol. Chem., 268, 18306-18312, 1993

(FIR 参考文献 3)

Zhou, F., Medh, R. D., and Thompson, E. B., J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 73, 195-202, 2000

(FIR 参考文献 4)

Thompson, E. A., Cancer Res., 51, 5544-5550, 1991

(FIR 参考文献 5)

Helmberg, A., Auphan, N., Caelles, C., and Karin, M., EMBO J., 14, 452-60, 1995

(FIR 参考文献 6)

McCormack, J., E, Pepe, V., H, Kent, R., B., and Dean, M., Marshak-Rothstein, A., Sonenshein, G., E., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 81, 5546-5550, 1984

(FIR 参考文献 7)

Sonenshein, G., E., J. Immunol., 158, 1994-1997, 1997

(FIR参考文献8)

Fischer, G., Kent, S., C., Joseph, L., Green, D., R., and Scott, D., W., J. Exp. Med., 179, 221-228, 1994

(FIR参考文献9)

Wu, M., Arsura, M., Bellas, R., E., FitzGerald, M., J., Lee, H., Schauer, S., L., Sherr, D., H., and Sonenshein, G., E., Mol. Cell. Biol., 16, 5015-5025, 1996

(FIR参考文献10)

Askew, D. S., Ashmun, R. A., Simmons, B. C., and Cleveland, J. L., Oncogene., 6, 1915-1922, 1991

(FIR参考文献11)

Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z., and Hancock, D. C., Cell., 69, 119-128, 1992

(FIR参考文献12)

Avigan, M., I., Strober, B., and Levens, D., J. Biol. Chem., 265, 18538-18545, 1990

(FIR参考文献13)

Bazar, L., Meighen, D., Harris, V., Duncan, R., Levens, D., Avigan, M., J. Biol. Chem., 270, 8241-8248, 1995

(FIR参考文献14)

Duncan, R., Bazar, L., Michelotti, G., Tomonaga, T., Krutzsch, H., Avigan, M., and Levens, D., Genes Dev., 8: 465-480, 1994

(FIR参考文献15)

Michelotti, G. A., Michelotti, E. F., Pullner, A., Duncan, R. C., Eick, D., and Levens, D., Mol. Cell. Biol., 16, 2656-2669, 1996

(FIR参考文献16)

Liu, J., He, L., Collins, I., Ge, H., Libutti, D., Li, J., Egly, J., andLevens, D., Mol. Cell, 5, 331-341, 2000

(FIR参考文献17)

Liu, J., Akoulitchev, S., Weber, A., Ge, H., Chuikov, S., Libutti, D., Wang, X. W., Conaway, J. W., Harris, C. C., Conaway, R. C., Reinberg, D., and Levens, D., Cell., 104, 353-363, 2001

（ＦＩＲの改変体）

本発明によって、ＦＩＲに少なくとも４つの種類の長さの改変体があることが判明した。その配列は、配列番号１、１１、１３、１５においてその核酸配列が、配列番号２、１２、１４、１６においてそのアミノ酸配列が示されている。配列番号１および２で特定されるＦＩＲは、本明細書においてＦＩＲ５４２とも称され、正常型の配列である。ＦＩＲの機能は、ｃ－ｍｙｃの発現抑制と報告され（FIR参考文献16）、このＦＩＲ５４２が担うとされている。

配列番号１１および１２で特定されるＦＩＲは、５５９アミノ酸配列の長さがあることからＦＩＲ５５９またはＰＵＦ６０と呼ばれる。ＰＵＦ６０は、ＲＮＡ Ｖｏｌ．５（１２）、１５４８－１５６０（１９９９）において報告され、ＲＮＡスプライシングに関与しているとされている。このＦＩＲ５５９は、配列番号１において１０２位と１０３位との間に１７アミノ酸が挿入されている。

配列番号１３および１４で特定されるＦＩＲは、５１６アミノ酸配列の長さを有することから、ＦＩＲ５１６と呼ばれる。ＦＩＲ５１６は、ＦＩＲ５５９から欠失された形態を有する。したがって、上述の挿入配列がＦＩＲ５５９と同様に挿入されているが、Ｎ末端は、４３アミノ酸欠失している。

配列番号１５および１６で特定されるＦＩＲは、４９９アミノ酸配列の長さを有することから、ＦＩＲ４９９と呼ばれる。ＦＩＲ４９９は、ＦＩＲ５４２からＮ末端から４３アミノ酸欠失している。

これらの４つの改変体に加え、そのアミノ酸配列に置換が見られる改変体もまた本発明によって見出された。この置換は、Ｎ末端側の４００塩基の部位に存在する約１３５アミノ酸の領域に多く見られる。

これらの、改変体は、大腸癌組織と正常粘膜とを比較すると、いずれも発現が増大していることが見出された。したがって、これらの改変体は、癌の指標として使用することができる。

これらの存在にもかかわらず、正常型のＦＩＲ５４２を外的に投与することによってｃ－ｍｙｃ癌細胞にアポトーシスを誘導することができることもまた実証された。したがって、発現増大しているＦＩＲ５４２は、好ましくは、ＦＩＲの正常な機能を少なくとも１つは欠いているといえる。ただし、正常な機能を有するＦＩＲは、治療効果を有することから、ＦＩＲの改変体のうち、正常な機能（特に、ＦＢＰへの結合機能）を有するものは、治療用に使用することができる。

（ＣＥＮＰ－Ａの背景説明）

本明細書において「ＣＥＮＰ－Ａ」とは、セントロメア関連タンパク質として同定されたタンパク質の一種のことをいい、代表的に、配列番号３および４で特定される因子をいう。ＣＥＮＰ－Ａは、以下のようないきさつで見出された。ＣＥＮＰ－Ａの具体的な配列などの形態は、本明細書において以下に詳述される。

ヒト癌における遺伝子の不安定性は、広く認識されているようである。ほとんどの癌において、この不安定性は、主に、全染色体の増加または損失として染色体レベルで観察され、異数性としても知られている（ＣＥＮＰ－Ａ参考文

献１）。異数性は、ほぼ全ての腫瘍型において見出されており、結腸、頸部、および食道の上皮内癌または前癌性病変において見られるように、腫瘍形成の早期に生じる（ＣＥＮＰ－Ａ参考文献２およびＣＥＮＰ－Ａ参考文献３を参照のこと）。さらに、ヒト細胞およびげっ歯類細胞を用いたインビトロでの研究は、異数性が腫瘍性トランスフォーメーションに必要とされることを示している（ＣＥＮＰ－Ａ参考文献４、ＣＥＮＰ－Ａ参考文献５）。これらの結果は、異数性が、癌の発症および進行に重要な役割を果たしていることを示唆する。

異数性は、異常な数の染色体を示すことから、細胞分裂の間の染色体の誤分離が原因であり得る。多くの有糸分裂プロセスにおける潜在的な障害は、染色体の不均等な分離を引き起こし得る。有糸分裂プロセスは、染色体の凝縮、姉妹染色分体の付着、動原体の集合、中心体の複製、微小管の動態、および細胞周期の適切な進行に関するチェックポイントを含む。近年、これらの有糸分裂標的のいくつかの調節遺伝子が、異数性および発癌の誘導に関与していることが、示された。例えば、ＳＴＫ１５／ＢＴＡＫ／ａｕｒｏｒａ２および脊椎動物セキュリンは、ヒト腫瘍において過剰発現され、そしてインビトロでトランスフォーム活性を示した（ＣＥＮＰ－Ａ参考文献６～８）。このチェックポイント遺伝子ｈＢＵＢ１およびｈＢＵＢＲ１は、ヒト結腸直腸癌の小画分において変異していることが見出されており、そして変異ＢＵＢ１の外因性の発現は、異常な紡錘体のチェックポイントを与える（ＣＥＮＰ－Ａ参考文献９）。

動原体は、セントロメアＤＮＡにおいて構築される大きな多タンパク質複合体であり、有糸分裂の間の適切な染色体分離に必須の紡錘体微小管に対する付着部位として機能する。その機能障害は、異数性の主要な要因となり得るが、動原体障害と腫瘍形成との間の直接的な関係は知られていない。今日までに発見されたいくつかの動原体タンパク質の中で、ＣＥＮＰ－Ａ^{3}は、ヒトにおいて最初に同定された動原体成分の１つである（ＣＥＮＰ－Ａ参考文献１０）。ＣＥＮＰ－Ａ^{3}は、活性なセントロメアでのみ見出され、セントロメアの同一

性（ｉｄｅｎｔｉｔｙ）の後成的な維持における中心的なエレメントであると考えられている、特有のヒストンＨ３様タンパク質である（ＣＥＮＰ－Ａ参考文献１１およびＣＥＮＰ－Ａ参考文献１２を参照のこと）。ＣＥＮＰ－Ａは、真核生物間で十分に保存されており（ＣＥＮＰ－Ａ参考文献１３～１５）、ＣＥＮＰ－Ａの変異またはノックアウトは、染色体の誤分離を引き起こす（ＣＥＮＰ－Ａ参考文献１６）。

これらの観察は、腫瘍細胞におけるＣＥＮＰ－Ａの発現の変化、およびＣＥＮＰ－Ａの機能障害が異数性を引き起こし、癌を誘導し得るか否かに関する重要な疑問を投げかける。従って、本発明者らは、結腸直腸癌においてＣＥＮＰ－Ａタンパク質レベルを試験した。本発明者らは、ＣＥＮＰ－Ａが、近傍の正常粘膜と比較して、ほとんどの癌組織において高度に過剰発現されていることを見出した。さらに、ＣＥＮＰ－Ａは、一部、腫瘍細胞において、セントロメア関連ＤＮＡ結合タンパク質ＣＥＮＰ－Ｂと共存していなかった。我々の結果は、結腸直腸癌におけるＣＥＮＰ－Ａの高レベルの発現が、クロマチンの非セントロメア領域との結合および動原体複合体の部分的な破壊を引き起こすことを示唆する。

異数性は、多くのヒト癌の特徴である。近年の研究は、有糸分裂時の染色体の誤分離（ｍｉｓｓｅｇｒｅｇａｔｉｏｎ）が、異数性の主な要因であり、そして腫瘍形成に寄与することを強く示唆している。セントロメアタンパク質（ＣＥＮＰ）－Ａは、セントロメアの構造および機能に必須の、セントロメア特異的ヒストンＨ３様改変体である。この改変体は、染色体の等分に必要不可欠な、動原体と呼ばれるタンパク質複合体の形成において中心的な役割を果たしている。本発明において、本発明者らは、動原体タンパク質ＣＥＮＰ－Ａが、１１個の原発性ヒト結腸直腸癌組織の全てにおいて過剰発現されていたことを実証する。ＣＥＮＰ－Ａ　ｍＲＮＡもまたアップレギュレートされており、このことは、ＣＥＮＰ－Ａの過剰発現が転写レベルで起こっていることを示す。

抗ＣＥＮＰ－Ａ抗体を用いた免疫染色により、これらの腫瘍細胞においてＣＥＮＰ－Ａシグナルが増大していることが示された。さらに、ＣＥＮＰ－ＡとＣＥＮＰ－Ｂ（セントロメア関連ＤＮＡ結合タンパク質）との同時免疫染色により、これらの腫瘍細胞において、ＣＥＮＰ－Ａが非セントロメアクロマチンに誤標的化されていることが示された。これらの結果は、ＣＥＮＰ－Ａの過剰発現が、結腸直腸癌における異数性に対して重要な役割を果たし得ることを示唆する。

(CENP-A 参考文献 1)
Langauer, C. et al., Nature, 396:643-649, 1998
(CENP-A 参考文献 2)
Pihan, G.A. et al., Semin. Cancer. Biol., 9:289-302, 1999
(CENP-A 参考文献 3)
Sen, S., Curr. Opin. Oncol., 12:82-88, 2000
(CENP-A 参考文献 4)
Namba, M. et al., Crit. Rev. Oncog., 7:19-31, 1996
(CENP-A 参考文献 5)
Li, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:14506-14511, 1997
(CENP-A 参考文献 6)
Zhou, H. et al., Nat. Genet., 20:189-193, 1998
(CENP-A 参考文献 7)
Bischoff, J.R. et al., EMBO J., 17:3052-3065, 1998
(CENP-A 参考文献 8)
Zou, H. et al., Science, 285:418-422, 1999
(CENP-A 参考文献 9)
Cahill, D.P. et al., Nature, 392:300-303, 1998
(CENP-A 参考文献 10)

Palmer,D.K. et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:3734-3738,1991

(CENP-A参考文献11)

Sullivan,K.F.,Curr.Opin.Genet.Dev.,11:182-188,2001

(CENP-A参考文献12)

Smith,M.M.,Curr.Opin.Cell.Biol.,14:279-285,2002

(CENP-A参考文献13)

Stoler,S. et al.,Genes Dev.,9:573-586,1995

(CENP-A参考文献14)

Takahashi,K. et al.,Science,288:2215-2219,2000

(CENP-A参考文献15)

Buchwitz,B.J. et al.,Nature,401:547-548,1999

(CENP-A参考文献16)

Howman,E.V. et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,97:1148-1153,2000

(定義)

(用語の定義)

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

本明細書において使用される用語「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語はまた、複数のポリペプチド鎖の複合体へとアセンブルされたものを包含し得る。この用語はまた、天然または人工的に改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変(例え

ば、標識成分との結合体化）。この定義にはまた、例えば、アミノ酸の１または２以上のアナログを含むポリペプチド（例えば、非天然のアミノ酸などを含む）、ペプチド様化合物（例えば、ペプトイド）および当該分野において公知の他の改変が包含される。ＦＩＲ、ＣＥＮＰ－Ａなどの遺伝子産物は、通常ポリペプチド形態をとる。本明細書では、本発明のポリペプチドは、通常、特定の配列（配列番号２、４などまたはそれらの改変体）を有する。ＦＩＲ、ＣＥＮＰ－Ａなどの遺伝子の遺伝子産物は、通常、このような配列を有するポリペプチド形態をとる。ここで、改変を有する配列は、本発明において、診断目的に使用され得る。

本明細書において使用される用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。この用語はまた、「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」を含む。「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、またはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、互換的に使用される。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば、２’－Ｏ－メチル－リボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がＮ３’－Ｐ５’ホスホロアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがＣ－５プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがＣ－５チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがＣ－５プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシ

ンがフェノキサジン修飾シトシン（ｐｈｅｎｏｘａｚｉｎｅ－ｍｏｄｉｆｉｅｄ　ｃｙｔｏｓｉｎｅ）で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、ＤＮＡ中のリボースが２’－Ｏ－プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが２’－メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドなどが例示される。他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体（例えば、縮重コドン置換体）および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、１またはそれ以上の選択された（または、すべての）コドンの３番目の位置が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る（Batzer et al., Nucleic Acid Res.19:5081(1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem.260: 2605-2608 (1985); Rossolini et al.,Mol. Cell. Probes 8: 91-98 (1994)）。ＦＩＲ、ＣＥＮＰ－Ａなどの遺伝子は、通常、このポリヌクレオチド形態をとる。

本明細書において使用される用語「核酸分子」もまた、本明細書において、核酸、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチドと互換可能に使用され、ｃＤＮＡ、ｍＲＮＡ、ゲノムＤＮＡなどを含む。本明細書では、核酸および核酸分子は、用語「遺伝子」の概念に含まれ得る。ある遺伝子配列をコードする核酸分子はまた、「スプライス変異体（バリアント、改変体）」を包含する。同様に、核酸によりコードされた特定のタンパク質は、その核酸のスプライス改変体によりコードされる任意のタンパク質を包含する。その名が示唆するように「スプライス変異体」は、遺伝子のオルタナティブスプライシングの産物である。転写後、最初の核酸転写物は、異なる（別の）核酸スプライス産物が異なるポリペプチドをコードするようにスプライスされ得る。スプライス変異体の産生機構は変化するが、エキソンのオルタナティブスプライシングを含む。読み過し転写により同じ核酸に由来する別のポリペプチドもまた、この定義に

包含される。スプライシング反応の任意の産物（組換え形態のスプライス産物を含む）がこの定義に含まれる。したがって、本明細書では、たとえば、ＦＩＲ、ＣＥＮＰ－Ａなどの遺伝子には、ＦＩＲ、ＣＥＮＰ－Ａなどのスプライス変異体もまた包含され得る。このような変異体は、本発明の診断および治療において有用である。

本明細書において「遺伝子」とは、遺伝形質を規定する因子をいう。タンパク質の一次構造を規定するものを構造遺伝子といい、その発現を左右するものを調節遺伝子（たとえば、プロモーター）という。本明細書では、遺伝子は、特に言及しない限り、構造遺伝子および調節遺伝子を包含する。したがって、ＦＩＲ、ＣＥＮＰ－Ａなどの遺伝子というときは、通常、ＦＩＲ、ＣＥＮＰ－Ａなどの構造遺伝子およびＦＩＲ、ＣＥＮＰ－Ａなどのプロモーターなどの転写または翻訳の調節配列の両方を包含する。本発明では、これらの調節配列もまた、診断に使用することができる。本明細書では、「遺伝子」は、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」ならびに／または「タンパク質」「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」を指すことがある。本明細書においてはまた、「遺伝子産物」は、遺伝子によって発現された「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」ならびに／または「タンパク質」「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」を包含する。当業者であれば、遺伝子産物が何たるかはその状況に応じて理解することができる。

本明細書において遺伝子（例えば、核酸配列、アミノ酸配列など）の「相同性」とは、２以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、ある２つの遺伝子の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。２種類の遺伝子が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、または核酸の場合ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。２つの遺伝子配列を直接比較する場合、その遺伝子配列間でＤ

ＮＡ配列が、代表的には少なくとも５０％同一である場合、好ましくは少なくとも７０％同一である場合、より好ましくは少なくとも８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。本明細書において、遺伝子（例えば、核酸配列、アミノ酸配列など）の「類似性」とは、上記相同性において、保存的置換をポジティブ（同一）とみなした場合の、２以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、保存的置換がある場合は、その保存的置換の存在に応じて同一性と類似性とは異なる。また、保存的置換がない場合は、同一性と類似性とは同じ数値を示す。

本明細書では、アミノ酸配列および塩基配列の類似性、同一性および相同性の比較は、配列分析用ツールであるＦＡＳＴＡを用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。

本明細書において「アミノ酸」は、本発明の目的を満たす限り、天然のものでも非天然のものでもよい。「誘導体アミノ酸」または「アミノ酸アナログ」とは、天然に存在するアミノ酸とは異なるがもとのアミノ酸と同様の機能を有するものをいう。そのような誘導体アミノ酸およびアミノ酸アナログは、当該分野において周知である。

本明細書において「天然のアミノ酸」とは、天然のアミノ酸のＬ－異性体を意味する。天然のアミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、メチオニン、トレオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、プロリン、ヒスチジン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、γ－カルボキシグルタミン酸、アルギニン、オルニチン、およびリジンである。特に示されない限り、本明細書でいう全てのアミノ酸はＬ体であるが、Ｄ体のアミノ酸を用いた形態もまた本発明の範囲内にある。

本明細書において「非天然アミノ酸」とは、タンパク質中で通常は天然に見出されないアミノ酸を意味する。非天然アミノ酸の例として、ノルロイシン、パラ－ニトロフェニルアラニン、ホモフェニルアラニン、パラ－フルオロフェニルアラニン、３－アミノ－２－ベンジルプロピオン酸、ホモアルギニンのＤ体またはＬ体およびＤ－フェニルアラニンが挙げられる。

本明細書において「アミノ酸アナログ」とは、アミノ酸ではないが、アミノ酸の物性および／または機能に類似する分子をいう。アミノ酸アナログとしては、例えば、エチオニン、カナバニン、２－メチルグルタミンなどが挙げられるがそれらに限定されない。アミノ酸アナログの例としてのアミノ酸模倣物とは、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様な様式で機能する化合物をいう。

本明細書において「ヌクレオチド」は、天然のものでも非天然のものでもよい。「誘導体ヌクレオチド」または「ヌクレオチドアナログ」とは、天然に存在するヌクレオチドとは異なるがもとのヌクレオチドと同様の機能を有するものをいう。そのような誘導体ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログは、当該分野において周知である。そのような誘導体ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログの例としては、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、２－Ｏ－メチルリボヌクレオチド、ペプチド－核酸（ＰＮＡ）が含まれるが、これらに限定されない。

アミノ酸は、その一般に公知の３文字記号か、またはＩＵＰＡＣ－ＩＵＢ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｉｓｓｉｏｎにより推奨される１文字記号のいずれかにより、本明細書中で言及され得る。ヌクレオチドも同様に、一般に認知された１文字コードにより言及され得る。

本明細書において「対応する」アミノ酸および核酸とは、それぞれあるポリペプチドおよび核酸分子において、比較の基準となるポリペプチドおよび核酸分子における所定のアミノ酸および核酸と同様の作用を有するか、または有す

ることが予測されるアミノ酸および核酸をいい、特に酵素分子にあっては、活性部位中の同様の位置に存在し触媒活性に同様の寄与をするアミノ酸およびそれをコードする核酸をいう。例えば、アンチセンス分子であれば、そのアンチセンス分子の特定の部分に対応するオルソログにおける同様の部分であり得る。

本明細書において「対応する」遺伝子（例えば、ポリペプチド、核酸分子など）とは、ある種において、比較の基準となる種における所定の遺伝子と同様の作用を有するか、または有することが予測される遺伝子をいい、そのような作用を有する遺伝子が複数存在する場合、進化学的に同じ起源を有するものをいう。従って、ある遺伝子の対応する遺伝子は、その遺伝子のオルソログであり得る。したがって、ヒトＦＩＲ、ＣＥＮＰ－Ａなどの遺伝子に対応する遺伝子は、他の動物（マウス、ラット、ブタ、ウシなど）においても見出すことができる。そのような対応する遺伝子は、当該分野において周知の技術を用いて同定することができる。したがって、例えば、ある動物における対応する遺伝子は、対応する遺伝子の基準となる遺伝子（例えば、ヒトＦＩＲ、ＣＥＮＰ－Ａなどの遺伝子）の配列をクエリ配列として用いてその動物（例えばマウス、ラット）の配列データベースを検索することによって見出すことができる。

本明細書において「フラグメント」とは、全長のポリペプチドまたはポリヌクレオチド（長さがｎ）に対して、１～ｎ－１までの配列長さを有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。フラグメントの長さは、その目的に応じて、適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリペプチドの場合、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５，２０、２５、３０、４０、５０およびそれ以上のアミノ酸が挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、１１など）もまた、下限として適切であり得る。また、ポリヌクレオチドの場合、５、６、７、８、９、１０、１５，２０、２５、３０、４０、５０、７５、１００およびそれ以上のヌクレオチドが挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、１１

など）もまた、下限として適切であり得る。本明細書において、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの長さは、上述のようにそれぞれアミノ酸または核酸の個数で表すことができるが、上述の個数は絶対的なものではなく、同じ機能を有する限り、上限または加減としての上述の個数は、その個数の上下数個（または例えば上下１０％）のものも含むことが意図される。そのような意図を表現するために、本明細書では、個数の前に「約」を付けて表現することがある。しかし、本明細書では、「約」のあるなしはその数値の解釈に影響を与えないことが理解されるべきである。

本明細書において生物学的因子（例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）に対して「特異的に相互作用する因子」または「特異的な因子」とは、交換可能に使用され、その生物学的因子（例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）に対する親和性が、他の無関連の（特に、同一性が３０％未満のもの。あるいは、ある特定の場合、同一性９９％未満のもの。さらに別の実施形態では、点変異のみの相違を有するものなど）生物学的因子（例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）に対する親和性よりも、代表的には同等またはより高いか、好ましくは有意に高いものをいう。そのような親和性は、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、結合アッセイなどによって測定することができる。生物学的因子がポリペプチドの場合、そのポリペプチドに特異的な因子には、特異的抗体が含まれ、特定の実施形態では、本発明の特異的な因子には、この特異的抗体に対して特異的な因子を含み得ることが理解される。このような特異的抗体に対して特異的な因子には、目的とするポリペプチド自体が含まれることが理解される。

本明細書において「因子」としては、意図する目的を達成することができる限りどのような物質または他の要素（例えば、エネルギー）でもあってもよい。そのような物質としては、例えば、タンパク質（例えば、抗体を含む）、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチ

ド、ヌクレオチド、核酸（例えば、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡのようなＤＮＡ、ｍＲＮＡのようなＲＮＡを含む）、ポリサッカリド、オリゴサッカリド、脂質、有機低分子（例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子、コンビナトリアルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子（例えば、低分子リガンドなど）など）、これらの複合分子（例えば、糖タンパク質、糖脂質など）が挙げられるがそれらに限定されない。ポリヌクレオチドに対して特異的な因子としては、代表的には、そのポリヌクレオチドの配列に対して一定の配列相同性を（例えば、７０％以上の配列同一性）もって相補性を有するポリヌクレオチド、プロモーター領域に結合する転写因子のようなポリペプチドなどが挙げられるがそれらに限定されない。したがって、そのような因子としては、例えば、アンチセンス、ＲＮＡｉなどが挙げられるがそれらに限定されない。ポリペプチドに対して特異的な因子としては、代表的には、そのポリペプチドに対して特異的に指向された抗体またはその誘導体あるいはその類似物（例えば、単鎖抗体）、そのポリペプチドがレセプターまたはリガンドである場合の特異的なリガンドまたはレセプター、そのポリペプチドが酵素である場合、その基質などが挙げられるがそれらに限定されない。

本明細書において「有機低分子」とは、有機分子であって、比較的分子量が小さなものをいう。通常有機低分子は、分子量が約１０００以下のものをいうが、それ以上のものであってもよい。有機低分子は、通常当該分野において公知の方法を用いるかそれらを組み合わせて合成することができる。そのような有機低分子は、生物に生産させてもよい。有機低分子としては、例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子、コンビナトリアルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子（例えば、低分子リガンドなど）などが挙げられるがそれらに限定されない。

本明細書において「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、多重特異性抗体、キメラ抗体、および抗イディオタイ

プ抗体、ならびにそれらの断片、例えばF（ａｂ’）$_2$およびＦａｂ断片、ならびにその他の組換えにより生産された結合体を含む。さらにこのような抗体を、酵素、例えばアルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、αガラクトシダーゼなど、に共有結合させまたは組換えにより融合させてよい。

本明細書中で使用される「モノクローナル抗体」は、同質な抗体集団を有する抗体組成物をいう。この用語は、それが作製される様式では限定されない。この用語は、全免疫グロブリン分子ならびにＦａｂ分子、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、Ｆｖフラグメント、およびもとのモノクローナル抗体分子の免疫学的結合特性を示す他の分子を含む。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作製する方法は当該分野で公知であり、そして以下でより十分に記載される。

モノクローナル抗体は、当該分野で周知の標準的な技術（例えば、Ｋｏｈｌｅｒおよび Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，Ｎａｔｕｒｅ（１９７５）２５６：４９５）またはその改変（例えば、Ｂｕｃｋら（１９８２）Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ １８：３７７）を使用して調製される。代表的には、マウスまたはラットを、タンパク質キャリアに結合したタンパク質で免疫化し、追加免疫し、そして脾臓（および必要に応じていくつかの大きなリンパ節）を取り出し、そして単一細胞を解離する。必要に応じて、この脾臓細胞は、非特異的接着細胞の除去後、抗原でコーティングされたプレートまたはウェルに細胞懸濁液を適用することにより、スクリーニングされ得る。抗原に特異的なイムノグロブリンを発現するＢ細胞がプレートに結合し、そして懸濁液の残渣でもリンス除去されない。次いで、得られたＢ細胞（すなわちすべての剥離した脾臓細胞）をミエローマ細胞と融合させて、ハイブリドーマを得、このハイブリドーマを用いてモノクローナル抗体を産生させる。

本明細書において「抗原」（ａｎｔｉｇｅｎ）とは、抗体分子によって特異的に結合され得る任意の基質をいう。本明細書において「免疫原」（ｉｍｍｕ

ｎｏｇｅｎ）とは、抗原特異的免疫応答を生じるリンパ球活性化を開始し得る抗原をいう。

本明細書において「単鎖抗体」とは、Ｆｖ領域の重鎖フラグメントおよび軽鎖フラグメントがアミノ酸架橋を介して連結されれることによって形成され、単鎖ポリペプチドを生じたものをいう。

本明細書において「複合分子」とは、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、脂質、糖、低分子などの分子が複数種連結してできた分子をいう。そのような複合分子としては、例えば、糖脂質、糖ペプチドなどが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書では、ＦＩＲ、ＣＥＮＰ－Ａなどの遺伝子またはその産物あるいは本発明の因子と同様の機能を有する限り、それぞれＦＩＲ、ＣＥＮＰ－Ａなどの遺伝子またはその産物あるいは本発明の因子としてそのような複合分子も使用することができる。

本明細書において「単離された」物質（例えば、核酸またはタンパク質などのような生物学的因子）とは、その物質が天然に存在する環境（例えば、生物体の細胞内）の他の物質（好ましくは、生物学的因子）（例えば、核酸である場合、核酸以外の因子および目的とする核酸以外の核酸配列を含む核酸；タンパク質である場合、タンパク質以外の因子および目的とするタンパク質以外のアミノ酸配列を含むタンパク質など）から実質的に分離または精製されたものをいう。「単離された」核酸およびタンパク質には、標準的な精製方法によって精製された核酸およびタンパク質が含まれる。したがって、単離された核酸およびタンパク質は、化学的に合成した核酸およびタンパク質を包含する。

本明細書において「精製された」物質（例えば、核酸またはタンパク質などのような生物学的因子）とは、その物質に天然に随伴する因子の少なくとも一部が除去されたものをいう。したがって、通常、精製された物質におけるその物質の純度は、その物質が通常存在する状態よりも高い（すなわち濃縮されている）。

本明細書において「精製された」および「単離された」とは、好ましくは少なくとも７５重量%、より好ましくは少なくとも８５重量%、よりさらに好ましくは少なくとも９５重量%、そして最も好ましくは少なくとも９８重量%の、同型の物質が存在することを意味する。

本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなど遺伝子産物の「発現」とは、その遺伝子（通常は、ＤＮＡ形態）などがインビボで一定の作用を受けて、別の形態になることをいう。好ましくは、遺伝子、ポリヌクレオチドなどが、転写および翻訳されて、ポリペプチドの形態になることをいうが、転写されてｍＲＮＡが作製されることもまた発現の一形態であり得る。別の実施形態では、そのようなポリペプチドの形態は、翻訳後プロセシングを受けたものであり得る。

従って、本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」の「減少」とは、本発明の因子を作用させたときに、作用させないときよりも、発現の量が有意に減少することをいう。好ましくは、発現の減少は、ポリペプチドの発現量の減少を含む。本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」の「増加」とは、本発明の因子を作用させたときに、作用させないときよりも、発現の量が有意に増加することをいう。好ましくは、発現の増加は、ポリペプチドの発現量の増加を含む。本明細書において遺伝子の「発現」の「誘導」とは、ある細胞にある因子を作用させてその遺伝子の発現量を増加させることをいう。したがって、発現の誘導は、まったくその遺伝子の発現が見られなかった場合にその遺伝子が発現するようにすること、およびすでにその遺伝子の発現が見られていた場合にその遺伝子の発現が増大することを包含する。

本明細書において、遺伝子が「特異的に発現する」とは、その遺伝子が、植物の特定の部位または時期において他の部位または時期とは異なる（好ましくは高い）レベルで発現されることをいう。特異的に発現するとは、ある部位

（例えば、癌罹患部位などの特異的部位）にのみ発現してもよく、それ以外の部位においても発現していてもよい。好ましくは特異的に発現するとは、ある部位においてのみ発現することをいう。

本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子（例えば、ポリペプチドまたはタンパク質）が、生体内において有し得る活性のことをいい、種々の機能（例えば、転写促進活性）を発揮する活性が包含される。例えば、２つの因子が相互作用する（例えば、ＦＩＲ、ＣＥＮＰ－Ａなどとその受容体とが結合する）場合、その生物学的活性は、ＦＩＲ、ＣＥＮＰ－Ａなどとその受容体との間の結合およびそれによって生じる生物学的変化（例えば、アポトーシス）などを包含する。ＦＩＲでは、ＦＢＰとの結合などが挙げられる。ＣＥＮＰ－Ａでは、セントロメアクロマチンとの結合などが挙げられるがそれらに限定されない。例えば、ある因子が酵素である場合、その生物学的活性は、その酵素活性を包含する。別の例では、ある因子がリガンドである場合、そのリガンドが対応するレセプターへの結合を包含する。そのような生物学的活性は、当該分野において周知の技術によって測定することができる。あるいは、本発明においては、生体内にある改変体分子と同様の活性を有する場合もまた、生物学的活性を有するとの定義に含め得る。

本明細書において「アンチセンス（活性）」とは、標的遺伝子の発現を特異的に抑制または低減することができる活性をいう。アンチセンス活性は、通常、目的とする遺伝子（例えば、ＦＩＲ、ＣＥＮＰ－Ａなど）の核酸配列と相補的な、少なくとも８の連続するヌクレオチド長の核酸配列によって達成される。そのような活性を有する核酸分子をアンチセンス分子という。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも９の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは１０の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは１１の連続するヌクレオチド長の、１２の連続するヌクレオチド長の、１３の連続するヌクレオチド長の、１４の連続するヌクレオチド長の、１５の連続するヌクレオチド長の、

２０の連続するヌクレオチド長の、２５の連続するヌクレオチド長の、３０の連続するヌクレオチド長の、４０の連続するヌクレオチド長の、５０の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。そのような核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも７０％相同な、より好ましくは、少なくとも８０％相同な、さらに好ましくは、９０％相同な、もっとも好ましくは９５％相同な核酸配列が含まれる。そのようなアンチセンス活性は、目的とする遺伝子の核酸配列の５’末端の配列に対して相補的であることが好ましい。そのようなアンチセンスの核酸配列には、上述の配列に対して、１つまたは数個あるいは１つ以上のヌクレオチドの置換、付加および／または欠失を有するものもまた含まれる。

本明細書において「ＲＮＡｉ」とは、ＲＮＡ ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅの略称で、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡともいう）のようなＲＮＡｉを引き起こす因子を細胞に導入することにより、相同なｍＲＮＡが特異的に分解され、遺伝子産物の合成が抑制される現象およびそれに用いられる技術をいう。本明細書においてＲＮＡｉはまた、場合によっては、ＲＮＡｉを引き起こす因子と同義に用いられ得る。

本明細書において「ＲＮＡｉを引き起こす因子」とは、ＲＮＡｉを引き起こすことができるような任意の因子をいう。本明細書において「遺伝子」に対して「ＲＮＡｉを引き起こす因子」とは、その遺伝子に関するＲＮＡｉを引き起こし、ＲＮＡｉがもたらす効果（例えば、その遺伝子の発現抑制など）が達成されることをいう。そのようなＲＮＡｉを引き起こす因子としては、例えば、標的遺伝子の核酸配列の一部に対して少なくとも約７０％の相同性を有する配列またはストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含む、少なくとも１０ヌクレオチド長の二本鎖部分を含むＲＮＡまたはその改変体が挙げられるがそれに限定されない。ここで、この因子は、好ましくは、３’突出末端

を含み、より好ましくは、3’突出末端は、2ヌクレオチド長以上のDNA（例えば、2～4ヌクレオチド長のDNAであり得る。

理論に束縛されないが、RNAiが働く機構として考えられるものの一つとして、dsRNAのようなRNAiを引き起こす分子が細胞に導入されると、比較的長い（例えば、40塩基対以上）RNAの場合、ヘリカーゼドメインを持つダイサー（Dicer）と呼ばれるRNaseIII様のヌクレアーゼがATP存在下で、その分子を3’末端から約20塩基対ずつ切り出し、短鎖dsRNA（siRNAとも呼ばれる）を生じる。本明細書において「siRNA」とは、short interfering RNAの略称であり、人工的に化学合成されるかまたは生化学的に合成されたものか、あるいは生物体内で合成されたものか、あるいは約40塩基以上の二本鎖RNAが体内で分解されてできた10塩基対以上の短鎖二本鎖RNAをいい、通常、5’－リン酸、3’－OHの構造を有しており、3’末端は約2塩基突出している。このsiRNAに特異的なタンパク質が結合して、RISC（RNA－induced－silencing－complex）が形成される。この複合体は、siRNAと同じ配列を有するmRNAを認識して結合し、RNaseIII様の酵素活性によってsiRNAの中央部でmRNAを切断する。siRNAの配列と標的として切断するmRNAの配列の関係については、100％一致することが好ましい。しかし、siRNAの中央から外れた位置についての塩基の変異については、完全にRNAiによる切断活性がなくなるのではなく、部分的な活性が残存する。他方、siRNAの中央部の塩基の変異は影響が大きく、RNAiによるmRNAの切断活性が極度に低下する。このような性質を利用して、変異をもつmRNAについては、その変異を中央に配したsiRNAを合成し、細胞内に導入することで特異的に変異を含むmRNAだけを分解することができる。従って、本発明では、siRNAそのものをRNAiを引き起こす因子として用いることができるし、siRNAを生成するような因子（例

えば、代表的に約４０塩基以上のｄｓＲＮＡ）をそのような因子として用いることができる。

また、理論に束縛されることを希望しないが、ｓｉＲＮＡは、上記経路とは別に、ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖がｍＲＮＡに結合してＲＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼ（ＲｄＲＰ）のプライマーとして作用し、ｄｓＲＮＡが合成され、このｄｓＲＮＡが再びダイサーの基質となり、新たなｓｉＲＮＡを生じて作用を増幅することも企図される。従って、本発明では、ｓｉＲＮＡ自体およびｓｉＲＮＡが生じるような因子もまた、有用である。実際に、昆虫などでは、例えば３５分子のｄｓＲＮＡ分子が、１，０００コピー以上ある細胞内のｍＲＮＡをほぼ完全に分解することから、ｓｉＲＮＡ自体およびｓｉＲＮＡが生じるような因子が有用であることが理解される。

本発明においてｓｉＲＮＡと呼ばれる、約２０塩基前後（例えば、代表的には約２１～２３塩基長）またはそれ未満の長さの二本鎖ＲＮＡを用いることができる。このようなｓｉＲＮＡは、細胞に発現させることにより遺伝子発現を抑制し、そのｓｉＲＮＡの標的となる病原遺伝子の発現を抑えることから、疾患の治療、予防、予後などに使用することができる。

本発明において用いられるｓｉＲＮＡは、ＲＮＡｉを引き起こすことができる限り、どのような形態を採っていてもよい。

別の実施形態において、本発明のＲＮＡｉを引き起こす因子は、３’末端に突出部を有する短いヘアピン構造（ｓｈＲＮＡ；ｓｈｏｒｔ　ｈａｉｒｐｉｎ　ＲＮＡ）であり得る。本明細書において「ｓｈＲＮＡ」とは、一本鎖ＲＮＡで部分的に回文状の塩基配列を含むことにより、分子内で二本鎖構造をとり、ヘアピンのような構造となる約２０塩基対以上の分子をいう。そのようなｓｈＲＮＡは、人工的に化学合成される。あるいは、そのようなｓｈＲＮＡは、センス鎖およびアンチセンス鎖のＤＮＡ配列を逆向きに連結したヘアピン構造のＤＮＡをＴ７　ＲＮＡポリメラーゼによりインビトロでＲＮＡを合成することに

よって生成することができる。理論に束縛されることは希望しないが、そのようなｓｈＲＮＡは、細胞内に導入された後、細胞内で約２０塩基（代表的には例えば、２１塩基、２２塩基、２３塩基）の長さに分解され、ｓｉＲＮＡと同様にＲＮＡｉを引き起こし、本発明の処置効果があることが理解されるべきである。このような効果は、昆虫、植物、動物（哺乳動物を含む）など広汎な生物において発揮されることが理解されるべきである。このように、ｓｈＲＮＡは、ｓｉＲＮＡと同様にＲＮＡｉを引き起こすことから、本発明の有効成分として用いることができる。ｓｈＲＮＡはまた、好ましくは、３’突出末端を有し得る。二本鎖部分の長さは特に限定されないが、好ましくは約１０ヌクレオチド長以上、より好ましくは約２０ヌクレオチド長以上であり得る。ここで、３’突出末端は、好ましくはＤＮＡであり得、より好ましくは少なくとも２ヌクレオチド長以上のＤＮＡであり得、さらに好ましくは２～４ヌクレオチド長のＤＮＡであり得る。

本発明において用いられるＲＮＡｉを引き起こす因子は、人工的に合成した（例えば、化学的または生化学的）ものでも、天然に存在するものでも用いることができ、この両者の間で本発明の効果に本質的な違いは生じない。化学的に合成したものでは、液体クロマトグラフィーなどにより精製をすることが好ましい。

本発明において用いられるＲＮＡｉを引き起こす因子は、インビトロで合成することもできる。この合成系において、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼおよびＴ７プロモーターを用いて、鋳型ＤＮＡからアンチセンスおよびセンスのＲＮＡを合成する。これらをインビトロでアニーリングした後、細胞に導入すると、上述のような機構を通じてＲＮＡｉが引き起こされ、本発明の効果が達成される。ここでは、例えば、リン酸カルシウム法でそのようなＲＮＡを細胞内に導入することができる。

本発明のＲＮＡｉを引き起こす因子としてはまた、ｍＲＮＡとハイブリダイズし得る一本鎖、あるいはそれらのすべての類似の核酸アナログのような因子も挙げられる。そのような因子もまた、本発明の処置方法および組成物において有用である。

本明細書において「ストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、当該分野で慣用される周知の条件をいう。本発明のポリヌクレオチド中から選択されたポリヌクレオチドをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより、そのようなポリヌクレオチドを得ることができる。具体的には、ストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドは、コロニーあるいはプラーク由来のＤＮＡを固定化したフィルターを用いて、０．７～１．０ＭのＮａＣｌ存在下、６５℃でハイブリダイゼーションを行った後、０．１～２倍濃度のＳＳＣ（ｓａｌｉｎｅ－ｓｏｄｉｕｍ　ｃｉｔｒａｔｅ）溶液（１倍濃度のＳＳＣ溶液の組成は、１５０ｍＭ　塩化ナトリウム、１５ｍＭ　クエン酸ナトリウムである）を用い、６５℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるポリヌクレオチドを意味する。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning 2nd ed., Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-38, DNA Cloning 1:Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press(1995)等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ここで、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列からは、好ましくは、Ａ配列のみまたはＴ配列のみを含む配列が除外される。「ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド」とは、上記ハイブリダイズ条件下で別のポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドをいう。ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとして具体的には、本発明で具体的に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするＤＮＡの塩

基配列と少なくとも６０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド、好ましくは８０％以上の相同性を有するポリヌクレオチド、さらに好ましくは９５％以上の相同性を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。

本明細書において「プローブ」とは、インビトロおよび／またはインビボなどのスクリーニングなどの生物学的実験において用いられる、検索の対象となる物質をいい、例えば、特定の塩基配列を含む核酸分子または特定のアミノ酸配列を含むペプチドなどが挙げられるがそれに限定されない。

通常プローブとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相同なまたは相補的な、少なくとも８の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも９の連続するヌクレオチド長の、より好ましく１０の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは１１の連続するヌクレオチド長の、１２の連続するヌクレオチド長の、１３の連続するヌクレオチド長の、１４の連続するヌクレオチド長の、１５の連続するヌクレオチド長の、２０の連続するヌクレオチド長の、２５の連続するヌクレオチド長の、３０の連続するヌクレオチド長の、４０の連続するヌクレオチド長の、５０の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも７０％相同な、より好ましくは、少なくとも８０％相同な、さらに好ましくは、９０％相同な、９５％相同な核酸配列が含まれる。

本明細書において「検索」とは、電子的にまたは生物学的あるいは他の方法により、ある核酸塩基配列を利用して、特定の機能および／または性質を有する他の核酸塩基配列を見出すことをいう。電子的な検索としては、ＢＬＡＳＴ (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)), FASTA (Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85: 2444-2448(1988))、Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｗａｔｅｒｍａｎ法(Smith and Waterman, J. Mol. Biol. 147: 195-197 (1981))、およびＮｅｅｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ法

(Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970))などが挙げられるがそれらに限定されない。生物学的な検索としては、ストリンジェントハイブリダイゼーション、ゲノムＤＮＡをナイロンメンブレン等に貼り付けたマクロアレイまたはガラス板に貼り付けたマイクロアレイ（マイクロアレイアッセイ）、ＰＣＲおよび　ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションなどが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において、ＦＩＲ、ＣＥＮＰ－Ａなどには、このような電子的検索、生物学的検索によって同定された対応遺伝子も含まれるべきであることが意図される。

本明細書における「プライマー」とは、高分子合成酵素反応において、合成される高分子化合物の反応の開始に必要な物質をいう。核酸分子の合成反応では、合成されるべき高分子化合物の一部の配列に相補的な核酸分子（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡなど）が用いられ得る。

通常プライマーとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相補的な、少なくとも８の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも９の連続するヌクレオチド長の、より好ましく１０の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは１１の連続するヌクレオチド長の、１２の連続するヌクレオチド長の、１３の連続するヌクレオチド長の、１４の連続するヌクレオチド長の、１５の連続するヌクレオチド長の、１６の連続するヌクレオチド長の、１７の連続するヌクレオチド長の、１８の連続するヌクレオチド長の、１９の連続するヌクレオチド長の、２０の連続するヌクレオチド長の、２５の連続するヌクレオチド長の、３０の連続するヌクレオチド長の、４０の連続するヌクレオチド長の、５０の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも７０％相同な、より好ましくは、少なくとも８０％相同な、さらに好ましくは、９０％相同な、９５％相同な核酸配列が含まれる。プライマーとして適切な配列は、合成（増

幅）が意図される配列の性質によって変動し得るが、当業者は、意図される配列に応じて適宜プライマーを設計することができる。そのようなプライマーの設計は当該分野において周知であり、手動でおこなってもよくコンピュータプログラム（例えば、ＬＡＳＥＲＧＥＮＥ，ＰｒｉｍｅｒＳｅｌｅｃｔ，ＤＮＡＳｔａｒ）を用いて行ってもよい。

本明細書において「エピトープ」とは、抗原を決定する構造を構成する基のことをいう。従って、エピトープには特定の免疫グロブリンによる認識に関与するアミノ酸残基のセット、または、Ｔ細胞の場合は、Ｔ細胞レセプタータンパク質および／もしくは主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）レセプターによる認識について必要であるアミノ酸残基のセットが包含される。この用語はまた、「抗原決定基」または「抗原決定部位」と交換可能に使用される。免疫系分野において、インビボまたはインビトロで、エピトープは、分子の特徴（例えば、一次ペプチド構造、二次ペプチド構造または三次ペプチド構造および電荷）であり、免疫グロブリン、Ｔ細胞レセプターまたはＨＬＡ分子によって認識される部位を形成する。ペプチドを含むエピトープは、エピトープに独特な空間的コンフォメーション中に３つ以上のアミノ酸を含み得る。一般に、エピトープは、少なくとも５つのこのようなアミノ酸からなり、代表的には少なくとも６つ、７つ、８つ、９つ、または１０のこのようなアミノ酸からなる。エピトープの長さは、より長いほど、もとのペプチドの抗原性に類似することから一般的に好ましいが、コンフォメーションを考慮すると、必ずしもそうでないことがある。アミノ酸の空間的コンフォメーションを決定する方法は、当該分野で公知であり、例えば、Ｘ線結晶学、および２次元核磁気共鳴分光法を含む。さらに、所定のタンパク質におけるエピトープの同定は、当該分野で周知の技術を使用して容易に達成される。例えば、Ｇｅｙｓｅｎら（１９８４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１：３９９８（所定の抗原における免疫原性エピトープの位置を決定するために迅速にペプチドを合成する一般的

な方法）；米国特許第４，７０８，８７１号（抗原のエピトープを同定し、そして化学的に合成するための手順）；およびＧｅｙｓｅｎら（１９８６）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　２３：７０９（所定の抗体に対して高い親和性を有するペプチドを同定するための技術）を参照されたい。同じエピトープを認識する抗体は、単純な免疫アッセイにおいて同定され得る。このように、ペプチドを含むエピトープを決定する方法は、当該分野において周知であり、そのようなエピトープは、核酸またはアミノ酸の一次配列が提供されると、当業者はそのような周知慣用技術を用いて決定することができる。

従って、ペプチドを含むエピトープとして使用するためには、少なくとも３アミノ酸の長さの配列が必要であり、好ましくは、この配列は、少なくとも４アミノ酸、より好ましくは５アミノ酸、６アミノ酸、７アミノ酸、８アミノ酸、９アミノ酸、１０アミノ酸、１５アミノ酸、２０アミノ酸、２５アミノ酸の長さの配列が必要であり得る。

（遺伝子の改変）

本発明のＦＩＲ、ＣＥＮＰ－Ａは、人為的に改変して用いることができる。あるタンパク質分子において、配列に含まれるあるアミノ酸は、相互作用結合能力の明らかな低下または消失なしに、例えば、カチオン性領域または基質分子の結合部位のようなタンパク質構造において他のアミノ酸に置換され得る。あるタンパク質の生物学的機能を規定するのは、タンパク質の相互作用能力および性質である。従って、特定のアミノ酸の置換がアミノ酸配列において、またはそのＤＮＡコード配列のレベルにおいて行われ得、置換後もなお、もとの性質を維持するタンパク質が生じ得る。従って、生物学的有用性の明らかな損失なしに、種々の改変が、本明細書において開示されたペプチドまたはこのペプチドをコードする対応する核酸分子において行われ得る。

上記のような改変を設計する際に、アミノ酸の疎水性指数が考慮され得る。タンパク質における相互作用的な生物学的機能を与える際の疎水性アミノ酸指数の重要性は、一般に当該分野で認められている（Ｋｙｔｅ．ＪおよびＤｏｏｌｉｔｔｌｅ，Ｒ．Ｆ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５７（１）：１０５－１３２，１９８２）。アミノ酸の疎水的性質は、生成したタンパク質の二次構造に寄与し、次いでそのタンパク質と他の分子（例えば、酵素、基質、レセプター、ＤＮＡ、抗体、抗原など）との相互作用を規定する。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷の性質に基づく疎水性指数を割り当てられる。それらは：イソロイシン（＋４．５）；バリン（＋４．２）；ロイシン（＋３．８）；フェニルアラニン（＋２．８）；システイン／シスチン（＋２．５）；メチオニン（＋１．９）；アラニン（＋１．８）；グリシン（－０．４）；スレオニン（－０．７）；セリン（－０．８）；トリプトファン（－０．９）；チロシン（－１．３）；プロリン（－１．６）；ヒスチジン（－３．２）；グルタミン酸（－３．５）；グルタミン（－３．５）；アスパラギン酸（－３．５）；アスパラギン（－３．５）；リジン（－３．９）；およびアルギニン（－４．５））である。

あるアミノ酸を、同様の疎水性指数を有する他のアミノ酸により置換して、そして依然として同様の生物学的機能を有するタンパク質（例えば、酵素活性において等価なタンパク質）を生じさせ得ることが当該分野で周知である。このようなアミノ酸置換において、疎水性指数が±２以内であることが好ましく、±１以内であることがより好ましく、および±０．５以内であることがさらにより好ましい。疎水性に基づくこのようなアミノ酸の置換は効率的であることが当該分野において理解される。

ポリペプチドはまた、親水性指数を考慮して改変され得る。米国特許第４，５５４，１０１号に記載されるように、以下の親水性指数がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン（＋３．０）；リジン（＋３．０）；アスパラ

ギン酸（＋３．０±１）；グルタミン酸（＋３．０±１）；セリン（＋０．３）；アスパラギン（＋０．２）；グルタミン（＋０．２）；グリシン（０）；スレオニン（－０．４）；プロリン（－０．５±１）；アラニン（－０．５）；ヒスチジン（－０．５）；システイン（－１．０）；メチオニン（－１．３）；バリン（－１．５）；ロイシン（－１．８）；イソロイシン（－１．８）；チロシン（－２．３）；フェニルアラニン（－２．５）；およびトリプトファン（－３．４）。アミノ酸が同様の親水性指数を有しかつ依然として生物学的等価体を与え得る別のものに置換され得ることが理解される。このようなアミノ酸置換において、親水性指数が±２以内であることが好ましく、±１以内であることがより好ましく、および±０．５以内であることがさらにより好ましい。

本明細書において「保存的置換」とは、アミノ酸置換において、元のアミノ酸と置換されるアミノ酸との親水性指数または／および疎水性指数が上記のように類似している置換をいう。保存的置換の例としては、例えば、親水性指数または疎水性指数が、±２以内のもの同士、好ましくは±１以内のもの同士、より好ましくは±０．５以内のもの同士のものが挙げられるがそれらに限定されない。従って、保存的置換の例は、当業者に周知であり、例えば、次の各グループ内での置換：アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシン、などが挙げられるがこれらに限定されない。

本明細書において「改変体」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドなどの物質に対して、一部が変更されているものをいう。そのような改変体としては、置換改変体、付加改変体、欠失改変体、短縮（ｔｒｕｎｃａｔｅｄ）改変体、対立遺伝子変異体などが挙げられる。そのような改変体としては、基準となる核酸分子またはポリペプチドに対して、１または数個の置換、付加

および／または欠失、あるいは１つ以上の置換、付加および／または欠失を含むものが挙げられるがそれらに限定されない。対立遺伝子（ａｌｌｅｌｅ）とは、同一遺伝子座に属し、互いに区別される遺伝的改変体のことをいう。従って、「対立遺伝子変異体」とは、ある遺伝子に対して、対立遺伝子の関係にある改変体をいう。そのような対立遺伝子変異体は、通常その対応する対立遺伝子と同一または非常に類似性の高い配列を有し、通常はほぼ同一の生物学的活性を有するが、まれに異なる生物学的活性を有することもある。「種相同体またはホモログ（ｈｏｍｏｌｏｇ）」とは、ある種の中で、ある遺伝子とアミノ酸レベルまたはヌクレオチドレベルで、相同性（好ましくは、６０％以上の相同性、より好ましくは、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上の相同性）を有するものをいう。そのような種相同体を取得する方法は、本明細書の記載から明らかである。「オルソログ（ｏｒｔｈｏｌｏｇ）」とは、オルソロガス遺伝子（ｏｒｔｈｏｌｏｇｏｕｓ　ｇｅｎｅ）ともいい、二つの遺伝子がある共通祖先からの種分化に由来する遺伝子をいう。例えば、多重遺伝子構造をもつヘモグロビン遺伝子ファミリーを例にとると、ヒトおよびマウスのαヘモグロビン遺伝子はオルソログであるが，ヒトのαヘモグロビン遺伝子およびβヘモグロビン遺伝子はパラログ（遺伝子重複で生じた遺伝子）である。オルソログは、分子系統樹の推定に有用である。オルソログは、通常別の種において、もとの種と同様の機能を果たしていることがあり得ることから、本発明のオルソログもまた、本発明において有用であり得る。

本明細書において「保存的（に改変された）改変体」は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、保存的に改変された改変体とは、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸をいい、核酸がアミノ酸配列をコードしない場合には、本質的に同一な配列をいう。遺伝コードの縮重のため、多数の機能的に同一な核酸が任意の所定のタンパク質をコードする。例えば、コドンＧＣＡ、ＧＣＣ、ＧＣＧ、およびＧＣＵ

はすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンにより特定される全ての位置で、そのコドンは、コードされたポリペプチドを変更することなく、記載された対応するコドンの任意のものに変更され得る。このような核酸の変動は、保存的に改変された変異の１つの種である「サイレント改変（変異）」である。ポリペプチドをコードする本明細書中のすべての核酸配列はまた、その核酸の可能なすべてのサイレント変異を記載する。当該分野において、核酸中の各コドン（通常メチオニンのための唯一のコドンであるＡＵＧ、および通常トリプトファンのための唯一のコドンであるＴＧＧを除く）が、機能的に同一な分子を産生するために改変され得ることが理解される。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、記載された各配列において暗黙に含まれる。サイレント変異もまた、本発明の診断の指標であり得る。好ましくは、そのような改変は、ポリペプチドの高次構造に多大な影響を与えるアミノ酸であるシステインの置換を回避するようになされ得る。このような塩基配列の改変法としては、制限酵素などによる切断、ＤＮＡポリメラーゼ、Ｋｌｅｎｏｗフラグメント、ＤＮＡリガーゼなどによる処理等による連結等の処理、合成オリゴヌクレオチドなどを用いた部位特異的塩基置換法（特定部位指向突然変異法；Ｍａｒｋ Ｚｏｌｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｃｈａｅｌ Ｓｍｉｔｈ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１００，４６８－５００（１９８３））が挙げられるが、この他にも通常分子生物学の分野で用いられる方法によって改変を行うこともできる。

本明細書中において、機能的に等価なポリペプチドを作製するために、アミノ酸の置換のほかに、アミノ酸の付加、欠失、または修飾もまた行うことができる。アミノ酸の置換とは、もとのペプチドを１つ以上、例えば、１～１０個、好ましくは１～５個、より好ましくは１～３個のアミノ酸で置換することをいう。アミノ酸の付加とは、もとのペプチド鎖に１つ以上、例えば、１～１０個、好ましくは１～５個、より好ましくは１～３個のアミノ酸を付加することをい

う。アミノ酸の欠失とは、もとのペプチドから１つ以上、例えば、１～１０個、好ましくは１～５個、より好ましくは１～３個のアミノ酸を欠失させることをいう。アミノ酸修飾は、アミド化、カルボキシル化、硫酸化、ハロゲン化、アルキル化、グリコシル化、リン酸化、水酸化、アシル化（例えば、アセチル化）などを含むが、これらに限定されない。置換、または付加されるアミノ酸は、天然のアミノ酸であってもよく、非天然のアミノ酸、またはアミノ酸アナログでもよい。天然のアミノ酸が好ましい。

本明細書において使用される用語「ペプチドアナログ」または「ペプチド誘導体」とは、ペプチドとは異なる化合物であるが、ペプチドと少なくとも１つの化学的機能または生物学的機能が等価であるものをいう。したがって、ペプチドアナログには、もとのペプチドに対して、１つ以上のアミノ酸アナログまたはアミノ酸誘導体が付加または置換されているものが含まれる。ペプチドアナログは、その機能が、もとのペプチドの機能（例えば、ｐＫａ値が類似していること、官能基が類似していること、他の分子との結合様式が類似していること、水溶性が類似していることなど）と実質的に同様であるように、このような付加または置換がされている。そのようなペプチドアナログは、当該分野において周知の技術を用いて作製することができる。したがって、ペプチドアナログは、アミノ酸アナログを含むポリマーであり得る。

同様に、「ポリヌクレオチドアナログ」、「核酸アナログ」は、ポリヌクレオチドまたは核酸とは異なる化合物であるが、ポリヌクレオチドまたは核酸と少なくとも１つの化学的機能または生物学的機能が等価であるものをいう。したがって、ポリヌクレオチドアナログまたは核酸アナログには、もとのペプチドに対して、１つ以上のヌクレオチドアナログまたはヌクレオチド誘導体が付加または置換されているものが含まれる。

本明細書において使用される核酸分子は、発現されるポリペプチドが天然型のポリペプチドと実質的に同一の活性を有する限り、上述のようにその核酸の

配列の一部が欠失または他の塩基により置換されていてもよく、あるいは他の核酸配列が一部挿入されていてもよい。あるいは、５’末端および／または３’末端に他の核酸が結合していてもよい。また、ポリペプチドをコードする遺伝子をストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、そのポリペプチドと実質的に同一の機能を有するポリペプチドをコードする核酸分子でもよい。このような遺伝子は、当該分野において公知であり、本発明において利用することができる。

このような核酸は、周知のＰＣＲ法により得ることができ、化学的に合成することもできる。これらの方法に、例えば、部位特異的変位誘発法、ハイブリダイゼーション法などを組み合わせてもよい。

本明細書において、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの「置換」、「付加」および「欠失」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して、それぞれアミノ酸もしくはその代替物、またはヌクレオチドもしくはその代替物が、置き換わること、付け加わること、および取り除かれることをいう。このような置換、付加または欠失の技術は、当該分野において周知であり、そのような技術の例としては、部位特異的変異誘発技術などが挙げられる。置換、付加または欠失は、１つ以上であれば任意の数でよく、そのような数は、その置換、付加または欠失を有する改変体において目的とする機能（例えば、ＦＢＰとの結合機能、セントロメアとの結合機能、ホルモン、サイトカインの情報伝達機能など）が保持される限り、多くすることができる。例えば、そのような数は、１または数個であり得、そして好ましくは、全体の長さの２０％以内、１０％以内、または１００個以下、５０個以下、２５個以下などであり得る。

（一般技術）

本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法は、当該分野において周知であり慣用されるものであり、例えば、

Sambrook J. et al. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor およびその 3rd Ed. (2001); Ausubel, F. M. (1987). Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. AssociatESand Wiley-Interscience; Ausubel, F. M. (1989). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Innis, M. A. (1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press; Ausubel, F. M. (1992). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Ausubel, F. M. (1995). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Innis, M. A. et al. (1995). PCR Strategies, Academic Press; Ausubel, F. M. (1999). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, and annual updates; Sninsky, J. J. et al. (1999). PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Academic Press、別冊実験医学「遺伝子導入＆発現解析実験法」羊土社、１９９７などに記載されており、これらは本明細書において関連する部分（全部であり得る）が参考として援用される。

人工的に合成した遺伝子を作製するためのＤＮＡ合成技術および核酸化学については、例えば、Gait, M. J. (1985). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Gait, M. J. (1990). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein, F. (1991). Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Adams, R. L. et al. (1992).. The Biochemistry of the Nucleic Acids, Chapman & Hall; Shabarova, Z. et al. (1994). Advanced Organic Chemistry of

Nucleic Acids, Weinheim; Blackburn, G. M. et al. (1996). Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Oxford University Press; Hermanson, G. T. (1996). Bioconjugate Techniques, Academic Press などに記載されており、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

本明細書において遺伝子発現（たとえば、ｍＲＮＡ発現、ポリペプチド発現）の「検出」または「定量」は、例えば、ｍＲＮＡの測定および免疫学的測定方法を含む適切な方法を用いて達成され得る。分子生物学的測定方法としては、例えば、ノーザンブロット法、ドットブロット法またはＰＣＲ法などが例示される。免疫学的測定方法としては、例えば、方法としては、マイクロタイタープレートを用いるＥＬＩＳＡ法、ＲＩＡ法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などが例示される。また、定量方法としては、ＥＬＩＳＡ法またはＲＩＡ法などが例示される。アレイ（例えば、ＤＮＡアレイ、プロテインアレイ）を用いた遺伝子解析方法によっても行われ得る。ＤＮＡアレイについては、（秀潤社編、細胞工学別冊「ＤＮＡマイクロアレイと最新ＰＣＲ法」）に広く概説されている。プロテインアレイについては、Nat Genet.2002 Dec;32 Suppl:526-32 に詳述されている。遺伝子発現の分析法としては、上述に加えて、ＲＴ－ＰＣＲ、ＲＡＣＥ法、ＳＳＣＰ法、免疫沈降法、ｔｗｏ－ｈｙｂｒｉｄシステム、インビトロ翻訳などが挙げられるがそれらに限定されない。そのようなさらなる分析方法は、例えば、ゲノム解析実験法・中村祐輔ラボ・マニュアル、編集・中村祐輔　羊土社（２００２）などに記載されており、本明細書においてそれらの記載はすべて参考として援用される。

本明細書において「発現量」とは、対象となる細胞などにおいて、ポリペプチドまたはｍＲＮＡが発現される量をいう。そのような発現量としては、本発明の抗体を用いてＥＬＩＳＡ法、ＲＩＡ法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などの免疫学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明ポリペプチドのタンパク質レベルでの発現量、またはノーザン

ブロット法、ドットブロット法、ＰＣＲ法などの分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明のポリペプチドのｍＲＮＡレベルでの発現量が挙げられる。「発現量の変化」とは、上記免疫学的測定方法または分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明のポリペプチドのタンパク質レベルまたはｍＲＮＡレベルでの発現量が増加あるいは減少することを意味する。

（ポリペプチドの製造方法）

本発明のポリペプチドをコードするＤＮＡを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞などに由来する形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、本発明の培養物より本発明のポリペプチドを採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、本発明の生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸または有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素物質、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コー

ンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養等の好気的条件下で行う。

培養温度は１５～４０℃がよく、培養時間は、通常５時間～７日間である。培養中ｐＨは、３．０～９．０に保持する。ｐＨの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。また培養中必要に応じて、アンピシリンまたはテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、ｌａｃプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピラノシド等を、ｔｒｐプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。遺伝子を導入した植物の細胞または器官は、ジャーファーメンターを用いて大量培養することができる。培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ（ＭＳ）培地、ホワイト（Ｗｈｉｔｅ）培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

例えば、動物細胞を用いる場合、本発明の細胞を培養する培地は、一般に使用されているＲＰＭＩ１６４０培地［Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ，１９９，５１９（１９６７）］、ＥａｇｌｅのＭＥＭ培地［Ｓｃｉｅｎｃｅ，１２２，５０

1（1952）］、DMEM培地［Virology, 8, 396（1959）］、199培地［Proceedings of the Society for the Biological Medicine, 73, 1（1950）］またはこれら培地にウシ胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

培養は、通常pH6～8、25～40℃、5%CO2存在下等の条件下で1～7日間行う。また培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

本発明のポリペプチドをコードする核酸配列で形質転換された形質転換体の培養物から、本発明のポリペプチドを単離または精製するためには、当該分野で周知慣用の通常の酵素の単離または精製法を用いることができる。例えば、本発明のポリペプチドが本発明のポリペプチド製造用形質転換体の細胞外に本発明のポリペプチドが分泌される場合には、その培養物を遠心分離等の手法により処理し、可溶性画分を取得する。その可溶性画分から、溶媒抽出法、硫安等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈澱法、ジエチルアミノエチル（DEAE）－Sepharose、DIAION HPA－75（三菱化成）等樹脂を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S－Sepharose FF（Pharmacia）等の樹脂を用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等の樹脂を用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用い、精製標品を得ることができる。

本発明のポリペプチドが本発明のポリペプチド製造用形質転換体の細胞内に溶解状態で蓄積する場合には、培養物を遠心分離することにより、培養物中の細胞を集め、その細胞を洗浄した後に、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモジナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出

液を得る。その無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、溶媒抽出法、硫安等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈澱法、ジエチルアミノエチル（ＤＥＡＥ）－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ、ＤＩＡＩＯＮ　ＨＰＡ－７５（三菱化成）等樹脂を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、Ｓ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　ＦＦ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）等の樹脂を用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等の樹脂を用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用いることによって、精製標品を得ることができる。

本発明のポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離を行うことにより得られた沈澱画分より、通常の方法により本発明のポリペプチドを回収後、そのポリペプチドの不溶体をポリペプチド変性剤で可溶化する。この可溶化液を、ポリペプチド変性剤を含まないあるいはポリペプチド変性剤の濃度がポリペプチドが変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、本発明のポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

また、通常のタンパク質の精製方法［J. Evan. Sadler et al.: Methods in Enzymology, 83, 458］に準じて精製できる。また、本発明のポリペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる［山川彰夫，実験医学（Experimental Medicine),13,469-474(1995)］。例えば、Ｌｏｗｅらの方法［Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227-8231 (1989), Genes Develop., 4, 1288 (1990)］に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテインＡとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンＧを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

また、本発明のポリペプチドをＦＬＡＧペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗ＦＬＡＧ抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989), Genes Develop., 4, 1288 (1990)]。

さらに、本発明のポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。本発明のポリペプチドは、公知の方法［J. Biomolecular NMR, 6, 129-134, Science, 242, 1162-1164, J. Biochem., 110, 166-168 (1991)］に準じて、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写・翻訳系を用いてを生産することができる。

上記で取得されたポリペプチドのアミノ酸情報を基に、Ｆｍｏｃ法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、ｔＢｏｃ法（ｔ－ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても本発明のポリペプチドを製造することができる。また、Ａｄｖａｎｃｅｄ　ＣｈｅｍＴｅｃｈ、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ、Ｓｙｎｔｈｅｃｅｌｌ－Ｖｅｇａ、ＰｅｒＳｅｐｔｉｖｅ、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、タンパク質化学で通常用いられる方法、例えば遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析（平野久著、東京化学同人発行、１９９３年）に記載の方法により実施可能である。本発明の新規ｐｓ２０様ポリペプチドの生理活性は、公知の測定法［Cell, 75, 1389 (1993)、J. Cell Bio. 1146, 233 (1999)、Cancer Res. 58, 1238 (1998), Neuron 17, 1157 (1996), Science 289, 1197(2000)］に準じて測定することができる。

（変異型ポリペプチドの作製方法）

本発明ポリペプチドのアミノ酸の欠失、置換もしくは付加は、出願前周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができる。かかる１もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-38, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487(1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315(1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 5662 (1984), Science, 224, 1431 (1984)、PCT WO 85/00817 (1985), Nature, 316, 601 (1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

（免疫化学）

本発明のポリペプチドを認識する抗体の作製もまた当該分野において周知である。例えば、ポリクローナル抗体の作製は、取得したポリペプチドの全長または部分断片精製標品、あるいは本発明のタンパク質の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として用い、動物に投与することにより行うことができる。

抗体を生産する場合、投与する動物として、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。その抗原の投与量は動物１匹当たり５０～１００μｇが好ましい。ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン（keyhole limpet haemocyanin）またはウシチログロブリン等のキャリアタンパク質に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。その抗原の投与は、１回目の投与の後１～２週間おきに３～１０回行う。各投与後、３～７日目に眼底静脈叢より採血し、その血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免

疫測定法［酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ法）：医学書院刊　１９７６年、Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lavoratory (1988)］等で確認することができる。

免疫に用いた抗原に対し、その血清が充分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物より血清を取得し、その血清より、周知技術を用いてポリクローナル抗体を分離、精製することができる。モノクローナル抗体の作製もまた当該分野において周知である。抗体産性細胞の調製のために、まず、免疫に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として使用し、骨髄腫細胞との融合により、ハイブリドーマの作製を行う。その後、酵素免疫測定法になどより、本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。このようにして得たハイブリドーマから産生されたモノクローナル抗体は種々の目的に使用することができる。

本発明の抗体は、抗体の合成のために当該分野で公知の任意の方法によって、化学合成によって、または、好ましくは、組換え発現技術によって産生され得る。

本発明の抗体、またはそのフラグメント、誘導体もしくはアナログ（例えば、本発明の抗体の重鎖もしくは軽鎖または本発明の単鎖抗体）の組換え発現は、その抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を必要とする。一旦、本発明の抗体分子または抗体の重鎖もしくは軽鎖、あるいはそれらの部分（好ましくは、重鎖または軽鎖の可変ドメインを含有する）をコードするポリヌクレオチドが得られると、抗体分子の産生のためのベクターは、当該分野で周知の技術を用いる組換えＤＮＡ技術によって生成され得る。従って、抗体をコードするヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドの発現によってタンパク質を調製するための方法は、本明細書に記載される。当業者に周知の方法は、抗体をコードする配列ならびに適切な転写制御シグナルおよび

翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターの構築のために使用され得る。これらの方法としては、例えば、インビトロの組換えＤＮＡ技術、合成技術、およびインビボの遺伝子組換えが挙げられる。従って、本発明は、プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体分子、あるいはその重鎖もしくは軽鎖、または重鎖もしくは軽鎖の可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む、複製可能なベクターを提供する。このようなベクターは、抗体分子の定常領域（例えば、ＰＣＴ公開　WO86/05807；ＰＣＴ公開　WO89/01036；および米国特許第５，１２２，４６４号を参照のこと）をコードするヌクレオチド配列を含み得、そしてこの抗体の可変ドメインは、重鎖または軽鎖の全体の発現のためにこのようなベクターにクローニングされ得る。

この発現ベクターは、従来技術によって宿主細胞へと移入され、次いで、このトランスフェクトされた細胞は、本発明の抗体を産生するために、従来技術によって培養される。従って、本発明は、異種プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体、あるいはその重鎖もしくは軽鎖、または本発明の単鎖抗体をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を含む。二重鎖抗体の発現についての好ましい実施形態において、重鎖および軽鎖の両方をコードするベクターは、免疫グロブリン分子全体の発現のために宿主細胞中に同時発現され得る。

このような抗体は、例えば、本発明のポリペプチドの免疫学的検出方法に使用することができ、本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドの免疫学的検出法としては、マイクロタイタープレートを用いるＥＬＩＳＡ法・蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法等を挙げることができる。

また、本発明ポリペプチドの免疫学的定量方法にも使用することができる。本発明ポリペプチドの定量方法としては、液相中で本発明のポリペプチドと反応する抗体のうちエピトープが異なる２種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチＥＬＩＳＡ法、^{126}Ｉ等の放射性同位体で標識した本発明のタンパ

ク質と本発明のタンパク質を認識する抗体とを用いるラジオイムノアッセイ法等を挙げることができる。

本発明ポリペプチドのｍＲＮＡの定量方法もまた、当該分野において周知である。例えば、本発明のポリヌクレオチドあるいはＤＮＡより調製した上記オリゴヌクレオチドを用い、ノーザンハイブリダイゼーション法またはＰＣＲ法により、本発明のポリペプチドをコードするＤＮＡの発現量をｍＲＮＡレベルで定量することができる。このような技術は、当該分野において周知であり、本明細書において列挙した文献にも記載されている。

当該分野で公知の任意の方法によって、これらのポリヌクレオチドが得られ得、そしてこれらポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、決定され得る。例えば、抗体のヌクレオチド配列が公知である場合、この抗体をコードするポリヌクレオチドは、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドからアセンブルされ得（例えば、Kutmeier et al.,BioTechniques 17:242(1994)に記載されるように）、これは、手短に言えば、抗体をコードする配列の部分を含むオーバーラップするヌクレオチドの合成、それらのオリゴヌクレオチドのアニーリングおよび連結、ならびに次いでＰＣＲによるこの連結されたオリゴヌクレオチドの増幅を含む。

抗体をコードするポリヌクレオチドは、適切な供給源由来の核酸から作製することができる。ある抗体をコードする核酸を含むクローンは入手不可能だが、その抗体分子の配列が既知である場合、免疫グロブリンをコードする核酸は、化学的に合成され得るか、あるいは適切な供給源（例えば、抗体ｃＤＮＡライブラリーまたは抗体を発現する任意の組織もしくは細胞（例えば、本発明の抗体の発現のために選択されたハイブリドーマ細胞）から生成されたｃＤＮＡライブラリー、またはそれから単離された核酸（好ましくはポリＡ＋ＲＮＡ））から、例えば、抗体をコードするｃＤＮＡライブラリーからのｃＤＮＡクローンを同定するために、その配列の３’末端および５’末端にハイブリダイズ可

能な合成プライマーを使用するＰＣＲ増幅によって、またはその特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用するクローニングによって得ることができる。ＰＣＲによって作製された増幅された核酸は、当該分野で周知の任意の方法を用いて、複製可能なクローニングベクターにクローニングされ得る。

一旦、抗体のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列が決定されると、抗体のヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列の操作について当該分野で周知の方法（例えば、組換えＤＮＡ技術、部位指向性変異誘発、ＰＣＲなど（例えば、Sambrook et al., 前出および Ausubel et al. 編, 前出に記載の技術を参照のこと。これらは両方がその全体において本明細書に参考として援用される。））を用いて操作され、例えば、アミノ酸の置換、欠失、および／または挿入を生成するように異なるアミノ酸配列を有する抗体を作製し得る。

特定の実施形態において、重鎖可変ドメインおよび／または軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、相補性決定領域（ＣＤＲ）の配列の同定のために、当該分野において周知の方法によって（例えば、配列超可変性の領域を決定するために、他の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の既知のアミノ酸配列と比較することによって）調べられ得る。慣用的な組換えＤＮＡ技術を用いて、１つ以上のＣＤＲが、前述のようにフレームワーク領域内に（例えば、非ヒト抗体をヒト化するために、ヒトフレームワーク領域中に）挿入され得る。このフレームワーク領域は天然に存在し得るか、またはコンセンサスフレームワーク領域であり得、そして好ましくはヒトフレームワーク領域であり得る（例えば、列挙したヒトフレームワーク領域については、Chothia ら, J. Mol. Biol. 278: 457-479 (1998) を参照のこと）。好ましくは、フレームワーク領域およびＣＤＲの組み合わせによって生成されたポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体をコードする。好ましくは、上記に議論されるように、１つ以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域内で作製され得、そして

好ましくは、そのアミノ酸置換は、抗体のその抗原への結合を改善する。さらに、このような方法は、１つ以上の鎖内ジスルフィド結合が欠如した抗体分子を生成するように、鎖内ジスルフィド結合に関与する１つ以上の可変領域のシステイン残基のアミノ酸置換または欠失を作製するために使用され得る。ポリヌクレオチドへの他の変更は、本発明によって、および当該分野の技術において包含される。

さらに、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子を、適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と共にスプライシングさせることによって、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術（Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 851-855 (1984); Neuberger et al., Nature 312: 604-608 (1984); Takeda et al., Nature 314: 452-454 (1985)）が使用され得る。上記のように、キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種に由来する分子であり、このような分子は、マウスｍＡｂおよびヒト免疫グロブリンの定常領域由来の可変領域を有する（例えば、ヒト化抗体）。

単鎖抗体を製造する場合、単鎖抗体の産生に関する記載された公知の技術（米国特許第４，９４６，７７８号；Bird, Science 242: 423-42 (1988); Huston etal., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988); および Ward et al., Nature 334: 544-54 (1989)）が、利用され得る。単鎖抗体は、Ｆｖ領域の重鎖フラグメントおよび軽鎖フラグメントがアミノ酸架橋を介して連結されれることによって形成され、単鎖ポリペプチドを生じる。Ｅ．ｃｏｌｉにおける機能性Ｆｖフラグメントのアセンブリのための技術もまた、使用され得る（Skerra et al., Science 242: 1038-1041 (1988)）。

（スクリーニング）

本明細書において「スクリーニング」とは、目的とするある特定の性質をもつ生物または物質などの標的を、特定の操作／評価方法で多数を含む集団の中

から選抜することをいう。スクリーニングのために、本発明の因子（例えば、抗体）、ポリペプチドまたは核酸分子を使用することができる。スクリーニングは、インビトロ、インビボなど実在物質を用いた系を使用してもよく、インシリコ（コンピュータを用いた系）の系を用いて生成されたライブラリーを用いてもよい。本発明では、所望の活性を有するスクリーニングによって得られた化合物もまた、本発明の範囲内に包含されることが理解される。また本発明では、本発明の開示をもとに、コンピュータモデリングによる薬物が提供されることも企図される。

（診断）

本明細書において「診断」とは、被験体における疾患の種類、障害の種類と程度、身体状態などに関連する種々のパラメータを同定し、そのような疾患、障害、状態の現状、薬物反応性予測、病態変化予測または原因を判定することをいう。本発明の方法、装置、システムを用いることによって、疾患を分析し、疾患の状態と相関付けることができ、そのような情報を用いて、被験体における疾患、障害、状態、投与すべき薬物の種類や量など処置または予防のための処方物または方法などの種々のパラメータを選定することができる。

本発明の診断方法は、原則として、身体から出たものを利用することができることから、医師などの医療従事者の手を離れて実施することができることから、産業上有用である。

本明細書において「ハイリスク」であるとは、ある疾患について用いられるとき、被験体がその疾患に罹患している可能性が高いこと（例えば、約２５％、約５０％、約７５％など）をいう。ハイリスク診断を受けた被験体は、別の診断法によって確定診断を行うことができる。

本明細書において「確定診断」とは、ある疾患について用いられるとき、ある被験体がその疾患に罹患していると確定的に診断することをいう。本発明の

因子、ポリペプチド、核酸分子、方法およびキットを用いることによって、癌（特に、ｃ－ｍｙｃ高発現癌（例えば、直腸癌、結腸癌））の確定診断を行うことができる。

（遺伝子治療）

特定の実施形態において、本発明の正常な遺伝子の核酸配列、抗体またはその機能的誘導体をコードする配列を含む核酸は、本発明のポリペプチドの異常な発現および／または活性に関連した疾患または障害を処置、阻害または予防するために、遺伝子治療の目的で投与される。遺伝子治療とは、発現されたか、または発現可能な核酸の、被験体への投与により行われる治療をいう。本発明のこの実施形態において、核酸は、それらのコードされたタンパク質を産生し、そのタンパク質は治療効果を媒介する。

当該分野で利用可能な遺伝子治療のための任意の方法が、本発明に従って使用され得る。例示的な方法は、以下のとおりである。

遺伝子治療の方法の一般的な概説については、Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 12: 488-505 (1993); Wu and Wu, Biotherapy 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596 (1993); Mulligan, Science 260: 926-932 (1993)；ならびに Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217 (1993); May, TIBTECH 11(5): 155-215 (1993)を参照のこと。遺伝子治療において使用される一般的に公知の組換えＤＮＡ技術は、Ausubel ら(編), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); および Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)に記載される。

（治療活性または予防活性の証明）

本発明の化合物または薬学的組成物は、好ましくは、ヒトでの使用の前にインビトロで、そして次いでインビボで、所望の治療活性または予防活性について試験される。例えば、化合物または薬学的組成物の、治療有用性または予防有用性を証明するためのインビトロアッセイとしては、細胞株または患者組織試料に対する化合物の効果が挙げられる。細胞株および／または組織試料に対する化合物または組成物の効果は、当業者に公知である技術（細胞溶解アッセイが挙げられるがこれらに限定されない）を利用して決定され得る。本発明に従って、特定の化合物の投与が示されるか否かを決定するために用いられ得るインビトロアッセイとしては、インビトロ細胞培養アッセイが挙げられ、このアッセイでは、患者組織試料が培養物において増殖し、そして化合物に曝されるか、そうでなければ化合物が投与され、そして、組織試料に対するそのような化合物の効果が観察される。

本明細書において「予防」（ｐｒｏｐｈｙｌａｘｉｓまたはｐｒｅｖｅｎｔｉｏｎ）とは、ある疾患または障害について、そのような状態が引き起こされる前に、そのような状態が起こらないように処置することをいう。

本明細書において「治療」とは、ある疾患または障害について、そのような状態になった場合に、そのような疾患または障害の悪化を防止、好ましくは、現状維持、より好ましくは、軽減、さらに好ましくは消長させることをいう。

本明細書において「癌」または「がん」は、互換可能に用いられ、異型性が強く、増殖が正常細胞より速く、周囲組織に破壊性に浸潤し得あるいは転移をおこし得る悪性腫瘍またはそのような悪性腫瘍が存在する状態をいう。本発明においては、癌は固形癌および造血器腫瘍を含むがそれらに限定されない。

本明細書において「固形癌」は、固形の形状がある癌をいい、白血病などの造血器腫瘍とは対峙する概念である。そのような固形癌としては、例えば、乳癌、肝癌、胃癌、肺癌、頭頸部癌、子宮頸部癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、悪性リンパ腫、食道癌、脳腫瘍、骨腫瘍が挙げられるがそれらに限定されない。

本明細書において「被験体」とは、本発明の処置が適用される生物をいい、「患者」ともいわれる。患者または被験体は好ましくは、ヒトであり得る。

（治療／予防のための投与および組成物）

本発明は、被験体への有効量の本発明の化合物または薬学的組成物の投与による処置、阻害および予防の方法を提供する。好ましい局面において、化合物は実質的に精製されたものであり得る（例えば、その効果を制限するかまたは望ましくない副作用を生じる物質が実質的に存在しない状態が挙げられる）。

本発明が対象とする動物は、神経系または類似の系を有するものであれば、どの生物（例えば、動物（たとえば、脊椎動物、無脊椎動物））でもよい。好ましくは、脊椎動物（たとえば、メクラウナギ類、ヤツメウナギ類、軟骨魚類、硬骨魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物など）であり、より好ましくは、哺乳動物（例えば、単孔類、有袋類、貧歯類、皮翼類、翼手類、食肉類、食虫類、長鼻類、奇蹄類、偶蹄類、管歯類、有鱗類、海牛類、クジラ目、霊長類、齧歯類、ウサギ目など）であり得る。例示的な被験体としては、例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどの動物が挙げられるがそれらに限定されない。さらに好ましくは、霊長類（たとえば、チンパンジー、ニホンザル、ヒト）由来の細胞が用いられる。最も好ましくはヒト由来の細胞が用いられる。

本発明の核酸分子またはポリペプチドが医薬として使用される場合、そのような組成物は、薬学的に受容可能なキャリアなどをさらに含み得る。本発明の医薬に含まれる薬学的に受容可能なキャリアとしては、当該分野において公知の任意の物質が挙げられる。

そのような適切な処方材料または薬学的に受容可能なキャリアとしては、抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および／または薬学的アジュバント挙げられるがそれらに限定されない。代表的には、本発明の

医薬は、有効成分を、１つ以上の生理的に受容可能なキャリア、賦形剤または希釈剤とともに含む組成物の形態で投与される。例えば、適切なビヒクルは、注射用水、生理的溶液、または人工脳脊髄液であり得、これらには、非経口送達のための組成物に一般的な他の物質を補充することが可能である。

本明細書で使用される受容可能なキャリア、賦形剤または安定化剤は、レシピエントに対して非毒性であり、そして好ましくは、使用される投薬量および濃度において不活性であり、例えば、リン酸塩、クエン酸塩、または他の有機酸；アスコルビン酸、α－トコフェロール；低分子量ポリペプチド；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン）；モノサッカリド、ジサッカリドおよび他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む）；キレート剤（例えば、ＥＤＴＡ）；糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）；塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）；ならびに／あるいは非イオン性表面活性化剤（例えば、Ｔｗｅｅｎ、プルロニック（ｐｌｕｒｏｎｉｃ）またはポリエチレングリコール（ＰＥＧ））などが挙げられるがそれらに限定されない。

例示の適切なキャリアとしては、中性緩衝化生理食塩水、または血清アルブミンと混合された生理食塩水が挙げられる。好ましくは、その生成物は、適切な賦形剤（例えば、スクロース）を用いて凍結乾燥剤として処方される。他の標準的なキャリア、希釈剤および賦形剤は所望に応じて含まれ得る。他の例示的な組成物は、ｐＨ７．０－８．５のＴｒｉｓ緩衝剤またはｐＨ４．０－５．５の酢酸緩衝剤を含み、これらは、さらに、ソルビトールまたはその適切な代替物を含み得る。

本発明の医薬は、経口的または非経口的に投与され得る。あるいは、本発明の医薬は、静脈内または皮下で投与され得る。全身投与されるとき、本発明に

おいて使用される医薬は、発熱物質を含まない、薬学的に受容可能な水溶液の形態であり得る。そのような薬学的に受容可能な組成物の調製は、ｐＨ、等張性、安定性などを考慮することにより、当業者は、容易に行うことができる。本明細書において、投与方法は、経口投与、非経口投与（例えば、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、粘膜投与、直腸内投与、膣内投与、患部への局所投与、皮膚投与など）であり得る。そのような投与のための処方物は、任意の製剤形態で提供され得る。そのような製剤形態としては、例えば、液剤、注射剤、徐放剤が挙げられる。

本発明の医薬は、必要に応じて生理学的に受容可能なキャリア、賦型剤または安定化剤（日本薬局方第１４版またはその最新版（追補を含む）、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990 などを参照）と、所望の程度の純度を有する糖鎖組成物とを混合することによって、凍結乾燥されたケーキまたは水溶液の形態で調製され保存され得る。

なお、タンパク質またはポリペプチドの治療的有効量（すなわち、有効量）は、約 0.001～30mg/kg 体重の範囲、好ましくは約 0.01～25mg/kg 体重、より好ましくは約 0.1～20 mg/kg 体重、さらにより好ましくは約 1～10mg/kg、2～9mg/kg、3～8mg/kg、4～7 mg/kg または 5～6 mg/kg 体重の範囲である。またタンパク質をコードするポリヌクレオチドを遺伝子治療等の方法によって導入する場合は、上記の範囲量のタンパク質を発現しうるポリヌクレオチドを投与すればよい。

本発明の処置方法において使用される糖鎖組成物の量は、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。本発明の処置方法を被験体（または患者）に対して施す頻度もまた、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、および治療経過な

どを考慮して、当業者が容易に決定することができる。頻度としては、例えば、毎日－数ヶ月に１回（例えば、１週間に１回－１ヶ月に１回）の投与が挙げられる。１週間－１ヶ月に１回の投与を、経過を見ながら施すことが好ましい。

本明細書において「指示書」は、本発明の医薬などを投与する方法または診断する方法などを医師、患者など投与を行う人、診断する人（患者本人であり得る）に対して記載したものである。この指示書は、本発明の診断薬、医薬などを投与する手順を指示する文言が記載されている。この指示書は、本発明が実施される国の監督官庁（例えば、日本であれば厚生労働省、米国であれば食品医薬品局（ＦＤＡ）など）が規定した様式に従って作成され、その監督官庁により承認を受けた旨が明記される。指示書は、いわゆる添付文書（ｐａｃｋａｇｅ　ｉｎｓｅｒｔ）であり、通常は紙媒体で提供されるが、それに限定されず、例えば、電子媒体（例えば、インターネットで提供されるホームページ（ウェブサイト）、電子メール、ＳＭＳ、ＰＤＦ文書など）のような形態でも提供され得る。

好ましい実施形態の説明

以下に本発明の最良の形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本発明のよりよい理解のために提供されるものであり、本発明の範囲は以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本発明の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。

（発明の概説）

配列番号 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、c-myc 遺伝子のプロモーターの 1.5kb 上流に結合する転写因子 FBP (Far Upstream Binding Protein: EMBO J. 19(5):1034-1044, 2000) と相互作用する転写因子 FIR (FBP

Interacting Receptor： Cell 104(3):343-363, 2001）として知られているタンパク質であるが、癌との関連性は全く知られていなかった。

また、配列番号４のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、動原体タンパク質（centromere-specific protein）の一種である CENP-A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88(9):3734-3738, 1991）として知られているタンパク質であるが、この CEMP-1 も癌との関連性は全く知られていなかった。

これら配列番号２のアミノ酸配列を有するポリペプチドおよびその改変体（例えば、配列番号１２、１４、１６、１８、２０、２２など）ならびに配列番号４のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、被験体の血清中に、本発明の抗原ペプチドと結合する抗体が存在するか否かを試験し、血清中にその抗体が存在する被験体を大腸癌患者または大腸癌ハイリスク者と判定することを特徴とするヒト大腸癌診断方法（好ましくは、抗原ペプチドを固定化したプレート上において被験体血清の抗体と抗原ペプチドとの結合を試験する）に関連する大腸癌診断に使用することができる。

これらの抗原ペプチドは、例えば、配列番号２または４のアミノ酸配列を有するペプチドをコードする遺伝子 DNA から転写された mRNA を鋳型として合成され、配列番号１または３の塩基配列またはその一部連続配列からなるＤＮＡ断片を有する組換え発現ベクター（これらも本発明に包含される）からインビトロ転写によって RNA を調製し、これを鋳型としてインビトロ翻訳を行うことによりインビトロでペプチドを発現できる。また組換え発現ベクターを大腸菌、枯草菌等の原核細胞や、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞等の真核細胞に導入して形質転換細胞（これも本発明に包含される）を作成すれば、この形質転換細胞から DNA 断片がコードしているペプチドを発現させることができる。

抗原ペプチドをインビトロ翻訳で発現させる場合には、上記の DNA 断片を、RNA ポリメラーゼプロモーターを有するベクターに挿入して組換え発現ベクターを作製し、このベクターを、プロモーターに対応する RNA ポリメラーゼを含

むウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などのインビトロ翻訳系に添加すれば、抗原ペプチドをインビトロで生産することができる。RNA ポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6 などが例示できる。これらの RNA ポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKA1、pCDM8、pT3/T7 18、pT7/3 19、pBluescript II などが例示できる。

抗原ペプチドを、大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNA クローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに上記の DNA 断片を組換えた発現ベクターを作成し、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養すれば、この DNA 断片がコードしている抗原ペプチドを微生物から発現させることができる。この際、他のタンパク質との融合タンパク質として発現させることもできる。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC 系、pBluescript II、pET 発現システム、pGEX 発現システムなどが例示できる。

抗原ペプチドを、真核細胞で発現させる場合には、上記の DNA 断片を、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに挿入して組換えベクターを作成し、真核細胞内に導入すれば、抗原ペプチドを形質転換真核細胞で発現させることができる。発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBV ベクター、pRS、pcDNA3、pMSG、pYES2 などが例示できる。また、pIND/V5-His、pFLAG-CMV-2、pEGFP-N1、pEGFP-C1 などを発現ベクターとして用いれば、His タグ、FLAG タグ、myc タグ、HA タグ、GFP など各種タグを付加した融合タンパク質として抗原ペプチドを発現させることもできる。真核細胞としては、サル腎臓細胞 COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO などの哺乳動物培養細胞、出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞などが一般に用いられるが、この発明の抗原ペプチドを発現できるものであれば、いかなる真核細胞でもよい。

発現ベクターを真核細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAE デキストラン法など公知の方法を用いることができる。

抗原ペプチドを原核細胞や真核細胞で発現させたのち、培養物から目的ペプチドを単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせて行うことができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどが挙げられる。

なお、以上の方法によって得られる組換え抗原ペプチドには、他の任意のタンパク質との融合タンパク質も含まれる。例えば、グルタチン－Ｓ－トランスフェラーゼ（GST）や緑色蛍光蛋白質（GFP）との融合蛋白質などが例示できる。さらに、形質転換細胞で発現されたペプチドは、翻訳された後、細胞内で各種修飾を受ける場合がある。したがって、修飾されたペプチドも本発明の抗原ペプチドの範囲に含まれる。このような翻訳後修飾としては、Ｎ末端メチオニンの脱離、Ｎ末端アセチル化、糖鎖付加、細胞内プロテアーゼによる限定分解、ミリストイル化、イソプレニル化、リン酸化などが例示できる。

本発明の mRNA は、それぞれ大腸癌抗原ペプチドをコードする遺伝子 DNA から転写された mRNA である。これらの mRNA は例えば大腸癌細胞から単離したトータル RNA から公知の方法で分離することができる。これらの mRNA は、被験体の生体試料に、本発明の mRNA が存在するか否かを試験し、試料中にその mRNA が存在する被験体を大腸癌患者または大腸癌ハイリスク者と判定することを特徴とするヒト大腸癌診断方法の対象となる。

本発明の mRNA を鋳型として合成され、配列番号 1 の塩基配列またはその一部連続配列からなる DNA 断片は、本発明の mRNA から合成され、配列番号 1 および 3 の塩基配列、またはその一部連続配列からなる DNA 断片である。ここで、

「一部連続配列」とは、例えば各塩基配列において抗原ペプチドをコードする領域（ORF またはCDS 領域）をカバーする塩基配列である。

配列番号 1 および 3 の塩基配列は、例えば、公知の方法（Mol. Cell Biol. 2, 161-170, 1982 ； J. Gene 25, 263-269, 1983 ； Gene, 150, 243-250, 1994）を用いて cDNA を合成し、配列番号 1 または 3 の塩基配列に基づいて作成したプローブ DNA を用いて、それぞれの cDNA を単離する方法によって取得することができる。また、本発明の mRNA をＰＣＲ増幅するためのプライマーセットを用い、ヒト細胞から単離した mRNA を鋳型とする RT-PCR 法によっても各 cDNA を得ることができる。得られた cDNA は、例えば、PCR（Polymerase Chain Reaction）法、NASBN（Nucleic acid sequence based amplification）法、TMA（Transcription-mediated amplification）法および SDA（Strand Displacement Amplification）法などの通常行われる遺伝子増幅法により増幅することができる。

本発明のペプチドと結合する抗体はポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得、それぞれ本発明の抗原ペプチドのエピトープに結合することができる全体分子、およびFab、$F(ab')_2$、Fv 断片等が全て含まれる。このような抗体は、例えばポリクローナル抗体の場合には、抗原ペプチドやその一部断片を免疫原として動物を免疫した後、血清から得ることができる。あるいは、上記の真核細胞用発現ベクターを注射や遺伝子銃によって、動物の筋肉や皮膚に導入した後、血清を採取することによって作製することができる。動物としては、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ニワトリなどが用いられる。

また、モノクローナル抗体は、公知のモノクローナル抗体作成法（「単クローン抗体」、長宗香明、寺田弘共著、廣川書店、1990 年； "Monoclonal Antibody" James W. Goding, third edition, Academic Press, 1996）に従い、例えば以下の様な手順で作製することができる。１：ハイブリドーマ細胞群の作製　本発明の抗原ペプチドのそれぞれ、またはその一部断片を含む免疫原を

用いて哺乳動物を免疫し、必要に応じて適宜に追加免疫して動物を充分に感化する。次いでこの動物から抗体産生細胞（リンパ細胞または脾臓細胞）を摘出し、これとミエローマ（骨髄種）細胞株との融合細胞を得る。そして、これらの融合細胞株から、目的とするモノクローナル抗体をそれぞれに産生する複数の細胞を選択し、培養することによって、ハイブリドーマ細胞群を得ることができる。以下、各工程を詳しく説明する。ａ）免疫原の調製　例えば、本発明の組換え発現ベクターから in vitro 転写で発現させた抗原ペプチド、または本発明のの形質転換細胞から発現させた抗原ペプチドを免疫原とすることができる。あるいは、その一部断片（10-20 アミノ酸）の場合には、配列番号 2 または 4 のアミノ酸配列に基づいて作成した合成ペプチドであってもよい。これらの免疫原は、他のタンパク質（例えば、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ：GST）との融合タンパク質の形で使用することもできる。このような融合タンパク質の使用は、宿主－ベクター系の発現産物からの目的タンパク質の単離、および後記するハイブリドーマ細胞のスクリーニング工程を容易かつ確実とする点において特に好ましい。ｂ）動物の免疫　被免疫動物としては、公知のハイブリドーマ作製法に用いられる哺乳動物を使用することができる。具体的には、たとえばマウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ等である。ただし、摘出した抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞の入手容易性等の観点からは、マウスまたはラットを被免疫動物とするのが好ましい。また、実際に使用するマウスおよびラットの系統は特に制限はなく、マウスの場合には、たとえば各系統 A、AKR、BALB/c、BDP、BA、CE、C3H、57BL、C57BR、C57L、DBA、FL、HTH、HT1、LP、NZB、NZW、RF、RIII、SJL、SWR、WB、129 等が、またラットの場合には、たとえば、Low、Lewis、Spraque、Daweley、ACI、BN、Fischer 等を用いることができる。このうち、後述のミエローマ細胞との融合適合性を勘案すれば、マウスでは BALB/c 系統が、ラットでは low 系統が被免疫動物と

して特に好ましい。なお、これらマウスまたはラットの免疫時の週齢は 5～12 週齢が好ましい。

動物の免疫は、免疫原の溶液を動物の皮内または腹腔内に投与することによって行うことができる。免疫原の投与スケジュールは被免疫動物の種類、個体差等により異なるが、一般には、抗原投与回数 2～6 回、投与間隔 1～2 週間が好ましい。また、抗原の投与量は動物の種類、個体差等により異なるが、一般には、10-100μg/μl 程度とする。c）細胞融合　上記の投与スケジュールの最終免疫日から 1～5 日後に被免疫動物から抗体産生細胞を含む脾臓細胞またはリンパ細胞を無菌的に取り出す。これらの脾臓細胞またはリンパ細胞からの抗体産生細胞の分離は、公知の方法に従って行うことができる。

次いで、抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合する。このミエローマ細胞には特段の制限はなく、公知の細胞株から適宜に選択して用いることができる。ただし、融合細胞からハイブリドーマを選択する際の利便性を考慮して、その選択手続が確立している HGPRT（Hpoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase）欠損株を用いるのが好ましい。すなわち、マウス由来の X63-Ag8(X63)、NS1-Ag4/1(NS-1)、P3X63-Ag8.U1(P3U1)、X63-Ag8.653(X63.653)、SP2/0-Ag14(SP2/0)、MPC11-45.6TG1.7(45.6TG)、FO、S149/5XXO,BU.1 等、ラット由来の 210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3)等、ヒト由来の U266AR(SKO-007)、GM1500・GTG-A12(GM1500)、UC729-6、LICR-LOW-HMy2(HMy2)、8226AR/NIP4-1(NP41)等である。

抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合は、公知の方法に従い、細胞の生存率を極度に低下させない程度の条件下で適宜実施することができる。そのような方法は、例えば、ポリエチレングリコール等の高濃度ポリマー溶液中で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを混合する化学的方法、電気的刺激を利用する物理的方法等を用いることができる。

融合細胞と非融合細胞の選択は、例えば、公知の HAT（ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン）選択法により行うのが好ましい。この方法は、アミノプテリン存在下で生存し得ない HGPRT 欠損株のミエローマ細胞を用いて融合細胞を得る場合に有効である。すなわち、未融合細胞および融合細胞を HAT 培地で培養することにより、アミノプテリンに対する耐性を持ち合わせた融合細胞のみを選択的に残存させ、かつ増殖させることができる。d）ハイブリドーマのスクリーニング　目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞のスクリーニングは、公知の酵素免疫検定法（EIA：Enzyme Immunoassay）、放射線免疫測定法（RIA：Radio Immunoassay）、蛍光抗体法等により行うことができる。また、融合タンパク質を免疫原とした場合には、融合パートナーであるタンパク質について上記の各スクリーニング方法を併せて実施することによって、より確実にハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることができる。

このようなスクリーニングによって、抗原ペプチドと特異的に結合するモノクローナル抗体をそれぞれに産生するハイブリドーマ細胞群が得られる。

なお、スクリーニング後のハイブリドーマ細胞は、メチルセルロース法、軟アガロース法、限界希釈法等の公知の方法によりクローニングし、抗体産生に用いる。

以上の通りの方法によって得たハイブリドーマ細胞は、液体窒素中または-80℃以下の冷凍庫中に凍結状態で保存することができる。２：モノクローナル抗体の取得および精製　上記１で作成したハイブリドーマ細胞を公知の方法で培養することによって、抗原ペプチドと特異的に結合するモノクローナル抗体を得ることができる。

培養は、例えば、上記のクローニング法で使用した同じ組成の培地中で培養してもよく、あるいはモノクローナル抗体を大量に産生するためには、マウス

腹腔内にハイブリドーマ細胞を注射し、腹水からモノクローナル抗体を採取してもよい。

このようにして得たモノクローナル抗体は、例えば硫安塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法等により精製することができる。

本発明の標識抗体は、本発明の抗体と同一のポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であって、標識物質によって標識されている抗体である。標識物質は、酵素、放射性同位体または蛍光色素を使用することができる。酵素は、turnover number が大であること、抗体と結合させても安定であること、基質を特異的に着色させる等の条件を満たすものであれば特段の制限はなく、通常の EIA に用いられる酵素、例えば、ペルオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコース－６－リン酸化脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素等を用いることもできる。また、酵素阻害物質や補酵素等を用いることもできる。これら酵素と抗体との結合は、マレイミド化合物等の架橋剤を用いる公知の方法によって行うことができる。基質としては、使用する酵素の種類に応じて公知の物質を使用することができる。例えば酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、3,3',5,5'－テトラメチルベンジシンを、また酵素としてアルカリフォスファターゼを用いる場合には、パラニトロフェノール等を用いることができる。放射性同位体としては、^{125}I や ^{3}H等の通常の RIA で用いられているものを使用することができる。蛍光色素としては、フルオレッセンスイソチオシアネート（FITC）やテトラメチルローダミンイソチオシアネート（TRITC）等の通常の蛍光抗体法に用いられるものを使用することができる。

本発明の癌診断方法は、被験体の血清中に、本発明の抗原ペプチドと結合する抗体が存在か否かを試験し、血清中にその抗体が存在する被験体を癌患者または癌ハイリスク者と判定する。すなわち、本発明の抗原ペプチドは、患者の血清中の抗体（IgG）と結合するペプチドであるから、被験体の血清と反応させ、これらの抗原ペプチドと結合する抗体を含む血清を、癌患者またはそのハイリスク患者の血清として判定することができる。なおその際に、２種類の抗原ペプチドについて血清中抗体との結合を判定することが好ましい。

具体的な診断は、例えば抗原ペプチドに被験体血清を接触させ、抗原ペプチドと被験体血清中の IgG 抗体とを液相中において反応させる。さらに血清中の IgG 抗体と特異的に結合する標識 IgG 抗体を反応させて、標識 IgG 抗体のシグナルを検出すればよい。標識 IgG 抗体の標識物質は、上記の標識抗体において例示したような酵素、放射性同位体または蛍光色素を使用することができる。酵素を用いる場合には、酵素作用によって分解して発色する基質を加え、基質の分解量を光学的に測定することによって酵素活性を求め、これを結合抗体量に換算し、標準値との比較から抗体量が算出される。放射生同位体を用いる場合には、放射性同位体の発する放射線量をシンチレーションカウンター等により測定する。また、蛍光色素を用いる場合には、蛍光顕微鏡を組み合わせた測定装置によって蛍光量を測定すればよい。

シグナルの検出は、実施例に示したようなウエスタンブロット分析を採用することができる。あるいは、抗原ペプチド＋血清中抗体＋標識 IgG 抗体の結合体を、公知の分離手段（クロマト法、塩析法、アルコール沈殿法、酵素法、固相法等）によって分離し、標識 IgG 抗体のシグナルを検出するようにしてもよい。

なお、このような診断方法の簡便かつ広範囲な実施を可能とするものとして、本発明の診断キットが提供される。

本発明の診断方法はまた、抗原ペプチドの１種類以上をプレート上に固定化し、この基板上において被験体血清の抗体との結合を試験する方法（これもまた本発明に包含される）として実施することもできる。抗原ペプチドを基板上に固定化することによって、未結合の標識結合分子を容易に除去することができる。また、このような診断方法の簡便かつ広範囲な実施を可能とするものとして、本発明の診断キットが提供される。

本発明の診断方法は、被験体の生体試料中に、本発明の抗体、もしくは本発明の標識抗体と結合する抗原ペプチドが存在するか否かを試験し、試料中にその抗原ペプチドが存在する被験体を大腸癌患者またはそのハイリスク者と判定する。すなわち、ここで使用する抗体または標識抗体は、大腸癌細胞で発現している抗原ペプチドと特異的に結合する抗体であるから、この抗体と結合する抗原ペプチドを含む生体試料を、大腸癌患者または大腸癌ハイリスク患者の試料として判定することができる。なおその際に、好ましくは２種の抗体について試料中の抗原ペプチドとの結合を判定することが好ましい。また、生体試料としては、血液や血液細胞（単核球等）を対象とすることができる。

本発明の診断方法における一つの態様は、抗体と抗原ペプチドとの結合を液相系において行う方法である。例えば、本発明の標識抗体と生体試料とを接触させて標識抗体と抗原ペプチドを結合させ、この結合体を本明細書において記載されるような方法で分離し、標識シグナルを同様の方法で検出する。このような診断方法の簡便かつ広範囲な実施を可能とするものとして、本発明の診断キットが提供される。

液相系での診断の別の方法は、本発明の抗体（一次抗体）と生体試料とを接触させて一次抗体と抗原ペプチドを結合させ、この結合体に本発明の標識抗体（二次抗体）を結合させ、この三者の結合体における標識シグナルを検出する。あるいは、さらにシグナルを増強させるためには、非標識の二次抗体を先ず抗体＋抗原ペプチド結合体に結合させ、この二次抗体に標識物質を結合させるよ

うにしてもよい。このような二次抗体への標識物質の結合は、例えば二次抗体をビオチン化し、標識物質をアビジン化しておくことによって行うことができる。あるいは、二次抗体の一部領域（例えば、Fc 領域）を認識する抗体（三次抗体）を標識し、この三次抗体を二次抗体に結合させるようにしてもよい。なお、一次抗体と二次抗体は、両方ともモノクローナル抗体を用いることもでき、あるいは、一次抗体と二次抗体のいずれか一方をポリクローナル抗体とすることもできる。液相からの結合体の分離やシグナルの検出は、本明細書において記載されるように行うことができる。また、このような診断方法の簡便かつ広範囲な実施を可能とするものとして、本発明の診断キットが提供される。

本発明の診断方法における別の態様は、抗体と抗原ペプチドとの結合を固相系において試験する方法である。この固相系における方法は、極微量の抗原ペプチド検出と操作の簡便化のため好ましい方法である。すなわちこの固相系の方法は、本発明の抗体（一次抗体）を樹脂プレート等に固定化し、この固定化抗体に抗原ペプチドを結合させ、非結合ペプチドを洗浄除去した後、プレート上に残った抗体＋抗原ペプチド結合体に標識抗体（二次抗体）を結合させ、この二次抗体のシグナルを検出する方法である。この方法は、いわゆる「サンドイッチ法」と呼ばれる方法であり、マーカーとして酵素を用いる場合には、「ELISA（enzyme linked immunosorbent assay）」として広く用いられている方法である。一次抗体と二次抗体は、両方ともモノクローナル抗体を用いることもでき、あるいは、一次抗体と二次抗体のいずれか一方をポリクローナル抗体とすることもできる。シグナルの検出は、本明細書に記載されるように行うことができる。また、このような診断方法の簡便かつ広範囲な実施を可能とするものとして、本発明の診断キットが提供される。

本発明の診断キットは、本発明の診断方法を行うための試薬キットである。このようなキットは、被検成分の種類に応じて各種のものが市販されており、この発明の診断キットも、この発明によって提供される抗原ペプチド、抗体お

よび／または標識抗体を用いることを除き、公知のキットに用いられている各要素によって構成することができる。

本発明の診断方法は、被験体の生体試料中に、本発明の mRNA が存在するか否かを試験し、試料中にその mRNA が存在する被験体を大腸癌患者またはそのハイリスク者と判定する。生体試料としては、便や血液、血液細胞（単核球等）を対象とすることができる。mRNA の検出、測定は公知の RT-PCR 法や定量的 RT-PCT 法によって行うことができ、その場合の PCR は本発明のプライマーセットを用いることができる。これらのプライマーセットは、配列番号１または３の塩基配列に基づき設計し、合成・精製の各工程を経て調製することができる。なお、プライマー設計の留意点として、例えば以下を指摘することができる。プライマーのサイズ（塩基数）は、鋳型 DNA との間の特異的なアニーリングを満足させることを考慮し、15-40 塩基、望ましくは 15-30 塩基である。ただし、LA（long accurate）PCR を行う場合には、少なくとも 30 塩基が効果的である。センス鎖（5'末端側）とアンチセンス鎖（3'末端側）からなる１組あるいは１対（２本）のプライマーが互いにアニールしないよう、両プライマー間の相補的配列を避けると共に、プライマー内のヘアピン構造の形成を防止するため自己相補配列をも避けるようにする。さらに、鋳型 DNA との安定な結合を確保するため GC 含量を約 50％にし、プライマー内において GC-rich あるいは AT-rich が偏在しないようにする。アニーリング温度は Tm（melting temperature）に依存するので、特異性の高い PCR 産物を得るため、Tm 値が 55-65℃で互いに近似したプライマーを選定する。また、PCR におけるプライマー使用の最終濃度が約 0.1～約１μM になるよう調整する等を留意することも必要である。また、プライマー設計用の市販のソフトウェア、例えば Oligo™［National Bioscience Inc.（米国）製］、GENETYX［ソフトウェア開発（株）（日本）製］等を用いることもできる。

本発明の診断方法は、本発明によって提供されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを備えたマイクロアレイによっても実施することができる。マイクロアレイの作製方法としては、固相担体表面で直接オリゴヌクレオチドを合成する方法（オン・チップ法）と、予め調製したオリゴヌクレオチドを固相担体表面に固定する方法とが知られている。この発明で使用するマイクロアレイは、このいずれの方法でも作製することができる。オン・チップ法としては、光照射で選択的に除去される保護基の使用と、半導体製造に利用されるフォトリソグラフィー技術および固相合成技術とを組み合わせて、微少なマトリックスの所定の領域での選択的合成を行う方法（マスキング技術：例えば、Fodor, S. et al. Science251: 767, 1991）等によって行うことができる。一方・予め調製したオリゴヌクレオチドを固相担体表面に固定する場合には、官能基を導入したオリゴヌクレオチドを合成し、表面処理した固相担体表面にオリゴヌクｉレオチドを点着し、共有結合させる（例えば、Lamture, J. B. et al. Nucl. Acids Res. 22: 2121-2125, 1994; Guo, ZI et al. Nucl. Acids Res. 22: 5456-5465, 1994）。オリゴヌクレオチドは、一般的には、表面処理した固相担体にスペーサーやクロスリンカーを介して共有結合させる。ガラス表面にポリアクリルアミドゲルの微小片を整列させ、そこに合成オリゴヌクレオチドを共有結合させる方法も知られている（Yershov, G, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4913, 1996）。また、シリカマイクロアレイ上に微小電極のアレイを作製し、電極上にはストレプトアビジンを含むアガロースの浸透層を設けて反応部位とし、この部位をプラスに荷電させることでビオチン化オリゴヌクレオチドを固定し、部位の荷電を制御することで、高速で厳密なハイブリダイゼーションを可能にする方法も知られている（Sosnowski, R, G. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1119-1123, 1997）。このマイクロアレイを使用して固形癌を診断する場合には、例えば被験者の細胞から単離したｍＲＮＡを鋳型として、ｃＤＮＡを合成し、ＰＣＲ増

幅する。その際に、標識ｄＮＴＰを取り込ませて標識ｃＤＮＡとする。この標識ｃＤＮＡをマクロアレイに接触させ、マイクロアレイのキャブチャ５－プローブ（オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド）にハイブリダイズしたｃＤＮＡを検出する。ハイブリダイゼーションは、９６穴もしくは３８４穴プラスチックプレートに分注して標識ｃＤＮＡ水性液を、マイクロアレイ上に点着することによって実施することができる。点着の量は、１～０ｎ１程度とすることができる。ハイブリダイゼーションは、室温～７０℃の温度範囲で、６～時間の範囲で実施することが好ましい。ハイブリダイゼーション終了後、界面活性剤と緩衝液との混合溶液を用いて洗浄を行い、未反応の標識ｃＤＮＡを除去する。界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）を用いることが好ましい。緩衝液としては、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等を用いることができるが、クエン酸緩衝液を用いることが好ましい。このように、本発明は、アレイを用いても診断することが可能である。ＤＮＡアレイについては、（秀潤社編、細胞工学別冊「ＤＮＡマイクロアレイと最新ＰＣＲ法」）に広く概説されている。プロテインアレイについては、Ｎａｔ　Ｇｅｎｅｔ．２００２　Ｄｅｃ；３２　Ｓｕｐｐ１：５２６－３２に詳述されている。遺伝子発現の分析法としては、上述に加えて、ＲＴ－ＰＣＲ、ＲＡＣＥ法、ＳＳＣＰ法、免疫沈降法、ｔｗｏ－ｈｙｂｒｉｄシステム、インビトロ翻訳などが挙げられるがそれらに限定されない。そのようなさらなる分析方法は、例えば、ゲノム解析実験法・中村祐輔ラボ・マニュアル、編集・中村祐輔　羊土社（２００２）などに記載されており、本明細書においてそれらの記載はすべて参考として援用される。

以下に、本発明をより詳細に説明する。

（ＦＩＲの核酸形態）

１つの局面において、本発明は、ＦＩＲをコードする核酸分子を含む、癌（例えば、直腸癌または結腸癌（これらを総称して大腸癌とも言う）を含むｃ－ｍｙｃ高発現癌）の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（例えば、がん診療レジデントマニュアル第２版、編集：国立がんセンター中央病院内科レジデント、医学書院、２０００を参照）。本発明では、癌の発症が、ＦＩＲの異常発現と予想外に関連していること、および正常型ＦＩＲを投与すると癌が治癒され得ることが明らかになった。このような関連、ならびにそれを利用した診断および治療効果は従来知られておらず、したがって、本発明のＦＩＲの核酸形態およびそれに関連する発明は、従来技術より優れた効果を示す。

従って、１つの実施形態において、本発明は、（ａ）配列番号１（ＦＩＲ５４２をコードする）に記載の塩基配列もしくはその相補体またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；（ｂ）配列番号２に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド；（ｃ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；（ｄ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または（ｅ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも７

０％である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含む、核酸分子を提供する。

１つの好ましい実施形態において、上記（ｃ）における置換、付加および欠失の数は、限定され、例えば、５０以下、４０以下、３０以下、２０以下、１５以下、１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、２以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、ＦＩＲと類似するかまたは実質的に同一の活性を有する、あるいはＦＩＲの異常型活性（例えば、ＦＢＰとの結合不良など））限り、多い数であってもよい。

別の好ましい実施形態において、上記ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号２に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、ＦＢＰとの相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。これらは例えば、免疫学的アッセイ、リン酸化定量などによって測定することができる。ここで、ＦＢＰに結合する能力は、配列番号２における３７２位～４４２位に記載される配列によって規定され、ＦＢＰを用いて測定することができる。

別の好ましい実施形態において、（ｄ）に記載の対立遺伝子変異体は、配列番号１に示す核酸配列と少なくとも９９％の相同性を有することが有利である。

上記種相同体は、その種の遺伝子配列データベースが存在する場合、そのデータベースに対して、本発明のＦＩＲ（またはより好ましくはＦＩＲ５４２）をクエリ配列として検索することによって同定することができる。あるいは、本発明のＦＩＲ（またはより好ましくはＦＩＲ５４２）の全部または一部をプローブまたはプライマーとして、その種の遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。そのような同定方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載される文献にも記載されている。種相同体は、例えば、配列番号１に示す核酸配列と少なくとも約３０％の相同

性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、相同であり得る。

好ましい実施形態において、上記（ａ）～（ｅ）のいずれか１つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性は、少なくとも約８０％であり得、より好ましくは少なくとも約９０％であり得、さらに好ましくは少なくとも約９８％であり得、もっとも好ましくは少なくとも約９９％であり得る。最も好ましくは、本発明のＦＩＲは、ＦＩＲ５４２である。

好ましい実施形態において、本発明のＦＩＲをコードする核酸分子またはそのフラグメントおよび改変体は、少なくとも８の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも１０の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも１５の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも２０の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、９、１１、１２、１３、１４、１６など）あるいは、それ以上の数（例えば、２１、２２、．．．３０、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、アンチセンス、ＲＮＡｉ、マーカー、プライマー、プローブ、所定の因子と相互作用し得ること）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号１に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約８のヌクレオチド長であり得、好ましくは約１０ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約１５ヌクレオチド長であり得、好ましくは約１７ヌクレオチド長であり得る。

１つの実施形態において、ＦＩＲをコードする核酸分子は、配列番号１の核酸配列の全範囲を含む。より好ましくは、ＦＩＲをコードする核酸分子は、配列番号１の核酸配列の全範囲からなる。

（特定のＦＩＲ核酸形態）

別の好ましい実施形態において、本発明は、配列番号１で示される配列またはその相補体を含む核酸分子を提供する。このような配列は、正常な組織でも発現しており、正常であることの指標として使用され得る。あるいは、その発現レベルが異常であれば、癌の発症リスクがあると判断され得る。このような正常なＦＩＲ核酸形態は、外部から投与することによって、ｃ－ｍｙｃ発現細胞に対してアポトーシスを起こさせることができ、従って、抗癌剤として使用することができる。

他の好ましい実施形態において、本発明は、（ａ）配列番号１またはその相補体において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列；または（ｂ）配列番号１１、１３および１５からなる群より選択される少なくとも１つの配列もしくはその相補体、または該少なくとも１つの配列もしくはその相補体において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列、を含む核酸分子を提供する。このような配列は、正常な組織では発現していないかまたはほとんど発現しておらず、しかも癌組織に特異的に発現していることから、その発現自体が癌の診断の指標として使用することができる。これらの核酸分子は、いずれも、癌組織に特異的であることから、癌の確定診断としても使用可能である。あるいは、これらの発現を、癌に罹患していない組織における発現と比較することによって（好ましくは統計学的処理による）癌の確定診断を行うこともできる。このような癌は、好ましくは、ｃ－ｍｙｃ高発現癌（例えば、直腸癌および／または結腸癌などを含む）である。このような核酸分子を減少させるような因子は、

治療薬として使用することができる可能性がある。従って、そのような因子もまた、本発明の範囲内にあることが理解される。

別の好ましい実施形態において、本発明の上記核酸分子における上記改変は、核酸の置換；配列番号１の３６９位と３７０位との間もしくは配列番号１５の１７６位と１７７位との間への核酸の付加；あるいは配列番号１の３６９位までもしくは配列番号１１の３０５位までまたは配列番号１３もしくは配列番号１５の１７６位までにおける核酸の欠失；あるいはそれらの組合せであることが好ましい。理論に束縛されることは望まないが、このような特定の改変は、本発明のＦＩＲの正常な機能を変化させ、好ましくは悪化させることによって、癌細胞の異常発生を引き起こす原因または結果であり得る。したがって、このような特定の配列を有するかまたは含む核酸分子を検出することによって、癌の診断の使用することができるという有用性を有する。

１つの好ましい実施形態において、本発明のＦＩＲ核酸分子における好ましい改変は、配列番号１の５’末端から約４００塩基までの範囲内に存在する。この範囲の改変が癌との関係が深いと考えられるからであるが、それに限定されない。より好ましくは、この改変は、配列番号１における約１５０位～約３６０位の範囲内における改変であり得る。この範囲の改変がより癌との関連が高いと考えられる症例が見出されたからであるが、本発明は、それに限定されないことが理解される。したがって、ＦＩＲの異常発現または機能異常を引き起こすような改変である限り、本発明の診断に使用され得ることが理解される。

別の好ましい実施形態において、本発明のＦＩＲ核酸分子における改変は、配列番号１において、コードするアミノ酸の非保存的置換を含む。このような非保存的置換を含むことによって、コードされるアミノ酸配列によって担われるポリペプチドの機能に異常が生じ得るからである。ＦＩＲの正常な機能の一つは、ｃ－ｍｙｃ発現細胞にアポトーシスを引き起こすことであり、その機能

が異常になっていること、あるいは、正常なＦＩＲの機能を阻害するような分子の存在は、癌の発症と密接に関連すると考えられる。

他の好ましい実施形態において、改変を含む本発明のＦＩＲ核酸分子（改変体とも言う）は、配列番号１１、１３、１５、１７、１９および２１からなる群より選択される配列を含む。これらの具体的な配列は、正常な組織では発現されておらず、癌組織において特異的に発現していることから、本発明のＦＩＲの改変体の具体的配列の例示としてあげることができるがそれらに限定されない。

（ＦＩＲの核酸形態に特異的な因子）

１つの局面において、本発明は、ＦＩＲをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む、癌（例えば、直腸癌または結腸癌（これらを総称して大腸癌とも言う）を含むｃ－ｍｙｃ高発現癌）の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。したがって、本発明は、本明細書に記載される任意のＦＩＲをコードする核酸分子またはその改変体もしくはフラグメントに対して特異的な因子を提供する。ここで、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（例えば、がん診療レジデントマニュアル第２版、編集：国立がんセンター中央病院内科レジデント、医学書院、２０００を参照）。本発明では、癌の発症が、ＦＩＲの異常発現と予想外に関連していること、および正常型ＦＩＲを投与すると癌が治癒され得ることが明らかになった。このような関連、ならびにそれを利用した診断および治療効果は従来知られておらず、したがって、本発明の因子は、従来技術により提供されるものより優れた効果を示す。

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される因子であり得る。このような因子は、本発明の核酸分子に特異的に結合するものであれば、どのようなものでもよいことが理解され得る。

好ましい実施形態では、本発明の因子は、核酸分子である。本発明の因子が核酸分子である場合、そのような核酸分子は、少なくとも８の連続するヌクレオチド長であり得、好ましくはＦＩＲの核酸配列（例えば、配列番号１）に対して特異的に結合し得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも１０の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも１５の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも２０の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、９、１１、１２、１３、１４、１６など）あるいは、それ以上の数（例えば、２１、２２、．．．３０、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、アンチセンス、ＲＮＡｉ、マーカー、プライマー、プローブ）として使用することができるかまたは所定の因子と相互作用することができる限り、その上限の長さは、配列番号１、１１などに示す配列またはその相補体の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約８のヌクレオチド長であり得、好ましくは約１０ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約１５ヌクレオチド長であり得、好ましくは約１７ヌクレオチド長であり得る。

従って、１つの例示的な実施形態において、本発明の因子は、上記（ａ）～（ｅ）のいずれかのＦＩＲポリヌクレオチドの核酸配列に対して相補的な配列またはそれに対して少なくとも７０％の同一性を有する配列を有する核酸分子であり得る。

別の例示的な実施形態において、本発明の因子は、（ａ）配列番号１に記載の塩基配列もしくはその相補体またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；（ｂ）配列番号２に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド；（ｃ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；（ｄ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または（ｅ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも７０％である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、のいずれかのＦＩＲポリヌクレオチドの核酸配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子であり得る。ストリンジェンシーは、高くても、中程度であっても、低くてもよく、程度は、当業者が適宜状況に応じて決定することができる。

あるいは、本発明の因子は、配列番号１で示される配列またはその相補体を含む核酸分子に対して特異的な因子であることが好ましい。このような配列は、正常な組織において存在する形態のＦＩＲを同定することができることから、ある組織または個体の癌化の程度を調べるために有用である。

好ましくは、配列番号１で示される配列またはその相補体を含む核酸分子に対して特異的な因子は、（ａ）配列番号１またはその相補体において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列；または（ｂ）配列番号１１、１３および１５からなる群より選択される少なくとも１つの配列もしくはその相補体、または該少なくとも１つの配列もしくはその相補体において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも

１つの改変を含む配列、を含む核酸分子には特異的に反応しないことが好ましい。このように弁別可能に反応することによって、ＦＩＲの改変体と正常なＦＩＲとを弁別して検出することができるからである。そのような検出によって、癌（特に、（直腸癌または結腸癌（これらを総称して大腸癌とも言う）を含むｃ－ｍｙｃ高発現癌）の従来不可能であった正確な診断を行うことができるという優れた効果および有用性を達成する。

別の好ましい実施形態において、本発明の因子は、（ａ）配列番号１またはその相補体において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列；または（ｂ）配列番号１１、１３および１５からなる群より選択される少なくとも１つの配列もしくはその相補体、または該少なくとも１つの配列もしくはその相補体において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列、を含む核酸分子に特異的に反応することが好ましい。このような改変体に対して特異的な因子を使用することによって、癌に罹患した個体または組織部分を検出することが容易となるという有用性が提供される。この因子は、好ましくは、配列番号１で示される配列またはその相補体を含む核酸分子に対しては特異的に反応しないことが有利である。このように弁別可能に反応することによって、ＦＩＲの改変体と正常なＦＩＲとを弁別して検出することができるからである。そのような検出によって、癌（特に、（直腸癌または結腸癌（これらを総称して大腸癌とも言う）を含むｃ－ｍｙｃ高発現癌）の従来不可能であった正確な診断を行うことができるという優れた効果および有用性を達成する。

別の好ましい実施形態では、本発明の因子は、ＦＩＲの核酸分子のアンチセンスまたはＲＮＡｉである。ＲＮＡｉは、ｓｉＲＮＡであってもｓｈＲＮＡであってもよく、そのような例としては、たとえば、約２０塩基前後（例えば、代表的には約２１～２３塩基長）またはそれ未満の長さの二本鎖ＲＮＡであって、好ましくは、５’－リン酸、３’－ＯＨの構造を有しており、３’末端は

約２塩基突出している。ｓｈＲＮＡはまた、好ましくは、３’突出末端を有し得る。二本鎖部分の長さは特に限定されないが、好ましくは約１０ヌクレオチド長以上、より好ましくは約２０ヌクレオチド長以上であり得る。ここで、３’突出末端は、好ましくはＤＮＡであり得、より好ましくは少なくとも２ヌクレオチド長以上のＤＮＡであり得、さらに好ましくは２～４ヌクレオチド長のＤＮＡであり得る。

別の好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子であり、ＰＣＲなどの核酸増幅反応などにおけるプライマーとして使用され得、あるいは、サザンブロットなどのプローブとして使用され得る。

好ましい実施形態において、本発明の因子は、標識されているかまたは標識と結合し得るものであることが有利であり得る。そのように標識がされている場合、本発明の因子によって測定することができる種々の状態を直接および／または容易に測定することができる。そのような標識は、識別可能に標識される限り、どのような標識でもよく、例えば、蛍光、リン光、化学発光、放射能、酵素基質反応および抗原抗体反応などの技法が挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、その因子が抗体などの免疫反応を利用して相互作用する場合、ビオチン－ストレプトアビジンのような免疫反応においてよく利用される系を用いてもよい。

（ＦＩＲ核酸形態を用いた診断キットおよび方法）

別の局面において、本発明は、Ａ）（ａ）配列番号１（ＦＩＲ５４２をコードする）に記載の塩基配列もしくはその相補体またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；（ｂ）配列番号２に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド；（ｃ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、

生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；（ｄ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または（ｅ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも７０％である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含む、核酸分子に対して特異的な第一の因子；およびＢ）該第一の因子に起因するシグナルを用いて該核酸分子の発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該核酸分子の発現量に比較して対象の被験体の対象部分における該核酸分子の発現が高い場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、手段、を備える、癌診断キットを提供する。ここで、診断対象となる癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌であることが好ましいが、それに限定されない。理論に束縛されることは望まないが、本発明のＦＩＲは、ｃ－ｍｙｃとの関連が高いことが指摘されているからである。このようなｃ－ｍｙｃ高発現癌としては、例えば、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。このようなＦＩＲに特異的な因子としては、本明細書において記載されるような任意の因子を使用することができる。第一の因子は、ＦＩＲの正常型および改変体のいずれとも特異的に反応してもよく、あるいは、ＦＩＲの正常型または改変体のいずれか一方と特異的に反応してもよい。その反応特異性さえ理解して提供される限り、どのような特異性を有する因子であっても本発明において利用することができ、したがって、そのような因子およびそれを含むキットは、本発明の範囲内にあることが理解される。１つの実施形態では、正常型と改変体との共通の配列（例えば、配列番号１、１１、１３、１５、１７、１９、２１などの３’末端側の配列であって、例えば、１００ヌクレオチド長の配列など）に対して特異的な因子が挙げられるがそれらに限定されない。

ここで、第一核酸分子の発現量の測定は、第一の因子に起因する任意のシグナルを用いて行うことができる。そのようなシグナルとしては、例えば、物理的信号（例えば、蛍光、発光など）、化学的信号（例えば、染色など）、生化学的信号（例えば、酵素反応）、生物学的信号（例えば、微生物の生存の判定）などが挙げられるがそれらに限定されない。このようなシグナルは、被験体の生体試料中に、本発明の mRNA が存在するか否かを直接または間接的に試験することが判定できるようなものであれば、どのようなものでも使用することができる。この場合、そのようなシグナルが検出される場合、試料中にその mRNA の存在量に異常が存在する被験体を癌患者またはそのハイリスク者と判定することができる。

特定の実施形態において、本発明は、A）配列番号１で示される配列またはその相補体を含む核酸分子（第二核酸分子）に対して特異的な第二の因子；B）該第二の因子に起因するシグナルを用いて該核酸分子の発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該核酸分子の発現量と、対象の被験体の対象部分における該核酸分子の発現量とが異なる場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、手段、を備える、癌診断キットを提供する。この特定の実施形態において、このようなＦＩＲに特異的な因子としては、本明細書において記載されるような任意の第二の因子を使用することができる。第二の因子は、正常型ＦＩＲと特異的に反応する限り、どのようなものを使用してもよい。好ましくは、第二の因子は、改変体とは特異的に反応しないことが有利であり得る。このような性質さえ有する限り、任意の第二の因子がその反応特異性さえ理解して提供され、どのような特異性を有する因子であっても本発明において利用することができ、したがって、そのような因子およびそれを含むキットは、本発明の範囲内にあることが理解される。１つの実施形態では、正常型と改変体との改変配列（例えば、５’末端側の配列であって、例えば、約４００ヌクレオチド

長における任意の配列など）に対して特異的な因子が挙げられるがそれらに限定されない。

ここで、第二核酸分子の発現量の測定は、第二の因子に起因する任意のシグナルを用いて行うことができる。そのようなシグナルとしては、例えば、物理的信号（例えば、蛍光、発光など）、化学的信号（例えば、染色など）、生化学的信号（例えば、酵素反応）、生物学的信号（例えば、微生物の生存の判定）などが挙げられるがそれらに限定されない。このようなシグナルは、被験体の生体試料中に、本発明の mRNA が存在するか否かを直接または間接的に試験することが判定できるようなものであれば、どのようなものでも使用することができる。この場合、そのようなシグナルが検出される場合、試料中にその mRNA の発現量に異常が存在する被験体を癌患者またはそのハイリスク者と判定することができる。

特定の実施形態において、本発明は、A）（a）配列番号１またはその相補体において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列；または（b）配列番号１１、１３および１５からなる群より選択される少なくとも１つの配列もしくはその相補体、または該少なくとも１つの配列もしくはその相補体において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列、を含む第三核酸分子に対して特異的な第三の因子；ならびにB）該第三の因子に起因するシグナルを用いて該第三核酸分子の発現量を測定するための手段であって、対象の被験体の対象部分において該核酸分子が検出される場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、手段、を備える、癌診断キットを提供する。この第三の因子は、ＦＩＲの改変体に対して特異的であり、その検出を行うことができることから、第三の因子に起因するシグナルを測定することによって、癌の診断を行うことが可能となる。ここで、第三の因子は、本明細書における上記「ＦＩＲの核酸形態に特異的な因子」節において説明されるような任意の形態をとることができる。

第三の因子は、ＦＩＲの改変体と特異的に反応し、ＦＩＲの正常型とは特異的に反応してもそうでなくてもよい。好ましくは、第二の因子は、正常型とは反応しないことが好ましい。ただし、その反応特異性さえ理解して提供される限り、どのような特異性を有する因子であっても本発明において利用することができ、したがって、そのような因子およびそれを含むキットは、本発明の範囲内にあることが理解される。１つの実施形態では、改変体に特異的な部分（例えば、配列番号１１、１３、１５、１７、１９、２１の５’末端側の配列であって、例えば、１００ヌクレオチド長の配列など）に対して特異的な因子が挙げられるがそれらに限定されない。

ここで、第三核酸分子の発現量の測定は、第三の因子に起因する任意のシグナルを用いて行うことができる。そのようなシグナルとしては、例えば、物理的信号（例えば、蛍光、発光など）、化学的信号（例えば、染色など）、生化学的信号（例えば、酵素反応）、生物学的信号（例えば、微生物の生存の判定）などが挙げられるがそれらに限定されない。このようなシグナルは、被験体の生体試料中に、本発明の第三核酸分子に対応する mRNA が存在するか否かを直接または間接的に試験することが判定できるようなものであれば、どのようなものでも使用することができる。この場合、そのようなシグナルが検出される場合、試料中にその mRNA の発現が存在する被験体を癌患者またはそのハイリスク者と判定することができる。

本発明の癌診断キットまたは方法において好ましい実施形態では、上記対象の被験体の対象部分における上記第三核酸分子の検出は、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該核酸分子の発現量に比較して対象の被験体の対象部分における該第三核酸分子の発現が高いことを検出することであり得る。

別の特定の実施形態において、本発明は、Ａ）配列番号１で示される配列またはその相補体を含む核酸分子（第二核酸分子）に対して特異的な第二の因

子；B）（a）配列番号１またはその相補体において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列；または（b）配列番号１１、１３および１５からなる群より選択される少なくとも１つの配列もしくはその相補体、または該少なくとも１つの配列もしくはその相補体において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列、を含む核酸分子（第三核酸分子）に対して特異的な第三の因子；C）該第二の因子および該第三の因子に起因するシグナルを識別可能に検知して、第二核酸分子と第三核酸分子のそれぞれの発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における第二核酸分子の発現に比較して対象の被験体の対象部分における第二核酸分子の発現が高く、かつ、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における第三核酸分子の発現に比較して対象の被験体の対象部分における第三核酸分子の発現が高い場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、手段、を備える、癌診断キットを提供する。

ここで、好ましくは、C）手段は、第二核酸分子と第三核酸分子との相対存在比を比較する手段を包含する。好ましい実施形態では、第二の因子は第三核酸分子に特異的に反応しないか、または、第三の因子は第二核酸分子に特異的に反応しないことが有利である。識別可能に両方の核酸分子を検出することができるからである。より好ましい実施形態では、第二の因子は第三核酸分子に特異的に反応しせず、かつ、第三の因子は第二核酸分子に特異的に反応しないことの両方であることが有利である。これらの因子によって検出されるシグナル強度が、対象とする核酸分子の量により正確に反映されるからである。これらの第二の因子と、第三の因子とは、識別可能に標識されているかまたは標識され得ることが好ましい。ここで、識別可能に標識されている因子は、その因子が、すでに、識別可能な標識を有していることを意味し、２つ以上の因子が識別可能に標識され得るとは、別の処理をその因子に行うことによって、その

２つ以上の因子を識別することができるようになることをいう。このような場合、本発明のキットは、第二の因子と、第三の因子とを、識別可能に標識する因子をさらに含む。このような識別可能な標識の識別は、物理的様式（例えば、蛍光、発光など）、化学的様式（例えば、特定の化学的切断、染色など）、生化学的様式（例えば、酵素反応）、生物学的様式（例えば、微生物の生存の判定）などによって行うことができる。

他の特定の実施形態において、本発明は、A）（ａ）配列番号１に記載の塩基配列もしくはその相補体またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；（ｂ）配列番号２に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド；（ｃ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；（ｄ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または（ｅ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも７０％である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含む、核酸分子（第一核酸分子）に対して特異的な第一の因子；B）（ａ）配列番号１またはその相補体において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列；または（ｂ）配列番号１１、１３および１５からなる群より選択される少なくとも１つの配列もしくはその相補体、または該少なくとも１つの配列もしくはその相補体において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列、を含む核酸分子（第三核酸分子）に対して特異的な第三の因子；C）第一の因子および第三の因子に起因するシグナルを識別可能に検知して、第一核酸分子と第三核酸

分子のそれぞれの発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における第一核酸分子の発現量における第三核酸分子の発現量の割合が、対象の被験体の対象部分における第一核酸分子の発現量における第三核酸分子の発現量の割合よりも高い場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、手段、を備える、癌診断キットを提供する。

ここで、診断対象となる癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌であることが好ましいが、それに限定されない。理論に束縛されることは望まないが、本発明のＦＩＲは、ｃ－ｍｙｃとの関連が高いことが指摘されているからである。このようなｃ－ｍｙｃ高発現癌としては、例えば、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。上記核酸分子の検出は、そのような核酸分子に対して特異的な因子を用いて行うことができる。そのような因子としては、本明細書に記載されるＦＩＲの核酸形態に対して特異的な任意の因子を用いることができる。

ここで、第一の因子は、第一核酸分子に特異的であり、第三の因子は、第三核酸分子に特異的である。第一核酸分子は、ＦＩＲの正常型およびその改変体の両方を包含し得ることから、ＦＩＲ関連分子の総量を検出することができる。従って、好ましくは、第一の因子は、ＦＩＲの正常型および改変体の両方に特異的に反応し得ることが有利である。第三核酸分子はＦＩＲの改変体であり、癌の組織に特異的に存在することから、癌の指標として使用することができる。これらの第一核酸分子および第三核酸分子の両方を測定することによって、相対的な測定を行うことができる。従って、上記Ｃ）手段は、第三核酸分子との相対存在比または絶対存在量を比較する手段を包含することが好ましい。相対存在比は、因子に起因するシグナル（例えば、蛍光強度）を直接対比することによって算出することができる。従って、絶対量を算出する必要がないことから、そのような状況において好ましい。絶対存在量を算出する場合、既知量の標準試料をもとに、各因子を用いて検量線を作成し、それによって絶対量を算出することができる。そのような方法は、当該分野において周知である。

別の好ましい実施形態において、本発明の診断キットにおいて使用される第一の因子は第三核酸分子に特異的に反応しないか、または第一の因子は第三核酸分子および第二核酸分子の両方に特異的に反応することが有利であり得る。第三核酸分子に特異的に反応しない場合、この第一の因子と第三の因子とを使用して、特定のＦＩＲ改変体とそうでないＦＩＲ分子との存在比を検出することができる。あるいは、第一の因子が第三核酸分子および第二核酸分子の両方に特異的に反応する場合、ＦＩＲの発現量の総量と改変体の発現量とを比較することができる。好ましくは、第一の因子と、第三の因子とは、識別可能に標識されているかまたは標識され得る。このような場合、本発明のキットは、第一の因子と、第三の因子とを、識別可能に標識する因子をさらに含む。このような識別可能な標識の識別は、物理的様式（例えば、蛍光、発光など）、化学的様式（例えば、特定の化学的切断、染色など）、生化学的様式（例えば、酵素反応）、生物学的様式（例えば、微生物の生存の判定）などによって行うことができる。

本発明のＦＩＲの検出のために、生体試料としては、便、尿、汗、生検組織、唾液、血液（例えば、全血、血清、血漿など）、血液細胞（単核球等）、他の体液、罹患した部分の細胞などを対象とすることができる。mRNA の検出、測定は公知の RT-PCR 法、定量的 RT-PCT 法によって行うことができ、その場合の PCR は本発明のプライマーセットを用いることができる。これらのプライマーセットは、配列番号１、１１、１３、１５、１７、１９の塩基配列またはその改変体に基づき設計し、合成・精製の各工程を経て調製することができる。なお、プライマー設計の留意点として、例えば以下を指摘することができる。プライマーのサイズ（塩基数）は、鋳型 DNA との間の特異的なアニーリングを満足させることを考慮し、15-40 塩基、望ましくは 15-30 塩基である。ただし、LA (long accurate) PCR を行う場合には、少なくとも 30 塩基が効果的である。

プライマーの設計の際には、センス鎖（5'末端側）とアンチセンス鎖（3'末端側）からなる１組あるいは１対（２本）のプライマーが互いにアニールしないよう、両プライマー間の相補的配列を避けると共に、プライマー内のヘアピン構造の形成を防止するため自己相補配列をも避けるようにする。本発明では、正常型とその改変体とを識別する必要がある場合、正常型と改変体との間で識別可能な部位に由来するプライマーを少なくとも１つ使用することが好ましい。このような識別可能な部位は、配列番号１の約４００位までの塩基配列により多く存在しており、好ましくは、そのような識別可能な部位は、配列番号１の約１５０位～約３６０位の範囲に存在する。測定対象が、付加型または欠失型（例えば、配列番号１および配列番号１１（これは、配列番号１に示す配列において１０２位と１０３位とをコードするアミノ酸の間にアミノ酸残基が挿入（付加）されている）、あるいは、配列番号１および配列番号１７（これは、配列番号１に示す配列から４３アミノ酸分をコードする核酸が欠失している））である場合、一方に存在し、他方には存在しないような配列（例えば、欠失または付加部分の配列）をプライマーの少なくとも一方として使用することが好ましく、プライマー対の両方として使用することがより好ましい。

さらに、鋳型 DNA との安定な結合を確保するため GC 含量を約 50%にし、プライマー内において GC-rich あるいは AT-rich が偏在しないようにする。アニーリング温度は Tm（melting temperature）に依存するので、特異性の高い PCR 産物を得るため、Tm 値が 55-65℃で互いに近似したプライマーを選定する。また、PCR におけるプライマー使用の最終濃度が約 0.1～約１μM になるよう調整する等を留意することも必要である。また、プライマー設計用の市販のソフトウェア、例えば Oligo™ [National Bioscience Inc.（米国）製]、GENETYX [ソフトウェア開発（株）（日本）製] 等を用いることもできる。

あるいは、本発明のキットまたは診断法は、アレイを用いて実行することができる。アレイの実行方法は、上述したとおりである。

別の局面において、本発明は、癌診断方法を提供する。この癌診断方法は、A）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；B）該試料中における、（a）配列番号１に記載の塩基配列もしくはその相補体またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；（b）配列番号２に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、（c）配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；（d）（a）～（c）のいずれか１つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または（e）（a）～（c）のいずれか１つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも７０％である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含む、核酸分子の存在量を測定する工程；C）該核酸分子の存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料における該核酸分子の量が増加している場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、工程、を包含する。この癌診断方法で使用される試料としては、便、尿、汗、生検組織、唾液、血液（例えば、全血、血清、血漿など）、血液細胞（単核球等）、他の体液、罹患した部分の細胞などを対象とすることができる。比較の対象のために、罹患していないことが明らかな部位、または罹患していない他の被験体からの試料を利用することができる。罹患していない他の被験体からの試料を使用する場合、好ましくは、そのような試料は、対象となる被験体の対象部位と同様の部位に由来する試料を利用することができる。ここで、診断対象となる癌は、ｃ－ｍｙ

ｃ高発現癌であることが好ましいが、それに限定されない。理論に束縛されることは望まないが、本発明のＦＩＲは、ｃ－ｍｙｃとの関連が高いことが指摘されているからである。このようなｃ－ｍｙｃ高発現癌としては、例えば、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。上記核酸分子の検出は、そのような核酸分子に対して特異的な因子を用いて行うことができる。そのような因子としては、本明細書に記載されるＦＩＲの核酸形態に対して特異的な任意の因子を用いることができる。

特定の実施形態において、本発明は、Ａ）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；Ｂ）該試料中において、配列番号１で示される配列またはその相補体を含む第二核酸分子の存在量を測定する工程；Ｃ）該第二核酸分子の存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、両者が異なる場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、工程、を包含する、癌診断方法を提供する。配列番号１で示される配列またはその相補体を含む第二核酸分子は、正常組織において通常に発現しており、ｃ－ｍｙｃを高発現する細胞にアポトーシスを起こすことが知られており、その変異（例えば、置換、決失、付加など）によって、正常な機能が損なわれ得る。したがって、このような変異は、アポトーシス異常（例えば、癌など）の原因および指標であり得る。あるいは、その正常型の発現量の異常もまた、アポトーシス異常（例えば、癌など）の原因および指標であり得る。したがって、このような異常型の検出および正常型の発現量の異常の検出は、アポトーシス異常の診断指標として有用である。第二の因子は、本明細書における上記「ＦＩＲの核酸形態に特異的な因子」節において説明されるような任意の形態をとることができる。第二の因子は、正常型のＦＩＲと特異的に反応し、その改変体とは特異的に反応してもそうでなくてもよい。好ましくは、第二の因子は、改変体とは反応しないことが好ましい。ただし、その反応特異性さえ理解して提供される限り、どのような

特異性を有する因子であっても本発明において利用することができ、したがって、そのような因子およびそれを含むキットは、本発明の範囲内にあることが理解される。１つの実施形態では、正常型に特異的な部分（例えば、配列番号１の５’末端側の配列であって、例えば、１００ヌクレオチド長の配列など）に対して特異的な因子が挙げられるがそれらに限定されない。

特定の実施形態において、本発明は、Ａ）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；Ｂ）該試料中において、（ａ）配列番号１またはその相補体において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列；または（ｂ）配列番号１１、１３および１５からなる群より選択される少なくとも１つの配列もしくはその相補体、または該少なくとも１つの配列もしくはその相補体において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列、を含む核酸分子を検出する工程；Ｃ）該核酸分子が検出される場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、工程、を包含する、癌診断方法を提供する。この癌診断方法で使用される試料としては、便、尿、汗、生検組織、唾液、血液（例えば、全血、血清、血漿など）、血液細胞（単核球等）、他の体液、罹患した部分の細胞などを対象とすることができる。比較の対象のために、罹患していないことが明らかな部位、または罹患していない他の被験体からの試料を利用することができる。罹患していない他の被験体からの試料を使用する場合、好ましくは、そのような試料は、対象となる被験体の対象部位と同様の部位に由来する試料を利用することができる。ここで、診断対象となる癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌であることが好ましいが、それに限定されない。理論に束縛されることは望まないが、本発明のＦＩＲは、ｃ－ｍｙｃとの関連が高いことが指摘されているからである。このようなｃ－ｍｙｃ高発現癌としては、例えば、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。上記核酸分子の検出は、そのような核酸分子に対して特異的な因子を用いて行うことができる。そのような因子としては、本

明細書に記載されるＦＩＲの核酸形態に対して特異的な任意の因子を用いることができる。ここで、好ましくは、Ｃ）工程では、上記核酸分子の存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、上記対象の被験体の対象部分からの試料における該核酸分子の量が増加している場合、該対象の被験体は癌患者であると確定することであるとすることができる。

他の特定の実施形態において、本発明は、Ａ）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；Ｂ）該試料中において、第二核酸分子および第三核酸分子の存在量を測定する工程；Ｃ）この第二核酸分子の存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料における第二核酸分子の発現量が変動（例えば、増加または減少）しており、かつ、第三核酸分子の存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料における第三核酸分子の発現量が増加している場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する工程、を包含する、癌診断方法を提供する。ここで、診断対象となる癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌であることが好ましいが、それに限定されない。理論に束縛されることは望まないが、本発明のＦＩＲは、ｃ－ｍｙｃとの関連が高いことが指摘されているからである。このようなｃ－ｍｙｃ高発現癌としては、例えば、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。上記核酸分子の検出は、そのような核酸分子に対して特異的な因子を用いて行うことができる。そのような因子としては、本明細書に記載されるＦＩＲの核酸形態に対して特異的な任意の因子を用いることができる。

他の特定の実施形態において、本発明は、Ａ）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；Ｂ）該試料中において、（ａ）配列番号１に記載の塩基配列もしくはその相補体またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレ

オチド；（ｂ）配列番号２に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド；（ｃ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；（ｄ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または（ｅ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも７０％である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含む、核酸分子（第一核酸分子）および（ａ）配列番号１またはその相補体において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列；または（ｂ）配列番号１１、１３および１５からなる群より選択される少なくとも１つの配列もしくはその相補体、または該少なくとも１つの配列もしくはその相補体において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列、を含む核酸分子（第三核酸分子）の存在量を測定する工程；Ｃ）第一核酸分子と第三核酸分子のそれぞれの発現量を測定する工程であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における第一核酸分子の発現量における第三核酸分子の発現量の割合が、対象の被験体の対象部分における第一核酸分子の発現量における第三核酸分子の発現量の割合よりも高い場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、工程、を包含する、癌診断方法を提供する。ここで、診断対象となる癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌であることが好ましいが、それに限定されない。理論に束縛されることは望まないが、本発明のＦＩＲは、ｃ－ｍｙｃとの関連が高いことが指摘されているからである。このようなｃ－ｍｙｃ高発現癌としては、例えば、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。上記核酸分子

の検出は、そのような核酸分子に対して特異的な因子を用いて行うことができる。そのような因子としては、本明細書に記載されるＦＩＲの核酸形態に対して特異的な任意の因子を用いることができる。

別の局面において、本発明は、（ａ）配列番号１に記載の塩基配列もしくはその相補体またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；（ｂ）配列番号２に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド；（ｃ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；（ｄ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または（ｅ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも７０％である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含む、核酸分子の、癌の診断剤の製造のための使用を提供する。ここで、診断対象となる癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌であることが好ましいが、それに限定されない。理論に束縛されることは望まないが、本発明のＦＩＲは、ｃ－ｍｙｃとの関連が高いことが指摘されているからである。このようなｃ－ｍｙｃ高発現癌としては、例えば、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。上記核酸分子の検出は、そのような核酸分子に対して特異的な因子を用いて行うことができる。そのような因子としては、本明細書に記載されるＦＩＲの核酸形態に対して特異的な任意の因子を用いることができる。

（ＦＩＲの核酸形態を用いた治療方法および治療剤）

別の局面において、本発明は、A）（a）配列番号１（ＦＩＲ５４２をコードする）に記載の塩基配列もしくはその相補体またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；（b）配列番号２に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド；（c）配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；（d）（a）～（c）のいずれか１つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または（e）（a）～（c）のいずれか１つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも７０％である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含む、核酸分子を含む、癌治療剤を提供する。ここで、治療対象となる癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌であることが好ましいが、それに限定されない。理論に束縛されることは望まないが、本発明のＦＩＲは、ｃ－ｍｙｃとの関連が高いことが指摘されているからである。このようなｃ－ｍｙｃ高発現癌としては、例えば、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。このようなＦＩＲの核酸形態としては、本明細書において記載されるような任意の核酸分子を使用することができる。好ましくは、ＦＩＲの正常型を発現することができる核酸分子が使用される。１つの実施形態では、例えば、配列番号１、１１、１３、１５、１７、１９、２１に示される配列またはその改変体であって、配列番号１と同等の機能を有する分子または配列番号２と同等の機能を有する分子を発現する分子を利用することができる。より好ましくは、本発明の治療剤に含まれる核酸分子は、配列番号２で示される配列を含むポリペプチド（Ｂポリペプチド）をコードする核酸分子を含む。

別の局面において、本発明は、上記癌治療剤を用いた癌治療法を提供する。この治療法は、本明細書において説明される任意の治療技術を用いることができる。

（ＦＩＲのポリペプチド形態）

別の局面において、本発明は、本発明は、ポリペプチド形態のＦＩＲを含む、癌（例えば、直腸癌または結腸癌（これらを総称して大腸癌とも言う）のようなｃ－ｍｙｃ高発現癌）の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（例えば、がん診療レジデントマニュアル第２版、編集：国立がんセンター中央病院内科レジデント、医学書院、２０００を参照）。本発明では、本発明では、癌の発症が、ＦＩＲの異常発現と予想外に関連していること、および正常型ＦＩＲを投与すると癌が治癒され得ることが明らかになった。このような関連、ならびにそれを利用した診断および治療効果は従来知られておらず、したがって、本発明のＦＩＲのポリペプチド形態およびそれに関連する発明は、従来技術より優れた効果を示す。

従って、１つの実施形態において、本発明は、（ａ）配列番号２に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；（ｂ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；（ｃ）配列番号１に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；（ｄ）配

列番号２に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または（ｅ）（ａ）～（ｄ）のいずれか１つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも７０％であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、を含む、ポリペプチドを提供する。

１つの好ましい実施形態において、上記（ｂ）における置換、付加および欠失の数は限定されていてもよく、例えば、５０以下、４０以下、３０以下、２０以下、１５以下、１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、２以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、配列番号２に示される配列からなる正常型ＦＩＲと類似するかまたは実質的に同一の活性を有する、あるいはＦＩＲの異常型活性（例えば、ＦＢＰとの結合不良など））限り、多い数であってもよい。

別の好ましい実施形態において、上記（ｃ）におけるスプライス変異体または対立遺伝子変異体は、配列番号２に示すアミノ酸配列と少なくとも９９％の相同性を有することが好ましい。

別の好ましい実施形態において、上記種相同体は、本明細書中上述のように同定することができ、配列番号２に示すアミノ酸配列と少なくとも約３０％の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、相同であり得る。

上記種相同体は、その種の遺伝子配列データベースが存在する場合、そのデータベースに対して、本発明のＦＩＲ（またはより好ましくはＦＩＲ５４２）をクエリ配列として検索することによって同定することができる。あるいは、本発明のＦＩＲ（またはより好ましくはＦＩＲ５４２）の全部または一部をプローブまたはプライマーとして、その種の遺伝子ライブラリーをスクリーニン

グすることによって同定することができる。そのような同定方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載される文献にも記載されている。種相同体は、例えば、配列番号１に示す核酸配列または配列番号２に示すアミノ酸配列と少なくとも約３０％の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、相同であり得る。

別の好ましい実施形態において、上記（ｅ）における上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号２に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、ＦＢＰとの相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。これらは例えば、免疫学的アッセイ、リン酸化定量などによって測定することができる。ここで、ＦＢＰに結合する能力は、配列番号２における３７２位～４４２位に記載される配列によって規定され、ＦＢＰを用いて測定することができる。

好ましい実施形態において、上記（ａ）～（ｄ）のいずれか１つのポリペプチドに対する相同性は、少なくとも約８０％であり得、より好ましくは少なくとも約９０％であり得、さらに好ましくは少なくとも約９８％であり得、もっとも好ましくは少なくとも約９９％であり得る。最も好ましくは、本発明のＦＩＲポリペプチドは、ＦＩＲ５４２である。

本発明のポリペプチドは、通常、少なくとも３の連続するアミノ酸配列を有する。本発明のポリペプチドが有するアミノ酸長は、目的とする用途に適合する限り、どれだけ短くてもよいが、好ましくは、より長い配列が使用され得る。従って、好ましくは、少なくとも４アミノ酸長、より好ましくは少なくとも５アミノ酸長、少なくとも６アミノ酸長、少なくとも７アミノ酸長、少なくとも８アミノ酸長、少なくとも９アミノ酸長、少なくとも１０アミノ酸長であってもよい。さらに好ましくは少なくとも１５アミノ酸長であり得、なお好ましく

は少なくとも２０アミノ酸長であり得る。これらのアミノ酸長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、１１、１２、１３、１４、１６など）あるいは、それ以上の数（例えば、２１、２２、．．．３０、など）であってもよい。本発明のポリペプチドは、ある因子と相互作用することができる限り、その上限の長さは、配列番号２に示す配列の全長と同一であってもよく、それを超える長さであってもよい。

本発明のポリペプチド形態のＦＩＲは、標識されているかまたは標識され得ることが好ましい。このような標識されているかまたは標識され得るＦＩＲを用いて、体内にあるＦＩＲに対する抗体量を測定することができ、それにより、ＦＩＲの発現量を間接的に測定することができるからである。

（特定のＦＩＲポリペプチド形態）

別の実施形態において、本発明は、配列番号２で示される配列を含むポリペプチドを提供する。このような配列は、正常な組織でも発現しており、正常であることの指標として使用され得る。あるいは、その発現レベルが異常であれば、癌の発症リスクがあると判断され得る。このような正常なＦＩＲポリペプチド形態は、外部から投与することによって、ｃ－ｍｙｃ発現細胞に対してアポトーシスを起こさせることができ、従って、抗癌剤として使用することができる。

他の好ましい実施形態において、本発明は、（ａ）配列番号２において、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含むアミノ酸配列；（ｂ）配列番号１２、１４および１６からなる群より選択される少なくとも１つの配列、または該少なくとも１つの配列において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列を含むポリペプチドを提供する。このような配列は、正常な組織では発現していないかまたはほとんど発現しておらず、しかも癌組織に特異的に発現していることか

ら、その発現自体が癌の診断の指標として使用することができる。これらのポリペプチドは、いずれも、癌組織に特異的であることから、癌の確定診断としても使用可能である。あるいは、これらの発現を、癌に罹患していない組織における発現と比較することによって（好ましくは統計学的処理による）癌の確定診断を行うこともできる。このような癌は、好ましくは、ｃ－ｍｙｃ高発現癌（例えば、直腸癌および／または結腸癌などを含む）である。このようなポリペプチドを減少させるような因子は、治療薬として使用することができる可能性がある。従って、そのような因子もまた、本発明の範囲内にあることが理解される。

別の好ましい実施形態において、本発明の上記ポリペプチドにおける上記改変は、置換；配列番号２の１０２位と１０３位との間もしくは配列番号１６の５９位と６０位との間への付加；あるいは配列番号２もしくは配列番号１２の１０２位までまたは配列番号１４もしくは配列番号１６の５９位までにおける欠失；あるいはそれらの組合せであることが好ましい。理論に束縛されることは望まないが、このような特定の改変は、本発明のＦＩＲの正常な機能を変化させ、好ましくは悪化させることによって、癌細胞の異常発生を引き起こす原因または結果であり得る。したがって、このような特定の配列を有するかまたは含むポリペプチドを検出することによって、癌の診断の使用することができるという有用性を有する。

１つの好ましい実施形態において、本発明のＦＩＲポリペプチドにおける好ましい改変は、配列番号２のＮ末端から約１３５アミノ酸までの範囲内に存在する（これは、ＴＦＩＩＨ結合部位とも呼ばれる。Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｅｌｌ　Ｖｏｌ．５，３３１－３４１．２０００）。この範囲の改変が癌との関係が深いと考えられるからであるが、それに限定されない。より好ましくは、この改変は、配列番号２における約５０位～約１２０位の範囲内における改変であり得る。この範囲の改変がより癌との関連が高いと考えられる症例が見出

されたからであるが、本発明は、それに限定されないことが理解される。したがって、ＦＩＲの異常発現または機能異常を引き起こすような改変である限り、本発明の診断に使用され得ることが理解される。

別の好ましい実施形態において、本発明のＦＩＲポリペプチドにおける改変は、配列番号２における非保存的置換を含む。このような非保存的置換を含むことによって、ＦＩＲポリペプチドの機能に異常が生じ得るからである。ＦＩＲの正常な機能の一つは、ｃ－ｍｙｃ発現細胞にアポトーシスを引き起こすことであり、その機能が異常になっていること、あるいは、正常なＦＩＲの機能を阻害するような分子の存在は、癌の発症と密接に関連すると考えられる。

他の好ましい実施形態において、改変を含む本発明のＦＩＲポリペプチド（改変体とも言う）は、配列番号１２、１４、１６、１８、２０および２２からなる群より選択される配列を含む。これらの具体的な配列は、正常な組織では発現されておらず、癌組織において特異的に発現していることから、本発明のＦＩＲの改変体の具体的配列の例示としてあげることができるがそれらに限定されない。

（ＦＩＲのポリペプチド形態に特異的な因子）

１つの局面において、本発明は、ＦＩＲのポリペプチド形態に対して特異的な因子を含む、癌（例えば、直腸癌または結腸癌（これらを総称して大腸癌とも言う）を含むｃ－ｍｙｃ高発現癌）の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。したがって、本発明は、本明細書に記載される任意のＦＩＲのポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメントに対して特異的な因子を提供する。ここで、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態ま

たは種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（例えば、がん診療レジデントマニュアル第２版、編集：国立がんセンター中央病院内科レジデント、医学書院、２０００を参照）。本発明では、癌の発症が、ＦＩＲの異常発現と予想外に関連していること、および正常型ＦＩＲを投与すると癌が治癒され得ることが明らかになった。このような関連、ならびにそれを利用した診断および治療効果は従来知られておらず、したがって、本発明の因子は、従来技術により提供されるものより優れた効果を示す。

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される因子であり得る。このような因子は、本発明のポリペプチドに特異的に結合するものであれば、どのようなものでもよいことが理解され得る。より好ましくは、本発明の因子は、抗体またはその誘導体（例えば、単鎖抗体）である。従って、本発明の因子は、プローブおよび／またはインヒビターとして使用することができる。

好ましい実施形態において、本発明の因子は、標識されているかまたは標識と結合し得るものであることが有利であり得る。そのように標識がされている場合、本発明の因子によって測定することができる種々の状態を直接および／または容易に測定することができる。そのような標識は、識別可能に標識される限り、どのような標識でもよく、例えば、蛍光、リン光、化学発光、放射能、酵素基質反応および抗原抗体反応などの技法が挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、その因子が抗体などの免疫反応を利用して相互作用する場合、ビオチンーストレプトアビジンのような免疫反応においてよく利用される系を用いてもよい。

別の例示的な実施形態において、本発明の因子は、（ａ）配列番号２に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；（ｂ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が置換、付加および

欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；（ｃ）配列番号１に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；（ｄ）配列番号２に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または（ｅ）（ａ）～（ｄ）のいずれか１つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも７０％であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、を含む、ポリペプチドに特異的な因子（たとえば、抗体またはその誘導体）であり得る。

あるいは、本発明の因子は、配列番号２で示されるポリペプチドに対して特異的な因子であることが好ましい。このような配列は、正常な組織において存在する形態のＦＩＲを同定することができることから、ある組織または個体の癌化の程度を調べるために有用である。

好ましくは、配列番号２で示される配列を含むポリペプチドに対して特異的な因子は、（ａ）配列番号２において、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含むアミノ酸配列；（ｂ）配列番号１２、１４および１６からなる群より選択される少なくとも１つの配列、または該少なくとも１つの配列において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列を含むポリペプチドに対して特異的に反応しないことが有利である。このように弁別可能に反応することによって、ＦＩＲの改変体と正常なＦＩＲとを弁別して検出することができるからである。そのような検出によって、癌（特に、（直腸癌または結腸癌（これらを総称して大腸癌とも言う）を含むｃ－ｍｙｃ高発現癌）の従来不可能であった正確な診断を行うことができるという優れた効果および有用性を達成する。

別の好ましい実施形態において、本発明の因子は、（ａ）配列番号２において、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含むアミノ酸配列；（ｂ）配列番号１２、１４および１６からなる群より選択

される少なくとも１つの配列、または該少なくとも１つの配列において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列を含むポリペプチドに特異的に反応することが好ましい。このような改変体に対して特異的な因子を使用することによって、癌に罹患した個体または組織部分を検出することが容易となるという有用性が提供される。この因子は、好ましくは、配列番号２で示される配列を含むポリペプチドに対しては特異的に反応しないことが有利である。このように弁別可能に反応することによって、ＦＩＲの改変体と正常なＦＩＲとを弁別して検出することができるからである。そのような検出によって、癌（特に、（直腸癌または結腸癌（これらを総称して大腸癌とも言う）を含むｃ－ｍｙｃ高発現癌）の従来不可能であった正確な診断を行うことができるという優れた効果および有用性を達成する。

（ＦＩＲのポリペプチド形態を用いた診断キットおよび方法）

別の局面において、本発明は、Ａ）（ａ）配列番号２に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；（ｂ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；（ｃ）配列番号１に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；（ｄ）配列番号２に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または（ｅ）（ａ）～（ｄ）のいずれか１つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも７０％であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、を含む、ポリペプチド（Ａポリペプチド）に対して特異的なＡ因子；および　Ｂ）該Ａ因子に起因するシグナルを用いて該ポリペプチドの発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該ポリペプチドの発現量に比較して対象の被験体の対象部分における該ポ

リペプチドの発現が高い場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、手段、を備える、癌診断キットを提供する。ここで、診断対象となる癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌であることが好ましいが、それに限定されない。理論に束縛されることは望まないが、本発明のＦＩＲは、ｃ－ｍｙｃとの関連が高いことが指摘されているからである。このようなｃ－ｍｙｃ高発現癌としては、例えば、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。このようなＦＩＲに特異的な因子としては、本明細書において記載されるような任意の因子を使用することができる。Ａ因子は、ＦＩＲの正常型および改変体のいずれとも特異的に反応してもよく、あるいは、ＦＩＲの正常型または改変体のいずれか一方と特異的に反応してもよい。その反応特異性さえ理解して提供される限り、どのような特異性を有する因子であっても本発明において利用することができ、したがって、そのような因子およびそれを含むキットは、本発明の範囲内にあることが理解される。１つの実施形態では、正常型と改変体との共通の配列（例えば、配列番号２、１２、１４、１６、１８、２０、２２などのＣ末端側の配列であって、例えば、３０アミノ酸長の配列など）に対して特異的な因子が挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、Ａ因子として、Ａポリペプチド自体を用いることができる。Ａポリペプチドを用いた場合、Ａポリペプチドに特異的な抗体を認識することができることから、生体内のＡポリペプチドに特異的な抗体量を算出し、それにより、Ａポリペプチドの体内における存在を同定することが可能であるからである。

ここで、ポリペプチドの発現量の測定は、Ａ因子に起因する任意のシグナルを用いて行うことができる。

別の特定の実施形態において、本発明は、Ａ）配列番号２で示される配列を含むポリペプチド（Ｂポリペプチド）に対して特異的なＢ因子；および　Ｂ）該Ｂ因子に起因するシグナルを用いて該ポリペプチドの発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分

における該ポリペプチドの発現量と、対象の被験体の対象部分における該ポリペプチドの発現量とが異なる場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、手段、を備える、癌診断キットを提供する。ここで、診断対象となる癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌であることが好ましいが、それに限定されない。理論に束縛されることは望まないが、本発明のＦＩＲは、ｃ－ｍｙｃとの関連が高いことが指摘されているからである。このようなｃ－ｍｙｃ高発現癌としては、例えば、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。このようなＦＩＲに特異的な因子としては、本明細書において記載されるような任意の因子を使用することができる。Ｂ因子は、正常型ＦＩＲと特異的に反応する限り、どのようなものを使用してもよい。好ましくは、Ｂ因子は、改変体とは特異的に反応しないことが有利であり得る。このような性質さえ有する限り、任意のＢ因子がその反応特異性さえ理解して提供され、どのような特異性を有する因子であっても本発明において利用することができ、したがって、そのような因子およびそれを含むキットは、本発明の範囲内にあることが理解される。１つの実施形態では、正常型と改変体との改変配列（例えば、配列番号２のＮ末端側の配列であって、例えば、約１３５アミノ酸長における任意の配列など）に対して特異的な因子が挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、Ｂ因子として、Ｂポリペプチド自体を用いることができる。Ｂポリペプチドを用いた場合、Ｂポリペプチドに特異的な抗体を認識することができることから、生体内のＢポリペプチドに特異的な抗体量を算出し、それにより、Ｂポリペプチドの体内における存在を同定することが可能であるからである。

ここで、ポリペプチドの発現量の測定は、Ｂ因子に起因する任意のシグナルを用いて行うことができる。

別の特定の実施形態において、本発明は、Ａ）配列番号２で示される配列を含むポリペプチド（Ｃポリペプチド）に対して特異的なＣ因子；およびＢ）該Ｃ因子に起因するシグナルを用いて該ポリペプチドの発現量を測定するための

手段であって、対象の被験体の対象部分において該ポリペプチドが検出される場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、手段、を備える、癌診断キットを提供する。この方法において、対象の被験体の対象部分における上記ポリペプチドの検出は、上記癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該ポリペプチドの発現量に比較して対象の被験体の対象部分における該ポリペプチドの発現が高いことを検出することであることが好ましいがそれに限定されない。ここで、診断対象となる癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌であることが好ましいが、それに限定されない。理論に束縛されることは望まないが、本発明のＦＩＲは、ｃ－ｍｙｃとの関連が高いことが指摘されているからである。このようなｃ－ｍｙｃ高発現癌としては、例えば、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。このようなＦＩＲに特異的な因子としては、本明細書において記載されるような任意の因子を使用することができる。Ｃ因子は、ＦＩＲの改変体と特異的に反応する限り、どのようなものを使用してもよい。好ましくは、Ｃ因子は、ＦＩＲ正常型とは特異的に反応しないことが有利であり得る。このような性質さえ有する限り、任意のＣ因子がその反応特異性さえ理解して提供され、どのような特異性を有する因子であっても本発明において利用することができ、したがって、そのような因子およびそれを含むキットは、本発明の範囲内にあることが理解される。１つの実施形態では、正常型と改変体との改変配列（例えば、Ｎ末端側の配列であって、例えば、約１３５アミノ酸長における任意の配列など）に対して特異的な因子が挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、Ｃ因子として、Ｃポリペプチド自体を用いることができる。Ｃポリペプチドを用いた場合、Ｃポリペプチドに特異的な抗体を認識することができることから、生体内のＣポリペプチドに特異的な抗体量を算出し、それにより、Ｃポリペプチドの体内における存在を同定することが可能であるからである。

ここで、ポリペプチドの発現量の測定は、Ｃ因子に起因する任意のシグナルを用いて行うことができる。

別の特定の実施形態において、本発明は、配列番号２で示される配列を含むポリペプチド（Ｂポリペプチド）に対して特異的なＢ因子；Ｂ）（ａ）配列番号２において、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含むアミノ酸配列；（ｂ）配列番号１２、１４および１６からなる群より選択される少なくとも１つの配列もしくはその相補体、または該少なくとも１つの配列において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列を含むポリペプチド（Ｃポリペプチド）に対して特異的なＣ因子；ならびにＣ）該Ｂ因子および該Ｃ因子に起因するシグナルを識別可能に検知して、ＢポリペプチドとＣポリペプチドのそれぞれの発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分におけるＢポリペプチドの発現に比較して対象の被験体の対象部分におけるＢポリペプチドの発現が高く、かつ、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分におけるＣポリペプチドの発現に比較して対象の被験体の対象部分におけるＣポリペプチドの発現が高い場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、手段、を備える、癌（例えば、直腸癌または結腸癌（これらを総称して大腸癌とも言う）の診断キットを提供する。

ここで、好ましくは、Ｃ）手段は、ＢポリペプチドとＣポリペプチドとの相対存在比を比較する手段を包含する。好ましい実施形態では、Ｂ因子はＣポリペプチドに特異的に反応しないか、または、Ｃ因子はＢポリペプチドに特異的に反応しないことが有利である。識別可能に両方のポリペプチドを検出することができるからである。より好ましい実施形態では、Ｂ因子はＣポリペプチドに特異的に反応しせず、かつ、Ｃ因子はＢポリペプチドに特異的に反応しないことの両方であることが有利である。これらの因子によって検出されるシグナル強度が、対象とするポリペプチドの量により正確に反映されるからである。

これらのＢ因子と、Ｃ因子とは、識別可能に標識されているかまたは標識され得ることが好ましい。ここで、識別可能に標識されている因子は、その因子が、すでに、識別可能な標識を有していることを意味し、２つ以上の因子が識別可能に標識され得るとは、別の処理をその因子に行うことによって、その２つ以上の因子を識別することができるようになることをいう。このような場合、本発明のキットは、Ｂ因子と、Ｃ因子とを、識別可能に標識する因子をさらに含む。このような識別可能な標識の識別は、物理的様式（例えば、蛍光、発光など）、化学的様式（例えば、特定の化学的切断、染色など）、生化学的様式（例えば、酵素反応）、生物学的様式（例えば、微生物の生存の判定）などによって行うことができる。

別の特定の実施形態において、本発明は、Ａ）（ａ）配列番号２に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；（ｂ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；（ｃ）配列番号１に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；（ｄ）配列番号２に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または（ｅ）（ａ）～（ｄ）のいずれか１つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも７０％であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、を含む、ポリペプチド（Ａポリペプチド）に対して特異的なＡ因子；Ｂ）（ａ）配列番号２において、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含むアミノ酸配列；（ｂ）配列番号１２、１４および１６からなる群より選択される少なくとも１つの配列、または該少なくとも１つの配列において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列を含むポリペプチド（Ｃポリペプチド）に対して特異的なＣ因子；　Ｃ）該Ａ因子および該Ｃ因子に起因するシグナルを識別可能

に検知して、Ａポリペプチドとｂポリペプチドのそれぞれの発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分におけるＡポリペプチドの発現量におけるＣポリペプチドの発現量の割合が、対象の被験体の対象部分におけるＡポリペプチドの発現量におけるＣポリペプチドの発現量の割合よりも高い場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、手段、を備える、癌診断キットを提供する。ここで、診断対象となる癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌であることが好ましいが、それに限定されない。理論に束縛されることは望まないが、本発明のＦＩＲは、ｃ－ｍｙｃとの関連が高いことが指摘されているからである。このようなｃ－ｍｙｃ高発現癌としては、例えば、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。ここで、Ａ因子は、Ａポリペプチドに特異的であり、Ｃ因子は、Ｃポリペプチドに特異的である。Ａポリペプチドは、ＦＩＲの正常型およびその改変体の両方を包含し得ることから、ＦＩＲ関連分子の総量を検出することができる。従って、好ましくは、Ａ因子は、ＦＩＲの正常型および改変体の両方に特異的に反応し得ることが有利である。ＣポリペプチドはＦＩＲの改変体であり、癌の組織に特異的に存在することから、癌の指標として使用することができる。これらのＡポリペプチドおよびＣポリペプチドの両方を測定することによって、相対的な測定を行うことができる。従って、上記Ｃ）手段は、Ｃポリペプチドとの相対存在比または絶対存在量を比較する手段を包含することが好ましい。相対存在比は、因子に起因するシグナル（例えば、蛍光強度）を直接対比することによって算出することができる。従って、絶対量を算出する必要がないことから、そのような状況において好ましい。絶対存在量を算出する場合、既知量の標準試料をもとに、各因子を用いて検量線を作成し、それによって絶対量を算出することができる。そのような方法は、当該分野において周知である。

好ましい実施形態において、Ａ因子はＣポリペプチドに特異的に反応しないか、Ａ因子はｂポリペプチドにもＣポリペプチドにも特異的に反応することが

有利であり得る。Cポリペプチドに特異的に反応しない場合、このA因子とC因子とを使用して、特定のＦＩＲ改変体とそうでないＦＩＲ分子との存在比を検出することができる。あるいは、A因子がCポリペプチドおよびBポリペプチドの両方に特異的に反応する場合、ＦＩＲの発現量の総量と改変体の発現量とを比較することができる。好ましくは、A因子と、C因子とは、識別可能に標識されているかまたは標識され得る。このような場合、本発明のキットは、A因子と、C因子とを、識別可能に標識する因子をさらに含む。このような識別可能な標識の識別は、物理的様式（例えば、蛍光、発光など）、化学的様式（例えば、特定の化学的切断、染色など）、生化学的様式（例えば、酵素反応）、生物学的様式（例えば、微生物の生存の判定）などによって行うことができる。

別の局面において、本発明は、A）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；B）該試料中において、（a）配列番号２に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；（b）配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；（c）配列番号１に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；（d）配列番号２に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または（e）（a）～（d）のいずれか１つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも７０％であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、を含む、ポリペプチド（Aポリペプチド）の存在量を測定する工程；C）該ポリペプチドの存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料における該ポリペプチドの量が増加している場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、工程、を包含する、癌診断方法を提

供する。この癌診断方法で使用される試料としては、便、尿、汗、生検組織、唾液、血液（例えば、全血、血清、血漿など）、血液細胞（単核球等）、他の体液、罹患した部分の細胞などを対象とすることができる。比較の対象のために、罹患していないことが明らかな部位、または罹患していない他の被験体からの試料を利用することができる。罹患していない他の被験体からの試料を使用する場合、好ましくは、そのような試料は、対象となる被験体の対象部位と同様の部位に由来する試料を利用することができる。ここで、診断対象となる癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌であることが好ましいが、それに限定されない。理論に束縛されることは望まないが、本発明のＦＩＲは、ｃ－ｍｙｃとの関連が高いことが指摘されているからである。このようなｃ－ｍｙｃ高発現癌としては、例えば、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。上記ポリペプチドの検出は、そのようなポリペプチド（Ａポリペプチド）に対して特異的な因子（例えば、Ａ因子）を用いて行うことができる。そのような因子としては、本明細書に記載されるＦＩＲのポリペプチド形態に対して特異的な任意の因子を用いることができる。Ａ因子は、ＦＩＲと特異的に反応する限り、どのようなものを使用してもよい。好ましくは、Ａ因子は、正常型ＦＩＲおよびその改変体の両方に特異的に反応することが有利であり得る。あるいは、Ａ因子は、改変体のみに対して特異的であっても、正常型のみに対して特異的であってもよい。このような性質さえ有する限り、任意のＡ因子がその反応特異性さえ理解して提供され、どのような特異性を有する因子であっても本発明において利用することができ、したがって、そのような因子およびそれを含むキットは、本発明の範囲内にあることが理解される。１つの実施形態では、正常型と改変体との改変配列（例えば、配列番号２のＮ末端側の配列であって、例えば、約１３５アミノ酸長における任意の配列など）に対して特異的な因子が挙げられるがそれらに限定されない。

別の特定の実施形態において、本発明は、A）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；B）該試料中において、配列番号２で示される配列を含むポリペプチド（Bポリペプチド）の存在量を測定する工程；C）該ポリペプチドの存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、両者が異なる場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、工程、を包含する、癌診断方法を提供する。配列番号２で示される配列を含むポリペプチドは、正常組織において通常に発現しており、ｃ－ｍｙｃを高発現する細胞にアポトーシスを起こすことが知られており、その変異（例えば、置換、決失、付加など）によって、正常な機能が損なわれ得る。したがって、このような変異は、アポトーシス異常（例えば、癌など）の原因および指標であり得る。あるいは、その正常型の発現量の異常もまた、アポトーシス異常（例えば、癌など）の原因および指標であり得る。したがって、このような異常型の検出および正常型の発現量の異常の検出は、アポトーシス異常の診断指標として有用である。上記ポリペプチドの検出は、そのようなポリペプチドに対して特異的な因子を用いて行うことができる。そのような因子としては、本明細書に記載されるＦＩＲのポリペプチド形態（Bポリペプチド）に対して特異的な任意の因子（例えば、B因子）を用いることができる。B因子は、本明細書における上記「ＦＩＲのポリペプチド形態に特異的な因子」節において説明されるような任意の形態をとることができる。B因子は、正常型のＦＩＲと特異的に反応し、その改変体とは特異的に反応してもそうでなくてもよい。好ましくは、第二の因子は、改変体とは反応しないことが好ましい。ただし、その反応特異性さえ理解して提供される限り、どのような特異性を有する因子であっても本発明において利用することができ、したがって、そのような因子およびそれを含むキットは、本発明の範囲内にあることが理解される。１つの実施形態では、正常型に特異的な部分（例えば、配列番号１の５’末端側の配列であって、例えば、１００ヌ

クレオチド長の配列など）に対して特異的な因子が挙げられるがそれらに限定されない。

別の特定の実施形態において、本発明は、A）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；B）該試料中において、（a）配列番号２において、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含むアミノ酸配列；（b）配列番号１２、１４および１６からなる群より選択される少なくとも１つの配列、または該少なくとも１つの配列において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列を含むポリペプチド（Cポリペプチド）を検出する工程；C）該ポリペプチドが検出される場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、工程、を包含する、癌診断方法を提供する。この癌診断方法で使用される試料としては、便、尿、汗、生検組織、唾液、血液（例えば、全血、血清、血漿など）、血液細胞（単核球等）、他の体液、罹患した部分の細胞などを対象とすることができる。比較の対象のために、罹患していないことが明らかな部位、または罹患していない他の被験体からの試料を利用することができる。罹患していない他の被験体からの試料を使用する場合、好ましくは、そのような試料は、対象となる被験体の対象部位と同様の部位に由来する試料を利用することができる。ここで、診断対象となる癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌であることが好ましいが、それに限定されない。理論に束縛されることは望まないが、本発明のＦＩＲは、ｃ－ｍｙｃとの関連が高いことが指摘されているからである。このようなｃ－ｍｙｃ高発現癌としては、例えば、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。上記ポリペプチドの検出は、そのようなポリペプチドに対して特異的な因子を用いて行うことができる。そのような因子としては、本明細書に記載されるＦＩＲのポリペプチド形態（Cポリペプチド）に対して特異的な任意の因子（例えば、C因子）を用いることができる。ここで、好ましくは、C）工程では、上記ポリペプチドの存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは

癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料におけるそのポリペプチドの量が増加している場合、該対象の被験体は癌患者であると確定することであるとすることができる。

別の特定の実施形態において、本発明は、A）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；B）該試料中において、Bポリペプチドおよびcポリペプチドの存在量を測定する工程；C）Bポリペプチドの存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一ポリペプチドの存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料におけるBポリペプチドの発現量が増加しており、かつ、Cポリペプチドの存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一ポリペプチドの存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料におけるCポリペプチドの発現量が増加している場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、工程、癌（例えば、直腸癌または結腸癌（これらを総称して大腸癌とも言う）の診断方法を提供する。ここで、診断対象となる癌は、c－myc高発現癌であることが好ましいが、それに限定されない。理論に束縛されることは望まないが、本発明のFIRは、c－mycとの関連が高いことが指摘されているからである。このようなc－myc高発現癌としては、例えば、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。上記ポリペプチドの検出は、そのようなポリペプチドに対して特異的な因子を用いて行うことができる。そのような因子としては、本明細書に記載されるFIRのポリペプチド形態に対して特異的な任意の因子を用いることができる。

別の局面において、本発明は、A）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；B）該試料中において、（a）配列番号2に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；（b）配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群

より選択される少なくとも１つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；（ｃ）配列番号１に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；（ｄ）配列番号２に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または（ｅ）（ａ）～（ｄ）のいずれか１つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも７０％であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、を含む、ポリペプチド（Ａポリペプチド）および（ａ）配列番号２において、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含むアミノ酸配列；（ｂ）配列番号１２、１４および１６からなる群より選択される少なくとも１つの配列、または該少なくとも１つの配列において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列を含むポリペプチド（Ｃポリペプチド）の存在量を測定する工程；Ｃ）ＡポリペプチドとＣポリペプチドのそれぞれの発現量を測定する工程であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分におけるＡポリペプチドの発現量におけるＣポリペプチドの発現量の割合が、対象の被験体の対象部分におけるＡポリペプチドの発現量におけるＣポリペプチドの発現量の割合よりも高い場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、工程、を包含する、癌診断方法を提供する。ここで、診断対象となる癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌であることが好ましいが、それに限定されない。理論に束縛されることは望まないが、本発明のＦＩＲは、ｃ－ｍｙｃとの関連が高いことが指摘されているからである。このようなｃ－ｍｙｃ高発現癌としては、例えば、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。上記ポリペプチドの検出は、そのようなポリペプチドに対して特異的な因子を用いて行うことができる。そのような因子としては、本明細書に記載されるＦＩＲのポリペプチド形態に対して特異的な任意の因子を用いることができる。

別の特定の実施形態において、本発明は、（ａ）配列番号２に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；（ｂ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；（ｃ）配列番号１に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；（ｄ）配列番号２に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または　（ｅ）（ａ）～（ｄ）のいずれか１つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも７０％であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、を含む、ポリペプチドの、癌の診断剤の製造のための使用を提供する。ここで、診断対象となる癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌であることが好ましいが、それに限定されない。理論に束縛されることは望まないが、本発明のＦＩＲは、ｃ－ｍｙｃとの関連が高いことが指摘されているからである。このようなｃ－ｍｙｃ高発現癌としては、例えば、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。上記ポリペプチドの検出は、そのようなポリペプチドに対して特異的な因子を用いて行うことができる。そのような因子としては、本明細書に記載されるＦＩＲのポリペプチド形態に対して特異的な任意の因子を用いることができる。

本発明の癌診断方法では、被験体の血清中に、本発明の抗原ペプチドと結合する抗体が存在するか否かを試験し、血清中にその抗体が存在する被験体を癌患者または癌ハイリスク者と判定することもできる。すなわち、本発明の抗原ペプチドは、患者の血清中の抗体（IgG）と結合するペプチドであるから、被験体の血清と反応させ、これらの抗原ペプチドと結合する抗体を含む血清を、癌患者またはそのハイリスク患者の血清として判定することができる。なおその際に、２種類の抗原ペプチドについて血清中抗体との結合を判定することが好ましい。

具体的な診断は、例えば抗原ペプチドに被験体血清を接触させ、抗原ペプチドと被験体血清中の IgG 抗体とを液相中において反応させる。さらに血清中の IgG 抗体と特異的に結合する標識 IgG 抗体を反応させて、標識 IgG 抗体のシグナルを検出すればよい。標識 IgG 抗体の標識物質は、上記の標識抗体において例示したような酵素、放射性同位体または蛍光色素を使用することができる。酵素を用いる場合には、酵素作用によって分解して発色する基質を加え、基質の分解量を光学的に測定することによって酵素活性を求め、これを結合抗体量に換算し、標準値との比較から抗体量が算出される。放射生同位体を用いる場合には、放射性同位体の発する放射線量をシンチレーションカウンター等により測定する。また、蛍光色素を用いる場合には、蛍光顕微鏡を組み合わせた測定装置によって蛍光量を測定すればよい。

シグナルの検出は、実施例に示したようなウエスタンブロット分析を採用することができる。あるいは、抗原ペプチド＋血清中抗体＋標識 IgG 抗体の結合体を、公知の分離手段（クロマト法、塩析法、アルコール沈殿法、酵素法、固相法等）によって分離し、標識 IgG 抗体のシグナルを検出するようにしてもよい。

このような診断方法の簡便かつ広範囲な実施を可能とするものとして、本発明の診断キットが提供される。

本発明の診断方法はまた、抗原ペプチドの１種類以上をプレート上に固定化し、この基板上において被験体血清の抗体との結合を試験する方法（これもまた本発明の包含される）として実施することもできる。抗原ペプチドを基板上に固定化することによって、未結合の標識結合分子を容易に除去することができる。また、このような診断方法の簡便かつ広範囲な実施を可能とするものとして、本発明の診断キットの１つの実施形態が提供される。

あるいは、本発明の診断方法は、被験体の生体試料中に、本発明の抗体、もしくは本発明の標識抗体と結合する抗原ペプチドが存在するか否かを試験し、

試料中にその抗原ペプチドが存在する被験体を癌患者またはそのハイリスク者と判定する。すなわち、ここで使用する抗体または標識抗体は、大腸癌細胞で発現している抗原ペプチドと特異的に結合する抗体であるから、この抗体と結合する抗原ペプチドを含む生体試料を、大腸癌患者または大腸癌ハイリスク患者の試料として判定することができる。なおその際に、好ましくは2種の抗体について試料中の抗原ペプチドとの結合を判定することが好ましい。また、生体試料としては、血液、血液細胞（単核球等）を対象とすることができる。

本発明の診断方法における一つの態様は、抗体と抗原ペプチドとの結合を液相系において行う方法である。例えば、本発明の標識抗体と生体試料とを接触させて標識抗体と抗原ペプチドを結合させ、この結合体を本明細書において記載されるような方法で分離し、標識シグナルを同様の方法で検出する。このような診断方法の簡便かつ広範囲な実施を可能とするものとして、本発明の診断キットが提供される。

液相系での診断の別の方法は、本発明の抗体（一次抗体）と生体試料とを接触させて一次抗体と抗原ペプチドを結合させ、この結合体に本発明の標識抗体（二次抗体）を結合させ、この三者の結合体における標識シグナルを検出する。あるいは、さらにシグナルを増強させるためには、非標識の二次抗体を先ず抗体＋抗原ペプチド結合体に結合させ、この二次抗体に標識物質を結合させるようにしてもよい。このような二次抗体への標識物質の結合は、例えば二次抗体をビオチン化し、標識物質をアビジン化しておくことによって行うことができる。あるいは、二次抗体の一部領域（例えば、Fc 領域）を認識する抗体（三次抗体）を標識し、この三次抗体を二次抗体に結合させるようにしてもよい。なお、一次抗体と二次抗体は、両方ともモノクローナル抗体を用いることもでき、あるいは、一次抗体と二次抗体のいずれか一方をポリクローナル抗体とすることもできる。液相からの結合体の分離やシグナルの検出は、本明細書において記載されるように行うことができる。また、このような診断方法の簡便かつ広

範囲な実施を可能とするものとして、本発明の診断キットの一つの実施形態が提供される。

本発明の診断方法における別の態様は、抗体と抗原ペプチドとの結合を固相系において試験する方法である。この固相系における方法は、極微量の抗原ペプチド検出と操作の簡便化のため好ましい方法である。すなわちこの固相系の方法は、本発明の抗体（一次抗体）を樹脂プレート等に固定化し、この固定化抗体に抗原ペプチドを結合させ、非結合ペプチドを洗浄除去した後、プレート上に残った抗体＋抗原ペプチド結合体に標識抗体（二次抗体）を結合させ、この二次抗体のシグナルを検出する方法である。この方法は、いわゆる「サンドイッチ法」と呼ばれる方法であり、マーカーとして酵素を用いる場合には、「ELISA（enzyme linked immunosorbent assay）」として広く用いられている方法である。一次抗体と二次抗体は、両方ともモノクローナル抗体を用いることもでき、あるいは、一次抗体と二次抗体のいずれか一方をポリクローナル抗体とすることもできる。シグナルの検出は、本明細書に記載されるように行うことができる。また、このような診断方法の簡便かつ広範囲な実施を可能とするものとして、本発明の診断キットの一つの実施形態が提供される。

本発明の診断キットは、本発明の診断方法を行うための試薬キットであり得る。このようなキットは、被検成分の種類に応じて各種のものが市販されており、この発明の診断キットも、この発明によって提供される抗原ペプチド、抗体および／または標識抗体を用いることを除き、当該分野において公知のキットに用いられている各要素によって構成することができる。

あるいは、本発明のキットまたは診断法は、アレイを用いて実行することができる。アレイを用いた診断の実行方法は、上述したとおりである。

（ＦＩＲのポリペプチド形態を用いた治療方法および治療剤）

別の局面において、本発明は、A）（a）配列番号２に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；（b）配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；（c）配列番号１に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；（d）配列番号２に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または（e）（a）～（d）のいずれか１つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも７０％であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、を含む、ポリペプチド（Aポリペプチド）を含む、癌治療剤を提供する。ここで、治療対象となる癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌であることが好ましいが、それに限定されない。理論に束縛されることは望まないが、本発明のＦＩＲは、ｃ－ｍｙｃとの関連が高いことが指摘されているからである。このようなｃ－ｍｙｃ高発現癌としては、例えば、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。このようなＦＩＲに特異的な因子としては、本明細書において記載されるような任意の因子を使用することができる。Aポリペプチドは、ＦＩＲの正常型な機能を少なくとも１つ有し、好ましくは、ＦＢＰに結合する能力および／またはｃ－ｍｙｃ抑制活性を有する。１つの実施形態では、例えば、配列番号２、１２、１４、１６、１８、２０、２２に示される配列またはその改変体であって、配列番号２と同等の機能を有する分子を利用することができる。より好ましくは、本発明の治療剤に含まれるポリペプチドは、配列番号２で示される配列を含むポリペプチド（Bポリペプチド）を含む。

別の局面において、本発明は、上記癌治療剤を用いた癌治療法を提供する。この治療法は、本明細書において説明される任意の治療技術を用いることができる。

（ＣＥＮＰ－Ａの核酸形態）

１つの局面において、本発明は、ＣＥＮＰ－Ａをコードする核酸分子を含む、癌（例えば、直腸癌または結腸癌（これらを総称して大腸癌とも言う）を含むｃ－ｍｙｃ高発現癌）の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（例えば、がん診療レジデントマニュアル第２版、編集：国立がんセンター中央病院内科レジデント、医学書院、２０００を参照）。本発明では、癌の発症が、ＣＥＮＰ－Ａの異常発現と予想外に関連していることが明らかになった。このような関連、ならびにそれを利用した診断および治療効果は従来知られておらず、したがって、本発明のＣＥＮＰ－Ａの核酸形態およびそれに関連する発明は、従来技術より優れた効果を示す。

従って、１つの実施形態において、本発明は、ａ）配列番号３に記載の塩基配列もしくはその相補体またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；（ｂ）配列番号４に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド；（ｃ）配列番号４に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；（ｄ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または（ｅ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも７０％である塩基配列からなり、かつ、

生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含む、核酸分子を提供する。

１つの好ましい実施形態において、上記（ｃ）における置換、付加および欠失の数は、限定され、例えば、５０以下、４０以下、３０以下、２０以下、１５以下、１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、２以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、ＣＥＮＰ－Ａと類似するかまたは実質的に同一の活性を有する、あるいはその異常型の活性（例えば、非セントロメアクロマチンへの結合））限り、多い数であってもよい。

別の好ましい実施形態において、上記ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号４に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、セントロメアクロマチンとの相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。これらは例えば、免疫学的アッセイ、標識アッセイなどによって測定することができる。

別の好ましい実施形態において、（ｄ）に記載の対立遺伝子変異体は、配列番号１に示す核酸配列と少なくとも９９％の相同性を有することが有利である。

上記種相同体は、その種の遺伝子配列データベースが存在する場合、そのデータベースに対して、本発明のＣＥＮＰ－Ａをクエリ配列として検索することによって同定することができる。あるいは、本発明のＣＥＮＰ－Ａの全部または一部をプローブまたはプライマーとして、その種の遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。そのような同定方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載される文献にも記載されている。種相同体は、例えば、配列番号３に示す核酸配列と少なくとも約３０％の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少な

くとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、相同であり得る。

好ましい実施形態において、上記（ａ）～（ｅ）のいずれか１つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性は、少なくとも約８０％であり得、より好ましくは少なくとも約９０％であり得、さらに好ましくは少なくとも約９８％であり得、もっとも好ましくは少なくとも約９９％であり得る。最も好ましくは、本発明のＣＥＮＰ－Ａは、配列番号３に記載される配列と１００％同一の配列を有する。

好ましい実施形態において、本発明のＣＥＮＰ－Ａをコードする核酸分子またはそのフラグメントおよび改変体は、少なくとも８の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも１０の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも１５の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも２０の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、９、１１、１２、１３、１４、１６など）あるいは、それ以上の数（例えば、２１、２２、．．．３０、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、アンチセンス、ＲＮＡｉ、マーカー、プライマー、プローブ、所定の因子と相互作用し得ること）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号１に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約８のヌクレオチド長であり得、好ましくは約１０ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約１５ヌクレオチド長であり得、好ましくは約１７ヌクレオチド長であり得る。

１つの実施形態において、ＣＥＮＰ－Ａをコードする核酸分子は、配列番号３の核酸配列の全範囲を含む。より好ましくは、ＣＥＮＰ－Ａをコードする核酸分子は、配列番号３の核酸配列の全範囲からなる。

（ＣＥＮＰ－Ａに対して特異的な因子）

１つの局面において、本発明は、ＣＥＮＰ－Ａをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む、癌（例えば、直腸癌または結腸癌（これらを総称して大腸癌とも言う））の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。したがって、本発明は、本明細書に記載される任意のＣＥＮＰ－Ａをコードする核酸分子またはその改変体もしくはフラグメントに対して特異的な因子を提供する。ここで、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（例えば、がん診療レジデントマニュアル第２版、編集：国立がんセンター中央病院内科レジデント、医学書院、２０００を参照）。本発明では、癌の発症が、ＣＥＮＰ－Ａの異常発現と予想外に関連していることが明らかになった。このような関連、ならびにそれを利用した診断および治療効果は従来知られておらず、したがって、本発明の因子は、従来技術により提供されるものより優れた効果を示す。

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される因子であり得る。このような因子は、本発明の核酸分子に特異的に結合するものであれば、どのようなものでもよいことが理解され得る。

好ましい実施形態では、本発明の因子は、核酸分子である。本発明の因子が核酸分子である場合、そのような核酸分子は、少なくとも８の連続するヌクレオチド長であり得、好ましくはＣＥＮＰ－Ａの核酸配列（例えば、配列番号３）に対して特異的に結合し得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも１０の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも１５の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも２０の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、９、１１、１２、１３、１４、１６など）あるいは、それ以上の数（例えば、２１、２２、．．．３０、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、アンチセンス、ＲＮＡｉ、マーカー、プライマー、プローブ）として使用することができるかまたは所定の因子と相互作用することができる限り、その上限の長さは、配列番号３などに示す配列またはその相補体の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約８のヌクレオチド長であり得、好ましくは約１０ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約１５ヌクレオチド長であり得、好ましくは約１７ヌクレオチド長であり得る。

従って、１つの例示的な実施形態において、本発明の因子は、上記（ａ）～（ｅ）のいずれかのＣＥＮＰ－Ａポリヌクレオチドの核酸配列に対して相補的な配列またはそれに対して少なくとも７０％の同一性を有する配列を有する核酸分子であり得る。

別の好ましい実施形態では、本発明の因子は、ＣＥＮＰ－Ａの核酸分子のアンチセンスまたはＲＮＡｉである。ＲＮＡｉは、ｓｉＲＮＡであってもｓｈＲＮＡであってもよく、そのような例としては、たとえば、約２０塩基前後（例

えば、代表的には約２１～２３塩基長）またはそれ未満の長さの二本鎖ＲＮＡであって、好ましくは、５’－リン酸、３’－ＯＨの構造を有しており、３’末端は約２塩基突出している。ｓｈＲＮＡはまた、好ましくは、３’突出末端を有し得る。二本鎖部分の長さは特に限定されないが、好ましくは約１０ヌクレオチド長以上、より好ましくは約２０ヌクレオチド長以上であり得る。ここで、３’突出末端は、好ましくはＤＮＡであり得、より好ましくは少なくとも２ヌクレオチド長以上のＤＮＡであり得、さらに好ましくは２～４ヌクレオチド長のＤＮＡであり得る。

別の好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子であり、ＰＣＲなどの核酸増幅反応などにおけるプライマーとして使用され得、あるいは、サザンブロットなどのプローブとして使用され得る。

好ましい実施形態において、本発明の因子は、標識されているかまたは標識と結合し得るものであることが有利であり得る。そのように標識がされている場合、本発明の因子によって測定することができる種々の状態を直接および／または容易に測定することができる。そのような標識は、識別可能に標識される限り、どのような標識でもよく、例えば、蛍光、リン光、化学発光、放射能、酵素基質反応および抗原抗体反応などの技法が挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、その因子が抗体などの免疫反応を利用して相互作用する場合、ビオチン－ストレプトアビジンのような免疫反応においてよく利用される系を用いてもよい。

好ましい実施形態では、本発明のＣＥＮＰ－Ａに対して特異的な因子は、配列番号３に示す配列からなるポリヌクレオチド（あるいは、正常な被検体に存在する改変体）に対して特異的な因子であることが有利である。このような因子は、ＣＥＮＰ－Ａの正常型を検出することができる。あるいは、本発明のＣＥＮＰ－Ａに対して特異的な因子は、配列番号３に示す配列からなるポリヌクレオチド（あるいは、正常な被検体に存在する改変体）以外のＣＥＮＰ－Ａの

改変体に対して特異的な因子であることが有利である。このような因子は、ＣＥＮＰ－Ａの改変体を検出することができる。

（ＣＥＮＰ－Ａ核酸形態を用いた診断キットおよび方法）

別の局面において、本発明は、Ａ）ａ）配列番号３に記載の塩基配列もしくはその相補体またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；（ｂ）配列番号４に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド；（ｃ）配列番号４に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；（ｄ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または（ｅ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも７０％である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含む、核酸分子に対して特異的な因子；およびＢ）該因子に起因するシグナルを用いて該核酸分子の発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該核酸分子の発現量に比較して対象の被験体の対象部分における該核酸分子の発現が高い場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、手段、を備える、癌診断キットを提供する。ここで、診断対象となる癌は、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。ＣＥＮＰ－Ａに特異的な因子としては、本明細書において記載されるような任意の因子を使用することができる。このような因子としては、その反応特異性さえ理解して提供される限り、どのような特異性を有する因子であっても本発明において利用することができ、したがって、そのような因子お

よびそれを含むキットは、本発明の範囲内にあることが理解される。１つの実施形態では、配列番号３中の任意の２０ヌクレオチド長を含む配列に対して特異的な因子が挙げられるがそれらに限定されない。

ここで、核酸分子の発現量の測定は、ＣＥＮＰ－Ａの核酸形態に対して特異的な因子に起因する任意のシグナルを用いて行うことができる。そのようなシグナルとしては、例えば、物理的信号（例えば、蛍光、発光など）、化学的信号（例えば、染色など）、生化学的信号（例えば、酵素反応）、生物学的信号（例えば、微生物の生存の判定）などが挙げられるがそれらに限定されない。このようなシグナルは、被験体の生体試料中に、例えば、本発明の mRNA が存在するか否かを直接または間接的に試験することが判定できるようなものであれば、どのようなものでも使用することができる。この場合、そのようなシグナルが検出される場合、試料中にその mRNA が存在する被験体を癌患者またはそのハイリスク者と判定することができる。

本発明のＣＥＮＰ－Ａの検出のために、生体試料としては、便、尿、汗、生検組織、唾液、血液（例えば、全血、血清、血漿など）、血液細胞（単核球等）、他の体液、罹患した部分の細胞などを対象とすることができる。mRNA の検出、測定は公知の RT-PCR 法、定量的 RT-PCT 法によって行うことができ、その場合の PCR は本発明のプライマーセットを用いることができる。これらのプライマーセットは、配列番号３の塩基配列またはその改変体に基づき設計し、合成・精製の各工程を経て調製することができる。なお、プライマー設計の留意点として、例えば以下を指摘することができる。プライマーのサイズ（塩基数）は、鋳型 DNA との間の特異的なアニーリングを満足させることを考慮し、15-40 塩基、望ましくは 15-30 塩基である。ただし、LA（long accurate）PCR を行う場合には、少なくとも 30 塩基が効果的である。

プライマーの設計の際には、センス鎖（5'末端側）とアンチセンス鎖（3'末端側）からなる１組あるいは１対（２本）のプライマーが互いにアニールしな

いよう、両プライマー間の相補的配列を避けると共に、プライマー内のヘアピン構造の形成を防止するため自己相補配列をも避けるようにする。本発明では、正常型とその改変体とを識別する必要がある場合、正常型と改変体との間で識別可能な部位に由来するプライマーを少なくとも１つ使用することが好ましい。このような場合、一方に存在し、他方には存在しないような配列（例えば、欠失または付加部分の配列）をプライマーの少なくとも一方として使用することが好ましく、プライマー対の両方として使用することがより好ましい。

さらに、鋳型 DNA との安定な結合を確保するため GC 含量を約 50％にし、プライマー内において GC-rich あるいは AT-rich が偏在しないようにする。アニーリング温度は Tm（melting temperature）に依存するので、特異性の高い PCR 産物を得るため、Tm 値が 55-65℃で互いに近似したプライマーを選定する。また、PCR におけるプライマー使用の最終濃度が約 0.1～約１μM になるよう調整する等を留意することも必要である。また、プライマー設計用の市販のソフトウェア、例えば Oligo™ [National Bioscience Inc.（米国）製]、GENETYX [ソフトウェア開発（株）（日本）製] 等を用いることもできる。

あるいは、本発明のキットまたは診断法は、アレイを用いて実行することができる。アレイの実行方法は、上述したとおりである。

別の局面において、本発明は、A）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；B）該試料中において、a）配列番号３に記載の塩基配列もしくはその相補体またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；（b）配列番号４に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド；（c）配列番号４に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；（d）（a）～（c）のいず

れか１つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または（ｅ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも７０％である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含む、核酸分子の存在量を測定する工程；Ｃ）該核酸分子の存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料における該核酸分子の量が増加している場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、工程、を包含する、癌診断方法を提供する。この癌診断方法で使用される試料としては、便、尿、汗、生検組織、唾液、血液（例えば、全血、血清、血漿など）、血液細胞（単核球等）、他の体液、罹患した部分の細胞などを対象とすることができる。比較の対象のために、罹患していないことが明らかな部位、または罹患していない他の被験体からの試料を利用することができる。罹患していない他の被験体からの試料を使用する場合、好ましくは、そのような試料は、対象となる被験体の対象部位と同様の部位に由来する試料を利用することができる。ここで、診断対象となる癌としては、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。上記核酸分子の検出は、そのような核酸分子に対して特異的な因子を用いて行うことができる。そのような因子としては、本明細書に記載されるＣＥＮＰ－Ａの核酸形態に対して特異的な任意の因子を用いることができる。

別の局面において、本発明は、（ａ）配列番号３に記載の塩基配列もしくはその相補体またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；（ｂ）配列番号４に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド；（ｃ）配列番号４に記載のアミノ酸配列において、１以上のア

ミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；（ｄ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または（ｅ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも７０％である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含む、核酸分子の、癌の診断剤の製造のための使用を提供する。ここで、診断対象となる癌としては、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。上記核酸分子の検出は、そのような核酸分子に対して特異的な因子を用いて行うことができる。そのような因子としては、本明細書に記載されるＣＥＮＰ－Ａの核酸形態に対して特異的な任意の因子を用いることができる。

（ＣＥＮＰ－Ａの核酸形態を用いた治療方法および治療剤）

別の局面において、本発明は、Ａ）（ａ）配列番号３に記載の塩基配列もしくはその相補体またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；（ｂ）配列番号４に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド；（ｃ）配列番号４に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；（ｄ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または（ｅ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも７０％である塩基配列からなり、かつ、生物学

的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含む、核酸分子を含む、癌治療剤を提供する。ここで、治療対象となる癌としては、例えば、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。このようなＦＩＲの核酸形態としては、本明細書において記載されるような任意の核酸分子を使用することができる。好ましくは、ＣＥＮＰ－Ａの正常型を発現することができる核酸分子が使用される。１つの実施形態では、例えば、配列番号３に示される配列またはその改変体であって、配列番号３と同等の機能を有する分子または配列番号２と同等の機能を有する分子を発現する分子を利用することができる。より好ましくは、本発明の治療剤に含まれる核酸分子は、配列番号３で示される配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子を含む。

別の局面において、本発明は、上記癌治療剤を用いた癌治療法を提供する。この治療法は、本明細書において説明される任意の治療技術を用いることができる。

（ＣＥＮＰ－Ａのポリペプチド形態）

別の局面において、本発明は、本発明は、ポリペプチド形態のＣＥＮＰ－Ａを含む、癌（例えば、直腸癌または結腸癌（これらを総称して大腸癌とも言う））の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（例えば、がん診療レジデントマニュアル第２版、編集：国立がんセンター中央病院内科レジデント、医学書院、２０００を参照）。本発明では、本発明では、癌の発症が、ＣＥＮＰ－Ａの異常発現と予想外に関連していることが明らかになった。このような関連、なら

びにそれを利用した診断および治療効果は従来知られておらず、したがって、本発明のＣＥＮＰ－Ａのポリペプチド形態およびそれに関連する発明は、従来技術より優れた効果を示す。

従って、１つの実施形態において、本発明は、（ａ）配列番号４に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；（ｂ）配列番号４に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；（ｃ）配列番号３に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；（ｄ）配列番号４に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または（ｅ）（ａ）～（ｄ）のいずれか１つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも７０％であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、を含む、ポリペプチドを提供する。

１つの好ましい実施形態において、上記（ｂ）における置換、付加および欠失の数は限定されていてもよく、例えば、５０以下、４０以下、３０以下、２０以下、１５以下、１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、２以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、配列番号４に示される配列からなる正常型ＣＥＮＰ－Ａと類似するかまたは実質的に同一の活性を有する、あるいはＣＥＮＰ－Ａの異常型活性（例えば、非セントロメアクロマチンへの結合））限り、多い数であってもよい。

別の好ましい実施形態において、上記（ｃ）におけるスプライス変異体または対立遺伝子変異体は、配列番号４に示すアミノ酸配列と少なくとも９９％の相同性を有することが好ましい。

別の好ましい実施形態において、上記種相同体は、本明細書中上述のように同定することができ、配列番号４に示すアミノ酸配列と少なくとも約３０％の

相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、相同であり得る。

上記種相同体は、その種の遺伝子配列データベースが存在する場合、そのデータベースに対して、本発明のＣＥＮＰ－Ａをクエリ配列として検索することによって同定することができる。あるいは、本発明のＣＥＮＰ－Ａの全部または一部をプローブまたはプライマーとして、その種の遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。そのような同定方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載される文献にも記載されている。種相同体は、例えば、配列番号３に示す核酸配列または配列番号４に示すアミノ酸配列と少なくとも約３０％の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、相同であり得る。

別の好ましい実施形態において、上記（ｅ）における上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号４に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、セントロメアクロマチンとの相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。これらは例えば、免疫学的アッセイ、蛍光アッセイなどによって測定することができる。

好ましい実施形態において、上記（ａ）～（ｄ）のいずれか１つのポリペプチドに対する相同性は、少なくとも約８０％であり得、より好ましくは少なくとも約９０％であり得、さらに好ましくは少なくとも約９８％であり得、もっ

とも好ましくは少なくとも約９９％であり得る。最も好ましくは、本発明のＣＥＮＰ－Ａポリペプチドは、配列番号４からなる配列を有する。

本発明のポリペプチドは、通常、少なくとも３の連続するアミノ酸配列を有する。本発明のポリペプチドが有するアミノ酸長は、目的とする用途に適合する限り、どれだけ短くてもよいが、好ましくは、より長い配列が使用され得る。従って、好ましくは、少なくとも４アミノ酸長、より好ましくは少なくとも５アミノ酸長、少なくとも６アミノ酸長、少なくとも７アミノ酸長、少なくとも８アミノ酸長、少なくとも９アミノ酸長、少なくとも１０アミノ酸長であってもよい。さらに好ましくは少なくとも１５アミノ酸長であり得、なお好ましくは少なくとも２０アミノ酸長であり得る。これらのアミノ酸長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、１１、１２、１３、１４、１６など）あるいは、それ以上の数（例えば、２１、２２、．．．３０、など）であってもよい。本発明のポリペプチドは、ある因子と相互作用することができる限り、その上限の長さは、配列番号４に示す配列の全長と同一であってもよく、それを超える長さであってもよい。

本発明のポリペプチド形態のＣＥＮＰ－Ａは、標識されているかまたは標識され得ることが好ましい。このような標識されているかまたは標識され得るＣＥＮＰ－Ａを用いて、体内にあるＣＥＮＰ－Ａに対する抗体量を測定することができ、それにより、ＣＥＮＰ－Ａの発現量を間接的に測定することができるからである。

（ＣＥＮＰ－Ａのポリペプチド形態に特異的な因子）

１つの局面において、本発明は、ＣＥＮＰ－Ａのポリペプチド形態に対して特異的な因子を含む、癌（例えば、直腸癌または結腸癌（これらを総称して大腸癌とも言う））の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。したがって、本発明は、本明細書に記載される任意のＣＥＮＰ－Ａのポリペプ

チドまたはその改変体もしくはフラグメントに対して特異的な因子を提供する。ここで、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（例えば、がん診療レジデントマニュアル第２版、編集：国立がんセンター中央病院内科レジデント、医学書院、２０００を参照）。本発明では、癌の発症が、ＣＥＮＰ－Ａの異常発現と予想外に関連していることが明らかになった。このような関連、ならびにそれを利用した診断および治療効果は従来知られておらず、したがって、本発明の因子は、従来技術により提供されるものより優れた効果を示す。

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される因子であり得る。このような因子は、本発明のポリペプチドに特異的に結合するものであれば、どのようなものでもよいことが理解され得る。より好ましくは、本発明の因子は、抗体またはその誘導体（例えば、単鎖抗体）である。従って、本発明の因子は、プローブおよび／またはインヒビターとして使用することができる。

好ましい実施形態において、本発明の因子は、標識されているかまたは標識と結合し得るものであることが有利であり得る。そのように標識がされている場合、本発明の因子によって測定することができる種々の状態を直接および／または容易に測定することができる。そのような標識は、識別可能に標識される限り、どのような標識でもよく、例えば、蛍光、リン光、化学発光、放射能、酵素基質反応および抗原抗体反応などの技法が挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、その因子が抗体などの免疫反応を利用して相互作用する場合、

ビオチン－ストレプトアビジンのような免疫反応においてよく利用される系を用いてもよい。

好ましい実施形態では、本発明のＣＥＮＰ－Ａに対して特異的な因子は、配列番号４に示す配列からなるポリペプチド（あるいは正常な被検体に存在する改変体）に対して特異的な因子であることが有利である。このような因子は、ＣＥＮＰ－Ａの正常型を検出することができる。あるいは、本発明のＣＥＮＰ－Ａに対して特異的な因子は、配列番号４に示す配列からなるポリペプチド（あるいは正常な被検体に存在する改変体）以外のＣＥＮＰ－Ａの改変体に対して特異的な因子であることが有利である。このような因子は、ＣＥＮＰ－Ａの改変体を検出することができる。

（ＣＥＮＰ－Ａポリペプチド形態を用いた診断キットおよび方法）

別の局面において、本発明は、Ａ）（ａ）配列番号４に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；（ｂ）配列番号４に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；（ｃ）配列番号３に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；（ｄ）配列番号４に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または（ｅ）（ａ）～（ｄ）のいずれか１つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも７０％であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、を含む、ポリペプチドに対して特異的な因子；およびＢ）該因子に起因するシグナルを用いて該ポリペプチドの発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該ポリペプチドの発現量に比較して対象の被験体の対象部分における該ポリペプチドの発現が高い場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、手段、を備える、

癌診断キットを提供する。ここで、診断対象となる癌としては、例えば、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。このようなＣＥＮＰ－Ａに特異的な因子としては、本明細書において記載されるような任意の因子を使用することができる。このような因子は、ＣＥＮＰ－Ａの正常型および改変体のいずれとも特異的に反応してもよく、あるいは、ＦＩＲの正常型または改変体のいずれか一方と特異的に反応してもよい。その反応特異性さえ理解して提供される限り、どのような特異性を有する因子であっても本発明において利用することができ、したがって、そのような因子およびそれを含むキットは、本発明の範囲内にあることが理解される。１つの実施形態では、正常型と改変体との共通の配列（例えば、配列番号４中の、３０アミノ酸長の配列など）に対して特異的な因子が挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、この因子として、ＣＥＮＰ－Ａポリペプチド自体を用いることができる。Ｂポリペプチドを用いた場合、ＣＥＮＰ－Ａポリペプチドに特異的な抗体を認識することができることから、生体内のＣＥＮＰ－Ａポリペプチドに特異的な抗体量を算出し、それにより、ＣＥＮＰ－Ａポリペプチドの体内における存在を同定することが可能であるからである。

ここで、ＣＥＮＰ－Ａのポリペプチドの発現量の測定は、本発明のＣＥＮＰ－Ａのポリペプチド形態に特異的な因子に起因する任意のシグナルを用いて行うことができる。

あるいは、本発明の癌診断方法では、被験体の血清中に、本発明の抗原ペプチドと結合する抗体が存在するか否かを試験し、血清中にその抗体が存在する被験体を癌患者または癌ハイリスク者と判定することもできる。すなわち、本発明の抗原ペプチドは、患者の血清中の抗体（IgG）と結合するペプチドであるから、被験体の血清と反応させ、これらの抗原ペプチドと結合する抗体を含む血清を、癌患者またはそのハイリスク患者の血清として判定することができ

る。なおその際に、２種類の抗原ペプチドについて血清中抗体との結合を判定することが好ましい。

具体的な診断は、例えば抗原ペプチドに被験体血清を接触させ、抗原ペプチドと被験体血清中の IgG 抗体とを液相中において反応させる。さらに血清中の IgG 抗体と特異的に結合する標識 IgG 抗体を反応させて、標識 IgG 抗体のシグナルを検出すればよい。標識 IgG 抗体の標識物質は、上記の標識抗体において例示したような酵素、放射性同位体または蛍光色素を使用することができる。酵素を用いる場合には、酵素作用によって分解して発色する基質を加え、基質の分解量を光学的に測定することによって酵素活性を求め、これを結合抗体量に換算し、標準値との比較から抗体量が算出される。放射生同位体を用いる場合には、放射性同位体の発する放射線量をシンチレーションカウンター等により測定する。また、蛍光色素を用いる場合には、蛍光顕微鏡を組み合わせた測定装置によって蛍光量を測定すればよい。

シグナルの検出は、実施例に示したようなウエスタンブロット分析を採用することができる。あるいは、抗原ペプチド＋血清中抗体＋標識 IgG 抗体の結合体を、公知の分離手段（クロマト法、塩析法、アルコール沈殿法、酵素法、固相法等）によって分離し、標識 IgG 抗体のシグナルを検出するようにしてもよい。

なお、このような診断方法の簡便かつ広範囲な実施を可能とするものとして、本発明の診断キットが提供される。

本発明の診断方法はまた、抗原ペプチドの１種類以上をプレート上に固定化し、この基板上において被験体血清の抗体との結合を試験する方法（これもまた本発明の包含される）として実施することもできる。抗原ペプチドを基板上に固定化することによって、未結合の標識結合分子を容易に除去することができる。また、このような診断方法の簡便かつ広範囲な実施を可能とするものとして、本発明の診断キットの１つの実施形態が提供される。

あるいは、本発明の診断方法は、被験体の生体試料中に、本発明の抗体、もしくは本発明の標識抗体と結合する抗原ペプチドが存在するか否かを試験し、試料中にその抗原ペプチドが存在する被験体を癌患者またはそのハイリスク者と判定する。すなわち、ここで使用する抗体または標識抗体は、大腸癌細胞で発現している抗原ペプチドと特異的に結合する抗体であるから、この抗体と結合する抗原ペプチドを含む生体試料を、大腸癌患者または大腸癌ハイリスク患者の試料として判定することができる。なおその際に、好ましくは2種の抗体について試料中の抗原ペプチドとの結合を判定することが好ましい。また、生体試料としては、血液、血液細胞（単核球等）を対象とすることができる。

本発明の診断方法における一つの態様は、抗体と抗原ペプチドとの結合を液相系において行う方法である。例えば、本発明の標識抗体と生体試料とを接触させて標識抗体と抗原ペプチドを結合させ、この結合体を本明細書において記載されるような方法で分離し、標識シグナルを同様の方法で検出する。このような診断方法の簡便かつ広範囲な実施を可能とするものとして、本発明の診断キットが提供される。

液相系での診断の別の方法は、本発明の抗体（一次抗体）と生体試料とを接触させて一次抗体と抗原ペプチドを結合させ、この結合体に本発明の標識抗体（二次抗体）を結合させ、この三者の結合体における標識シグナルを検出する。あるいは、さらにシグナルを増強させるためには、非標識の二次抗体を先ず抗体＋抗原ペプチド結合体に結合させ、この二次抗体に標識物質を結合させるようにしてもよい。このような二次抗体への標識物質の結合は、例えば二次抗体をビオチン化し、標識物質をアビジン化しておくことによって行うことができる。あるいは、二次抗体の一部領域（例えば、Fc 領域）を認識する抗体（三次抗体）を標識し、この三次抗体を二次抗体に結合させるようにしてもよい。なお、一次抗体と二次抗体は、両方ともモノクローナル抗体を用いることもでき、あるいは、一次抗体と二次抗体のいずれか一方をポリクローナル抗体とするこ

ともできる。液相からの結合体の分離やシグナルの検出は、本明細書において記載されるように行うことができる。また、このような診断方法の簡便かつ広範囲な実施を可能とするものとして、本発明の診断キットの一つの実施形態が提供される。

本発明の診断方法における別の態様は、抗体と抗原ペプチドとの結合を固相系において試験する方法である。この固相系における方法は、極微量の抗原ペプチド検出と操作の簡便化のため好ましい方法である。すなわちこの固相系の方法は、本発明の抗体（一次抗体）を樹脂プレート等に固定化し、この固定化抗体に抗原ペプチドを結合させ、非結合ペプチドを洗浄除去した後、プレート上に残った抗体＋抗原ペプチド結合体に標識抗体（二次抗体）を結合させ、この二次抗体のシグナルを検出する方法である。この方法は、いわゆる「サンドイッチ法」と呼ばれる方法であり、マーカーとして酵素を用いる場合には、「ELISA（enzyme linked immunosorbent assay）」として広く用いられている方法である。一次抗体と二次抗体は、両方ともモノクローナル抗体を用いることもでき、あるいは、一次抗体と二次抗体のいずれか一方をポリクローナル抗体とすることもできる。シグナルの検出は、本明細書に記載されるように行うことができる。また、このような診断方法の簡便かつ広範囲な実施を可能とするものとして、本発明の診断キットの一つの実施形態が提供される。

本発明の診断キットは、本発明の診断方法を行うための試薬キットであり得る。このようなキットは、被検成分の種類に応じて各種のものが市販されており、この発明の診断キットも、この発明によって提供される抗原ペプチド、抗体および／または標識抗体を用いることを除き、当該分野において公知のキットに用いられている各要素によって構成することができる。

あるいは、本発明のキットまたは診断法は、アレイを用いて実行することができる。アレイの実行方法は、上述したとおりである。

別の局面において、本発明は、A）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；B）該試料中において、請求項１４２に記載のポリペプチドの存在量を測定する工程；C）該ポリペプチドの存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料における該ポリペプチドの量が増加している場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、工程、を包含する、癌診断方法を提供する。この癌診断方法で使用される試料としては、便、尿、汗、生検組織、唾液、血液（例えば、全血、血清、血漿など）、血液細胞（単核球等）、他の体液、罹患した部分の細胞などを対象とすることができる。比較の対象のために、罹患していないことが明らかな部位、または罹患していない他の被験体からの試料を利用することができる。罹患していない他の被験体からの試料を使用する場合、好ましくは、そのような試料は、対象となる被験体の対象部位と同様の部位に由来する試料を利用することができる。ここで、診断対象となる癌としては、例えば、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。上記ポリペプチドの検出は、そのようなポリペプチド（ＣＥＮＰ－Ａポリペプチド）に対して特異的な因子（例えば、抗体）を用いて行うことができる。そのような因子としては、本明細書に記載されるＣＥＮＰ－Ａのポリペプチド形態に対して特異的な任意の因子を用いることができる。好ましくは、このような因子は、配列番号４に示される配列を有する正常型ＣＥＮＰ－Ａおよびその改変体の両方に特異的に反応することが有利であり得る。あるいは、この因子は、改変体のみに対して特異的であっても、正常型のみに対して特異的であってもよい。このような性質さえ有する限り、任意の因子がその反応特異性さえ理解して提供され、どのような特異性を有する因子であっても本発明において利用することができ、したがって、そのような因子およびそれを含むキットは、本発明の範囲内にあることが理解

される。１つの実施形態では、正常型と改変体とにおいて相違がある配列部分に対して特異的な因子が挙げられるがそれらに限定されない。

別の局面において、本発明は、（ａ）配列番号４に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；（ｂ）配列番号４に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；（ｃ）配列番号３に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；（ｄ）配列番号４に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または（ｅ）（ａ）～（ｄ）のいずれか１つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも７０％であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、を含む、ポリペプチドの、癌の診断剤の製造のための使用を提供する。ここで、診断対象となる癌としては、例えば、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。上記ポリペプチドの検出は、そのようなポリペプチドに対して特異的な因子を用いて行うことができる。そのような因子としては、本明細書に記載されるＣＥＮＰ－Ａのポリペプチド形態に対して特異的な任意の因子を用いることができる。

（ＦＩＲのポリペプチド形態を用いた治療方法および治療剤）

別の局面において、本発明は、Ａ）（ａ）配列番号４に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；（ｂ）配列番号４に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；（ｃ）配列番号３に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；（ｄ）配列番号４に

記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または（ｅ）（ａ）～（ｄ）のいずれか１つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも７０％であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、を含む、ポリペプチドを含む、癌治療剤を提供する。ここで、治療対象となる癌としては、例えば、直腸癌および結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。このようなＦＩＲに特異的な因子としては、本明細書において記載されるような任意の因子を使用することができる。このポリペプチドは、ＣＥＮＰ－Ａの正常型な機能を少なくとも１つ有し、好ましくは、セントロメアクロマチンに結合する能力を有する。１つの実施形態では、例えば、配列番号４に示される配列またはその改変体であって、配列番号４と同等の機能を有する分子を利用することができる。より好ましくは、本発明の治療剤に含まれるポリペプチドは、配列番号４で示される配列を含むポリペプチドを含む。

別の局面において、本発明は、上記癌治療剤を用いた癌治療法を提供する。この治療法は、本明細書において説明される任意の治療技術を用いることができる。

以下、実施例を示して本願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、本願の発明は以下の例によって限定されるものではない。従って、本発明の範囲は、実施例のみに限定されるものではなく、特許請求の範囲によってのみ限定される。

実施例

実施例１

本発明の抗原ペプチド FIR（配列番号２）の癌組織および正常組織での発現をウェスタンブロットによって分析した。

(1)材料と方法

(1-1)抗FIR抗体

事前にFIRペプチドのアミノ酸配列（配列番号２）から抗原性、疎水性、反応性、ペプチドの特異性をＢＬＡＳＴサーチし、特異的抗原性ペプチドとして以下の２つのペプチドをFmoc/t-Bocによる固相法で合成した。

NH_2-CDKWKPPQGTDSIKME-$COOH_2$（配列番号５）

NH_2-CEVYDQERFDNSDLSA-$COOH_2$（配列番号６）

なお、下線はそれぞれ配列番号２の31-45アミノ酸配列および528-542アミノ酸配列と一致する。

合成したペプチドは、純度を保証するためHPLCにより分析し、質量分析装置により分子量を同定した。

この合成ペプチドを用いて、無菌帝王切開を受けたニュージーランド産S.P.F基準（無病原菌）のウサギを常法により免疫し、血清を抽出し、アフィニティー精製した抗FIR抗体を作成した。

(1-2)ウェスタンブロット分析

患者の了解のもと、大腸癌摘出直後の癌部および非癌部組織のそれぞれから凍結標本を採取し、-80℃に保存した。この凍結標本の適量を、9.5 M Uera, 2% CHAPS, 1% DTT溶液中でホモジェナイズした後、卓上高速遠心器（ベックマン社）で15,000gにて遠心し、上清（タンパク質溶液）を週出し、吸光度によりタンパク質濃度を同定した。

癌部および非癌部組織から得られたタンパク質それぞれ50μgを8% Tris/Glycine SDS-Polyacrylamide gelにて電気泳動した。泳動されたタンパク質をニトロセルロース膜にトランスファーし、上記(1-2)の抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

(2)結果

結果は図１に示したとおりである。８例の大腸癌患者の癌組織（T）および正常組織（N）を比較したところ、癌組織において FIR タンパク質の特異的発現が確認された。

実施例２

本発明の抗原ペプチド FIR をコードする遺伝子の転写産物（mRNA）の癌組織および正常組織での転写を RT-PCR によって分析した。

(1)材料と方法

大腸癌摘出直後の癌部および非癌部組織のそれぞれから採取した凍結標本から、RNeasy Mini Kit（Qiagen 社）を用いて mRNA を抽出した。この mRNA（5μg/20μl）を、1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR（AMV, cat no. 1 483 188, Roche 社）により cDNA に変換し、これを PCR 増幅した。

PCR に使用したプライマーセットは以下のとおりである。

順方向プライマー：5'-ggccccatcaagagcatc-3'（配列番号７）

逆方向プライマー　：5'-ggggctgggccagggtcag-3'（配列番号８）

PCR 条件は以下のとおりである。

95℃/10 分間

（94℃/１分間；54℃/１分間；72℃/１分間）×30

72℃/７分間

(2)結果

結果は図２に示したとおりである。８例の大腸癌患者の癌組織（T）および正常組織（N）からの FIR mRNA の転写を比較したところ、癌組織細胞において FIR mRNA の特異的発現が確認された。

実施例３

本発明の CENP-A（配列番号４）の癌組織および正常組織での発現をウェスタンブロットによって分析した。

(1)材料と方法

(1-1)被検組織

市販の抗セントロメア抗体［Human ANA Centromere Autoantibody：The Binding Site 社（英国）製］を用いたことを除き、実施例１と同様の方法により、ウェスタンブロット分析を行った。

以下に具体的な手法を示す。

（ヒト組織試料）

１１症例の原発性結腸直腸癌由来の組織を、外科切除した（表１）。

表１　結腸直腸癌の患者の臨床的特徴

	サンプル番号	年齢	性別	位置[a]	デュークステージ
1	1	82	男性	S	B
2	112	72	男性	S	C
3	6	57	男性	S	B
4	117	49	男性	C	D
5	118	85	男性	S	B
6	24	64	女性	C	C
7	27	51	男性	R	D
8	28	67	男性	R	C
9	29	51	男性	R	C
10	32	80	男性	A	B
11	35	72	女性	S	B

[a] S: S状結腸 , C: 盲腸 , R: 直腸 , A: 上行結腸

書面でのインフォームドコンセントを、手術前に各患者から得た。切除試料を、腫瘍組織およびこの腫瘍から５～１０ｃｍ離れた対応する非腫瘍組織から術後１時間以内に獲得した。切除した組織の全てを、直ちに液体窒素中に入れ、さらに分析するまで－８０℃にて保存した。

（タンパク質抽出および免疫ブロッティング）

凍結組織試料を、４℃にて１時間の遠心分離（１００，０００×ｇ）後に、溶解緩衝液（７Ｍ尿素、２Ｍチオ尿素、２％　３－［（３－コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ］－１－プロパンスルホネート、０．１Ｍ　ＤＴＴ、２％　ＩＰＧ緩衝液（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｂｕｃｋｉｎｇｈａｍｓｈｉｒｅ，Ｕｎｉｔｅｄ　Ｋｉｎｇｄｏｍ）、および４０ｍＭ　Ｔｒｉｓ）中で、Ｐｏｌｙｔｒｏｎホモジナイザー（Ｋｉｎｅｍａｔｉｃａ，Ｌｉｔｔａｕ－Ｌｕｚｅｒｎ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を用いて溶解した。上清のタンパク質を、７．５～１５％勾配ゲル（Ｎｉｋｋｙｏ　Ｔｅｃｈｎｏｓ　ＤＲＣ，Ｔｏｋｙｏ，Ｊａｐａｎ）上での電気泳動により分離した。タンパク質を、タンクトランスファー装置（Ｂｉｏ－Ｒａｄ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）中で、フッ化ポリビニリデンメンブレン（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，Ｂｅｄｆｏｒｄ，ＭＡ）に移し、そしてこのメンブレンを、５％スキムミルクを含有するＰＢＳでブロックした。ブロッキング緩衝液中に、１：１００希釈した核セントロメア自己抗体ポジティブコントロール（ＡＮＡ血清；Ｔｈｅ　Ｂｉｎｄｉｎｇ　Ｓｉｔｅ，Ｂｉｒｍｉｎｇｈａｍ，Ｕｎｉｔｅｄ　Ｋｉｎｇｄｏｍ）、１：５００希釈した抗ヒトＣＥＮＰ－Ａモノクローナル抗体（Ａｎｄｏ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，２２：２２２９－２２４１，２００２）、１：１００希釈したウサギ抗ＰＣＮＡ（ＦＬ－２６１）抗体（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ，Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ，ＣＡ）、および１：５００希釈したヤギ抗β－アクチン抗体（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）を、一次抗体として使用した。ブロッキング緩衝液中に、１：１０，０００希釈したヤギ抗ヒトＩｇＧ　ＨＲＰ結合体（Ｊａｃｋｓｏｎ，Ｗｅｓｔ　Ｇｒｏｖｅ，ＰＡ）、１：３，０００希釈したヤギ抗ウサギＩｇＧ　ＨＲＰ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）、および１：５００希釈したウサギ抗ヤギＩｇＧ　ＨＲＰ（Ｃａｐｐｅｌ，Ｗｅｓｔ　Ｃｈｅｓｔｅｒ，ＰＡ）を、二次抗体として使用した。メンブレン

上の抗原を、強化化学発光検出試薬（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）により検出した。各バンドの強度を、ＮＩＨ画像により測定した。

（免疫組織学）

室温にて５分間、４％パラホルムアルデヒドを含有するＰＢＳを用いて組織をスライドガラス上に固定した。ＰＢＳで３回洗浄した後、試料を、０．５％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ-１００を含有するＰＢＳで５分間透過化処理し、そして４％パラホルムアルデヒド／ＰＢＳで５分間再固定した。いくつかの実験では、アセトンを用いて４℃にて１０分間、組織を固定した。抗体の非特異的結合を、ブロッキング緩衝液（１％　ＢＳＡまたは１０％ウシ胎仔血清／ＰＢＳ）で１時間ブロックした。試料を、ブロッキング緩衝液中に１：５００希釈した抗ヒトＣＥＮＰ－Ａモノクローナル抗体および／または１：２５希釈したヤギ抗ヒトＣＥＮＰ－Ｂ（Ｙ－１７）抗体（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）と共に、１時間インキュベートした。ＰＢＳで洗浄した後、試料を、１：５００希釈したＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８または５６８結合ヤギ抗マウスＩｇＧ二次抗体およびＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５９４結合ロバ抗ヤギＩｇＧ二次抗体（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ，Ｅｕｇｅｎｅ，ＯＲ）と共に、１時間インキュベートした。ＤＮＡを、ＤＡＰＩ　ＩＩＩ　Ｃｏｕｎｔｅｒｓｔａｉｎ（Ｖｙｓｉｓ，Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ，ＩＬ）を用いて対比染色した。試料を、蛍光顕微鏡（Ｌｅｉｃａ　ＱＦＩＳＨ；Ｌｅｉｃａ　Ｍｉｃｒｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｔｏｋｙｏ，Ｊａｐａｎ）により観察した。

（ＲＴ－ＰＣＲおよびリアルタイム定量ＰＣＲ）

総ＲＮＡおよびゲノムＤＮＡを、ＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｎｉ　ｋｉｔおよびＤＮｅａｓｙ　Ｔｉｓｓｕｅ　ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて腫瘍組織および非腫瘍組織から抽出した。ｆｉｒｓｔ－ｓｔｒａｎｄ　ｃＤＮＡ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　ｋｉｔ　ｆｏｒ　ＰＴ－ＰＣＲ（Ｒｏｃｈｅ，Ｍａｎｎｈｅｉｍ，

Ｇｅｒｍａｎｙ）を用いて、総ＲＮＡからｃＤＮＡを合成した。このｃＤＮＡをテンプレートとして使用し、以下の適切なプライマーを用いてＣＥＮＰ－ＡｃＤＮＡを増幅した（順方向：５’－TAGGCGCTTCCTCCCATCAA－３’（配列番号９）、逆方向：５’－GCCGAGTCCCTCCTCAAG－３’（配列番号１０））。

コントロールのために、ＧＡＰＤＨ　ｃＤＮＡを増幅した。ＰＣＲ反応のためにテンプレートｃＤＮＡの連続希釈を行い、直線範囲内でＰＣＲ産物を最適化した。ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ機器（Ｒｏｃｈｅ）を用いたＣＥＮＰ－ＡｃＤＮＡのリアルタイム定量ＰＣＲを、ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ　ＤＮＡ　Ｍａｓｔｅｒ　ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　Ｉ（ＦａｓｔＳｔａｒｔ　Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ、デオキシヌクレオチド三リン酸、緩衝液、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　Ｉ）、３．０ｍＭ　$MgCl_2$、ならびに各０．５μＭの順方向プライマー（５’－ＡＣＡＡＧＧＴＴＧＧＣＴＡＡＡＧＧＡ－３’（配列番号２３））および逆方向プライマー（５’－ＡＴＧＣＴＴＣＴＧＣＴＧＣＣＴＣＴＴ－３’（配列番号２４））を含有する２０μｌの反応混合物を含むＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒキャピラリー中で実施した。ＣＥＮＰ－ＡゲノムＤＮＡもまた、上記のようにしてリアルタイムＰＣＲにより定量した。しかし、以下のプライマーも使用した（順方向：５’－ＡＣＧＣＣＴＡＴＣＴＣＣＴＣＡＣＣＴＴ－３’（配列番号２５）、および逆方向：５’－ＴＧＧＣＴＧＡＧＣＡＧＧＡＡＡＧＡＣ－３’（配列番号２６））。ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒソフトウェアバージョン３．３（Ｒｏｃｈｅ）を、定量ＰＣＲの分析に使用した。Ｎｉｈｏｎ　Ｇｅｎｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．（Ｓｅｎｄａｉ，Ｊａｐａｎ）にて、プライマーの最適化を実施した。

（ＦＩＳＨ分析）

以前に記載された（Ｐｅｒｓｏｎｓ，Ｄ．Ｌ．ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２：８８３－８８８，１９９６；Ｌｉｎｇｌｅ，Ｗ．Ｌ．ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９９：１９７

８－１９８３，２００２）タッチプレパレーションのためのＦＩＳＨ法を若干改変した。簡単に述べると、新鮮な組織または凍結組織のタッチプレパレーションのスライドを風乾した。ＰＢＳ中で洗浄した後、スライドを、室温にて１０分間、７５ｍＭ　ＫＣｌ中でインキュベートし、次いで、メタノール：酢酸（３：１）中で１０分間固定した。スライドを、３７℃にて３０分間、０．１ｍｇ／ｍｌのＲＮａｓｅ　Ａを含有する２×ＳＳＣで処理し、２×ＳＳＣ中で洗浄し、そして３７℃で５分間、０．００５％のペプシン溶液中でインキュベートした。ＰＢＳ中で洗浄した後、スライドを、７０％、８５％、および１００％のエタノール中で脱水した。次いで、スライドを、３７℃にて３０分間、２×ＳＳＣ／０．１％　ＮＰ４０溶液中でインキュベートし、再度脱水した。標的ＤＮＡを、７３℃にて５分間、７０％ホルムアミド／２×ＳＳＣ溶液中で変性した。第７染色体（ＣＥＰ７　Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｇｒｅｅｎ）、第８染色体（ＣＥＰ８　Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｏｒａｎｇｅ）、第１２染色体（ＣＥＰ１２　Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｏｒａｎｇｅ）、および第１５染色体（ＣＥＰ１５　Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｇｒｅｅｎ；Ｖｙｓｉｓ，Ｄｏｗｎｅｒｓ　Ｇｒｏｖｅ，ＩＬ）のセントロメア周囲の領域に対する１０μｌのプローブもまた、７３℃にて５分間変性させ、次いで、３７℃にて一晩インキュベートすることにより標的ＤＮＡにハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後の洗浄を、以前に記載された通り実施した（Ｐｅｒｓｏｎｓ，Ｄ．Ｌ．ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２：８８３－８８８，１９９６）。ハイブリダイゼーションシグナルを、Ｌｅｉｃａ　ＱＦＩＳＨ（Ｌｅｉｃａ）により観察および分析した。各試料の少なくとも１００個の核を、染色体数について評価した。

（結果）

多くの型の癌において見られる異数性は、染色体の分離に関与するタンパク質の異常な機能から生じ得る。従って、本発明者らは、ヒト原発性癌における

適切な染色体分離に必須の任意の因子の変化を試験した。動原体集合に必須のタンパク質であるＣＥＮＰ－Ａが、１１症例全ての原発性結腸直腸癌において過剰発現されていたことを、抗セントロメア抗体を用いたウェスタンブロットにより検出した（ＡＮＡ血清；図３Ａ）。近傍の正常組織と比較すると、腫瘍細胞におけるＣＥＮＰ－Ａタンパク質の相対的な発現レベルは、１．５から３２．５の間で変化していた。先に示した結腸直腸腫瘍におけるＣＥＮＰ－Ａの過剰発現もまた、抗ヒトＣＥＮＰ－Ａモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットにより確認した（図３Ｂ）。ＣＥＮＰ－Ａは、ヒト動原体複合体の構成成分であるので、他の動原体タンパク質もまた、過剰発現されている可能性がある。

ＡＮＡ血清は、ＣＥＮＰ－Ａに加えて、ＣＥＮＰ－ＢおよびＣＥＮＰ－Ａに対する抗体を含む。従って、これらのタンパク質の発現もまた試験した。図３Ｃに示されるように、ＣＥＮＰ－Ｂタンパク質の発現レベルは、腫瘍組織と近傍の正常組織とで類似した。ＣＥＮＰ－Ｃに対応するバンドは、ＡＮＡ血清によっては検出できなかった（データは示していない）。この結腸直腸癌におけるＣＥＮＰ－Ａの過剰発現は、腫瘍細胞の高い率での増殖が原因ではなく、ＰＣＮＡタンパク質の相対的な発現レベルが、ほとんどの症例において、腫瘍組織と正常組織との間で匹敵したことが原因である（図３Ｄ）。

ＣＥＮＰ－Ａの過剰発現が、転写の増加の結果であるか否かを決定するために、結腸直腸癌細胞および正常結腸上皮のＣＥＮＰ－Ａ　ｍＲＮＡレベルを、ＲＴ－ＰＣＲにより試験した（図４Ａ）。症例３２を除く全ての症例は、腫瘍細胞において、正常細胞よりも高いＣＥＮＰ－Ａ　ｍＲＮＡレベルを示した。また、腫瘍細胞における相対的なｍＲＮＡレベルは、図３Ａに示される相対的なタンパク質レベルと十分に相関した。結腸直腸癌細胞における増加したＣＥＮＰ－Ａ　ｍＲＮＡレベルを、リアルタイム定量ＲＴ－ＰＣＲによりさらに確認した（図４Ｂ）。ＣＥＮＰ－Ａ遺伝子の増幅もまた、上記実験において使用

した同一の対応する腫瘍／正常試料由来のゲノムＤＮＡを用いたリアルタイム定量ＰＣＲにより試験した。図４Ｃに示されるように、腫瘍において、増幅は観察されなかった。これらの結果は、ＣＥＮＰ－Ａの過剰発現が、転写レベルで起っていたことを示す。

大部分の癌において、染色体が減少しているかまたは増大していることが示されており、いくつかの結腸直腸癌細胞株は、しばしば多染色体性である（Ｌｅｎｇａｕｅｒ，Ｃ．　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３９６：６４３－６４９，１９９８）。これらの観察は、ＣＥＮＰ－Ａの過剰発現が倍数性の結果であり得るかという疑問を投げかける。この疑問に取り組むために、正常細胞および腫瘍細胞のＦＩＳＨ分析を、いくつかのセントロメアプローブを用いて実施した。ＣＥＮＰ－Ａを過剰発現する３つの結腸直腸癌由来のタッチプレパレーションを獲得し、そして第７、第８、第１２および第１５染色体に対するセントロメアシグナルの数を計数した（表２）。

表２ 直腸結腸癌組織のFISH分析

	正常			腫瘍１			腫瘍２			腫瘍３		
	染色体数（%）			染色体数（%）			染色体数（%）			染色体数（%）		
	1	2	≧3	1	2	≧3	1	2	≧3	1	2	≧3
第７染色体	16.5	82.5	1.0	3.7	7.4	88.9	11.6	82.0	6.4	3.1	47.7	49.2
第８染色体	18.2	77.8	4.0	4.8	14.4	80.8	23.6	71.9	4.5	8.4	77.9	13.7
第12染色体	13.9	84.5	1.6	2.1	12.3	85.6	12.7	82.6	4.7	10.0	74.3	15.7
第15染色体	19.4	77.7	2.9	21.8	49.1	29.1	20.3	65.6	14.1	14.9	76.2	8.9

試験した染色体の各々について、染色体数（%）を示す。症例１は、非常に異数性であるが、症例２および症例３は、ほぼ２倍体である。

倍数性細胞は、正常組織においてほとんど観察されなかったが（１～４％）；対照的に、３つの腫瘍は全て、少なくとも１つの染色体において倍数性を示した。腫瘍１において、第７、第８、および第１２染色体の８０％より上が倍数性であったのに対し、腫瘍２においては第１５染色体のみ（１４．１％）、そして腫瘍３においては第７染色体のみ（４９．２％）が倍数性であった。このことは、必ずしも腫瘍細胞の全てが高度に倍数性ではないことを示唆する。これらの結果は、ＣＥＮＰ－Ａの過剰発現が、結腸直腸癌における倍数性の結果にとどまらないことを示している。

ＣＥＮＰ－Ａが、癌細胞において過剰発現され、周囲の間葉細胞において過剰発現されなかったかどうかを調査するために、結腸直腸癌組織および近傍の正常組織の組織切片を、抗ヒトＣＥＮＰ－Ａモノクローナル抗体を用いて染色した（Ａｎｄｏ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，２２：２２２９－２２４１，２００２）。ＣＥＮＰ－Ａは、核において分散したドットとして存在した。これは、正常細胞および腫瘍細胞の両方におけるセントロメア－動原体染色について代表的に見られる。顕微鏡下でのいくつかの組織切片の試験は、正常上皮細胞と比較して、腫瘍細胞においてＣＥＮＰ－Ａ染色が増加することを示す。このことは、ＣＥＮＰ－Ａが腫瘍細胞において実際に増加していることを示す（図５Ｂおよび図５Ｄ）。

上記の観察は、過剰発現されたＣＥＮＰ－Ａが腫瘍細胞の何処に局在化しているのかという重要な疑問を投げかける。ＣＥＮＰ－Ａは、動原体の中心的な構成成分として知られており、他の動原体タンパク質のサブセットを動員する。従って、ＣＥＮＰ－Ａの誤局在化（ｍｉｓｌｏｃａｌｉｚａｔｉｏｎ）は、異所性のセントロメア形成を引き起こし得、染色体の誤分離の原因となり得る。この仮説を試験するために、組織切片を、抗ＣＥＮＰ－Ａ抗体および抗ＣＥＮＰ－Ｂ抗体で同時染色し、そして個々の細胞を、高倍率で試験した（図６Ａ）。ＣＥＮＰ－Ｂがセントロメアαサテライトｄｎａに結合することを考慮して、

ＣＥＮＰ－Ｂをセントロメアマーカーとして使用した。ほとんど全てのＣＥＮＰ－ＡシグナルおよびＣＥＮＰ－Ｂシグナルは、正常細胞において同時に存在したのに対して、ＣＥＮＰ－Ａの１０％より多くが、腫瘍細胞においてＣＥＮＰ－Ｂと同時に存在しなかった（図６Ａおよび図６Ｂ）。この結果は、ＣＥＮＰ－Ａが、非セントロメア染色体領域と結合することだけでなく、ネイティブのセントロメアから分離することを示唆する。

結果のまとめ

本発明の CENP-A（配列番号４）の癌組織および正常組織での発現をウェスタンブロットによって分析した結果は図３に示したとおりである。11 例の大腸癌患者の癌組織（T）および正常組織（N）を比較したところ、癌組織において CENP-A タンパク質の特異的発現が確認された。

本発明の CENP-A をコードする遺伝子の転写産物（mRNA）の癌組織および正常組織での転写を RT-PCR によって分析した結果のまとめは、図４に示したとおりである。11 例の大腸癌患者の癌組織（T）および正常組織（N）からの CENP-A mRNA の転写を比較したところ、癌組織細胞において CENP-A mRNA の特異的発現が確認された。

（考察）

この報告の中で、本発明者らは、動原体タンパク質ＣＥＮＰ－Ａが原発性結腸直腸癌において過剰発現されている証拠を初めて示した。本発明者らは、腫瘍細胞において過剰発現されたＣＥＮＰ－Ａが、染色体の非セントロメア領域に誤標的化されている可能性があることを見出した。さらに、ＣＥＮＰ－Ａは、特定の染色体のセントロメアから消失しており、このことは、ネイティブの動原体複合体の破壊を示唆する。これらの観察は、結腸直腸癌における染色体の不安定性の理解に新たな見識を提供する。

近年、多くの遺伝子が、酵母細胞において変異された場合に染色体の誤分離を引き起こすことが同定された（Ｓｐｅｎｃｅｒ，Ｆ．ｅｔ　ａｌ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，１２４：２３７－２４９，１９９０；Ｙａｎａｇｉｄａ，Ｍ．ｅｔａｌ．，Ｂｉｏｅｓｓａｙｓ，１７：５１９－５２６，１９９５）。ＳＴＫ１５／ＢＴＡＫ／ａｕｒｏｒａ２、Ｂｕｂ１、Ｍａｄ２、およびｖ－セキュリンは、それらの機能障害により異数性を誘導し、それに加えて、染色体の凝縮、姉妹染色分体の付着および動原体の構造を含むいくつかのプロセスにおける欠損もまた、異数性を引き起こし得る。いくつかの動原体タンパク質（例えば、ＣＥＮＰ－ＦまたはＩＮＣＥＮＰ）が、ヒト癌細胞においてアップレギュレートされていたが（ｄｅ　ｌａ　Ｇｕａｒｄｉａ，Ｃ．ｅｔ　ａｌ．Ｈｅａｄ　Ｎｅｃｋ，２３：１０４－１１２，２００１；Ａｄａｍｓ，Ｒ．Ｒ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍａ，１１０：６５－７４，２００１）；これらのタンパク質の真の機能はまだ不明確であった。対照的に、ＣＥＮＰ－Ａは、セントロメア機能に必須のタンパク質である。ＣＥＮＰ－Ａは、セントロメア特異的ヌクレオソームにおいてヒストンＨ３と置き換わることにより、セントロメアクロマチンと他のクロマチンを区別する（Ｙｏｄａ，Ｋ．ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９７：７２６６－７２７１，２０００）。さらに、ＣＥＮＰ－Ａは、セントロメアへの他の動原体タンパク質の動員に必要とされる（Ｈｏｗｍａｎ，Ｅ．Ｖ．ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９７：１１４８－１１５３，２０００）。従って、ＣＥＮＰ－Ａの不適切な発現は、異常な動原体機能および染色体誤分離を誘導し得る。

ＣＥＮＰ－Ａの過剰発現が異数性の原因であるならば、それは如何なる機構なのか？１つの説明は、異所性のセントロメア形成であり得る。Ｖａｎ　Ｈｏｏｓｅｒら（Ｖａｎ　Ｈｏｏｓｅｒ，Ａ．Ａ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｓｃｉ．，１１４：３５２９－３５４２，２００１）は、近年、ＨｅＬａ細胞

におけるＣＥＮＰ－Ａの過剰発現が、全長染色体へのその組込みを生じ、そしてクロマチンの非セントロメア領域に、セントロメアー動原体構成成分のサブセットを動員し、動原体複合体前駆体を生成することを実証した。結腸直腸癌細胞における状況も同様である。ＣＥＮＰ－Ａは、癌細胞において過剰発現され、そして非セントロメア領域に誤標的された。本発明者らは、有糸分裂細胞が組織切片においてほとんど見られなかったために、ＣＥＮＰ－Ａと染色体全体との結合を観察できなかったことに注意されたい。ＨｅＬａ細胞におけるＣＥＮＰ－Ａ単独での過剰発現は、非セントロメア染色体領域での完全な動原体集合のために十分ではないけれども、活性な非セントロメアは、いくつかのさらなる機構により結腸直腸癌細胞に集合され得る。従って、結腸直腸癌において変更され得る完全なセントロメア活性に必須のさらなる因子を見出すことが重要である。

特定のセントロメアからのＣＥＮＰ－Ａの欠失は、いくらか予想外のことである。その正確な機構は不明確であるけれども、ＣＥＮＰ－Ａの過剰発現は、他のセントロメアー動原体構成成分を枯渇させ、そして動原体複合体を破壊し得る。別の可能性は、クロマチンの非セントロメア領域へのＣＥＮＰ－Ａの誤標的化が、染色体のコンホメーションを変更し、それによって、正常な動原体集合が妨げられ得るということである。実際、ＨｅＬａ細胞において過剰発現されたＣＥＮＰ－Ａは、染色体の正染性アーム上で顕著に見出され、特定の染色体の中心付近のヘテロクロマチンにおけるＣＥＮＰ－Ａレベルが減少していた（Ｖａｎ　Ｈｏｏｓｅｒ，Ａ．Ａ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｓｃｉ．，１１４：３５２９－３５４２，２００１）。結腸直腸癌におけるＣＥＮＰ－Ａの誤標的化の機構および染色体の不安定性への寄与方法を明確にするためには、さらなる調査が必要である。

ＣＥＮＰ－Ａは、どのようにして結腸直腸癌において過剰発現されるのか？本発明者らは、ＣＥＮＰ－Ａ　ｍＲＮＡもまた増大していることを実証した。

このことは、ＣＥＮＰ－Ａの過剰発現が、転写レベルで起こることを示す。従って、いくつかのエンハンサータンパク質が活性されているのかもしれないが、このような転写因子またはエンハンサーエレメントは知られていない。ＣＥＮＰ－Ａ転写の調節に関する調査が必要である。ＣＥＮＰ－Ａの発現はまた、細胞周期において調節されることが知られている。ＣＥＮＰ－Ａは、ＤＮＡ合成が行なわれた後のG_2期で合成され、セントロメアヌクレオソーム集合に重要であり得る（Ｓｈｅｌｂｙ，Ｒ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，１５１：１１１３－１１１８，２０００）。ＣＥＮＰ－Ａの発現およびセントロメア集合は、細胞周期の間、緊密に調節されており、この調節の異常は、異数性を誘導し得る。結腸直腸癌細胞株において、細胞周期を通してＣＥＮＰ－Ａの発現レベルを試験することが重要である。

ほとんどの固形腫瘍において見られる染色体の不安定性は、その正確な機構が完全に明らかになった場合、新規の治療標的を提供し得る。潜在的に染色体分離に影響を及ぼす遺伝子は、最も見込みのある候補である。ＣＥＮＰ－Ａの過剰発現が腫瘍進行の駆動力であるならば、癌細胞におけるその発現レベルの抑制は、腫瘍の増殖を停止し得る。実際、ＣＥＮＰ－Ａに対する抗体の微量注入は、ＨｅＬａ細胞を間期で制止する（Ｆｉｇｕｅｒｏａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍａ，１０７：３９７－４０５，１９９８）。ＣＥＮＰ－Ａは、ヒストンＨ３に類似のＣＯＯＨ末端ヒストン折り畳みドメインおよび高度に可変性のNH_2末端ドメインを有する。この独特のNH_2末端ドメインは、抗癌薬を設計するのに有用な標的であり得る。

実施例４　さらなる症例を用いたFIRの解析

次に、さらなる大腸癌患者３症例（１１８Ｋ、１Ｋ、２８Ｋ）から得た試料を用いて、ＦＩＲを同定し、同定されたＦＩＲについて配列分析を行った。配列決定は、ＡＢＩから市販される配列決定機を用いて行った。

その結果、症例１１８Ｋからは、配列番号１７および１８により特定される配列、症例１Ｋからは、配列番号１９および２０により特定される配列および症例２８Ｋからは、配列番号２１および２２により特定される配列が見出された。

これらの配列では、症例１１８Ｋにおいて、配列番号２のアミノ酸配列において、５４位アミノ酸ＬｅｕをコードするＣＴＧがＣＴＴに、６７位アミノＬｅｕ酸をコードするＣＴＴがＣＴＣに、８２位アミノ酸ＶａｌをコードするＧＴＧがＧＴＡに、９０位アミノ酸ＨｉｓをコードするＣＡＣがＣＧＣに変異していることが見出された。これらのうち、９０位アミノ酸をコードするアミノ酸の変異は、ＨｉｓからＡｒｇに変更されるものであり、機能が障害されていることが予測される。

症例１Ｋにおいては、配列番号２の６９位アミノ酸ＬｙｓをコードするＡＡＧがＡＡＡに変異していた。

症例２８Ｋにおいては、配列番号２の１０９位アミノ酸ＡｌａをコードするＧＣＣがＧＣＴに、１１３位のアミノ酸ＡｒｇをコードするＣＧＣがＣＡＣに変異していた。このうち１１３位の変異は、ＡｒｇがＨｉｓに変異するものであり、機能が障害されていることが示唆される。

このように、配列番号２のアミノ酸配列において、１位～１３５位（配列番号１の核酸配列では１位～約４００位）において、癌と関連する変異が多発していることがわかる。従って、この部位における変異を調べることによって、癌診断を行うことが可能である。

この知見をもとに、癌診断を別の被験体を用いて行う。１０人の被験体を対象に、この実験を行う。これら１０人からコンセントを得て血清試料を入手する。血清資料中のＦＩＲおよび／またはそれに特異的な抗体の存在量を検出する。このうち、配列番号１２、１４および１６の少なくともいずれか１つの分

子の発現が見られる被験体について、大腸組織の生検試料の試験を行うと、癌細胞が認められる。従って、配列番号１２、１４および１６に示される配列を有する分子の存在は、癌の確定診断に使用することができることが示される。

同様に、配列番号２に示される分子について、配列決定を行ってさらなる解析を行ったところ、配列番号２の５０位～１２０位の間に変異を有する分子を発現している被験体が見出される。この被験体を上記同様に試験試料の試験を行うと、癌細胞が認められる。従って、配列番号２に示される配列において変異を有する分子の存在は、癌の確定診断に使用することができることが示される。

実施例５　FIR のさらなる解析

次に、FIR の癌との関連をさらに解析した。

（材料および方法）

（プラスミド）

クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）遺伝子の上流にｃ－ｍｙｃプロモーターを含むレポータープラスミドを、ＣＡＴアッセイのために使用した（Avigan, M., I., Strober, B., and Levens, D., J. Biol. Chem., 265: 18538-18545, 1990）。全長ＦＩＲ　ｃＤＮＡ（ＨＡ－ＦＩＲ）および最初の７７アミノ酸が欠失したＦＩＲ変異体（ＨＡ－ＦＩＲΔＮ７７）を、ｐＣＧＮＭ２ベクタープラスミドにクローン化し（Liu, J., Akoulitchev, S., Weber, A., Ge, H., Chuikov, S., Libutti, D., Wang, X. W., Conaway, J. W., Harris, C. C., Conaway, R. C., Reinberg, D., and Levens, D., Cell., 104: 353-363, 2001）、そのアミノ末端に赤血球凝集素（ＨＡ）タグを導入した。全てのプラスミドを、ＣｓＣｌ超遠心によって調製し、そして配列を確認した。

（ヒト組織試料）

１５症例の原発性結腸直腸癌から、組織を外科的に切除した（表３）。書面でのインフォームドコンセントを手術前に各患者から得た。切除試料を、腫瘍組織およびその腫瘍から５～１０ｃｍの対応する非腫瘍上皮から、手術によって切除した後１時間以内に得た。２人の病理学者が、全ての組織試料が腺癌であることを顕微鏡によって確認した。全ての切除組織をすぐに液体窒素に置き、そしてさらなる分析まで－８０℃で保存した。

表３　患者およびそれの臨床的、病理学的知見の表
年齢、性別、腫瘍の位置、およびデュークステージを列挙した

番号	サンプル番号	年齢	性別	位置	デュークステージ
1	1c	82	男性	S字結腸	B
2	5c	46	男性	S字結腸	A
3	112c	72	男性	S字結腸	C
4	117c	49	男性	盲腸	D
5	118c	85	男性	S字結腸	B
6	6R	57	男性	S字結腸	B
7	17R	68	男性	S字結腸	D
8	19R	60	女性	直腸	B
9	23c	61	女性	横行結腸	D
10	24c	64	女性	盲腸	C
11	27R	51	男性	直腸	D
12	28R	67	男性	直腸	C
13	29R	51	男性	直腸	C
14	32c	80	男性	上行結腸	B
15	35c	72	女性	S字結腸	B

（トランスフェクションおよびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）アッセイ）

ＨｅＬａ細胞を、１０％ ウシ胎仔血清を含むＤｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅ’ｓ Ｍｅｄｉｕｍ（DMEM, Ｇｉｂｃｏ－ＢＲＬ）中で培養した。細胞を、エレクトロポレーションによってトランスフェクトし、トランスフェクションの４８時間後に回収し、そして以前に記載されるようにＣＡＴ活性についてアッセイした（Tomonaga,T., and Levens,D., J. Biol. Chem., 270: 4875-4881, 1995）。

（免疫細胞化学およびフローサイトメトリー分析）

ＨｅＬａ細胞をカバーガラス上で一晩増殖させ、次いで、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ Ｐｌｕｓ試薬（Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ）を用いてプラスミドでトランスフェクトした。プラスミドのトランスフェクションの１８時間後、細胞を以前に記載されるように免疫細胞化学のために処理した（He, L., Liu, J., Collins, I., Sanford, S., O’Connell, B., Benham, C. J., and Levens, D., EMBO J.,19,1034-44,2000）。ＨＡに対するマウスモノクローナル一次抗体（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ, ＣＡ）およびｃ－Ｍｙｃに対するウサギポリクローナル一次抗体（Ｕｐｓｔａｔｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ, ＮＹ）を、ブロッキング緩衝液中で１：５００および１：１，０００に希釈した（He, L., Liu, J., Collins, I., Sanford, S., O’Connell, B., Benham, C. J., and Levens, D., EMBO J.,19、1034-44,2000）。スライドガラスを室温で１時間インキュベートした。ＰＢＳでの洗浄後、二次抗体としてローダミン結合体化抗マウスＩｇＧ（Ｒｏｃｈｅ）またはフルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）結合体化抗ウサギＩｇＧ（Ｓｉｇｍａ）を、それぞれ、１；１，０００希釈および１：５００希釈で使用した。ＤＮＡをジアミジノフェニルインドール（ＤＡＰＩ、１μｇ／ｍｌ）を用いて対比染色し、そして細胞を、免疫蛍光顕微鏡（Ｌｅｉｃａ ＱＦＩＳ

Ｈ；Ｌｅｉｃａ　Ｍｉｃｒｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｔｏｋｙｏ，Ｊａｐａｎ）の下で観察した。各観察者は、数百個のトランスフェクト細胞を調べ、そして全ての観察者が実験結果に対して合意していた。

細胞を、二色分析のために処理し（He, L., Liu, J., Collins, I., Sanford, S., O'Connell, B., Benham, C. J., and Levens, D., EMBO J.,19: 1034-44, 2000）、ＦＩＲによるｃ－ｍｙｃ抑制を定量した。トランスフェクションの２２時間後、細胞をトリプシン処理し、そして上記と同じ一次抗体を用いて免疫染色した。ＰＢＳでの洗浄後、二次抗体としてＦＩＴＣ結合体化抗ウサギＩｇＧ（Ｓｉｇｍａ）およびＲ－ＰＥ－結合体化抗マウスＩｇＧ（ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）を、それぞれ１：２００希釈で使用した。各試料の１０，０００個の細胞を、ｃ－Ｍｙｃ－ＦＩＴＣをＦＬ１に、そしてＨＡ－ＰＥをＦＬ２に設定して、フローサイトメトリーを用いて分析した。トランスフェクトした細胞を、ｘ軸上に示されるＰＥポジティブ細胞として同定した。

（アポトーシスの検出）

アポトーシス細胞を、製造者の指示書（Ａｐｏｐｔｏｓｉｓ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ，Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ．Ｐｒｏｍｅｇａ，ＷＩ，ＵＳＡ）に従って、ＴＵＮＥＬアッセイによって検出した。簡単に言うと、カバーガラス上で培養したＨｅＬａ細胞を、氷上で１５分間４℃のパラホルムアルデヒドを用いて固定した。ＰＢＳでの洗浄後、細胞をＰＢＳ中の０．５％　Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ－１００（登録商標）溶液を用いて５分間透過化処理した。ＰＢＳで２回洗浄し、ＦＩＴＣ標識ｄＵＴＰを含むターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ（ＴｄＴ）を用いたインサイチュでのニックエンド標識を用いて（ＭＥＢＳＴＡＩＮ　Ａｐｏｐｔｏｓｉｓ　Ｋｉｔ：Ｍｅｄｉｃａｌ　＆　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，ＪＡＰＡＮ）、ＤＮＡのヌクレオソーム内断片化を検出することによって、アポトーシス細胞を可視化した。１単位／ｍｌ　ＤＮａｓｅ　Ｉ（ＧｅｎＨｕｎｔｅｒ　Ｃｏｒ

poration, Nashville, TN）で処理したHeLa細胞をポジティブコントロールとして使用した。DNAをDAPI III Counterstain（Vysis, Abbott Park, IL）を用いて対比染色し、そして蛍光顕微鏡（Leica QFISH;Leica Microsystems, Tokyo, Japan）の下で観察した。

二色分析のために、細胞をトリプシン処理した後に遠心分離（10分間、300×g）することによって収集し、そして−20℃のエタノールを用いて少なくとも2時間透過化処理した。細胞を、上記と同じ工程で処理し、そして最終的に、FITC標識dUTPを含む50μlのTdT緩衝液中でインキュベートした（MEBSTAIN Apoptosis Kit:Medical & Biological Laboratories, JAPAN）。次いで、250μgのDNaseフリーのRNase Aを含む0．5mlのヨウ化プロピジウム（PI）溶液（PBS中5μg／mlに新しく希釈した）中で遠心分離（10分間、300×g）することによって、細胞を回収した。各試料の10，000個の細胞を、FITCをFL1に、そしてPIをFL2に設定して分析した。アポトーシス細胞を、y軸上に示される高FITCポジティブ細胞として同定した。

（タンパク質抽出および免疫ブロッティング）

凍結組織試料を、Polytronホモジナイザー（Kinematica, Switzerland）を用いて、溶解緩衝液（7M 尿素、2M チオ尿素、2% 3−［（3−コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ−］1−プロパンスルフェート（3−［（3−Cholamidopropyl）dimethylammonio−］1−propanesulfate）（CHAPS）、0．1M ジチオトレイトール（DTT）、2% IPG緩衝液（Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghampshire, UK）、40mM Tris）中で可溶化し、その後4℃で1

時間遠心分離した（１００，０００×ｇ）。上清中のタンパク質量を、タンパク質アッセイ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）によって測定した。タンパク質を、８％　アクリルアミドゲル上での電気泳動によって分離し、そして転写装置槽（Ｂｉｏ－Ｒａｄ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）中でフッ化ポリビニリデン膜（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，Ｂｅｄｆｏｒｄ，ＭＡ）に転写した。この膜を、ＰＢＳ中の５％　スキムミルクを用いて１時間ブロックした。それぞれブロッキング緩衝液中に１：１，０００および１：５００に希釈した、ウサギポリクローナル抗ＦＩＲ抗体（Liu, J., He, L., Collins, I., Ge, H., Libutti, D., Li, J., Egly, J., and Levens, D., Mol. Cell, 5, 331-341, 2000）およびヤギポリクローナル抗β－アクチン抗体（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ，Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ，ＣＡ）を、一次抗体として使用した。１：３，０００に希釈したヤギ抗ウサギＩｇＧ西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体（ＨＲＰ）（Ｊａｃｋｓｏｎ，Ｗｅｓｔ　Ｇｒｏｖｅ，ＰＡ）および１：５００に希釈したウサギ抗ヤギＩｇＧ　ＨＲＰ（Ｃａｐｐｅｌ，Ｗｅｓｔ　Ｃｈｅｓｔｅｒ，ＰＡ）を、二次抗体として使用した。膜上の抗原を、ＥＣＬ™検出試薬（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）によって検出した。各バンドの強度を、ＮＩＨ画像によって測定した。

（逆転写酵素（ＲＴ）－ＰＣＲおよびリアルタイム定量ＰＣＲ）

総ＲＮＡおよびゲノムＤＮＡをＲＮｅａｓｙ™　Ｍｉｎｉ　ＫｉｔおよびＤＮｅａｓｙ™　Ｔｉｓｓｕｅｓ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて、腫瘍および非腫瘍上皮組織から抽出した。１ｓｔ　ｓｔｒａｎｄ　ｃＤＮＡ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　Ｋｉｔ　ｆｏｒ　ＲＴ－ＰＣＲ（Ｒｏｃｈｅ，Ｍａｎｎｈｅｉｍ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を用いて、総ＲＮＡからｃＤＮＡを合成した。このｃＤＮＡをテンプレートとして使用して、ＦＩＲ　ｃＤＮＡをＲＴ－ＰＣＲによって適切なプライマーを用いて増幅した：

順方向：５’－GGCCCCATCAAGAGCATC－３’（配列番号７）

逆方向：5’－GGGGCTGGGCCAGGGTCAG－3’（配列番号８）。

コントロールのために、ＧＡＰＤＨ　ｃＤＮＡを増幅した。

ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ™装置（Ｒｏｃｈｅ，Ｍａｎｎｈｅｉｍ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を用いたＦＩＲ　ｃＤＮＡのリアルタイム定量ＰＣＲを、ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ™キャピラリー中で、ＦａｓｔＳｔａｒｔ　Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ、ｄＮＴＰ混合物、および緩衝液（ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ™ ＤＮＡ Ｍａｓｔｅｒ　ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ　ｐｒｏｂｅ、Ｒｏｃｈｅ）を含むマスターミックス（ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ™－ＦａｓｔＳｔａｒｔ ＤＮＡ Ｍａｓｔｅｒ　ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　Ｉ）、３．０ｍＭ $MgCl_2$、０．５μＭの各センスプライマーおよびアンチセンスプライマー、ならびに１μｌのテンプレートｃＤＮＡからなる２０μｌの反応混合物中で実行した。ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ™ソフトウェアバージョン３．３（Ｒｏｃｈｅ）を、定量ＲＴ－ＰＣＲの分析のために使用した。プライマーおよびＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ™条件の最適化を、Ｎｉｈｏｎ　Ｇｅｎｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｉｎｃ．（Ｓｅｎｄａｉ，Ｊａｐａｎ）にて実行した。リアルタイム定量ＰＣＲによるＦＩＲ　ｃＤＮＡ増幅のためのプライマーは、以下の通りであった（ＰＣＲ産物のサイズは、２７５塩基対である）：

順方向：5’－GCACCTGGAGTCATCACA－3’（配列番号２７）

逆方向：5’－CGCAGAACCATCACTGTAG－3’（配列番号２８）。

これらのプライマーによるＰＣＲ産物を、ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ™の定量曲線を決定するために精製した（Ｑｉａｇｅｎ　ＰＣＲ　ｐｒｏｄｕｃｔ　ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｋｉｔ）。ＦＩＲゲノムＤＮＡもまた、以下のプライマーを用いてリアルタイムＰＣＲによって定量した：

順方向：5’－GGAGTCTACAGTGATGGTTC－3’（配列番号２９）

逆方向：5’－TCCTGGTCGTACACTTCA－3’（配列番号３０）。

ヒトｃ－ｍｙｃ　ｃＤＮＡおよびヒトβ－アクチン　ｃＤＮＡに対するプライマーは以下の通りであった：

順方向：５’－GCCTCAGAGTGCATCGAC－３’（ｃ－ｍｙｃ）（配列番号３１）、

逆方向：５’－TCCACAGAAACAACATCG－３’（ｃ－ｍｙｃ）（配列番号３２）、

順方向：５’－TGGAGAAAATCTGGCACCAC－３’（β－アクチン）（配列番号３３）、

逆方向：５’－AATGGTGATGACCTGGCCGT－３’（β－アクチン）（配列番号３４）。

（結果）

（ＦＩＲのアミノ末端抑制ドメインは、ｃ－ｍｙｃ発現を抑制するのに必要である）

これまでの研究によって、ＦＩＲがアクチベーター依存性の転写リプレッサーであることが明らかになっている。ＦＩＲが、ＦＢＰのカルボキシル末端領域中に見出される強力な転写アクチベーターおよびウイルスタンパク質Ｅ１ａによって刺激される転写をブロックするのに対し、別のウイルス因子（ＶＰ１６）による転写活性化を鈍らせない。ＦＩＲの最初の５５アミノ酸が、活性化された転写を抑制するのに必要とされた。全長ＦＩＲもまた、トランスフェクトされたレポータープラスミドのｃ－ｍｙｃプロモーターからの転写を抑制した。ｃ－ｍｙｃプロモーターのＦＩＲ抑制に対するアミノ末端の必要性を確認するために、全長ＦＩＲ（１－５４２）またはそのアミノ末端抑制ドメインが欠失したＦＩＲであるＦＩＲΔＮ７７（７８～５４２）を、ｃ－ｍｙｃプロモーターによって駆動されるＣＡＴレポータープラスミドと共にコトランスフェクトし、そしてＣＡＴ活性についてアッセイした。全長ＦＩＲは用量依存様式でＣＡＴ発現を強力に阻害したが、そのアミノ末端を欠失させることによって（ＦＩＲΔＮ７７）リプレッサー活性が減弱した（図７）。従って、ネイティブなＦＩＲはｃ－ｍｙｃ転写のアクチベーター依存性転写リプレッサーのよう

であるが、ｃ－ｍｙｃレポーターは、信頼できないことが知られている（Liu, J., He, L., Collins, I., Ge, H., Libutti, D., Li, J., Egly, J., and Levens, D., Mol. Cell, 5: 331-341, 2000；ならびに He, L., Liu, J., Collins, I., Sanford, S., O' Connell, B.,Benham, C. J.,and Levens, D., EMBO J.,19,1034-44,2000）。従って、内因性ｃ－Ｍｙｃ発現のＦＩＲ抑制を調べた。ＨＡでタグ化した全長ＦＩＲ（ＨＡ－ＦＩＲ）を、ＨｅＬａ細胞およびＵ－２　ＯＳ細胞中で発現させ、そしてｃ－Ｍｙｃ発現を、抗ｃ－Ｍｙｃ抗体を用いた免疫染色によって可視化した（図８Ａ：ＨＡ－ＦＩＲまたはＨＡ－ＦＩＲΔＮ７７は赤色であり；ｃ－Ｍｙｃは緑色である）。ｃ－Ｍｙｃレベルは、ＨＡ－ＦＩＲ発現細胞（矢印）中で大きく減少したが、ＨＡ－ＦＩＲΔＮ７７細胞（矢じり）においては変化がなく、このことは、ＦＩＲが細胞自律機構を介して内因性ｃ－Ｍｙｃ発現を抑制することを実証する。内因性ｃ－Ｍｙｃのこの抑制を裏付けるために、ＨＡ－ＦＩＲをＨｅＬａ細胞にトランスフェクトした。二色ＦＡＣＳ分析を用いてｃ－Ｍｙｃレベルおよびｈａ－ＦＩＲレベルを調べることによって、ＦＩＲが、広範囲の細胞集団において（図８Ｂ、上段の囲んだ領域）ｃ－Ｍｙｃを効果的に低下させたことを実証した。ＨＡ－ＦＩＲポジティブ集団内において、ｃ－Ｍｙｃレベルは、この囲んだ領域において明らかに２つのモードを有した（図８Ｂ、上段左）。ｃ－Ｍｙｃレベルは、ＨＡ－ＦＩＲをトランスフェクトした細胞中で急激に抑制された。ＨＡベクタープラスミドにおいて、ｃ－Ｍｙｃレベルは、トランスフェクト細胞と非トランスフェクト細胞との間で一様に識別不可能であった（図８Ｂ、上段右）。

（ＦＩＲのアミノ末端は、アポトーシスの誘導に必要とされる）

ｃ－ｍｙｃ発現のダウンレギュレーションは、細胞アポトーシスを誘導することが報告されている（Thompson, E. B., Ann. Rev. Physiol., 60, 575-600, 1998; Thulasi, R., Harbor, D. V., and Thompson, E. B., J. Biol. Chem., 268, 18306-18312, 1993; Zhou, F., Medh, R. D., and Thompson, E. B., J.

Steroid Biochem. Mol. Biol., 73, 195-202, 2000; Thompson, E. A., Cancer Res., 51, 5544-5550, 1991; Helmberg, A., Auphan, N., Caelles, C., and Karin, M., EMBO J., 14, 452-60, 1995; McCormack, J., E, Pepe, V., H, Kent, R., B., and Dean, M., Marshak-Rothstein, A., Sonenshein, G, E., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 81, 5546-5550, 1984; Sonenshein, G., E., J. Immunol., 158, 1994-1997, 1997; Fischer, G., Kent, S., C., Joseph, L., Green, D., R., and Scott, D., W., J. Exp. Med., 179, 221-228, 1994; Wu, M., Arsura, M., Bellas, R., E., FitzGerald, M., J., Lee, H., Schauer, S., L., Sherr, D., H., and Sonenshein, G., E., Mol. Cell. Biol., 16、5015-5025, 1996; ならびに、D' Agnano, I., Valentini, A., Fornari, C., Bucci, B., Starace, G., Felsani, A., and Citro, G., Oncogene., 20, 2814-2825, 2001）。ＦＩＲはネイティブなｃ－ｍｙｃ発現を抑制するので、本発明者らは、ＦＩＲの強制発現もまたアポトーシスを誘導するか否かを試験した。全長ＦＩＲ（ＨＡ－ＦＩＲ）およびそのアミノ末端欠失（ＨＡ－ＦＩＲΔＮ７７）を、ＨｅＬａ細胞にトランスフェクトし、そしてアポトーシス活性をＴＵＮＥＬアッセイによって調べた（図９Ａ）。予想したように、ＨＡ－ＦＩＲは、ＤＮＡの断片化を伴なうアポトーシスを誘導し（図９Ａ；矢印のある上段のパネル）、一方でＨＡ－ＦＩＲΔＮ７７をトランスフェクトした細胞（図９Ａ；中段）およびＨＡ空ベクターをトランスフェクトした細胞（図９Ａ；下段、コントロール）においてアポトーシスはほとんど生じなかった。全長ＨＡ－ＦＩＲによって駆動されるアポトーシスの程度は、フローサイトメトリー分析で評価した場合１６．５％であったが、ＨＡ－ＦＩＲΔ７７およびＨＡ空ベクターをトランスフェクトした場合、それぞれたった６．６％および２．０％に低下しなかった（図９Ｂ）。ＨｅＬａ細胞中のＨＡ－ＦＩＲタンパク質およびＨＡ－ＦＩＲΔＮ７７タンパク質の同等な発現は、ウエスタンブロットによって確認した（データには示さない）。これらの結果は、

ＦＩＲの強制発現が、おそらくｃ－ｍｙｃ抑制に起因して、アポトーシスを誘発することを証明する。

（ＦＩＲは、ｃ－Ｍｙｃの増加と関連する結腸直腸癌において逆にアップレギュレートされる）

ｃ－Ｍｙｃが、調節されないｃ－ｍｙｃ発現に起因して大多数の結腸直腸癌において増大していることは、周知である（Erisman, M. D., Rothberg, P. G., Diehl, R. E., Morse, C. C., Spandorfer, J. M., およびAstrin, S. M., Mol. Cell. Biol., 5, 1969-1976, 1985; Imaseki, H., Hayashi, H., Taira, M., Ito, Y., Tabata, Y., Onoda, S., Isono, K., およびTatibana, M., Cancer., 64, 704-709, 1989; および、Tsuboi, K., Hirayoshi, K., Takeuchi, K., Sabe, H., Shimada, Y., Ohshio, G., Tobe, T., ならびに、Hatanaka, M., Biochem. Biophys. Res. Commun., 146, 699-704, 1987）。従って、本発明者らは、癌細胞中のｃ－ｍｙｃ発現はＦＩＲの抑制性の影響を回避する必要があるとの仮説を立てた。ＦＩＲ自体は、癌においてダウンレギュレートされ得るか；あるいは、転写およびアポトーシスにおけるＦＩＲのエフェクター作用は、無効とされ得る。ＦＩＲが結腸直腸癌中でダウンレギュレートされるか否かを試験するために、１０症例からの腫瘍組織および正常組織中のＦＩＲタンパク質レベルを、免疫ブロットによって調べた。驚くべきことに、ＦＩＲレベルは、対応する非腫瘍上皮と比較して、ほとんどの結腸直腸癌組織において実際に増大していた（図１０Ａ）。これらのＦＩＲレベルの増加がＦＩＲ　ｍＲＮＡレベルの増加から生じたか否かを決定するために、結腸直腸癌細胞および正常結腸上皮由来のＲＮＡを、ＲＴ－ＰＣＲによって調べた（図１０Ｂ）。症例５を除く全ての症例において、非腫瘍組織と比較して腫瘍においてより高いＦＩＲｍＲＮＡレベルが示された。ＦＩＲのｍＲＮＡレベルおよびタンパク質レベルは、全ての症例において互いに対応していた。結腸直腸癌細胞中のＦＩＲ　ｍＲＮＡレベルの増加を、リアルタイム定量ＲＴ－ＰＣＲによってさらに確認し

た（図１０Ｃ）。ＦＩＲ遺伝子の増幅もまた評価したが、増幅観察されなかった。ゆえに、ＦＩＲタンパク質の増加は、結腸直腸癌におけるＦＩＲ　ｍＲＮＡの転写の増加または安定性の増加のいずれかを反映する。

これらの結果は、結腸直腸癌におけるｃ－ｍｙｃの調節不全が、ＦＩＲのダウンレギュレーションによるのではなく、おそらく、欠損したＦＩＲ機能を反映するということを示唆する。従って、結腸直腸癌において観察されたＦＩＲの過剰発現は、無益なネガティブフィードバック機構を表し得る。実際、ＦＩＲ　ｍＲＮＡ発現のレベルは、ｃ－ｍｙｃのレベルと有意に相関する（図１０Ｄ）。

（考察）

ｃ－Ｍｙｃの過剰発現は、細胞の成長、増殖および不死化を促進することが長い間知られている。さらに、ｃ－Ｍｙｃの減少は、アポトーシスを誘導する。本発明は、ＦＩＲが内因性ｃ－ｍｙｃの転写を強力に抑制し、そしてアポトーシスを誘導することを実証する。ＦＩＲアミノ末端リプレッサードメインの欠失は、そのプロアポトーシス作用を抑止し、このことは、ＦＩＲがおそらく、ｃ－ｍｙｃを含むその標的の転写ダウンレギュレーションを介して細胞を死滅させることを示す。ｃ－Ｍｙｃは、ＦＩＲレベルの増加にかかわらず、ほとんどの結腸直腸癌腫において上昇している。従って、おそらくｃ－ｍｙｃは、いくつかの遺伝的な変化または後成的な変化によって、ＦＩＲによるダウンレギュレーションを回避することが可能となる。おそらく、これらのいくつかの変化は、腫瘍細胞におけるＦＩＲ誘導性アポトーシスを減弱することによって、腫瘍進行に寄与する。

特定の状況下で、ｃ－ｍｙｃの過剰発現またはｃ－ｍｙｃの過少発現は、アポトーシスを誘導する。持続的な高レベルのｃ－ｍｙｃ発現は、血清中の有糸分裂促進因子のシグナルを除去するか、または規定された増殖因子を欠損させると、アポトーシスを誘発する（Thompson, E. B. , Ann. Rev. Physiol.,

60:575-600, 1998)。逆に、例えば、グルココルチコイド(Thulasi, R., Harbor, D. V., and Thompson, E. B., J. Biol. Chem., 268, 18306-18312, 1993;Zhou, F., Medh, R. D., and Thompson, E. B., J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 73, 195-202, 2000;Thompson, E. A., Cancer Res., 51, 5544-5550, 1991;ならびに、Helmberg, A., Auphan, N., Caelles, C., and Karin, M., EMBO J., 14, 452-60, 1995)、表面レセプターの活性化(McCormack, J., E, Pepe, V., H, Kent, R., B., and Dean, M., Marshak-Rothstein, A., Sonenshein, G, E., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 81、5546-5550, 1984;Sonenshein, G., E., J. Immunol., 158、1994-1997, 1997;Fischer, G., Kent, S., C., Joseph, L., Green, D., R., and Scott, D., W., J. Exp. Med., 179, 221-228, 1994;ならびに、Wu, M., Arsura, M., Bellas, R., E., FitzGerald, M., J., Lee, H., Schauer, S., L., Sherr, D., H., and Sonenshein, G., E., Mol. Cell. Biol., 16、5015-5025, 1996)、または他の化学物質(Ayala-Torres, S., Zhou, F., and Thompson, E. B., Exp. Cell. Res., 246, 193-202, 1999; Lerga, A., Belandia, B., Delgado, M. D., Cuadrado, M. A., Richard, C., Ortiz, J. M., Martin-Perez, J., and Leon, J., Biochem. Biophys. Res. Commun., 215, 889-895, 1995; Ohta, H., Sweeney, E. A., Masamune, A., Yatomi, Y., Hakomori, S., and Igarashi, Y., Cancer Res., 55, 691-697, 1995; Davidoff, A. N., and Mendelow, B. V., Anticancer Res., 13:2257-2260, 1993; Sumitani, K., Kamijo, R., and Nagumo, M., Anticancer Res., 17, 865-871, 1997; ならびに、Fornari, F. A. Jr, Jarvis, W. D., Grant, S., Orr, M. S., Randolph, J. K., White, F. K., Mumaw, V. R., Lovings, E. T., Freeman, R. H., and Gewirtz, D. A., Cell. Growth. Differ., 5, 723-733, 1994)によるｃ－ｍｙｃのダウンレギュレーションもまた、アポトーシスを誘導し得る。さらに、アンチセンスオリゴヌクレオチドによるｃ－ｍｙｃ　ｍＲＮＡの直接的な低下がアポトーシスを

引き起こし、このことは、Bリンパ球細胞株およびTリンパ球細胞株において最も調べられている（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ，Ｅ．Ｂ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．，６０：５７５－６００，１９９８）。本明細書中において、本発明者らは、ｃ－Ｍｙｃの抑制がＨｅＬａ細胞においてアポトーシスを誘導することを報告し、このことは、ｃ－Ｍｙｃが細胞増殖を促進し、そして細胞死をブロックするという考えを支持するものである。

本発明者らは、ＦＩＲがｃ－Ｍｙｃ抑制を介して直接アポトーシスを誘導するか否かに興味を持った。ＦＩＲはＸＰＢ／ｐ８９／ＥＲＣＣ３に結合するので、ＦＩＲのアポトーシス活性は、ＸＰＢ／ｐ８９／ＥＲＣＣ３を介して媒介され得る。実際、ＸＰＢ／ｐ８９／ＥＲＣＣ３およびＸＰＤ／ＥＲＣＣ２は、両方ともＴＦＩＩＨのＤＮＡヘリカーゼーサブユニットであり、そしてｐ５３媒介アポトーシス経路に関与すると考えられている（Wang, X. W., Vermeulen, W., Coursen, J. D., Gibson, M., Lupold, S. E., Forrester, K., XU, G., Elmore, L., Yeh, H., Hoeijmakers, J. H., and Harris, C. C., Genes Dev., 10, 1219-1232, 1996）。ＸＰＢ／ｐ８９／ＥＲＣＣ３は、ｐ５３（Leveillard, T., Andera, L., Bissonnette,N., Schaeffer,L., Bracco,L., Egly,J.M., and Wasylyk, B., EMBO J.,15, 1615-1624, 1996）と相互作用し、そしてｐ５３媒介アポトーシスは、ＸＰＢ／ｐ８９／ＥＲＣＣ３に変異を保有する色素性乾皮症（ＸＰ）の個体由来の初代ヒト繊維芽細胞において減弱される（Wang, X.W., Vermeulen, W., Coursen, J. D., Gibson, M., Lupold, S. E., Forrester,K., XU,G., Elmore, L., Yeh, H., Hoeijmakers, J. H., and Harris, C. C., Genes Dev.,10,1219-1232,1996）。ｐ５３は、ＴＦＩＩＨヘリカーゼ活性を阻害し、そして損傷を受けたＤＮＡの修復を停止させてアポトーシスを誘導する（Robles, A. I., Wang, X. W.,and Harris, C. C., Oncogene., 18: 4681-4688, 1999）。ＦＩＲがＴＦＩＩＨに直接作用してアポ

トーシスを誘発するのか、または細胞死がＦＩＲによる転写抑制の二次的な結果であるのかを決定するために、さらなる研究が必要である。

ＦＩＲは、ｃ－ｍｙｃと共に結腸直腸癌組織中で過剰発現し、このことは、ＦＩＲ抑制がこれらの癌において欠けていることを示す。本発明者らは、この抑制の欠損の機構について興味をもった。その１つの可能性としては、異常な事象が、直接またはＦＩＲが機能するために必要とされる経路もしくは補助因子を無能にすることによって、ＦＩＲのリプレッサー機能を無能にするという可能性が考えられる。そして高レベルのｃ－Ｍｙｃは、ＦＩＲをアップレギュレーションすることによって、ｃ－ｍｙｃ発現を適切なレベルまで低下させるための、無益な試みを誘発する。例えば、腫瘍リプレッサーである遺伝子ｐ５３は、癌において高度に変異され、そして変異ｐ５３タンパク質は、多くの腫瘍細胞において蓄積している（Bazan,V., Migliavacca, M., Tubiolo, C., Macaluso, M., Zanna, I., Corsale, S., Amato, A., Calo, V., Dardanoni, G, Morello, V., La Farina, M., Albanese, I., Tomasino, R. M., Gebbia, N., and Russo,A.,J.Cell.Physiol.,191:237-246,2002）。ＷＴ１は、いくつかの腫瘍細胞におけるその変異がタンパク質の蓄積を導く別の例である（Loeb, D. M., and Sukumar,S., Int. J. Hemotol., 76, 117-126, 2002;ならびに、Oji, Y., Ogawa, H., Tamaki, H., Oka, Y., Tsuboi, A., Kim, E. H., Soma, T., Takekawa, T., Kawakami, M., Asada, M., Kishimoto, T., and Sugiyama, H., Jpn. J. Cancer res.,90,194-204,1999）。別の可能性としては、ＴＦＩＩＨの機能が、結腸直腸癌において損傷し、その結果、ＦＩＲがｃ－ｍｙｃを抑制し得ないという可能性である。ＴＦＩＩＨは、２つの独立した機能（基礎的な転写の開始およびＤＮＡ修復）を有することが知られている（Lehmann, A.R., Genes Dev.,15,15-23,2001）。ＴＦＩＩＨの遺伝的な変異を有するＸＰ患者は、皮膚癌の高い危険性を有することが、周知である。さらに、近年の研究によって、ＸＰＤ遺伝子における多型が、正常な集団であっても、皮膚癌の

危険性を増大させることが実証された（Dybdahl, M., Vogel, U., Frentz, G., Wallin, H.,and Nexo, B. A., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.,8:77-81,1999；ならびに、Tomescu, D., Kavanagh, G., Ha, T., Campbell, H., and Melton, D. W., Corcinogenesis.,22,403-408,2001）。ＤＮＡ損傷の修復ができないことはＸＰ患者において癌の危険性が高いことの主要な原因であるが、転写調節の欠損が癌発生に寄与し得る。

これらの結果は、結腸直腸癌腫におけるｃ－ｍｙｃ活性化の機構についての新しい考察を提供するだけでなく、腫瘍の処置のための新規治療標的を明らかにし得る。非腫瘍細胞において、ｃ－ｍｙｃは、一般的に腫瘍細胞と比較して発現が低く、このことは、ＦＩＲによるｃ－ｍｙｃ抑制に起因する副作用が正常細胞において少ないことを示す。腫瘍の処置に加えて、ｃ－Ｍｙｃはまた、動脈硬化の進行の観点から心血管疾患において、中枢となる役割を果たす。ＦＩＲによるｃ－Ｍｙｃ抑制は、新生物疾患および心血管疾患の両方に対する治療のための手がかりを本発明者らに提供し得る。

（実施例７）

次に、正常型 FIR（配列番号２）に示す配列を有するポリペプチドを、任意の公知の方法を用いて組換え産生する。このポリペプチドを、５ｍｇ／ｋｇの投与量で結腸直腸癌の細胞を有する被験体にコンセントを得て投与する。

被験体の経過観察を行うと、癌が退行していくことがわかる。従って、本発明の正常型のＦＩＲは、癌治療剤として有用なことがわかる。

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その

内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、本願の発明によって、大腸癌の診断用マーカーとして有用な新規抗原ペプチド２種と、これらを用いた大腸癌診断方法が提供される。これによって、大腸癌の早期かつ高精度の診断が可能となる。これらは、製薬業界のみならず、種々のサービス業において利用可能であり、有用性に富む。

請求の範囲

1．　（a）配列番号１に記載の塩基配列もしくはその相補体またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

（b）配列番号２に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

（c）配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

（d）（a）～（c）のいずれか１つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

（e）（a）～（c）のいずれか１つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも７０％である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

を含む、核酸分子。

2．少なくとも８の連続するヌクレオチド長を有する、請求項１に記載の核酸分子。

3．前記生物学的活性は、ＦＢＰに結合する能力である、請求項１に記載の核酸分子。

4．前記ＦＢＰに結合する能力は、配列番号２における３７２位～４４２位に記載される配列によって規定される、請求項３に記載の核酸分子。

５．請求項１に記載の核酸分子に対して特異的な因子。

６．前記因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される、請求項５に記載の因子。

７．前記因子は、少なくとも８の連続するヌクレオチド長を有する核酸分子である、請求項６に記載の因子。

８．前記因子は、核酸分子であり、プライマーとして使用される、請求項５に記載の因子。

９．前記因子は、プローブとして使用される、請求項５に記載の因子。

１０．前記因子は、標識されているかまたは標識され得る、請求項５に記載の因子。

１１．前記標識は、蛍光、リン光、化学発光、放射能、酵素基質反応および抗原抗体反応からなる群より選択される技法を利用する、請求項１０に記載の因子。

１２．配列番号１で示される配列またはその相補体を含む、請求項１に記載の核酸分子。

１３．（ａ）配列番号１またはその相補体において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列；または

（ｂ）配列番号１１、１３および１５からなる群より選択される少なくとも１つの配列もしくはその相補体、または該少なくとも１つの配列もしくはその相補体において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列、

を含む、請求項１に記載の核酸分子。

１４．前記改変は、置換；配列番号１の３６９位と３７０位との間もしくは配列番号１５の１７６位と１７７位との間への付加；あるいは配列番号１の３６９位までもしくは配列番号１１の３０５位までまたは配列番号１３もしくは配列番号１５の１７６位までにおける欠失；あるいはそれらの組合せである、請求項１３に記載の核酸分子。

１５．前記改変は、配列番号１の５’末端から約４００塩基までの範囲内に存在する、請求項１３に記載の核酸分子。

１６．前記改変は、配列番号１における約１５０位～約３６０位の範囲内における改変である、請求項１３に記載の核酸分子。

１７．前記改変は、配列番号１において、コードするアミノ酸の非保存的置換を含む、請求項１３に記載の核酸分子。

１８．配列番号１１、１３、１５、１７、１９および２１からなる群より選択される配列を含む、請求項１３に記載の核酸分子。

１９．請求項１２に記載の核酸分子に対して特異的な因子。

２０．請求項１３に記載の核酸分子には特異的に反応しない、請求項１９に記載の因子。

２１．前記因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される、請求項１９に記載の因子。

２２．前記因子は、少なくとも８の連続するヌクレオチド長を有する核酸分子である、請求項１９に記載の因子。

２３．前記因子は、核酸分子であり、プライマーとして使用される、請求項１９に記載の因子。

２４．前記因子は、プローブとして使用される、請求項１９に記載の因子。

２５．前記因子は、標識されているかまたは標識され得る、請求項１９に記載の因子。

２６．前記標識は、蛍光、リン光、化学発光、放射能、酵素基質反応および抗原抗体反応からなる群より選択される技法を利用する、請求項２５に記載の因子。

２７．請求項１３に記載の核酸分子に対して特異的な因子。

２８．請求項１２に記載の核酸分子には特異的に反応しない、請求項２７に記載の因子。

２９．前記因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される、請求項２７に記載の因子。

３０．前記因子は、少なくとも８の連続するヌクレオチド長を有する核酸分子である、請求項２７に記載の因子。

３１．前記因子は、核酸分子であり、プライマーとして使用される、請求項２７に記載の因子。

３２．前記因子は、プローブとして使用される、請求項２７に記載の因子。

３３．前記因子は、標識されているかまたは標識され得る、請求項２７に記載の因子。

３４．前記標識は、蛍光、リン光、化学発光、放射能、酵素基質反応および抗原抗体反応からなる群より選択される技法を利用する、請求項３３に記載の因子。

３５．A）請求項１に記載の第一核酸分子に対して特異的な第一の因子；および

B）該第一の因子に起因するシグナルを用いて該第一核酸分子の発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該第一核酸分子の発現量に比較して対象の被験体の対象部分における該第一核酸分子の発現が高い場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、手段、

を備える、癌診断キット。

３６．前記癌は、ｃ-ｍｙｃ高発現癌を含む、請求項３５に記載のキット。

３７．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項３５に記載のキット。

３８．癌診断方法であって、

Ａ）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

Ｂ）該試料中における、請求項１に記載の第一核酸分子の存在量を測定する工程；

Ｃ）該第一核酸分子の存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料における該第一核酸分子の量が増加している場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、工程、

を包含する、方法。

３９．Ａ）請求項１２に記載の第二核酸分子に対して特異的な第二の因子；

Ｂ）該第二の因子に起因するシグナルを用いて該第二核酸分子の発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該第二核酸分子の発現量と、対象の被験体の対象部分における該第二核酸分子の発現量とが異なる場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、手段、

を備える、癌診断キット。

４０．前記癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌を含む、請求項３９に記載のキット。

４１．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項３９に記載のキット。

４２．癌診断方法であって、

Ａ）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

Ｂ）該試料中において、請求項１２に記載の第二核酸分子の存在量を測定する工程；

Ｃ）該第二核酸分子の存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、両者が異なる場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、工程、

を包含する、方法。

４３．Ａ）請求項１３に記載の第三核酸分子に対して特異的な第三の因子；

Ｂ）該第三の因子に起因するシグナルを用いて該第三核酸分子の発現量を測定するための手段であって、対象の被験体の対象部分において該第三核酸分子が検出される場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、手段、

を備える、癌診断キット。

４４．前記対象の被験体の対象部分における前記核酸分子の検出は、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該核酸分子の発現量に比較して対象の被験体の対象部分における該核酸分子の発現が高いことを検出することである、請求項４３に記載のキット。

４５．前記癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌を含む、請求項４３に記載のキット。

４６．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項４３に記載のキット。

４７．癌診断方法であって、

A）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

B）該試料中において、請求項１３に記載の第三核酸分子を検出する工程；

C）該第三核酸分子が検出される場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、工程、

を包含する、方法。

４８．前記C）工程は、前記第三核酸分子の存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、前記対象の被験体の対象部分からの試料における該核酸分子の量が増加している場合、該対象の被験体は癌患者であると確定することである、請求項４７に記載の方法。

４９．A）請求項１２に記載の第二核酸分子に対して特異的な第二の因子；

B）請求項１３に記載の第三核酸分子に対して特異的な第三の因子；

C）該第二の因子および該第三の因子に起因するシグナルを識別可能に検知して、該第二核酸分子と該第三核酸分子のそれぞれの発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該第二核酸分子の発現に比較して対象の被験体の対象部分における該第二核酸分子の発現が高く、かつ、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該第三核酸分子の発現に比較して対象の被験体の対象部分における該第三核酸分子の発現が高い場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、手段、

を備える、癌診断キット。

５０．前記C）手段は、前記第二核酸分子と前記第三核酸分子との相対存在比を比較する手段を包含する、請求項４９に記載のキット。

５１．前記癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌を含む、請求項４９に記載のキット。

５２．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項４９に記載のキット。

５３．前記第二の因子は請求項１３に記載の核酸分子に特異的に反応しないか、前記第三の因子は請求項１２に記載の核酸分子に特異的に反応しないか、またはその両方である、請求項４９に記載のキット。

５４．前記第二の因子と、前記第三の因子とは、識別可能に標識されているかまたは標識され得る、請求項４９に記載のキット。

５５．前記第二の因子と、前記第三の因子とを、識別可能に標識する因子をさらに含む、請求項４９に記載のキット。

５６．癌診断方法であって、

Ａ）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

Ｂ）該試料中において、請求項１２に記載の第二核酸分子および請求項１３に記載の第三核酸分子の存在量を測定する工程；

Ｃ）該第二核酸分子の存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料における該第二核酸分子の発現量が変動しており、かつ、該第三核酸分子の存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料における該第三核酸分子の発現量が増加している場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する工程、

を包含する、方法。

５７．Ａ）請求項１に記載の第一核酸分子に対して特異的な第一の因子；

Ｂ）請求項１３に記載の第三核酸分子に対して特異的な第三の因子；

Ｃ）該第一の因子および該第三の因子に起因するシグナルを識別可能に検知して、該第一核酸分子と該第三核酸分子のそれぞれの発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該第一核酸分子の発現量における該第三核酸分子の発現量の割合が、対象の被験体の対象部分における該第一核酸分子の発現量における該第三核酸分子の発現量の割合よりも高い場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、手段、

を備える、癌診断キット。

５８．前記Ｃ）手段は、前記第三核酸分子との相対存在比または絶対存在量を比較する手段を包含する、請求項５７に記載のキット。

５９．前記癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌を含む、請求項５７に記載のキット。

６０．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項５７に記載のキット。

６１．前記第一の因子は請求項１３に記載の核酸分子に特異的に反応しないか、または該第一の因子は請求項１３に記載の核酸分子および請求項１２に記載の核酸分子の両方に特異的に反応する、請求項５７に記載のキット。

６２．前記第一の因子と、前記第三の因子とは、識別可能に標識されているかまたは標識され得る、請求項５７に記載のキット。

６３．前記第一の因子と、前記第三の因子とを、識別可能に標識する因子をさらに含む、請求項５７に記載のキット。

６４．癌診断方法であって、

A）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

B）該試料中において、請求項１に記載の第一核酸分子および請求項１３に記載の第三核酸分子の存在量を測定する工程；

C）該第一核酸分子と該第三核酸分子のそれぞれの発現量を測定する工程であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該第一核酸分子の発現量における該第三核酸分子の発現量の割合が、対象の被験体の対象部分における該第一核酸分子の発現量における該第三核酸分子の発現量の割合よりも高い場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、工程、を包含する、方法。

６５．（a）配列番号１に記載の塩基配列もしくはその相補体またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

（b）配列番号２に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

（c）配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

（d）（a）～（c）のいずれか１つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

（ｅ）（ａ）～（ｃ）のいずれか１つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも７０％である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

を含む、核酸分子の、癌の診断剤の製造のための使用。

６６．　（ａ）配列番号２に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；

（ｂ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；

（ｃ）配列番号１に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；

（ｄ）配列番号２に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または

（ｅ）（ａ）～（ｄ）のいずれか１つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも７０％であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

を含む、ポリペプチド。

６７．少なくとも３の連続するアミノ酸長を有する、請求項６６に記載のポリペプチド。

６８．前記生物学的活性は、ＦＢＰに結合する能力である、請求項６６に記載のポリペプチド。

６９．前記ＦＢＰに結合する能力は、配列番号２における３７２位～４４２位に記載される配列によって規定される、請求項６８に記載のポリペプチド。

７０．ポリペプチドは、標識されているかまたは標識され得る、請求項６６に記載のポリペプチド。

７１．請求項６６に記載のポリペプチドに対して特異的な因子。

７２．前記因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される、請求項７１に記載の因子。

７３．前記因子は、抗体またはその誘導体である、請求項７１に記載の因子。

７４．前記因子は、プローブとして使用される、請求項７１に記載の因子。

７５．前記因子は、標識されているかまたは標識され得る、請求項７１に記載の因子。

７６．前記標識は、蛍光、リン光、化学発光、放射能、酵素基質反応および抗原抗体反応からなる群より選択される技法を利用する、請求項７５に記載の因子。

７７．配列番号２で示される配列を含む、請求項６６に記載のポリペプチド。

７８．（ａ）配列番号２において、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含むアミノ酸配列；

（b）配列番号１２、１４および１６からなる群より選択される少なくとも１つの配列、または該少なくとも１つの配列において置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む配列、
を含む、請求項６６に記載のポリペプチド。

７９．前記改変は、置換；配列番号２の１０２位と１０３位との間もしくは配列番号１６の５９位と６０位との間への付加；あるいは配列番号２もしくは配列番号１２の１０２位までまたは配列番号１４もしくは配列番号１６の５９位までにおける欠失；あるいはそれらの組合せである、請求項７８に記載のポリペプチド。

８０．前記改変は、配列番号２のN末端から約１３５アミノ酸までの範囲内に存在する、請求項７８に記載のポリペプチド。

８１．前記改変は、配列番号２における約５０位～約１２０位の範囲内における改変である、請求項７８に記載のポリペプチド。

８２．前記改変は、配列番号２における非保存的置換を含む、請求項７８に記載のポリペプチド。

８３．配列番号１２、１４、１６、１８、２０および２２からなる群より選択される配列を含む、請求項７８に記載のポリペプチド。

８４．請求項７７に記載のポリペプチドに対して特異的な因子。

８５．請求項７８に記載のポリペプチドに対して特異的に反応しない、請求項８４に記載の因子。

８６．前記因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される、請求項８４に記載の因子。

８７．前記因子は、抗体またはその誘導体である、請求項８４に記載の因子。

８８．前記因子は、プローブとして使用される、請求項８４に記載の因子。

８９．前記因子は、標識されているかまたは標識され得る、請求項８４に記載の因子。

９０．前記標識は、蛍光、リン光、化学発光、放射能、酵素基質反応および抗原抗体反応からなる群より選択される技法を利用する、請求項８９に記載の因子。

９１．請求項７８に記載のポリペプチドに対して特異的な因子。

９２．請求項７７に記載のポリペプチドに対して特異的に反応しない、請求項９１に記載の因子。

９３．前記因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される、請求項９１に記載の因子。

９４．前記因子は、抗体またはその誘導体である、請求項９１に記載の因子。

９５．前記因子は、プローブとして使用される、請求項９１に記載の因子。

９６．前記因子は、標識されているかまたは標識され得る、請求項９１に記載の因子。

９７．前記標識は、蛍光、リン光、化学発光、放射能、酵素基質反応および抗原抗体反応からなる群より選択される技法を利用する、請求項９６に記載の因子。

９８．Ａ）請求項６６に記載のＡポリペプチドに対して特異的なＡ因子；および

Ｂ）該Ａ因子に起因するシグナルを用いて該Ａポリペプチドの発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該Ａポリペプチドの発現量に比較して対象の被験体の対象部分における該Ａポリペプチドの発現が高い場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、手段、

を備える、癌診断キット。

９９．前記癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌を含む、請求項９８に記載のキット。

１００．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項９８に記載のキット。

１０１．癌診断方法であって、

Ａ）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

B）該試料中において、請求項６６に記載のＡポリペプチドの存在量を測定する工程；

C）該Ａポリペプチドの存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料における該Ａポリペプチドの量が増加している場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、工程、

を包含する、方法。

１０２．A）請求項７７に記載のＢポリペプチドに対して特異的なＢ因子；および

B）該Ｂ因子に起因するシグナルを用いて該Ｂポリペプチドの発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該Ｂポリペプチドの発現量と、対象の被験体の対象部分における該Ｂポリペプチドの発現量とが異なる場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、手段、

を備える、癌診断キット。

１０３．前記癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌を含む、請求項１０２に記載のキット。

１０４．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項１０２に記載のキット。

１０５．癌診断方法であって、

A）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

B）該試料中において、請求項７７に記載のＣポリペプチドの存在量を測定する工程；

C）該Cポリペプチドの存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、両者が異なる場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、工程、を包含する、方法。

106．A）請求項78に記載のポリペプチドに対して特異的なC因子；および

B）該C因子に起因するシグナルを用いて該Cポリペプチドの発現量を測定するための手段であって、対象の被験体の対象部分において該Cポリペプチドが検出される場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、手段、

を備える、癌診断キット。

107．対象の被験体の対象部分における前記Cポリペプチドの検出は、前記癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該ポリペプチドの発現量に比較して対象の被験体の対象部分における該ポリペプチドの発現が高いことを検出することである、請求項106に記載のキット。

108．前記癌は、c－myc高発現癌を含む、請求項106に記載のキット。

109．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項106に記載のキット。

110．癌診断方法であって、

A）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

B）該試料中において、請求項78に記載のCポリペプチドを検出する工程；

C）該Cポリペプチドが検出される場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、工程、

を包含する、方法。

１１１．前記C）工程は、前記Cポリペプチドの存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料における該ポリペプチドの量が増加している場合、該対象の被験体は癌患者であると確定することである、請求項１１０に記載の方法。

１１２．A）請求項７７に記載のBポリペプチドに対して特異的なB因子；

B）請求項７８に記載のCポリペプチドに対して特異的なC因子；

C）該B因子および該C因子に起因するシグナルを識別可能に検知して、該Bポリペプチドと該Cポリペプチドのそれぞれの発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該Bポリペプチドの発現に比較して対象の被験体の対象部分における該Bポリペプチドの発現が高く、かつ、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該Cポリペプチドの発現に比較して対象の被験体の対象部分における該Cポリペプチドの発現が高い場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、手段、

を備える、癌診断キット。

１１３．前記C）手段は、前記Bポリペプチドと前記Cポリペプチドとの相対存在比を比較する手段を包含する、請求項１１２に記載のキット。

１１４．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項１１２に記載のキット。

１１５．前記癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌を含む、請求項１１２に記載のキット。

１１６．前記Ｂ因子は請求項７８に記載の核酸分子に特異的に反応しないか、前記Ｃ因子は請求項７７に記載の核酸分子に特異的に反応しないか、またはその両方である、請求項１１２に記載のキット。

１１７．前記Ｂ因子と、前記Ｃ因子とは、識別可能に標識されているかまたは標識され得る、請求項１１２に記載のキット。

１１８．前記Ｂ因子と、前記Ｃ因子とを、識別可能に標識する因子をさらに含む、請求項１１２に記載のキット。

１１９．癌診断方法であって、

Ａ）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

Ｂ）該試料中において、請求項７７に記載のＢポリペプチドおよび請求項７８に記載のＣポリペプチドの存在量を測定する工程；

Ｃ）該Ｂポリペプチドの存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一ポリペプチドの存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料における該Ｂポリペプチドの発現量が増加しており、かつ、該Ｃポリペプチドの存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一ポリペプチドの存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料における該Ｃポリペプチドの発現量が増加している場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、工程、

を包含する、方法。

１２０．A）請求項６６に記載のAポリペプチドに対して特異的なA因子；

B）請求項７８に記載のCポリペプチドに対して特異的なC因子；

C）該A因子および該C因子に起因するシグナルを識別可能に検知して、該Aポリペプチドと該Cポリペプチドのそれぞれの発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該Aポリペプチドの発現量における該Cポリペプチドの発現量の割合が、対象の被験体の対象部分における該Aポリペプチドの発現量における該Cポリペプチドの発現量の割合よりも高い場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、手段、

を備える、癌診断キット。

１２１．前記C）手段は、前記Aポリペプチドと前記Cポリペプチドとの相対存在比または絶対存在量を比較する手段を包含する、請求項１２０に記載のキット。

１２２．前記癌は、ｃ－ｍｙｃ高発現癌を含む、請求項１２０に記載のキット。

１２３．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項１２０に記載のキット。

１２４．前記第A因子は請求項７８に記載のポリペプチドに特異的に反応しないか、または請求項７７に記載のポリペプチドおよび請求項７８に記載のポリペプチドに特異的に反応する、請求項１２０に記載のキット。

１２５．前記第A因子と、前記C因子とは、識別可能に標識されているかまたは標識され得る、請求項１２０に記載のキット。

１２６．前記Ａ因子と、前記Ｃ因子とを、識別可能に標識する因子をさらに含む、請求項１２０に記載のキット。

１２７．癌診断方法であって、

Ａ）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

Ｂ）該試料中において、請求項６６に記載のＡポリペプチドおよび請求項７８に記載のＣポリペプチドの存在量を測定する工程；

Ｃ）該Ａポリペプチドと該Ｃポリペプチドのそれぞれの発現量を測定する工程であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該Ａポリペプチドの発現量における該Ｃポリペプチドの発現量の割合が、対象の被験体の対象部分における該Ａポリペプチドの発現量における該Ｃポリペプチドの発現量の割合よりも高い場合、該対象の被験体は癌患者であると確定する、工程、

を包含する、方法。

１２８．（ａ）配列番号２に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；

（ｂ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；

（ｃ）配列番号１に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；

（ｄ）配列番号２に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；

または

（e）（a）～（d）のいずれか１つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも７０％であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

を含む、ポリペプチドの、癌の診断剤の製造のための使用。

１２９．　（a）配列番号３に記載の塩基配列もしくはその相補体またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

（b）配列番号４に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

（c）配列番号４に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

（d）（a）～（c）のいずれか１つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

（e）（a）～（c）のいずれか１つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも７０％である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

を含む、核酸分子。

１３０．少なくとも８の連続するヌクレオチド長を有する、請求項１２９に記載の核酸分子。

１３１．前記生物学的活性は、セントロメアクロマチンへの結合である、請求項１２９に記載の核酸分子。

１３２．請求項１２９に記載の核酸分子に対して特異的な因子。

１３３．前記因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される、請求項１３２に記載の因子。

１３４．前記因子は、少なくとも８の連続するヌクレオチド長を有する核酸分子である、請求項１３２に記載の因子。

１３５．前記因子は、核酸分子であり、プライマーとして使用される、請求項１３２に記載の因子。

１３６．前記因子は、プローブとして使用される、請求項１３２に記載の因子。

１３７．前記因子は、標識されているかまたは標識され得る、請求項１３２に記載の因子。

１３８．前記標識は、蛍光、リン光、化学発光、放射能、酵素基質反応および抗原抗体反応からなる群より選択される技法を利用する、請求項１３７に記載の因子。

１３９．A）請求項１２９に記載の核酸分子に対して特異的な因子；および

B）該因子に起因するシグナルを用いて該核酸分子の発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該核酸分子の発現量に比較して対象の被験体の対象部分における該核

酸分子の発現が高い場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、手段、

を備える、癌診断キット。

１４０．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項１３９に記載のキット。

１４１．癌診断方法であって、

A）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

B）該試料中において、請求項１２８に記載の核酸分子の存在量を測定する工程；

C）該核酸分子の存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料における該核酸分子の量が増加している場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、工程、

を包含する、方法。

１４２．（a）配列番号３に記載の塩基配列もしくはその相補体またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

（b）配列番号４に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

（c）配列番号４に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

（d）（a）～（c）のいずれか１つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

（e）（a）～（c）のいずれか１つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも７０％である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

を含む、核酸分子の、癌の診断剤の製造のための使用。

１４３．　（a）配列番号４に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；

（b）配列番号４に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；

（c）配列番号３に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；

（d）配列番号４に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または

（e）（a）～（d）のいずれか１つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも７０％であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

を含む、ポリペプチド。

１４４．少なくとも３の連続するアミノ酸長を有する、請求項１４２に記載のポリペプチド。

１４５．前記生物学的活性は、セントロメアクロマチンへの結合である、請求項１４２に記載のポリペプチド。

１４６．前記ポリペプチドは、標識されているかまたは標識され得る、請求項１４２に記載のポリペプチド。

１４７．請求項１４２に記載のポリペプチドに対して特異的な因子。

１４８．前記因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される、請求項１４７に記載の因子。

１４９．前記因子は、抗体またはその誘導体である、請求項１４７に記載の因子。

１５０．前記因子は、プローブとして使用される、請求項１４７に記載の因子。

１５１．前記因子は、標識されているかまたは標識され得る、請求項１４７に記載の因子。

１５２．前記標識は、蛍光、リン光、化学発光、放射能、酵素基質反応および抗原抗体反応からなる群より選択される技法を利用する、請求項１５１に記載の因子。

１５３．Ａ）請求項１４３に記載のポリペプチドに対して特異的な因子；および

び

B）該因子に起因するシグナルを用いて該ポリペプチドの発現量を測定するための手段であって、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分における該ポリペプチドの発現量に比較して対象の被験体の対象部分における該ポリペプチドの発現が高い場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、手段、

を備える、癌診断キット。

１５４．前記癌は、直腸癌および結腸癌を含む、請求項１５３に記載のキット。

１５５．癌診断方法であって、

A）対象の被験体の対象部分からの試料を提供する工程；

B）該試料中において、請求項１４２に記載のポリペプチドの存在量を測定する工程；

C）該ポリペプチドの存在量と、癌に罹患していない被験体もしくは癌に罹患していない部分からの試料における同一核酸分子の存在量とを比較し、該対象の被験体の対象部分からの試料における該ポリペプチドの量が増加している場合、該対象の被験体は癌のハイリスク者であると診断する、工程、

を包含する、方法。

１５６．（a）配列番号４に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；

（b）配列番号４に記載のアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも１つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；

（c）配列番号３に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；

（ｄ）配列番号４に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または

（ｅ）（ａ）～（ｄ）のいずれか１つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも７０％であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

を含む、ポリペプチドの、癌の診断剤の製造のための使用。

図1

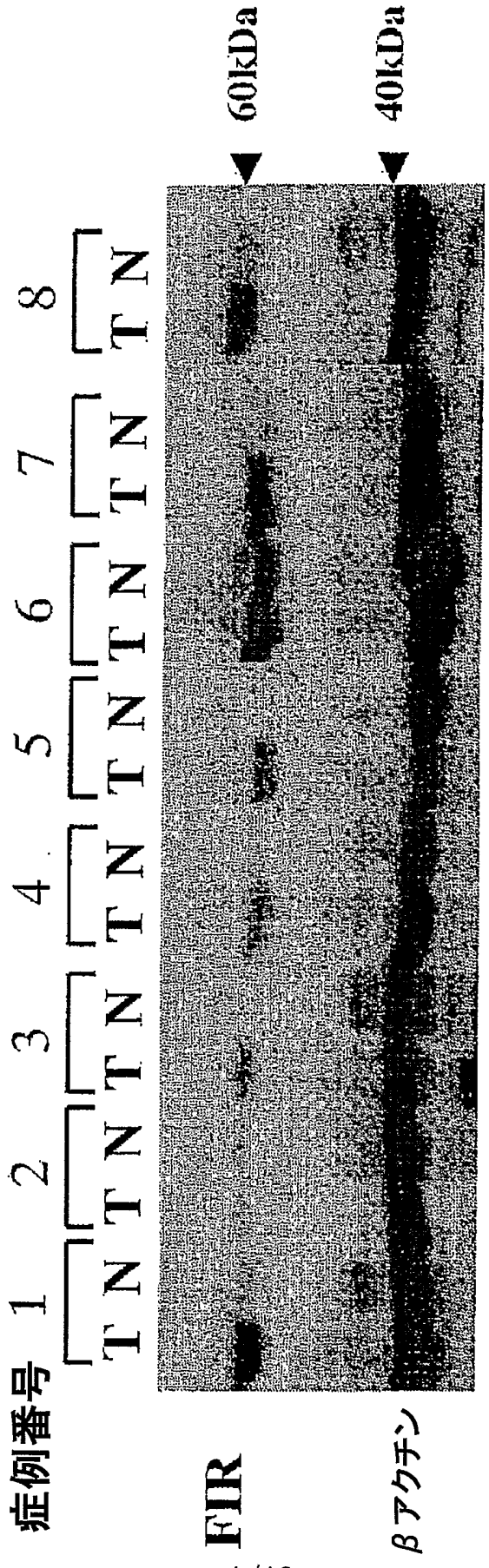


図2



図3

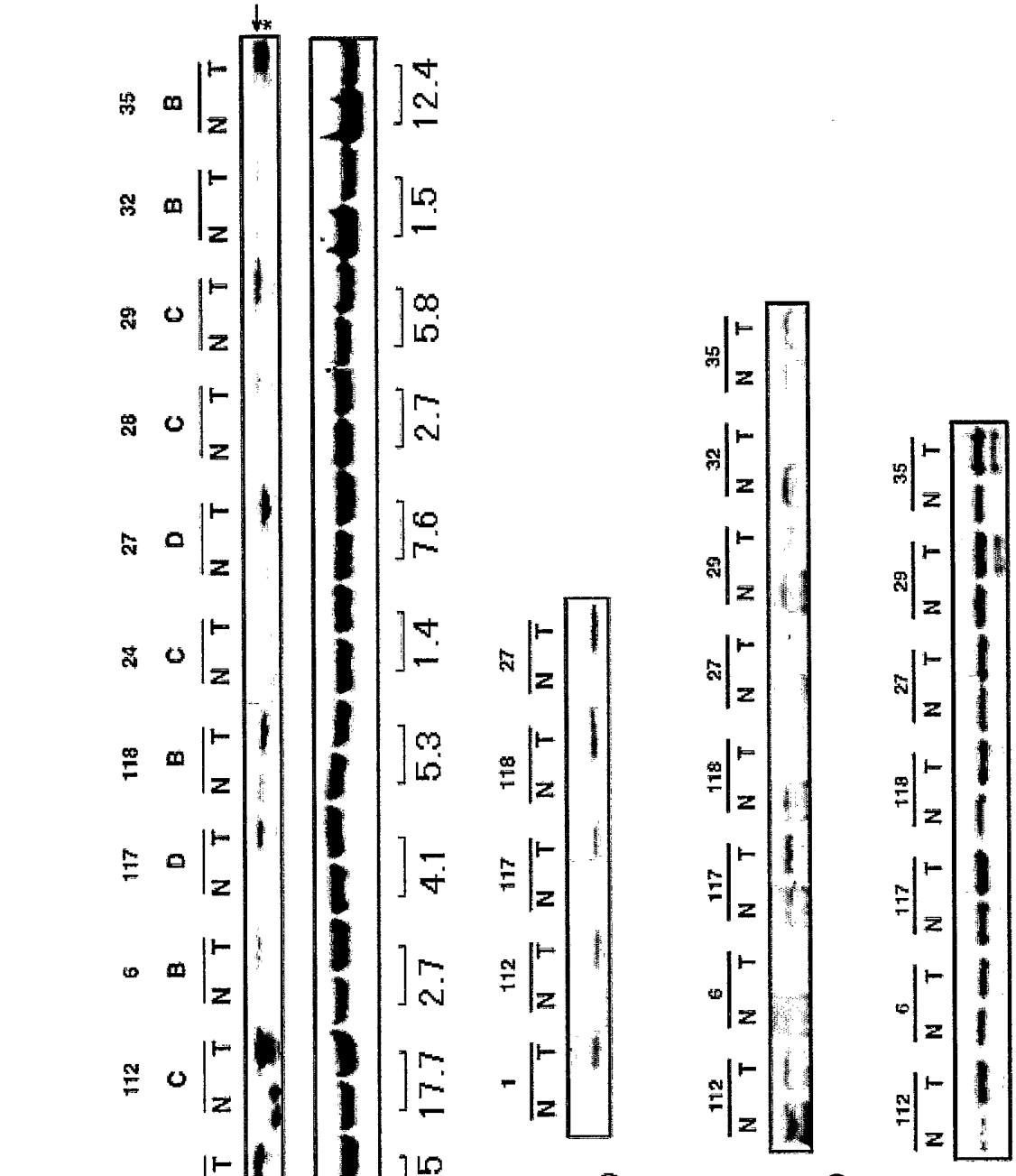

A
症例
デュークスステージ
CENP-A
(ACA血漿)
βアクチン
結腸直腸癌における
相対CENP-Aタンパク質レベル
32.5
17.7
2.7
4.1
5.3
1.4
7.6
2.7
5.8
1.5
12.4
B
症例
CENP-A
(αCENP-A Ab)
C
症例
CENP-B
(ACA血漿)
D
症例
PCNA

図4

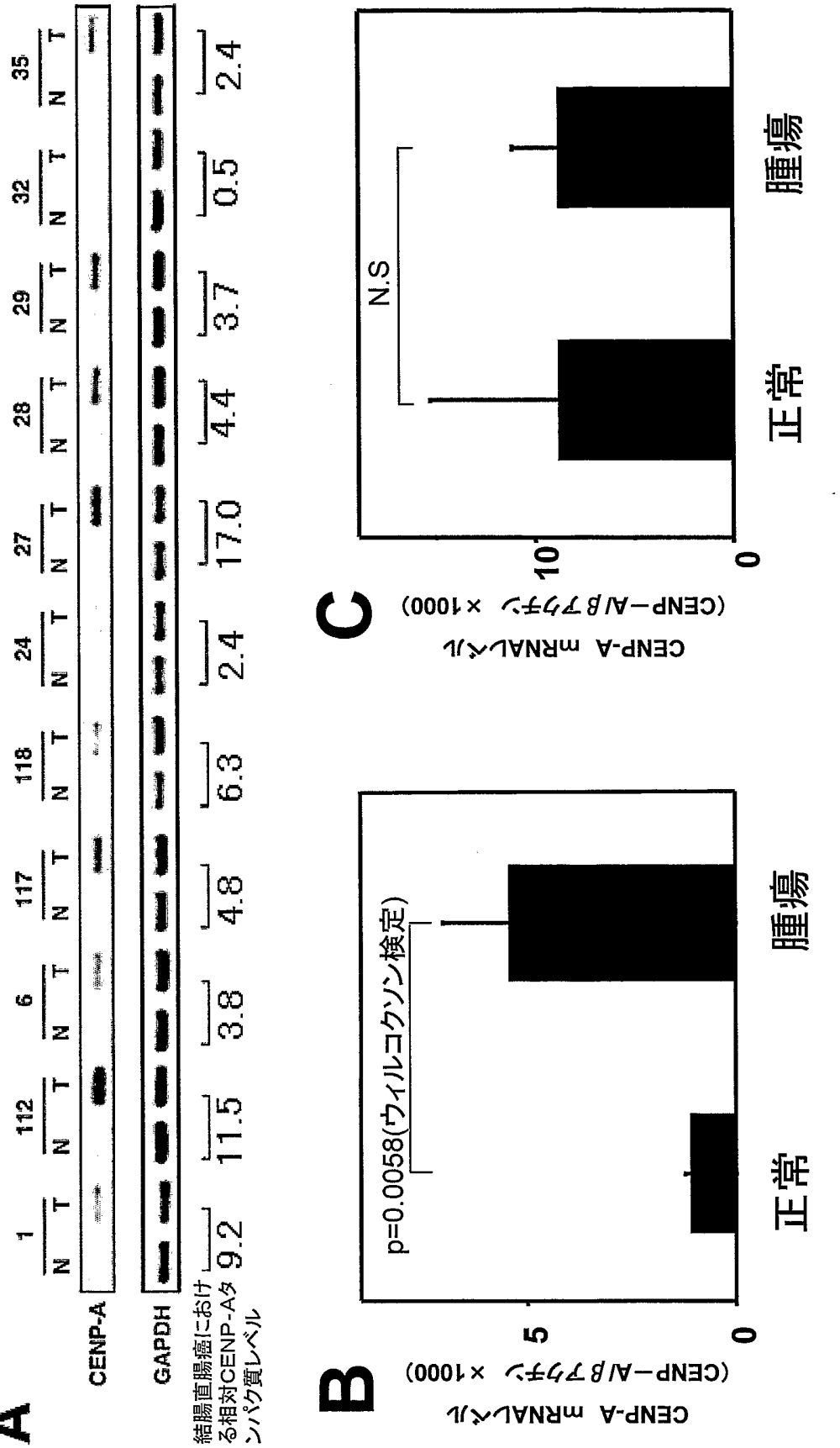

A
1 112 6 117 118 24 27 28 29 32 35
N T N T N T N T N T N T N T N T N T N T
CENP-A
GAPDH
結腸直腸癌における相対CENP-Aタンパク質レベル
9.2 11.5 3.8 4.8 6.3 2.4 17.0 4.4 3.7 0.5 2.4
B
CENP-A mRNAレベル
(CENP−A/βアクチン ×1000)
p=0.0058(ウィルコクソン検定)
0
5
正常
腫瘍
C
CENP-A mRNAレベル
(CENP−A/βアクチン ×1000)
N.S
0
10
正常
腫瘍

図5

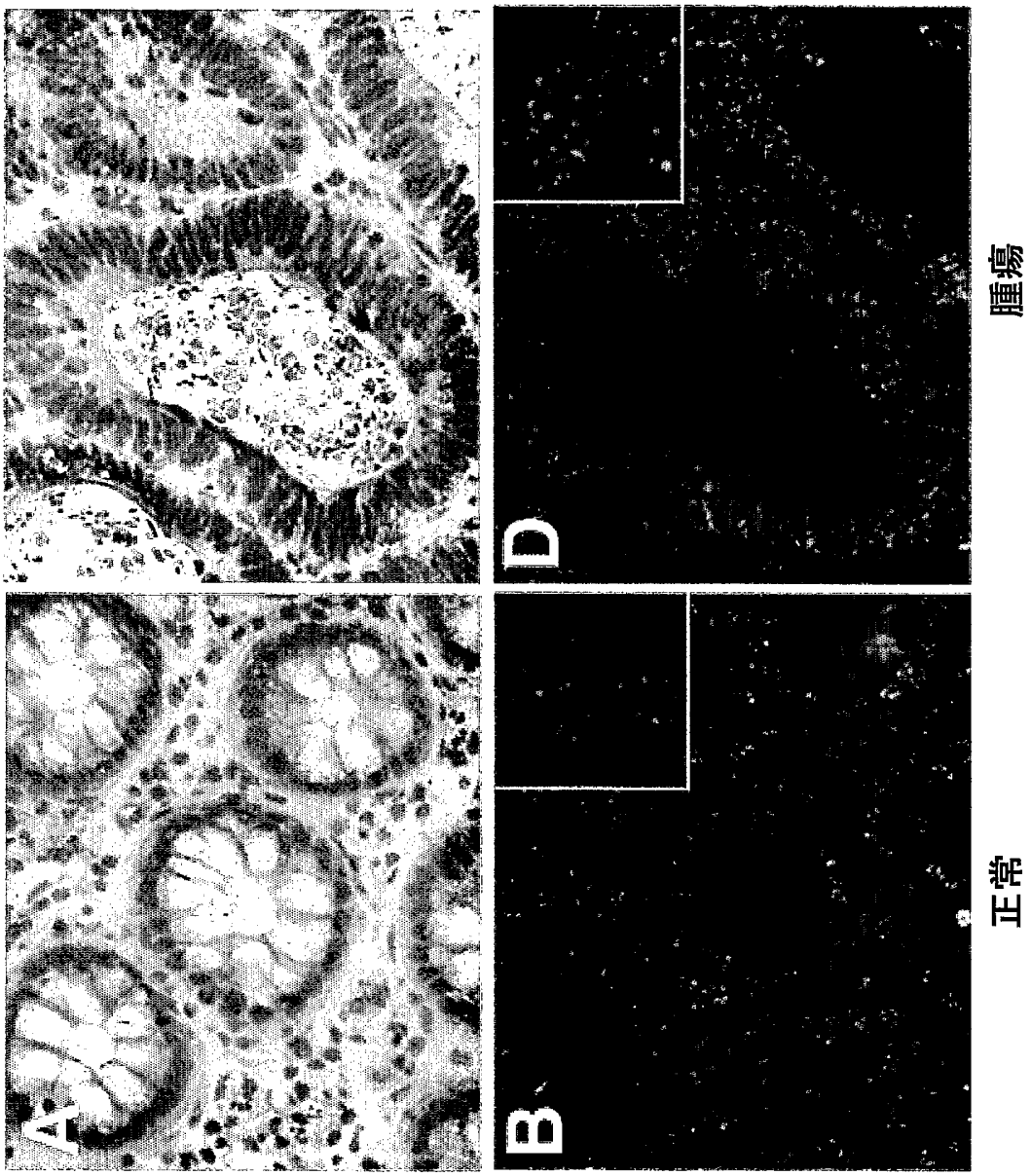


図６

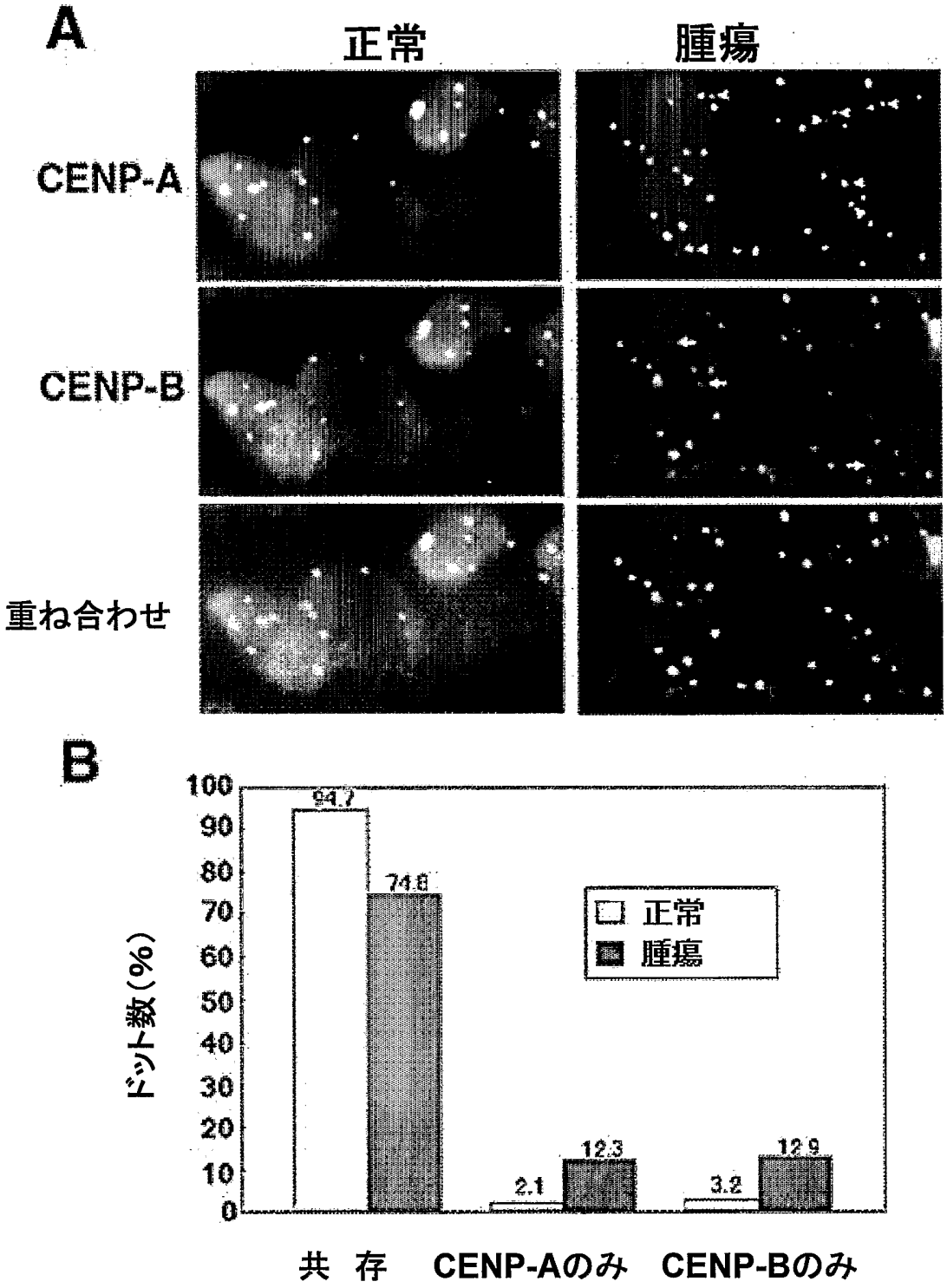
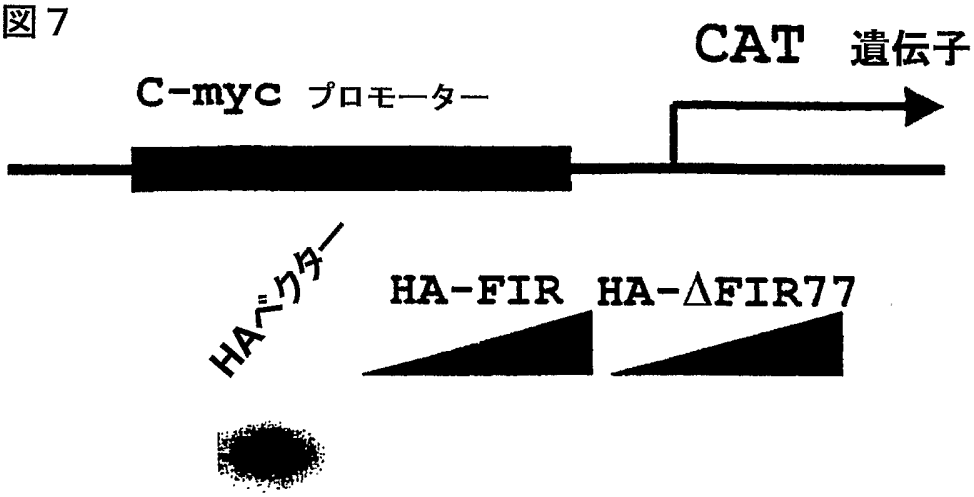

A
正常
腫瘍
CENP-A
CENP-B
重ね合わせ
B
ドット数（%）
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
94.7
74.6
2.1
12.3
3.2
12.9
正常
腫瘍
共存
CENP-Aのみ
CENP-Bのみ

図7


CAT 遺伝子
C-myc プロモーター
HAベクター
HA-FIR
HA-ΔFIR77


CAT 発現

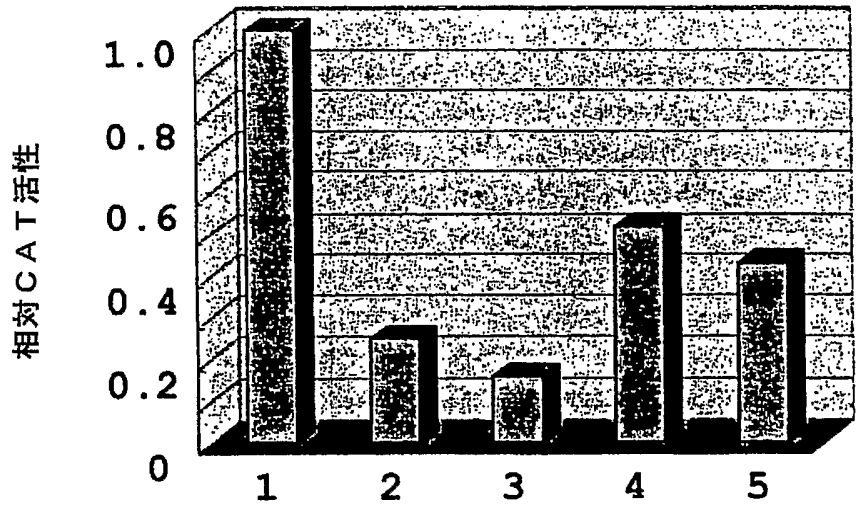

相対CAT活性
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1
2
3
4
5

図８Ａ

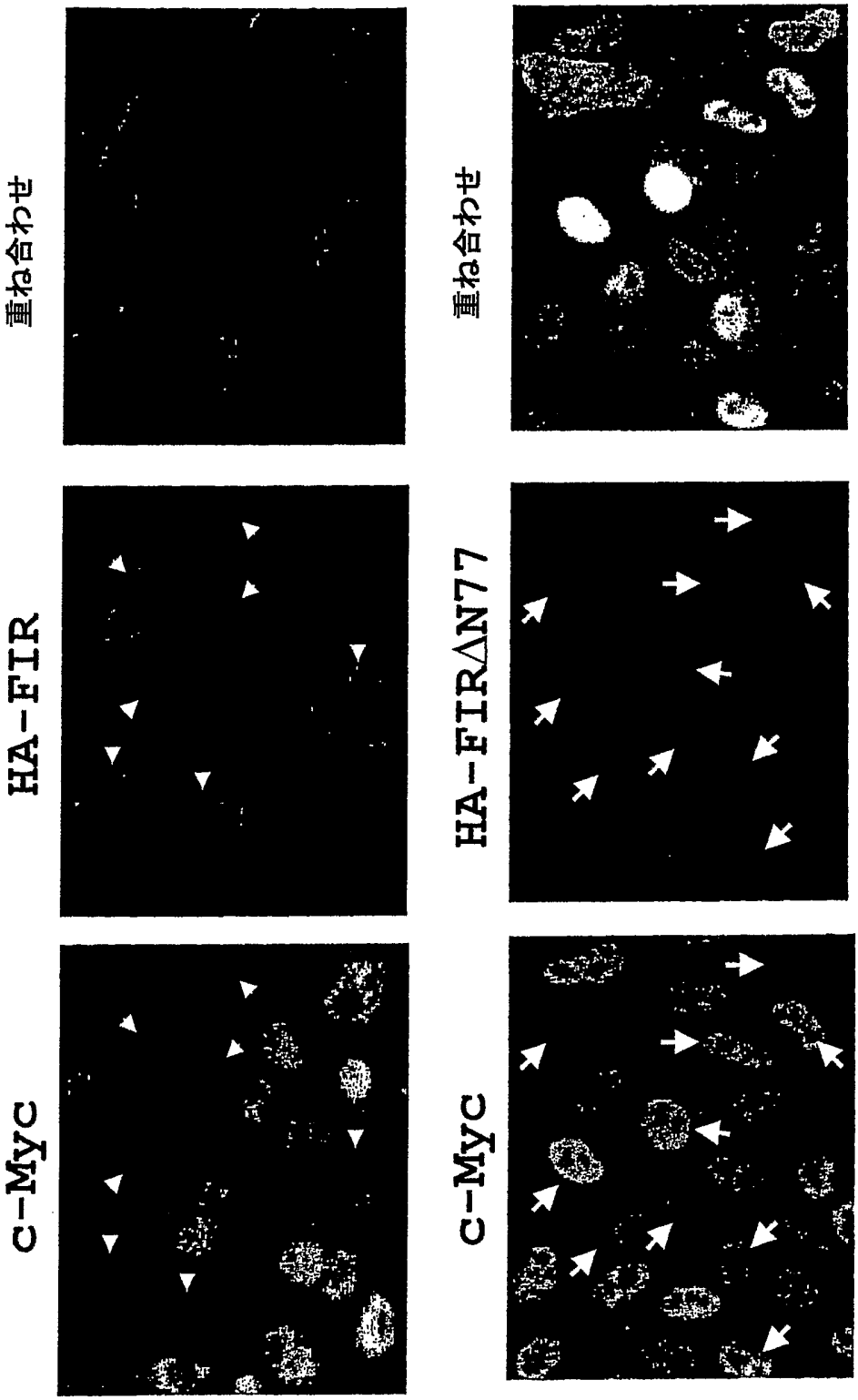
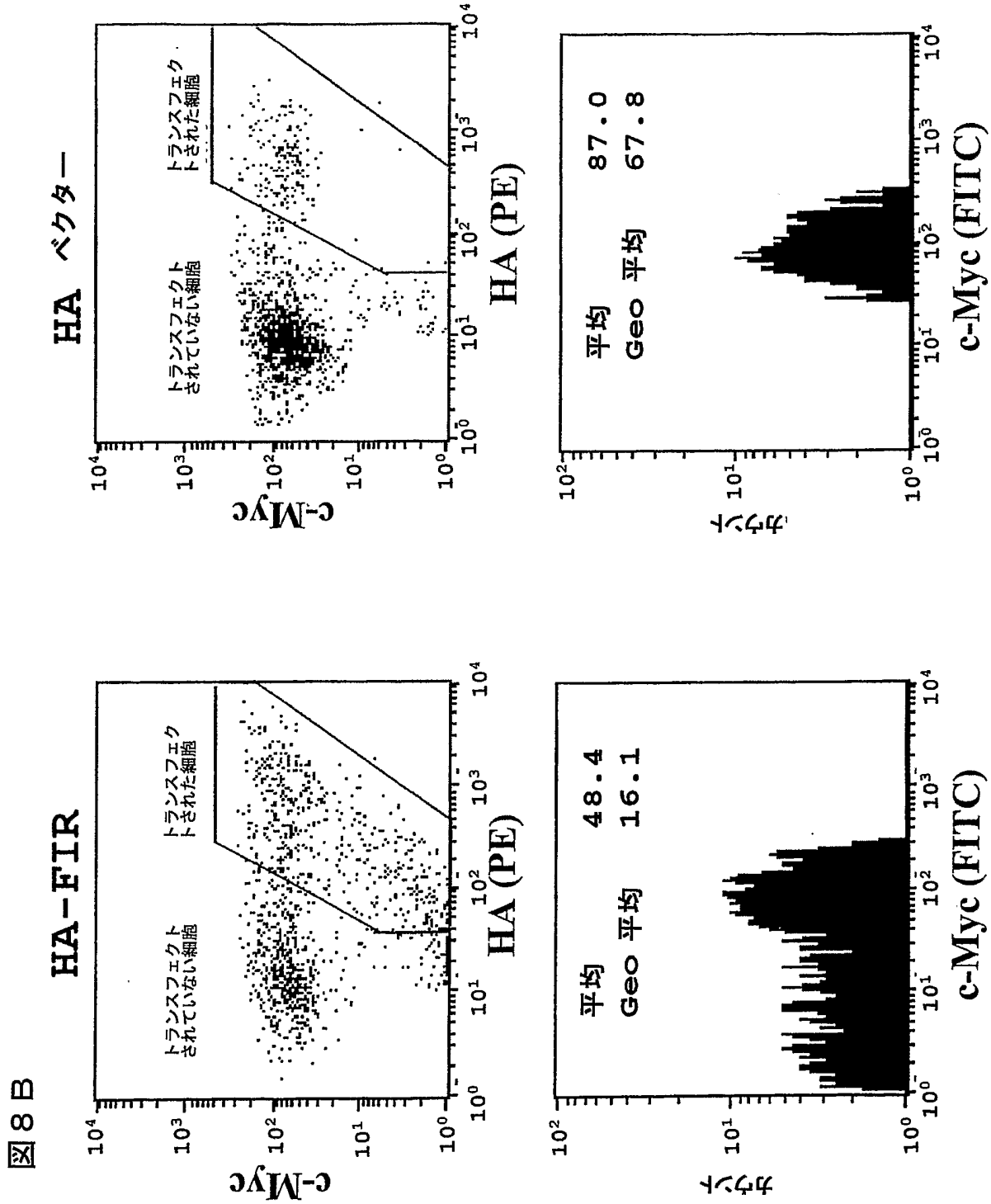


図８Ｂ


HA-FTR
HA ベクター
c-Myc
HA (PE)
トランスフェクトされていない細胞
トランスフェクトされた細胞
カウント
c-Myc (FITC)
平均 48.4
Geo 平均 16.1
平均 87.0
Geo 平均 67.8

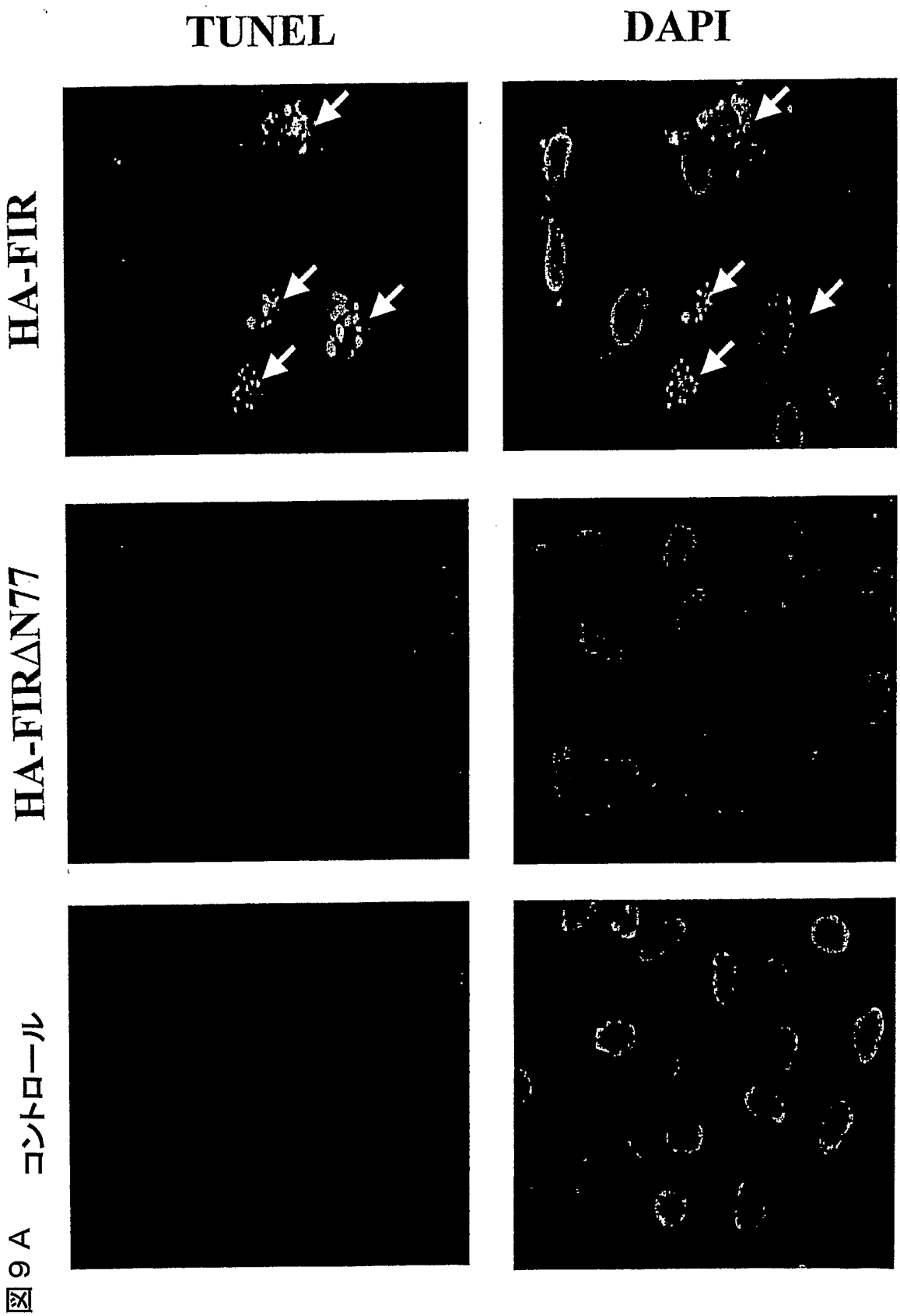


図９Ａ

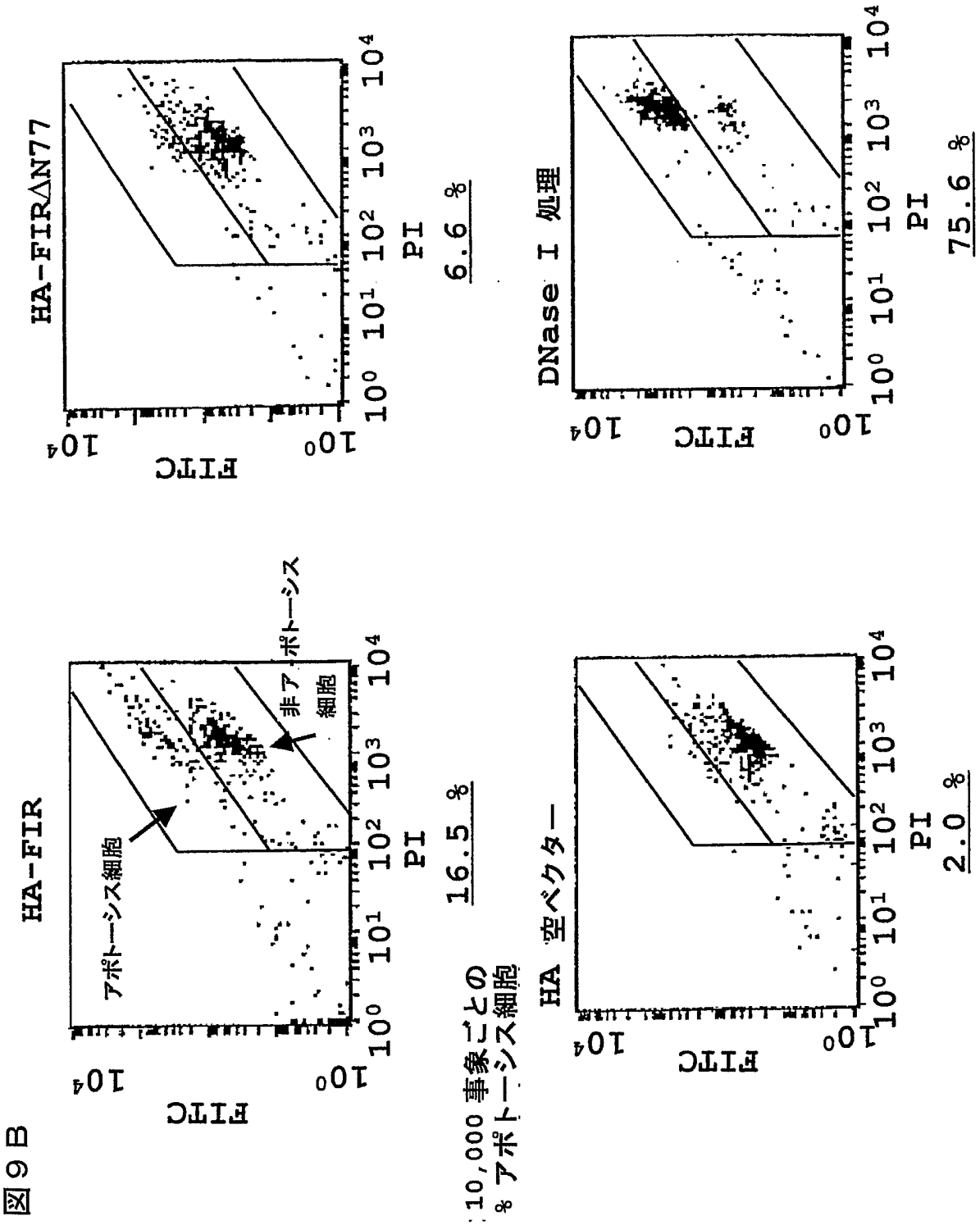
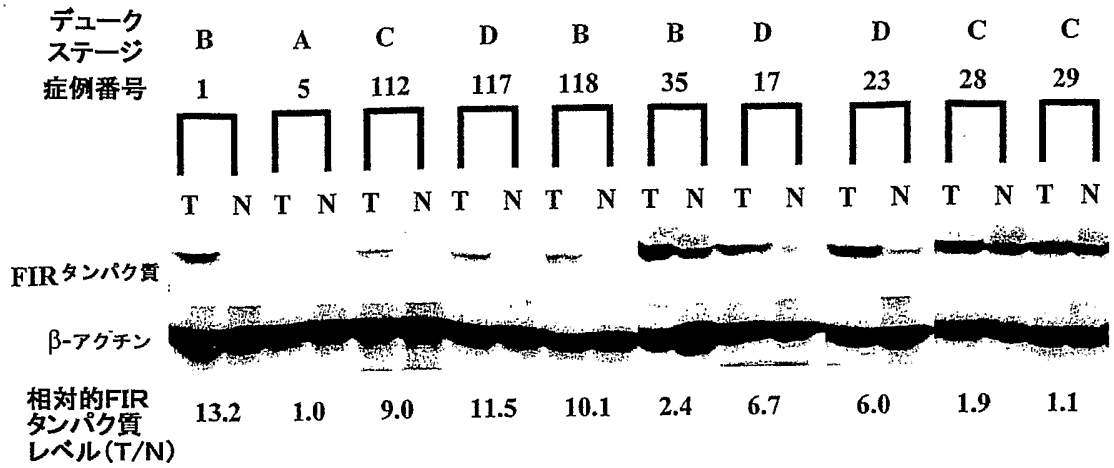

HA-FIRΔN77
FITC
PI
6.6 %
DNase I 処理
75.6 %
HA-FIR
アポトーシス細胞
非アポトーシス細胞
16.5 %
HA 空ベクター
2.0 %
10,000 事象ごとの
% アポトーシス細胞

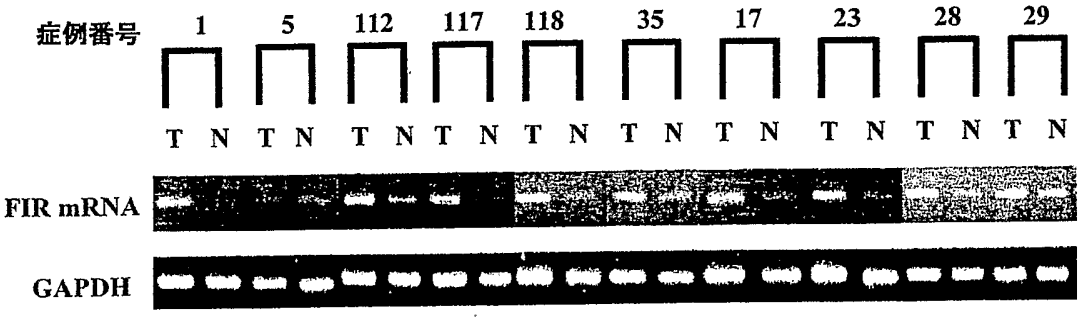
図９Ｂ

図１０

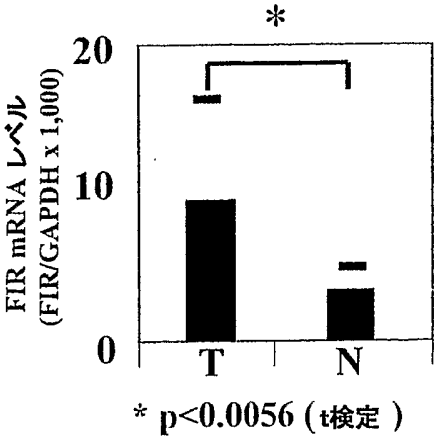
A


デューク
ステージ
B A C D B B D D C C
症例番号
1 5 112 117 118 35 17 23 28 29
T N T N T N T N T N T N T N T N T N T N
FIRタンパク質
β-アクチン
相対的FIR
タンパク質
レベル(T/N)
13.2 1.0 9.0 11.5 10.1 2.4 6.7 6.0 1.9 1.1

B


症例番号
1 5 112 117 118 35 17 23 28 29
T N T N T N T N T N T N T N T N T N T N
FIR mRNA
GAPDH

C


*
FIR mRNA レベル
(FIR/GAPDH x 1,000)
20
10
0
T
N
* p<0.0056 (t検定)

D

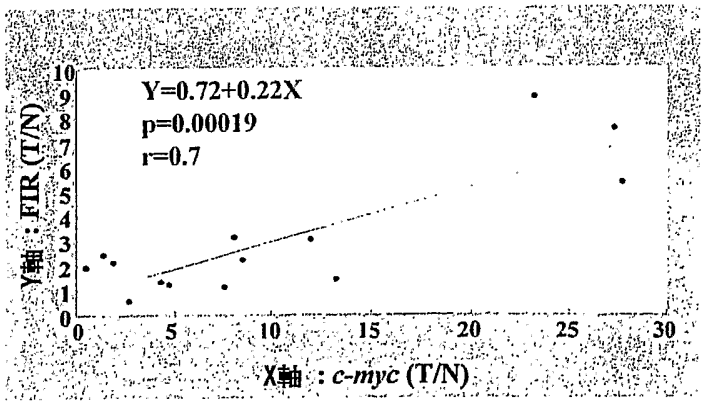
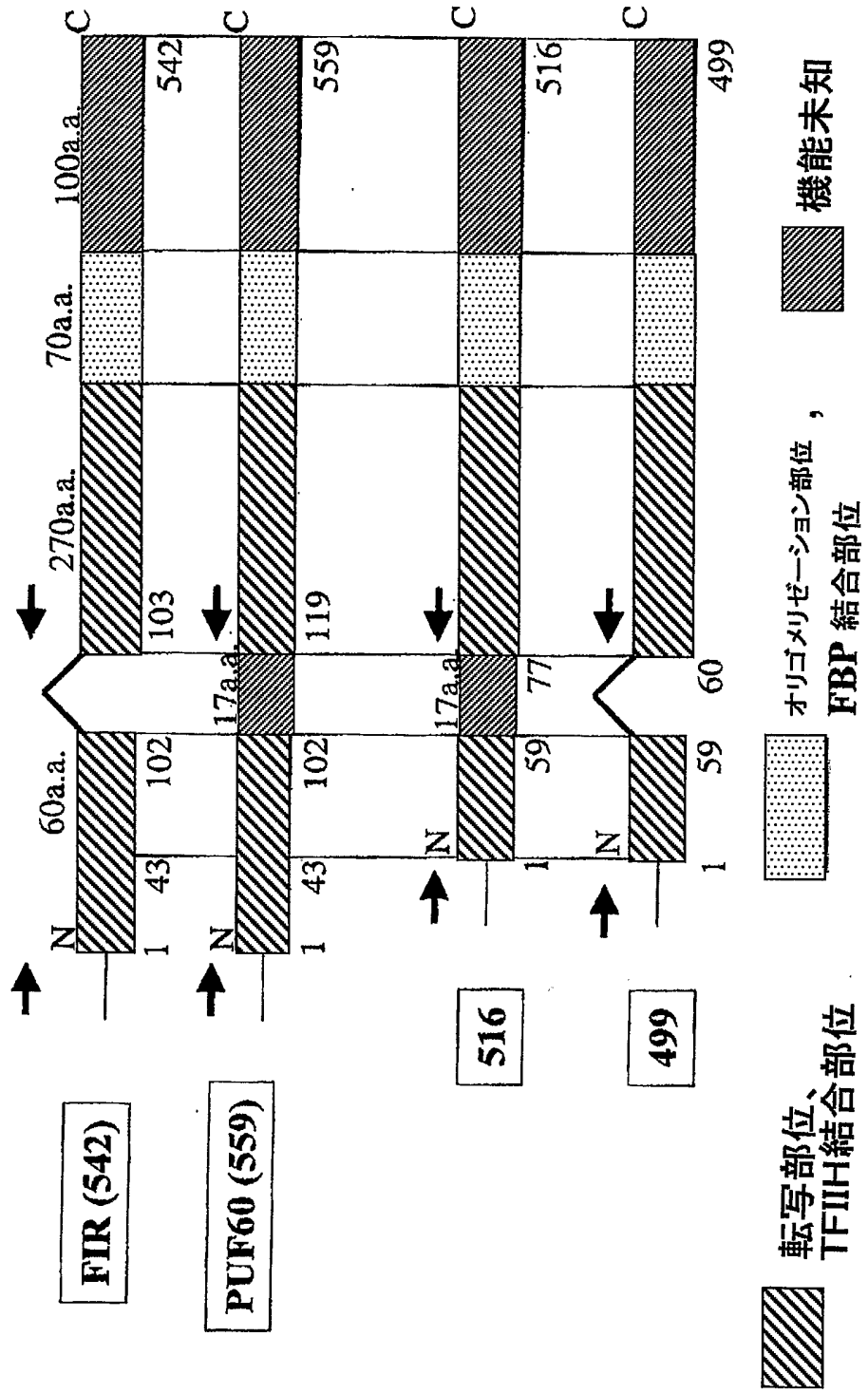

Y=0.72+0.22X
p=0.00019
r=0.7
Y軸：FIR (T/N)
X軸：c-myc (T/N)
0 5 10 15 20 25 30

図１１

FIR変異体の4つの構築物



SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Method and kit for cancer diagnosis

<130> KJ005PCT

<150> JP 2002-244249
<151> 2002-8-23

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 1853
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (65)..(1693)

<300>
<301> Liu, J. et al.
<302> Defective interplay of activators with TFIH in xerderma pigmentosum
<303> Cell
<304> 104
<305> 3
<306> 353-353
<307> 2001
<308> GenBank/NM_014281
<309> 2001-12-26
<313> 1 TO 1853

<400> 1

atcgcgcgag acagcggaag gagcaagagt gggaggcgcg cgcggaggcc gcgacggacg 60

caag atg gcg acg gcg acc ata gct ctc cag gtc aat ggc cag caa gga 109
Met Ala Thr Ala Thr Ile Ala Leu Gln Val Asn Gly Gln Gln Gly
1 5 10 15

ggg ggg tcc gag ccg gcg gcg gcg gcg gca gtg gtg gca gcg gga gac 157
Gly Gly Ser Glu Pro Ala Ala Ala Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Asp
20 25 30

aaa tgg aaa cct cca cag ggc aca gac tcc atc aag atg gag aac ggg 205
Lys Trp Lys Pro Pro Gln Gly Thr Asp Ser Ile Lys Met Glu Asn Gly
35 40 45

cag agc aca gcc gcc aag ctg ggg ctg cct ccc ctg acg ccc gag cag 253
Gln Ser Thr Ala Ala Lys Leu Gly Leu Pro Pro Leu Thr Pro Glu Gln
50 55 60

cag gag gcc ctt cag aag gcc aag aag tac gcc atg gag cag agc atc 301
Gln Glu Ala Leu Gln Lys Ala Lys Lys Tyr Ala Met Glu Gln Ser Ile
65 70 75

aag agt gtg ctg gtg aag cag acc atc gcg cac cag cag cag cag ctc 349
Lys Ser Val Leu Val Lys Gln Thr Ile Ala His Gln Gln Gln Gln Leu
80 85 90 95

acc aac ctg cag atg gcg gct cag cgg cag cgg gcg ctg gcc atc atg 397
Thr Asn Leu Gln Met Ala Ala Gln Arg Gln Arg Ala Leu Ala Ile Met
100 105 110

tgc cgc gtc tac gtg ggc tct atc tac tat gag ctg ggg gag gac acc 445
Cys Arg Val Tyr Val Gly Ser Ile Tyr Tyr Glu Leu Gly Glu Asp Thr
115 120 125

atc cgc cag gcc ttt gcc ccc ttt ggc ccc atc aag agc atc gac atg 493
Ile Arg Gln Ala Phe Ala Pro Phe Gly Pro Ile Lys Ser Ile Asp Met
130 135 140

tcc tgg gac tcc gtc acc atg aag cac aag ggc ttt gcc ttc gtg gag 541
Ser Trp Asp Ser Val Thr Met Lys His Lys Gly Phe Ala Phe Val Glu
145 150 155

tat gag gtc ccc gaa gct gca cag ctg gcc ttg gag cag atg aac tcg 589
Tyr Glu Val Pro Glu Ala Ala Gln Leu Ala Leu Glu Gln Met Asn Ser
160 165 170 175

gtg atg ctg ggg ggc agg aac atc aag gtg ggc aga ccc agc aac ata 637
Val Met Leu Gly Gly Arg Asn Ile Lys Val Gly Arg Pro Ser Asn Ile
180 185 190

ggg cag gcc cag ccc atc ata gac cag ttg gct gag gag gca cgg gcc 685
Gly Gln Ala Gln Pro Ile Ile Asp Gln Leu Ala Glu Glu Ala Arg Ala
195 200 205

ttc aac cgc atc tac gtg gcc tct gtg cac cag gac ctc tca gac gat 733
Phe Asn Arg Ile Tyr Val Ala Ser Val His Gln Asp Leu Ser Asp Asp
210 215 220

gac atc aag agc gtg ttt gag gcc ttt ggc aag atc aag tcc tgc aca 781
Asp Ile Lys Ser Val Phe Glu Ala Phe Gly Lys Ile Lys Ser Cys Thr
225 230 235

ctg gcc cgg gac ccc aca act ggc aag cac aag ggc tac ggc ttc att 829
Leu Ala Arg Asp Pro Thr Thr Gly Lys His Lys Gly Tyr Gly Phe Ile
240 245 250 255

gag tac gag aag gcc cag tcg tcc caa gat gct gtg tct tcc atg aac 877
Glu Tyr Glu Lys Ala Gln Ser Ser Gln Asp Ala Val Ser Ser Met Asn
260 265 270

ctc ttt gac ctg ggt ggc cag tac ttg cgg gtg ggc aag gct gtc aca 925
Leu Phe Asp Leu Gly Gly Gln Tyr Leu Arg Val Gly Lys Ala Val Thr
275 280 285

ccg ccc atg ccc cta ctc aca cca gcc acg cct gga ggc ctc cca cct 973
Pro Pro Met Pro Leu Leu Thr Pro Ala Thr Pro Gly Gly Leu Pro Pro
290 295 300

gcc gct gct gtg gca gct gct gca gcc act gcc aag atc aca gct cag 1021
Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Lys Ile Thr Ala Gln
305 310 315

gaa gca gtg gcc gga gca gcg gtg ctg ggt acc ctg ggc aca cct gga 1069
Glu Ala Val Ala Gly Ala Ala Val Leu Gly Thr Leu Gly Thr Pro Gly
320 325 330 335

ctg gtg tcc cca gca ctg acc ctg gcc cag ccc ctg ggc act ttg ccc 1117
Leu Val Ser Pro Ala Leu Thr Leu Ala Gln Pro Leu Gly Thr Leu Pro
340 345 350

cag gct gtc atg gct gcc cag gca cct gga gtc atc aca ggt gtg acc 1165
Gln Ala Val Met Ala Ala Gln Ala Pro Gly Val Ile Thr Gly Val Thr
355 360 365

cca gcc cgt cct cct atc ccg gtc acc atc ccc tcg gtg gga gtg gtg 1213
Pro Ala Arg Pro Pro Ile Pro Val Thr Ile Pro Ser Val Gly Val Val
370 375 380

aac ccc atc ctg gcc agc cct cca acg ctg ggt ctc ctg gag ccc aag 1261
Asn Pro Ile Leu Ala Ser Pro Pro Thr Leu Gly Leu Leu Glu Pro Lys
385 390 395

aag gag aag gaa gaa gag gag ctg ttt ccc gag tca gag cgg cca gag 1309
Lys Glu Lys Glu Glu Glu Glu Leu Phe Pro Glu Ser Glu Arg Pro Glu
400 405 410 415

atg ctg agc gag cag gag cac atg agc atc tcg ggc agt agc gcc cga 1357
Met Leu Ser Glu Gln Glu His Met Ser Ile Ser Gly Ser Ser Ala Arg
420 425 430

cac atg gtg atg cag aag ctg ctc cgc aag cag gag tct aca gtg atg 1405
His Met Val Met Gln Lys Leu Leu Arg Lys Gln Glu Ser Thr Val Met
435 440 445

gtt ctg cgc aac atg gtg gac ccc aag gac atc gat gat gac ctg gaa 1453
Val Leu Arg Asn Met Val Asp Pro Lys Asp Ile Asp Asp Asp Leu Glu
450 455 460

ggg gag gtg aca gag gag tgt ggc aag ttc ggg gcc gtg aac cgc gtc 1501
Gly Glu Val Thr Glu Glu Cys Gly Lys Phe Gly Ala Val Asn Arg Val
465 470 475

atc atc tac caa gag aaa caa ggc gag gag gag gat gca gaa atc att 1549
Ile Ile Tyr Gln Glu Lys Gln Gly Glu Glu Glu Asp Ala Glu Ile Ile
480 485 490 495

gtc aag atc ttt gtg gag ttt tcc ata gcc tct gag act cat aag gcc 1597
Val Lys Ile Phe Val Glu Phe Ser Ile Ala Ser Glu Thr His Lys Ala
500 505 510

atc cag gcc ctc aat ggc cgc tgg ttt gct ggc cgc aag gtg gtg gct 1645
Ile Gln Ala Leu Asn Gly Arg Trp Phe Ala Gly Arg Lys Val Val Ala
515 520 525

gaa gtg tac gac cag gag cgt ttt gat aac agt gac ctc tct gcg tga 1693
Glu Val Tyr Asp Gln Glu Arg Phe Asp Asn Ser Asp Leu Ser Ala
530 535 540

cagtggtccc tctccccgga cttgcacttg ttccttgttt cctctgggtt ttatagtgat 1753

acagtggtgt ccccggggcc aggcgcgctc tgcccagccc agcctacagt gcggataaag 1813

gtgcggatgc tgctggccct gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1853

<210> 2
<211> 542
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Ala Thr Ala Thr Ile Ala Leu Gln Val Asn Gly Gln Gln Gly Gly
  1               5                  10                  15
Gly Ser Glu Pro Ala Ala Ala Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Asp Lys
            20                  25                  30
Trp Lys Pro Pro Gln Gly Thr Asp Ser Ile Lys Met Glu Asn Gly Gln
        35                  40                  45
Ser Thr Ala Ala Lys Leu Gly Leu Pro Pro Leu Thr Pro Glu Gln Gln
    50                  55                  60
Glu Ala Leu Gln Lys Ala Lys Lys Tyr Ala Met Glu Gln Ser Ile Lys
65                  70                  75                  80
Ser Val Leu Val Lys Gln Thr Ile Ala His Gln Gln Gln Gln Leu Thr
                85                  90                  95
Asn Leu Gln Met Ala Ala Gln Arg Gln Arg Ala Leu Ala Ile Met Cys
            100                 105                 110
Arg Val Tyr Val Gly Ser Ile Tyr Tyr Glu Leu Gly Glu Asp Thr Ile
        115                 120                 125
Arg Gln Ala Phe Ala Pro Phe Gly Pro Ile Lys Ser Ile Asp Met Ser
    130                 135                 140
Trp Asp Ser Val Thr Met Lys His Lys Gly Phe Ala Phe Val Glu Tyr
145                 150                 155                 160
Glu Val Pro Glu Ala Ala Gln Leu Ala Leu Glu Gln Met Asn Ser Val
                165                 170                 175
Met Leu Gly Gly Arg Asn Ile Lys Val Gly Arg Pro Ser Asn Ile Gly
            180                 185                 190
Gln Ala Gln Pro Ile Ile Asp Gln Leu Ala Glu Glu Ala Arg Ala Phe
        195                 200                 205
Asn Arg Ile Tyr Val Ala Ser Val His Gln Asp Leu Ser Asp Asp Asp
```

210 215 220

Ile Lys Ser Val Phe Glu Ala Phe Gly Lys Ile Lys Ser Cys Thr Leu

225 230 235 240

Ala Arg Asp Pro Thr Thr Gly Lys His Lys Gly Tyr Gly Phe Ile Glu

245 250 255

Tyr Glu Lys Ala Gln Ser Ser Gln Asp Ala Val Ser Ser Met Asn Leu

260 265 270

Phe Asp Leu Gly Gly Gln Tyr Leu Arg Val Gly Lys Ala Val Thr Pro

275 280 285

Pro Met Pro Leu Leu Thr Pro Ala Thr Pro Gly Gly Leu Pro Pro Ala

290 295 300

Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Lys Ile Thr Ala Gln Glu

305 310 315 320

Ala Val Ala Gly Ala Ala Val Leu Gly Thr Leu Gly Thr Pro Gly Leu

325 330 335

Val Ser Pro Ala Leu Thr Leu Ala Gln Pro Leu Gly Thr Leu Pro Gln

340 345 350

Ala Val Met Ala Ala Gln Ala Pro Gly Val Ile Thr Gly Val Thr Pro

355 360 365

Ala Arg Pro Pro Ile Pro Val Thr Ile Pro Ser Val Gly Val Val Asn

370 375 380

Pro Ile Leu Ala Ser Pro Pro Thr Leu Gly Leu Leu Glu Pro Lys Lys

385 390 395 400

Glu Lys Glu Glu Glu Glu Leu Phe Pro Glu Ser Glu Arg Pro Glu Met

405 410 415

Leu Ser Glu Gln Glu His Met Ser Ile Ser Gly Ser Ser Ala Arg His

420 425 430

Met Val Met Gln Lys Leu Leu Arg Lys Gln Glu Ser Thr Val Met Val

435 440 445

Leu Arg Asn Met Val Asp Pro Lys Asp Ile Asp Asp Asp Leu Glu Gly

450 455 460

Glu Val Thr Glu Glu Cys Gly Lys Phe Gly Ala Val Asn Arg Val Ile

465 470 475 480

Ile Tyr Gln Glu Lys Gln Gly Glu Glu Glu Asp Ala Glu Ile Ile Val

485 490 495

Lys Ile Phe Val Glu Phe Ser Ile Ala Ser Glu Thr His Lys Ala Ile

500 505 510
Gln Ala Leu Asn Gly Arg Trp Phe Ala Gly Arg Lys Val Val Ala Glu
515 520 525
Val Tyr Asp Gln Glu Arg Phe Asp Asn Ser Asp Leu Ser Ala
530 535 540

<210> 3
<211> 1389
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (145)..(567)

<300>
<301> Palmer, D.K. et al.
<302> Purification of the centromere-specific protein CEMP-A
and demonstration that it is a distinctive histone
<303> Proc. Natl. Acad. Sci. USA
<304> 88
<305> 9
<306> 3734-3738
<307> 1991
<308> GenBank/NM_001809
<309> 2000-10-31
<313> 1 TO 1389

<400> 3
cgcggacttc tgccaagcac cggctcatgt gaggctcgcg gcacagcgtt ctctgggctc 60

cccagaagcc agcctttcgc tcccggaccc ggcagcccga gcaggagccg tgggaccggg 120

```
cgccagcacc ctctgcggcg tgtc atg ggc ccg cgc cgc cgg agc cga aag    171
                           Met Gly Pro Arg Arg Arg Ser Arg Lys
                             1               5

ccc gag gcc ccg agg agg cgc agc ccg agc ccg acc ccg acc ccc ggc    219
Pro Glu Ala Pro Arg Arg Arg Ser Pro Ser Pro Thr Pro Thr Pro Gly
 10                  15                  20                  25

ccc tcc cgg cgg ggc ccc tcc tta ggc gct tcc tcc cat caa cac agt    267
Pro Ser Arg Arg Gly Pro Ser Leu Gly Ala Ser Ser His Gln His Ser
                 30                  35                  40

cgg cgg aga caa ggt tgg cta aag gag atc cga aag ctt cag aag agc    315
Arg Arg Arg Gln Gly Trp Leu Lys Glu Ile Arg Lys Leu Gln Lys Ser
             45                  50                  55

aca cac ctc ttg ata agg aag ctg ccc ttc agc cgc ctg gca aga gaa    363
Thr His Leu Leu Ile Arg Lys Leu Pro Phe Ser Arg Leu Ala Arg Glu
         60                  65                  70

ata tgt gtt aaa ttc act cgt ggt gtg gac ttc aat tgg caa gcc cag    411
Ile Cys Val Lys Phe Thr Arg Gly Val Asp Phe Asn Trp Gln Ala Gln
     75                  80                  85

gcc cta ttg gcc cta caa gag gca gca gaa gca ttt cta gtt cat ctc    459
Ala Leu Leu Ala Leu Gln Glu Ala Ala Glu Ala Phe Leu Val His Leu
 90                  95                  100                 105

ttt gag gac gcc tat ctc ctc acc tta cat gca ggc cga gtt act ctc    507
Phe Glu Asp Ala Tyr Leu Leu Thr Leu His Ala Gly Arg Val Thr Leu
                110                 115                 120

ttc cca aag gat gtg caa ctg gcc cgg agg atc cgg ggc ctt gag gag    555
Phe Pro Lys Asp Val Gln Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Leu Glu Glu
            125                 130                 135
```

gga ctc ggc tga gctcctgcac ccagtgtttc tgtcagtctt tcctgctcag 607
Gly Leu Gly
140

ccaggggga tgataccggg gactctccag agccatgact agatccaatg gattctgcga 667

tgctgtctgg actttgctgt ctctgaacag tatgtgtgtg ttgctttaaa tatttttctt 727

ttttttgaga aggagaagac tgcatgactt tcctctgtaa cagaggtaat atatgagaca 787

atcaacaccg ttccaaaggc ctgaaaataa ttttcagata aagagactcc aaggttgact 847

ttagtttgtg agttactcat gtgactattt gaggattttg aaaacatcag atttgctgtg 907

gtatgggaga aaaggttatg tacttattat tttagctctt tctgtaatat ttacattttt 967

taccatatgt acatttgtac ttttatttta cacataaggg aaaaaataag accactttga 1027

gcagttgcct ggaaggctgg gcatttccat catatagacc tctgcccttc agagtagcct 1087

caccattagt ggcagcatca tgtaactgag tggactgtgc ttgtcaacgg atgtgtagct 1147

tttcagaaac ttaattgggg atgaatagaa aacctgtaag ctttgatgtt ctggttactt 1207

ctagtaaatt cctgtcaaaa tcaattcaga aattctaact tggagaattt aacattttac 1267

tcttgtaaat catagaagat gtatcataac agttcagaat tttaaagtac attttcgatg 1327

cttttatggg tatttttgta gtttctttgt agagagataa taaaaatcaa aatatttaat 1387

ga 1389

<210> 4
<211> 140
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```
Met Gly Pro Arg Arg Arg Ser Arg Lys Pro Glu Ala Pro Arg Arg Arg
  1               5                  10                  15
Ser Pro Ser Pro Thr Pro Thr Pro Gly Pro Ser Arg Arg Gly Pro Ser
             20                  25                  30
Leu Gly Ala Ser Ser His Gln His Ser Arg Arg Arg Gln Gly Trp Leu
         35                  40                  45
Lys Glu Ile Arg Lys Leu Gln Lys Ser Thr His Leu Leu Ile Arg Lys
     50                  55                  60
Leu Pro Phe Ser Arg Leu Ala Arg Glu Ile Cys Val Lys Phe Thr Arg
 65                  70                  75                  80
Gly Val Asp Phe Asn Trp Gln Ala Gln Ala Leu Leu Ala Leu Gln Glu
                 85                  90                  95
Ala Ala Glu Ala Phe Leu Val His Leu Phe Glu Asp Ala Tyr Leu Leu
            100                 105                 110
Thr Leu His Ala Gly Arg Val Thr Leu Phe Pro Lys Asp Val Gln Leu
        115                 120                 125
Ala Arg Arg Ile Arg Gly Leu Glu Glu Gly Leu Gly
    130                 135                 140
```

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligopeptide

<400> 5

```
Cys Asp Lys Trp Lys Pro Pro Gln Gly Thr Asp Ser Ile Lys Met Glu
  1               5                  10                  15
```

<210> 6

<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligopeptide

<400> 6
Ala Glu Val Tyr Asp Gln Glu Arg Phe Asp Asn Ser Asp Leu Ser Ala
1 5 10 15

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 7
ggccccatca agagcatc 18

<210> 8
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 8
ggggctgggc cagggtcag 19

<210> 9
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial sequence
<220>
<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 9
taggcgcttc ctcccatcaa 20

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 10
gccgagtccc tcctcaag 18

<210> 11
<211> 1841
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1680)

<400> 11
atg gcg acg gcg acc ata gct ctc cag gtc aat ggc cag caa gga ggg 48
Met Ala Thr Ala Thr Ile Ala Leu Gln Val Asn Gly Gln Gln Gly Gly
1 5 10 15

ggg tcc gag ccg gcg gcg gcg gca gtg gtg gca gcg gga gac aaa 96
Gly Ser Glu Pro Ala Ala Ala Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Asp Lys

```
                20                  25                  30

tgg aaa cct cca cag ggc aca gac tcc atc aag atg gag aac ggg cag      144
Trp Lys Pro Pro Gln Gly Thr Asp Ser Ile Lys Met Glu Asn Gly Gln
        35                  40                  45

agc aca gcc gcc aag ctg ggg ctg cct ccc ctg acg ccc gag cag cag      192
Ser Thr Ala Ala Lys Leu Gly Leu Pro Pro Leu Thr Pro Glu Gln Gln
    50                  55                  60

gag gcc ctt cag aag gcc aag aag tac gcc atg gag cag agc atc aag      240
Glu Ala Leu Gln Lys Ala Lys Lys Tyr Ala Met Glu Gln Ser Ile Lys
65                  70                  75                  80

agt gtg ctg gtg aag cag acc atc gcg cac cag cag cag cag ctc acc      288
Ser Val Leu Val Lys Gln Thr Ile Ala His Gln Gln Gln Gln Leu Thr
                85                  90                  95

aac ctg cag atg gca gca gtg aca atg ggc ttt gga gat cct ctc tca      336
Asn Leu Gln Met Ala Ala Val Thr Met Gly Phe Gly Asp Pro Leu Ser
            100                 105                 110

cct ttg caa tcg atg gcg gct cag cgg cag cgg gcg ctg gcc atc atg      384
Pro Leu Gln Ser Met Ala Ala Gln Arg Gln Arg Ala Leu Ala Ile Met
        115                 120                 125

tgc cgc gtc tac gtg ggc tct atc tac tat gag ctg ggg gag gac acc      432
Cys Arg Val Tyr Val Gly Ser Ile Tyr Tyr Glu Leu Gly Glu Asp Thr
    130                 135                 140

atc cgc cag gcc ttt gcc ccc ttt ggc ccc atc aag agc atc gac atg      480
Ile Arg Gln Ala Phe Ala Pro Phe Gly Pro Ile Lys Ser Ile Asp Met
145                 150                 155                 160

tcc tgg gac tcc gtc acc atg aag cac aag ggc ttt gcc ttc gtg gag      528
Ser Trp Asp Ser Val Thr Met Lys His Lys Gly Phe Ala Phe Val Glu
```

165 170 175

tat gag gtc ccc gaa gct gca cag ctg gcc ttg gag cag atg aac tcg 576
Tyr Glu Val Pro Glu Ala Ala Gln Leu Ala Leu Glu Gln Met Asn Ser
180 185 190

gtg atg ctg ggg ggc agg aac atc aag gtg ggc aga ccc agc aac ata 624
Val Met Leu Gly Gly Arg Asn Ile Lys Val Gly Arg Pro Ser Asn Ile
195 200 205

ggg cag gcc cag ccc atc ata gac cag ttg gct gag gag gca cgg gcc 672
Gly Gln Ala Gln Pro Ile Ile Asp Gln Leu Ala Glu Glu Ala Arg Ala
210 215 220

ttc aac cgc atc tac gtg gcc tct gtg cac cag gac ctc tca gac gat 720
Phe Asn Arg Ile Tyr Val Ala Ser Val His Gln Asp Leu Ser Asp Asp
225 230 235 240

gac atc aag agc gtg ttt gag gcc ttt ggc aag atc aag tcc tgc aca 768
Asp Ile Lys Ser Val Phe Glu Ala Phe Gly Lys Ile Lys Ser Cys Thr
245 250 255

ctg gcc cgg gac ccc aca act ggc aag cac aag ggc tac ggc ttc att 816
Leu Ala Arg Asp Pro Thr Thr Gly Lys His Lys Gly Tyr Gly Phe Ile
260 265 270

gag tac gag aag gcc cag tcg tcc caa gat gct gtg tct tcc atg aac 864
Glu Tyr Glu Lys Ala Gln Ser Ser Gln Asp Ala Val Ser Ser Met Asn
275 280 285

ctc ttt gac ctg ggt ggc cag tac ttg cgg gtg ggc aag gct gtc aca 912
Leu Phe Asp Leu Gly Gly Gln Tyr Leu Arg Val Gly Lys Ala Val Thr
290 295 300

ccg ccc atg ccc cta ctc aca cca gcc acg cct gga ggc ctc cca cct 960
Pro Pro Met Pro Leu Leu Thr Pro Ala Thr Pro Gly Gly Leu Pro Pro

305 310 315 320

gcc gct gct gtg gca gct gct gca gcc act gcc aag atc aca gct cag 1008
Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Lys Ile Thr Ala Gln
325 330 335

gaa gca gtg gcc gga gca gcg gtg ctg ggt acc ctg ggc aca cct gga 1056
Glu Ala Val Ala Gly Ala Ala Val Leu Gly Thr Leu Gly Thr Pro Gly
340 345 350

ctg gtg tcc cca gca ctg acc ctg gcc cag ccc ctg ggc act ttg ccc 1104
Leu Val Ser Pro Ala Leu Thr Leu Ala Gln Pro Leu Gly Thr Leu Pro
355 360 365

cag gct gtc atg gct gcc cag gca cct gga gtc atc aca ggt gtg acc 1152
Gln Ala Val Met Ala Ala Gln Ala Pro Gly Val Ile Thr Gly Val Thr
370 375 380

cca gcc cgt cct cct atc ccg gtc acc atc ccc tcg gtg gga gtg gtg 1200
Pro Ala Arg Pro Pro Ile Pro Val Thr Ile Pro Ser Val Gly Val Val
385 390 395 400

aac ccc atc ctg gcc agc cct cca acg ctg ggt ctc ctg gag ccc aag 1248
Asn Pro Ile Leu Ala Ser Pro Pro Thr Leu Gly Leu Leu Glu Pro Lys
405 410 415

aag gag aag gaa gaa gag gag ctg ttt ccc gag tca gag cgg cca gag 1296
Lys Glu Lys Glu Glu Glu Glu Leu Phe Pro Glu Ser Glu Arg Pro Glu
420 425 430

atg ctg agc gag cag gag cac atg agc atc tcg ggc agt agc gcc cga 1344
Met Leu Ser Glu Gln Glu His Met Ser Ile Ser Gly Ser Ser Ala Arg
435 440 445

cac atg gtg atg cag aag ctg ctc cgc aag cag gag tct aca gtg atg 1392
His Met Val Met Gln Lys Leu Leu Arg Lys Gln Glu Ser Thr Val Met

450 455 460

gtt ctg cgc aac atg gtg gac ccc aag gac atc gat gat gac ctg gaa 1440
Val Leu Arg Asn Met Val Asp Pro Lys Asp Ile Asp Asp Asp Leu Glu
465 470 475 480

ggg gag gtg aca gag gag tgt ggc aag ttc ggg gcc gtg aac cgc gtc 1488
Gly Glu Val Thr Glu Glu Cys Gly Lys Phe Gly Ala Val Asn Arg Val
485 490 495

atc atc tac caa gag aaa caa ggc gag gag gag gat gca gaa atc att 1536
Ile Ile Tyr Gln Glu Lys Gln Gly Glu Glu Glu Asp Ala Glu Ile Ile
500 505 510

gtc aag atc ttt gtg gag ttt tcc ata gcc tct gag act cat aag gcc 1584
Val Lys Ile Phe Val Glu Phe Ser Ile Ala Ser Glu Thr His Lys Ala
515 520 525

atc cag gcc ctc aat ggc cgc tgg ttt gct ggc cgc aag gtg gtg gct 1632
Ile Gln Ala Leu Asn Gly Arg Trp Phe Ala Gly Arg Lys Val Val Ala
530 535 540

gaa gtg tac gac cag gag cgt ttt gat aac agt gac ctc tct gcg tga 1680
Glu Val Tyr Asp Gln Glu Arg Phe Asp Asn Ser Asp Leu Ser Ala
545 550 555

cagtggtccc tctccccgga cttgcacttg ttccttgttt cctctgggtt ttatagtgat 1740

acagtggtgt ccccggggcc aggcgcgctc tgcccagccc agcctacagt gcggataaag 1800

gtgcggatgc tgctggccct gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 1841

<210> 12
<211> 559
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Ala Thr Ala Thr Ile Ala Leu Gln Val Asn Gly Gln Gln Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser Glu Pro Ala Ala Ala Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Asp Lys
20 25 30

Trp Lys Pro Pro Gln Gly Thr Asp Ser Ile Lys Met Glu Asn Gly Gln
35 40 45

Ser Thr Ala Ala Lys Leu Gly Leu Pro Pro Leu Thr Pro Glu Gln Gln
50 55 60

Glu Ala Leu Gln Lys Ala Lys Lys Tyr Ala Met Glu Gln Ser Ile Lys
65 70 75 80

Ser Val Leu Val Lys Gln Thr Ile Ala His Gln Gln Gln Gln Leu Thr
85 90 95

Asn Leu Gln Met Ala Ala Val Thr Met Gly Phe Gly Asp Pro Leu Ser
100 105 110

Pro Leu Gln Ser Met Ala Ala Gln Arg Gln Arg Ala Leu Ala Ile Met
115 120 125

```
Cys Arg Val Tyr Val Gly Ser Ile Tyr Tyr Glu Leu Gly Glu Asp Thr
    130                 135                 140

Ile Arg Gln Ala Phe Ala Pro Phe Gly Pro Ile Lys Ser Ile Asp Met
145                 150                 155                 160

Ser Trp Asp Ser Val Thr Met Lys His Lys Gly Phe Ala Phe Val Glu
                165                 170                 175

Tyr Glu Val Pro Glu Ala Ala Gln Leu Ala Leu Glu Gln Met Asn Ser
            180                 185                 190

Val Met Leu Gly Gly Arg Asn Ile Lys Val Gly Arg Pro Ser Asn Ile
        195                 200                 205

Gly Gln Ala Gln Pro Ile Ile Asp Gln Leu Ala Glu Glu Ala Arg Ala
    210                 215                 220

Phe Asn Arg Ile Tyr Val Ala Ser Val His Gln Asp Leu Ser Asp Asp
225                 230                 235                 240

Asp Ile Lys Ser Val Phe Glu Ala Phe Gly Lys Ile Lys Ser Cys Thr
                245                 250                 255

Leu Ala Arg Asp Pro Thr Thr Gly Lys His Lys Gly Tyr Gly Phe Ile
            260                 265                 270
```

Glu Tyr Glu Lys Ala Gln Ser Ser Gln Asp Ala Val Ser Ser Met Asn
275 280 285

Leu Phe Asp Leu Gly Gly Gln Tyr Leu Arg Val Gly Lys Ala Val Thr
290 295 300

Pro Pro Met Pro Leu Leu Thr Pro Ala Thr Pro Gly Gly Leu Pro Pro
305 310 315 320

Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Lys Ile Thr Ala Gln
325 330 335

Glu Ala Val Ala Gly Ala Ala Val Leu Gly Thr Leu Gly Thr Pro Gly
340 345 350

Leu Val Ser Pro Ala Leu Thr Leu Ala Gln Pro Leu Gly Thr Leu Pro
355 360 365

Gln Ala Val Met Ala Ala Gln Ala Pro Gly Val Ile Thr Gly Val Thr
370 375 380

Pro Ala Arg Pro Pro Ile Pro Val Thr Ile Pro Ser Val Gly Val Val
385 390 395 400

Asn Pro Ile Leu Ala Ser Pro Pro Thr Leu Gly Leu Leu Glu Pro Lys
405 410 415

Lys Glu Lys Glu Glu Glu Glu Leu Phe Pro Glu Ser Glu Arg Pro Glu
420 425 430

Met Leu Ser Glu Gln Glu His Met Ser Ile Ser Gly Ser Ser Ala Arg
435 440 445

His Met Val Met Gln Lys Leu Leu Arg Lys Gln Glu Ser Thr Val Met
450 455 460

Val Leu Arg Asn Met Val Asp Pro Lys Asp Ile Asp Asp Asp Leu Glu
465 470 475 480

Gly Glu Val Thr Glu Glu Cys Gly Lys Phe Gly Ala Val Asn Arg Val
485 490 495

Ile Ile Tyr Gln Glu Lys Gln Gly Glu Glu Glu Asp Ala Glu Ile Ile
500 505 510

Val Lys Ile Phe Val Glu Phe Ser Ile Ala Ser Glu Thr His Lys Ala
515 520 525

Ile Gln Ala Leu Asn Gly Arg Trp Phe Ala Gly Arg Lys Val Val Ala
530 535 540

Glu Val Tyr Asp Gln Glu Arg Phe Asp Asn Ser Asp Leu Ser Ala
545 550 555

<210> 13
<211> 1712
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1551)

<400> 13

```
atg gag aac ggg cag agc aca gcc gcc aag ctg ggg ctg cct ccc ctg      48
Met Glu Asn Gly Gln Ser Thr Ala Ala Lys Leu Gly Leu Pro Pro Leu
1               5                  10                  15

acg ccc gag cag cag gag gcc ctt cag aag gcc aag aag tac gcc atg      96
Thr Pro Glu Gln Gln Glu Ala Leu Gln Lys Ala Lys Lys Tyr Ala Met
            20                  25                  30

gag cag agc atc aag agt gtg ctg gtg aag cag acc atc gcg cac cag     144
Glu Gln Ser Ile Lys Ser Val Leu Val Lys Gln Thr Ile Ala His Gln
        35                  40                  45

cag cag cag ctc acc aac ctg cag atg gca gca gtg aca atg ggc ttt     192
Gln Gln Gln Leu Thr Asn Leu Gln Met Ala Ala Val Thr Met Gly Phe
    50                  55                  60

gga gat cct ctc tca cct ttg caa tcg atg gcg gct cag cgg cag cgg     240
Gly Asp Pro Leu Ser Pro Leu Gln Ser Met Ala Ala Gln Arg Gln Arg
65                  70                  75                  80

gcg ctg gcc atc atg tgc cgc gtc tac gtg ggc tct atc tac tat gag     288
Ala Leu Ala Ile Met Cys Arg Val Tyr Val Gly Ser Ile Tyr Tyr Glu
                85                  90                  95
```

```
ctg ggg gag gac acc atc cgc cag gcc ttt gcc ccc ttt ggc ccc atc      336
Leu Gly Glu Asp Thr Ile Arg Gln Ala Phe Ala Pro Phe Gly Pro Ile
            100                 105                 110

aag agc atc gac atg tcc tgg gac tcc gtc acc atg aag cac aag ggc      384
Lys Ser Ile Asp Met Ser Trp Asp Ser Val Thr Met Lys His Lys Gly
        115                 120                 125

ttt gcc ttc gtg gag tat gag gtc ccc gaa gct gca cag ctg gcc ttg      432
Phe Ala Phe Val Glu Tyr Glu Val Pro Glu Ala Ala Gln Leu Ala Leu
    130                 135                 140

gag cag atg aac tcg gtg atg ctg ggg ggc agg aac atc aag gtg ggc      480
Glu Gln Met Asn Ser Val Met Leu Gly Gly Arg Asn Ile Lys Val Gly
145                 150                 155                 160

aga ccc agc aac ata ggg cag gcc cag ccc atc ata gac cag ttg gct      528
Arg Pro Ser Asn Ile Gly Gln Ala Gln Pro Ile Ile Asp Gln Leu Ala
                165                 170                 175

gag gag gca cgg gcc ttc aac cgc atc tac gtg gcc tct gtg cac cag      576
Glu Glu Ala Arg Ala Phe Asn Arg Ile Tyr Val Ala Ser Val His Gln
            180                 185                 190

gac ctc tca gac gat gac atc aag agc gtg ttt gag gcc ttt ggc aag      624
Asp Leu Ser Asp Asp Asp Ile Lys Ser Val Phe Glu Ala Phe Gly Lys
        195                 200                 205

atc aag tcc tgc aca ctg gcc cgg gac ccc aca act ggc aag cac aag      672
Ile Lys Ser Cys Thr Leu Ala Arg Asp Pro Thr Thr Gly Lys His Lys
    210                 215                 220

ggc tac ggc ttc att gag tac gag aag gcc cag tcg tcc caa gat gct      720
Gly Tyr Gly Phe Ile Glu Tyr Glu Lys Ala Gln Ser Ser Gln Asp Ala
225                 230                 235                 240
```

gtg tct tcc atg aac ctc ttt gac ctg ggt ggc cag tac ttg cgg gtg 768
Val Ser Ser Met Asn Leu Phe Asp Leu Gly Gly Gln Tyr Leu Arg Val
245 250 255

ggc aag gct gtc aca ccg ccc atg ccc cta ctc aca cca gcc acg cct 816
Gly Lys Ala Val Thr Pro Pro Met Pro Leu Leu Thr Pro Ala Thr Pro
260 265 270

gga ggc ctc cca cct gcc gct gct gtg gca gct gct gca gcc act gcc 864
Gly Gly Leu Pro Pro Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala
275 280 285

aag atc aca gct cag gaa gca gtg gcc gga gca gcg gtg ctg ggt acc 912
Lys Ile Thr Ala Gln Glu Ala Val Ala Gly Ala Ala Val Leu Gly Thr
290 295 300

ctg ggc aca cct gga ctg gtg tcc cca gca ctg acc ctg gcc cag ccc 960
Leu Gly Thr Pro Gly Leu Val Ser Pro Ala Leu Thr Leu Ala Gln Pro
305 310 315 320

ctg ggc act ttg ccc cag gct gtc atg gct gcc cag gca cct gga gtc 1008
Leu Gly Thr Leu Pro Gln Ala Val Met Ala Ala Gln Ala Pro Gly Val
325 330 335

atc aca ggt gtg acc cca gcc cgt cct cct atc ccg gtc acc atc ccc 1056
Ile Thr Gly Val Thr Pro Ala Arg Pro Pro Ile Pro Val Thr Ile Pro
340 345 350

tcg gtg gga gtg gtg aac ccc atc ctg gcc agc cct cca acg ctg ggt 1104
Ser Val Gly Val Val Asn Pro Ile Leu Ala Ser Pro Pro Thr Leu Gly
355 360 365

ctc ctg gag ccc aag aag gag aag gaa gaa gag gag ctg ttt ccc gag 1152
Leu Leu Glu Pro Lys Lys Glu Lys Glu Glu Glu Glu Leu Phe Pro Glu

370 375 380

tca gag cgg cca gag atg ctg agc gag cag gag cac atg agc atc tcg 1200
Ser Glu Arg Pro Glu Met Leu Ser Glu Gln Glu His Met Ser Ile Ser
385 390 395 400

ggc agt agc gcc cga cac atg gtg atg cag aag ctg ctc cgc aag cag 1248
Gly Ser Ser Ala Arg His Met Val Met Gln Lys Leu Leu Arg Lys Gln
405 410 415

gag tct aca gtg atg gtt ctg cgc aac atg gtg gac ccc aag gac atc 1296
Glu Ser Thr Val Met Val Leu Arg Asn Met Val Asp Pro Lys Asp Ile
420 425 430

gat gat gac ctg gaa ggg gag gtg aca gag gag tgt ggc aag ttc ggg 1344
Asp Asp Asp Leu Glu Gly Glu Val Thr Glu Glu Cys Gly Lys Phe Gly
435 440 445

gcc gtg aac cgc gtc atc atc tac caa gag aaa caa ggc gag gag gag 1392
Ala Val Asn Arg Val Ile Ile Tyr Gln Glu Lys Gln Gly Glu Glu Glu
450 455 460

gat gca gaa atc att gtc aag atc ttt gtg gag ttt tcc ata gcc tct 1440
Asp Ala Glu Ile Ile Val Lys Ile Phe Val Glu Phe Ser Ile Ala Ser
465 470 475 480

gag act cat aag gcc atc cag gcc ctc aat ggc cgc tgg ttt gct ggc 1488
Glu Thr His Lys Ala Ile Gln Ala Leu Asn Gly Arg Trp Phe Ala Gly
485 490 495

cgc aag gtg gtg gct gaa gtg tac gac cag gag cgt ttt gat aac agt 1536
Arg Lys Val Val Ala Glu Val Tyr Asp Gln Glu Arg Phe Asp Asn Ser
500 505 510

gac ctc tct gcg tga cagtggtccc tctccccgga cttgcacttg ttccttgttt 1591

Asp Leu Ser Ala
515

cctctgggtt ttatagtgat acagtggtgt ccccggggcc aggcgcgctc tgcccagccc 1651

agcctacagt gcggataaag gtgcggatgc tgctggccct gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1711

a 1712

<210> 14
<211> 516
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Glu Asn Gly Gln Ser Thr Ala Ala Lys Leu Gly Leu Pro Pro Leu
1 5 10 15

Thr Pro Glu Gln Gln Glu Ala Leu Gln Lys Ala Lys Lys Tyr Ala Met
20 25 30

Glu Gln Ser Ile Lys Ser Val Leu Val Lys Gln Thr Ile Ala His Gln
35 40 45

Gln Gln Gln Leu Thr Asn Leu Gln Met Ala Ala Val Thr Met Gly Phe
50 55 60

Gly Asp Pro Leu Ser Pro Leu Gln Ser Met Ala Ala Gln Arg Gln Arg
65 70 75 80

Ala Leu Ala Ile Met Cys Arg Val Tyr Val Gly Ser Ile Tyr Tyr Glu
85 90 95

Leu Gly Glu Asp Thr Ile Arg Gln Ala Phe Ala Pro Phe Gly Pro Ile
100 105 110

Lys Ser Ile Asp Met Ser Trp Asp Ser Val Thr Met Lys His Lys Gly
115 120 125

Phe Ala Phe Val Glu Tyr Glu Val Pro Glu Ala Ala Gln Leu Ala Leu
130 135 140

Glu Gln Met Asn Ser Val Met Leu Gly Gly Arg Asn Ile Lys Val Gly
145 150 155 160

Arg Pro Ser Asn Ile Gly Gln Ala Gln Pro Ile Ile Asp Gln Leu Ala
165 170 175

Glu Glu Ala Arg Ala Phe Asn Arg Ile Tyr Val Ala Ser Val His Gln
180 185 190

Asp Leu Ser Asp Asp Asp Ile Lys Ser Val Phe Glu Ala Phe Gly Lys
195 200 205

Ile Lys Ser Cys Thr Leu Ala Arg Asp Pro Thr Thr Gly Lys His Lys
210 215 220

Gly Tyr Gly Phe Ile Glu Tyr Glu Lys Ala Gln Ser Ser Gln Asp Ala
225 230 235 240

Val Ser Ser Met Asn Leu Phe Asp Leu Gly Gly Gln Tyr Leu Arg Val
245 250 255

Gly Lys Ala Val Thr Pro Pro Met Pro Leu Leu Thr Pro Ala Thr Pro
260 265 270

Gly Gly Leu Pro Pro Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala
275 280 285

Lys Ile Thr Ala Gln Glu Ala Val Ala Gly Ala Ala Val Leu Gly Thr
290 295 300

Leu Gly Thr Pro Gly Leu Val Ser Pro Ala Leu Thr Leu Ala Gln Pro
305 310 315 320

Leu Gly Thr Leu Pro Gln Ala Val Met Ala Ala Gln Ala Pro Gly Val
325 330 335

Ile Thr Gly Val Thr Pro Ala Arg Pro Pro Ile Pro Val Thr Ile Pro
340 345 350

Ser Val Gly Val Val Asn Pro Ile Leu Ala Ser Pro Pro Thr Leu Gly
355 360 365

Leu Leu Glu Pro Lys Lys Glu Lys Glu Glu Glu Glu Leu Phe Pro Glu
370 375 380

Ser Glu Arg Pro Glu Met Leu Ser Glu Gln Glu His Met Ser Ile Ser
385 390 395 400

Gly Ser Ser Ala Arg His Met Val Met Gln Lys Leu Leu Arg Lys Gln
405 410 415

Glu Ser Thr Val Met Val Leu Arg Asn Met Val Asp Pro Lys Asp Ile
420 425 430

Asp Asp Asp Leu Glu Gly Glu Val Thr Glu Glu Cys Gly Lys Phe Gly
435 440 445

Ala Val Asn Arg Val Ile Ile Tyr Gln Glu Lys Gln Gly Glu Glu Glu
450 455 460

Asp Ala Glu Ile Ile Val Lys Ile Phe Val Glu Phe Ser Ile Ala Ser
465 470 475 480

Glu Thr His Lys Ala Ile Gln Ala Leu Asn Gly Arg Trp Phe Ala Gly
485 490 495

Arg Lys Val Val Ala Glu Val Tyr Asp Gln Glu Arg Phe Asp Asn Ser
500 505 510

Asp Leu Ser Ala
515

<210> 15
<211> 1660
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1500)

<400> 15

```
atg gag aac ggg cag agc aca gcc gcc aag ctg ggg ctg cct ccc ctg       48
Met Glu Asn Gly Gln Ser Thr Ala Ala Lys Leu Gly Leu Pro Pro Leu
1               5                  10                  15

acg ccc gag cag cag gag gcc ctt cag aag gcc aag aag tac gcc atg       96
Thr Pro Glu Gln Gln Glu Ala Leu Gln Lys Ala Lys Lys Tyr Ala Met
            20                  25                  30

gag cag agc atc aag agt gtg ctg gtg aag cag acc atc gcg cac cag      144
Glu Gln Ser Ile Lys Ser Val Leu Val Lys Gln Thr Ile Ala His Gln
        35                  40                  45

cag cag cag ctc acc aac ctg cag atg gcg gct cag cgg cag cgg gcg      192
Gln Gln Gln Leu Thr Asn Leu Gln Met Ala Ala Gln Arg Gln Arg Ala
    50                  55                  60

ctg gcc atc atg tgc cgc gtc tac gtg ggc tct atc tac tat gag ctg      240
Leu Ala Ile Met Cys Arg Val Tyr Val Gly Ser Ile Tyr Tyr Glu Leu
65                  70                  75                  80

ggg gag gac acc atc cgc cag gcc ttt gcc ccc ttt ggc ccc atc aag      288
Gly Glu Asp Thr Ile Arg Gln Ala Phe Ala Pro Phe Gly Pro Ile Lys
```

85 90 95

agc atc gac atg tcc tgg gac tcc gtc acc atg aag cac aag ggc ttt 336
Ser Ile Asp Met Ser Trp Asp Ser Val Thr Met Lys His Lys Gly Phe
100 105 110

gcc ttc gtg gag tat gag gtc ccc gaa gct gca cag ctg gcc ttg gag 384
Ala Phe Val Glu Tyr Glu Val Pro Glu Ala Ala Gln Leu Ala Leu Glu
115 120 125

cag atg aac tcg gtg atg ctg ggg ggc agg aac atc aag gtg ggc aga 432
Gln Met Asn Ser Val Met Leu Gly Gly Arg Asn Ile Lys Val Gly Arg
130 135 140

ccc agc aac ata ggg cag gcc cag ccc atc ata gac cag ttg gct gag 480
Pro Ser Asn Ile Gly Gln Ala Gln Pro Ile Ile Asp Gln Leu Ala Glu
145 150 155 160

gag gca cgg gcc ttc aac cgc atc tac gtg gcc tct gtg cac cag gac 528
Glu Ala Arg Ala Phe Asn Arg Ile Tyr Val Ala Ser Val His Gln Asp
165 170 175

ctc tca gac gat gac atc aag agc gtg ttt gag gcc ttt ggc aag atc 576
Leu Ser Asp Asp Asp Ile Lys Ser Val Phe Glu Ala Phe Gly Lys Ile
180 185 190

aag tcc tgc aca ctg gcc cgg gac ccc aca act ggc aag cac aag ggc 624
Lys Ser Cys Thr Leu Ala Arg Asp Pro Thr Thr Gly Lys His Lys Gly
195 200 205

tac ggc ttc att gag tac gag aag gcc cag tcg tcc caa gat gct gtg 672
Tyr Gly Phe Ile Glu Tyr Glu Lys Ala Gln Ser Ser Gln Asp Ala Val
210 215 220

tct tcc atg aac ctc ttt gac ctg ggt ggc cag tac ttg cgg gtg ggc 720
Ser Ser Met Asn Leu Phe Asp Leu Gly Gly Gln Tyr Leu Arg Val Gly

225 230 235 240

aag gct gtc aca ccg ccc atg ccc cta ctc aca cca gcc acg cct gga 768
Lys Ala Val Thr Pro Pro Met Pro Leu Leu Thr Pro Ala Thr Pro Gly
245 250 255

ggc ctc cca cct gcc gct gct gtg gca gct gct gca gcc act gcc aag 816
Gly Leu Pro Pro Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Lys
260 265 270

atc aca gct cag gaa gca gtg gcc gga gca gcg gtg ctg ggt acc ctg 864
Ile Thr Ala Gln Glu Ala Val Ala Gly Ala Ala Val Leu Gly Thr Leu
275 280 285

ggc aca cct gga ctg gtg tcc cca gca ctg acc ctg gcc cag ccc ctg 912
Gly Thr Pro Gly Leu Val Ser Pro Ala Leu Thr Leu Ala Gln Pro Leu
290 295 300

ggc act ttg ccc cag gct gtc atg gct gcc cag gca cct gga gtc atc 960
Gly Thr Leu Pro Gln Ala Val Met Ala Ala Gln Ala Pro Gly Val Ile
305 310 315 320

aca ggt gtg acc cca gcc cgt cct cct atc ccg gtc acc atc ccc tcg 1008
Thr Gly Val Thr Pro Ala Arg Pro Pro Ile Pro Val Thr Ile Pro Ser
325 330 335

gtg gga gtg gtg aac ccc atc ctg gcc agc cct cca acg ctg ggt ctc 1056
Val Gly Val Val Asn Pro Ile Leu Ala Ser Pro Pro Thr Leu Gly Leu
340 345 350

ctg gag ccc aag aag gag aag gaa gaa gag gag ctg ttt ccc gag tca 1104
Leu Glu Pro Lys Lys Glu Lys Glu Glu Glu Glu Leu Phe Pro Glu Ser
355 360 365

gag cgg cca gag atg ctg agc gag cag gag cac atg agc atc tcg ggc 1152
Glu Arg Pro Glu Met Leu Ser Glu Gln Glu His Met Ser Ile Ser Gly

370 375 380

agt agc gcc cga cac atg gtg atg cag aag ctg ctc cgc aag cag gag 1200
Ser Ser Ala Arg His Met Val Met Gln Lys Leu Leu Arg Lys Gln Glu
385 390 395 400

tct aca gtg atg gtt ctg cgc aac atg gtg gac ccc aag gac atc gat 1248
Ser Thr Val Met Val Leu Arg Asn Met Val Asp Pro Lys Asp Ile Asp
405 410 415

gat gac ctg gaa ggg gag gtg aca gag gag tgt ggc aag ttc ggg gcc 1296
Asp Asp Leu Glu Gly Glu Val Thr Glu Glu Cys Gly Lys Phe Gly Ala
420 425 430

gtg aac cgc gtc atc atc tac caa gag aaa caa ggc gag gag gag gat 1344
Val Asn Arg Val Ile Ile Tyr Gln Glu Lys Gln Gly Glu Glu Glu Asp
435 440 445

gca gaa atc att gtc aag atc ttt gtg gag ttt tcc ata gcc tct gag 1392
Ala Glu Ile Ile Val Lys Ile Phe Val Glu Phe Ser Ile Ala Ser Glu
450 455 460

act cat aag gcc atc cag gcc ctc aat ggc cgc tgg ttt gct ggc cgc 1440
Thr His Lys Ala Ile Gln Ala Leu Asn Gly Arg Trp Phe Ala Gly Arg
465 470 475 480

aag gtg gtg gct gaa gtg tac gac cag gag cgt ttt gat aac agt gac 1488
Lys Val Val Ala Glu Val Tyr Asp Gln Glu Arg Phe Asp Asn Ser Asp
485 490 495

ctc tct gcg tga cagtggtccc tctccccgga cttgcacttg ttcctigttt 1540
Leu Ser Ala

cctctgggtt ttatagtgat acagtggtgt ccccggggcc aggcgcgctc tgcccagccc 1600

agcctacagt gcggataaag gtgcggatgc tgctggccct gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1660

<210> 16
<211> 499
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Glu Asn Gly Gln Ser Thr Ala Ala Lys Leu Gly Leu Pro Pro Leu
1 5 10 15

Thr Pro Glu Gln Gln Glu Ala Leu Gln Lys Ala Lys Lys Tyr Ala Met
20 25 30

Glu Gln Ser Ile Lys Ser Val Leu Val Lys Gln Thr Ile Ala His Gln
35 40 45

Gln Gln Gln Leu Thr Asn Leu Gln Met Ala Ala Gln Arg Gln Arg Ala
50 55 60

Leu Ala Ile Met Cys Arg Val Tyr Val Gly Ser Ile Tyr Tyr Glu Leu
65 70 75 80

Gly Glu Asp Thr Ile Arg Gln Ala Phe Ala Pro Phe Gly Pro Ile Lys
85 90 95

Ser Ile Asp Met Ser Trp Asp Ser Val Thr Met Lys His Lys Gly Phe
100 105 110

Ala Phe Val Glu Tyr Glu Val Pro Glu Ala Ala Gln Leu Ala Leu Glu
115 120 125

Gln Met Asn Ser Val Met Leu Gly Gly Arg Asn Ile Lys Val Gly Arg
130 135 140

Pro Ser Asn Ile Gly Gln Ala Gln Pro Ile Ile Asp Gln Leu Ala Glu
145 150 155 160

Glu Ala Arg Ala Phe Asn Arg Ile Tyr Val Ala Ser Val His Gln Asp
165 170 175

Leu Ser Asp Asp Asp Ile Lys Ser Val Phe Glu Ala Phe Gly Lys Ile
180 185 190

Lys Ser Cys Thr Leu Ala Arg Asp Pro Thr Thr Gly Lys His Lys Gly
195 200 205

Tyr Gly Phe Ile Glu Tyr Glu Lys Ala Gln Ser Ser Gln Asp Ala Val
210 215 220

Ser Ser Met Asn Leu Phe Asp Leu Gly Gly Gln Tyr Leu Arg Val Gly
225 230 235 240

Lys Ala Val Thr Pro Pro Met Pro Leu Leu Thr Pro Ala Thr Pro Gly
245 250 255

Gly Leu Pro Pro Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Lys
260 265 270

Ile Thr Ala Gln Glu Ala Val Ala Gly Ala Ala Val Leu Gly Thr Leu
275 280 285

Gly Thr Pro Gly Leu Val Ser Pro Ala Leu Thr Leu Ala Gln Pro Leu
290 295 300

Gly Thr Leu Pro Gln Ala Val Met Ala Ala Gln Ala Pro Gly Val Ile
305 310 315 320

Thr Gly Val Thr Pro Ala Arg Pro Pro Ile Pro Val Thr Ile Pro Ser
325 330 335

Val Gly Val Val Asn Pro Ile Leu Ala Ser Pro Pro Thr Leu Gly Leu
340 345 350

Leu Glu Pro Lys Lys Glu Lys Glu Glu Glu Glu Leu Phe Pro Glu Ser
355 360 365

Glu Arg Pro Glu Met Leu Ser Glu Gln Glu His Met Ser Ile Ser Gly
370 375 380

Ser Ser Ala Arg His Met Val Met Gln Lys Leu Leu Arg Lys Gln Glu
385 390 395 400

Ser Thr Val Met Val Leu Arg Asn Met Val Asp Pro Lys Asp Ile Asp
405 410 415

Asp Asp Leu Glu Gly Glu Val Thr Glu Glu Cys Gly Lys Phe Gly Ala
420 425 430

Val Asn Arg Val Ile Ile Tyr Gln Glu Lys Gln Gly Glu Glu Glu Asp
435 440 445

Ala Glu Ile Ile Val Lys Ile Phe Val Glu Phe Ser Ile Ala Ser Glu
450 455 460

Thr His Lys Ala Ile Gln Ala Leu Asn Gly Arg Trp Phe Ala Gly Arg
465 470 475 480

Lys Val Val Ala Glu Val Tyr Asp Gln Glu Arg Phe Asp Asn Ser Asp
485 490 495

Leu Ser Ala

<210> 17
<211> 1853
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS

<222> (65)..(1693)

<400> 17

atcgcgcgag acagcggaag gagcaagagt gggaggcgcg cgcggaggcc gcgacggacg 60

caag atg gcg acg gcg acc ata gct ctc cag gtc aat ggc cag caa gga 109
Met Ala Thr Ala Thr Ile Ala Leu Gln Val Asn Gly Gln Gln Gly
1 5 10 15

ggg ggg tcc gag ccg gcg gcg gcg gcg gca gtg gtg gca gcg gga gac 157
Gly Gly Ser Glu Pro Ala Ala Ala Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Asp
20 25 30

aaa tgg aaa cct cca cag ggc aca gac tcc atc aag atg gag aac ggg 205
Lys Trp Lys Pro Pro Gln Gly Thr Asp Ser Ile Lys Met Glu Asn Gly
35 40 45

cag agc aca gcc gcc aag ctt ggg ctg cct ccc ctg acg ccc gag cag 253
Gln Ser Thr Ala Ala Lys Leu Gly Leu Pro Pro Leu Thr Pro Glu Gln
50 55 60

cag gag gcc ctc cag aag gcc aag aag tac gcc atg gag cag agc atc 301
Gln Glu Ala Leu Gln Lys Ala Lys Lys Tyr Ala Met Glu Gln Ser Ile
65 70 75

aag agt gta ctg gtg aag cag acc atc gcg cgc cag cag cag cag ctc 349
Lys Ser Val Leu Val Lys Gln Thr Ile Ala Arg Gln Gln Gln Gln Leu
80 85 90 95

acc aac ctg cag atg gcg gct cag cgg cag cgg gcg ctg gcc atc atg 397
Thr Asn Leu Gln Met Ala Ala Gln Arg Gln Arg Ala Leu Ala Ile Met
100 105 110

tgc cgc gtc tac gtg ggc tct atc tac tat gag ctg ggg gag gac acc 445
Cys Arg Val Tyr Val Gly Ser Ile Tyr Tyr Glu Leu Gly Glu Asp Thr
115 120 125

atc cgc cag gcc ttt gcc ccc ttt ggc ccc atc aag agc atc gac atg 493
Ile Arg Gln Ala Phe Ala Pro Phe Gly Pro Ile Lys Ser Ile Asp Met
130 135 140

tcc tgg gac tcc gtc acc atg aag cac aag ggc ttt gcc ttc gtg gag 541
Ser Trp Asp Ser Val Thr Met Lys His Lys Gly Phe Ala Phe Val Glu
145 150 155

tat gag gtc ccc gaa gct gca cag ctg gcc ttg gag cag atg aac tcg 589
Tyr Glu Val Pro Glu Ala Ala Gln Leu Ala Leu Glu Gln Met Asn Ser
160 165 170 175

gtg atg ctg ggg ggc agg aac atc aag gtg ggc aga ccc agc aac ata 637
Val Met Leu Gly Gly Arg Asn Ile Lys Val Gly Arg Pro Ser Asn Ile
180 185 190

ggg cag gcc cag ccc atc ata gac cag ttg gct gag gag gca cgg gcc 685
Gly Gln Ala Gln Pro Ile Ile Asp Gln Leu Ala Glu Glu Ala Arg Ala
195 200 205

ttc aac cgc atc tac gtg gcc tct gtg cac cag gac ctc tca gac gat 733
Phe Asn Arg Ile Tyr Val Ala Ser Val His Gln Asp Leu Ser Asp Asp
210 215 220

gac atc aag agc gtg ttt gag gcc ttt ggc aag atc aag tcc tgc aca 781
Asp Ile Lys Ser Val Phe Glu Ala Phe Gly Lys Ile Lys Ser Cys Thr
225 230 235

ctg gcc cgg gac ccc aca act ggc aag cac aag ggc tac ggc ttc att 829
Leu Ala Arg Asp Pro Thr Thr Gly Lys His Lys Gly Tyr Gly Phe Ile
240 245 250 255

gag tac gag aag gcc cag tcg tcc caa gat gct gtg tct tcc atg aac 877
Glu Tyr Glu Lys Ala Gln Ser Ser Gln Asp Ala Val Ser Ser Met Asn
260 265 270

```
ctc ttt gac ctg ggt ggc cag tac ttg cgg gtg ggc aag gct gtc aca   925
Leu Phe Asp Leu Gly Gly Gln Tyr Leu Arg Val Gly Lys Ala Val Thr
            275                 280                 285

ccg ccc atg ccc cta ctc aca cca gcc acg cct gga ggc ctc cca cct   973
Pro Pro Met Pro Leu Leu Thr Pro Ala Thr Pro Gly Gly Leu Pro Pro
        290                 295                 300

gcc gct gct gtg gca gct gct gca gcc act gcc aag atc aca gct cag   1021
Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Lys Ile Thr Ala Gln
    305                 310                 315

gaa gca gtg gcc gga gca gcg gtg ctg ggt acc ctg ggc aca cct gga   1069
Glu Ala Val Ala Gly Ala Ala Val Leu Gly Thr Leu Gly Thr Pro Gly
320                 325                 330                 335

ctg gtg tcc cca gca ctg acc ctg gcc cag ccc ctg ggc act ttg ccc   1117
Leu Val Ser Pro Ala Leu Thr Leu Ala Gln Pro Leu Gly Thr Leu Pro
                340                 345                 350

cag gct gtc atg gct gcc cag gca cct gga gtc atc aca ggt gtg acc   1165
Gln Ala Val Met Ala Ala Gln Ala Pro Gly Val Ile Thr Gly Val Thr
            355                 360                 365

cca gcc cgt cct cct atc ccg gtc acc atc ccc tcg gtg gga gtg gtg   1213
Pro Ala Arg Pro Pro Ile Pro Val Thr Ile Pro Ser Val Gly Val Val
        370                 375                 380

aac ccc atc ctg gcc agc cct cca acg ctg ggt ctc ctg gag ccc aag   1261
Asn Pro Ile Leu Ala Ser Pro Pro Thr Leu Gly Leu Leu Glu Pro Lys
    385                 390                 395

aag gag aag gaa gaa gag gag ctg ttt ccc gag tca gag cgg cca gag   1309
Lys Glu Lys Glu Glu Glu Glu Leu Phe Pro Glu Ser Glu Arg Pro Glu
400                 405                 410                 415
```

```
atg ctg agc gag cag gag cac atg agc atc tcg ggc agt agc gcc cga   1357
Met Leu Ser Glu Gln Glu His Met Ser Ile Ser Gly Ser Ser Ala Arg
                420                 425                 430

cac atg gtg atg cag aag ctg ctc cgc aag cag gag tct aca gtg atg   1405
His Met Val Met Gln Lys Leu Leu Arg Lys Gln Glu Ser Thr Val Met
            435                 440                 445

gtt ctg cgc aac atg gtg gac ccc aag gac atc gat gat gac ctg gaa   1453
Val Leu Arg Asn Met Val Asp Pro Lys Asp Ile Asp Asp Asp Leu Glu
        450                 455                 460

ggg gag gtg aca gag gag tgt ggc aag ttc ggg gcc gtg aac cgc gtc   1501
Gly Glu Val Thr Glu Glu Cys Gly Lys Phe Gly Ala Val Asn Arg Val
    465                 470                 475

atc atc tac caa gag aaa caa ggc gag gag gag gat gca gaa atc att   1549
Ile Ile Tyr Gln Glu Lys Gln Gly Glu Glu Glu Asp Ala Glu Ile Ile
480                 485                 490                 495

gtc aag atc ttt gtg gag ttt tcc ata gcc tct gag act cat aag gcc   1597
Val Lys Ile Phe Val Glu Phe Ser Ile Ala Ser Glu Thr His Lys Ala
                500                 505                 510

atc cag gcc ctc aat ggc cgc tgg ttt gct ggc cgc aag gtg gtg gct   1645
Ile Gln Ala Leu Asn Gly Arg Trp Phe Ala Gly Arg Lys Val Val Ala
            515                 520                 525

gaa gtg tac gac cag gag cgt ttt gat aac agt gac ctc tct gcg tga   1693
Glu Val Tyr Asp Gln Glu Arg Phe Asp Asn Ser Asp Leu Ser Ala
        530                 535                 540

cagtggtccc tctccccgga cttgcacttg ttccttgttt cctctgggtt ttatagtgat 1753

acagtggtgt ccccggggcc aggcgcgctc tgcccagccc agcctacagt gcggataaag 1813
```

gtgcggatgc tgctggccct gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1853

<210> 18
<211> 542
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

```
Met Ala Thr Ala Thr Ile Ala Leu Gln Val Asn Gly Gln Gln Gly Gly
  1               5                  10                  15
Gly Ser Glu Pro Ala Ala Ala Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Asp Lys
             20                  25                  30
Trp Lys Pro Pro Gln Gly Thr Asp Ser Ile Lys Met Glu Asn Gly Gln
         35                  40                  45
Ser Thr Ala Ala Lys Leu Gly Leu Pro Pro Leu Thr Pro Glu Gln Gln
     50                  55                  60
Glu Ala Leu Gln Lys Ala Lys Lys Tyr Ala Met Glu Gln Ser Ile Lys
 65                  70                  75                  80
Ser Val Leu Val Lys Gln Thr Ile Ala Arg Gln Gln Gln Gln Leu Thr
                 85                  90                  95
Asn Leu Gln Met Ala Ala Gln Arg Gln Arg Ala Leu Ala Ile Met Cys
            100                 105                 110
Arg Val Tyr Val Gly Ser Ile Tyr Tyr Glu Leu Gly Glu Asp Thr Ile
        115                 120                 125
Arg Gln Ala Phe Ala Pro Phe Gly Pro Ile Lys Ser Ile Asp Met Ser
    130                 135                 140
Trp Asp Ser Val Thr Met Lys His Lys Gly Phe Ala Phe Val Glu Tyr
145                 150                 155                 160
Glu Val Pro Glu Ala Ala Gln Leu Ala Leu Glu Gln Met Asn Ser Val
                165                 170                 175
Met Leu Gly Gly Arg Asn Ile Lys Val Gly Arg Pro Ser Asn Ile Gly
            180                 185                 190
Gln Ala Gln Pro Ile Ile Asp Gln Leu Ala Glu Glu Ala Arg Ala Phe
        195                 200                 205
```

Asn Arg Ile Tyr Val Ala Ser Val His Gln Asp Leu Ser Asp Asp Asp
210 215 220
Ile Lys Ser Val Phe Glu Ala Phe Gly Lys Ile Lys Ser Cys Thr Leu
225 230 235 240
Ala Arg Asp Pro Thr Thr Gly Lys His Lys Gly Tyr Gly Phe Ile Glu
245 250 255
Tyr Glu Lys Ala Gln Ser Ser Gln Asp Ala Val Ser Ser Met Asn Leu
260 265 270
Phe Asp Leu Gly Gly Gln Tyr Leu Arg Val Gly Lys Ala Val Thr Pro
275 280 285
Pro Met Pro Leu Leu Thr Pro Ala Thr Pro Gly Gly Leu Pro Pro Ala
290 295 300
Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Lys Ile Thr Ala Gln Glu
305 310 315 320
Ala Val Ala Gly Ala Ala Val Leu Gly Thr Leu Gly Thr Pro Gly Leu
325 330 335
Val Ser Pro Ala Leu Thr Leu Ala Gln Pro Leu Gly Thr Leu Pro Gln
340 345 350
Ala Val Met Ala Ala Gln Ala Pro Gly Val Ile Thr Gly Val Thr Pro
355 360 365
Ala Arg Pro Pro Ile Pro Val Thr Ile Pro Ser Val Gly Val Val Asn
370 375 380
Pro Ile Leu Ala Ser Pro Pro Thr Leu Gly Leu Leu Glu Pro Lys Lys
385 390 395 400
Glu Lys Glu Glu Glu Glu Leu Phe Pro Glu Ser Glu Arg Pro Glu Met
405 410 415
Leu Ser Glu Gln Glu His Met Ser Ile Ser Gly Ser Ser Ala Arg His
420 425 430
Met Val Met Gln Lys Leu Leu Arg Lys Gln Glu Ser Thr Val Met Val
435 440 445
Leu Arg Asn Met Val Asp Pro Lys Asp Ile Asp Asp Asp Leu Glu Gly
450 455 460
Glu Val Thr Glu Glu Cys Gly Lys Phe Gly Ala Val Asn Arg Val Ile
465 470 475 480
Ile Tyr Gln Glu Lys Gln Gly Glu Glu Glu Asp Ala Glu Ile Ile Val
485 490 495

Lys Ile Phe Val Glu Phe Ser Ile Ala Ser Glu Thr His Lys Ala Ile
500 505 510
Gln Ala Leu Asn Gly Arg Trp Phe Ala Gly Arg Lys Val Val Ala Glu
515 520 525
Val Tyr Asp Gln Glu Arg Phe Asp Asn Ser Asp Leu Ser Ala
530 535 540

<210> 19
<211> 1853
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (65)..(1693)

<400> 19
atcgcgcgag acagcggaag gagcaagagt gggaggcgcg cgcggaggcc gcgacggacg 60

caag atg gcg acg gcg acc ata gct ctc cag gtc aat ggc cag caa gga 109
Met Ala Thr Ala Thr Ile Ala Leu Gln Val Asn Gly Gln Gln Gly
1 5 10 15

ggg ggg tcc gag ccg gcg gcg gcg gcg gca gtg gtg gca gcg gga gac 157
Gly Gly Ser Glu Pro Ala Ala Ala Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Asp
20 25 30

aaa tgg aaa cct cca cag ggc aca gac tcc atc aag atg gag aac ggg 205
Lys Trp Lys Pro Pro Gln Gly Thr Asp Ser Ile Lys Met Glu Asn Gly
35 40 45

cag agc aca gcc gcc aag ctg ggg ctg cct ccc ctg acg ccc gag cag 253
Gln Ser Thr Ala Ala Lys Leu Gly Leu Pro Pro Leu Thr Pro Glu Gln
50 55 60

cag gag gcc ctt cag aaa gcc aag aag tac gcc atg gag cag agc atc 301

```
Gln Glu Ala Leu Gln Lys Ala Lys Lys Tyr Ala Met Glu Gln Ser Ile
     65                  70                  75

aag agt gtg ctg gtg aag cag acc atc gcg cac cag cag cag cag ctc   349
Lys Ser Val Leu Val Lys Gln Thr Ile Ala His Gln Gln Gln Gln Leu
 80                  85                  90                  95

acc aac ctg cag atg gcg gct cag cgg cag cgg gcg ctg gcc atc atg   397
Thr Asn Leu Gln Met Ala Ala Gln Arg Gln Arg Ala Leu Ala Ile Met
                100                 105                 110

tgc cgc gtc tac gtg ggc tct atc tac tat gag ctg ggg gag gac acc   445
Cys Arg Val Tyr Val Gly Ser Ile Tyr Tyr Glu Leu Gly Glu Asp Thr
            115                 120                 125

atc cgc cag gcc ttt gcc ccc ttt ggc ccc atc aag agc atc gac atg   493
Ile Arg Gln Ala Phe Ala Pro Phe Gly Pro Ile Lys Ser Ile Asp Met
        130                 135                 140

tcc tgg gac tcc gtc acc atg aag cac aag ggc ttt gcc ttc gtg gag   541
Ser Trp Asp Ser Val Thr Met Lys His Lys Gly Phe Ala Phe Val Glu
    145                 150                 155

tat gag gtc ccc gaa gct gca cag ctg gcc ttg gag cag atg aac tcg   589
Tyr Glu Val Pro Glu Ala Ala Gln Leu Ala Leu Glu Gln Met Asn Ser
160                 165                 170                 175

gtg atg ctg ggg ggc agg aac atc aag gtg ggc aga ccc agc aac ata   637
Val Met Leu Gly Gly Arg Asn Ile Lys Val Gly Arg Pro Ser Asn Ile
                180                 185                 190

ggg cag gcc cag ccc atc ata gac cag ttg gct gag gag gca cgg gcc   685
Gly Gln Ala Gln Pro Ile Ile Asp Gln Leu Ala Glu Glu Ala Arg Ala
            195                 200                 205

ttc aac cgc atc tac gtg gcc tct gtg cac cag gac ctc tca gac gat   733
```

```
Phe Asn Arg Ile Tyr Val Ala Ser Val His Gln Asp Leu Ser Asp Asp
        210                 215                 220

gac atc aag agc gtg ttt gag gcc ttt ggc aag atc aag tcc tgc aca   781
Asp Ile Lys Ser Val Phe Glu Ala Phe Gly Lys Ile Lys Ser Cys Thr
    225                 230                 235

ctg gcc cgg gac ccc aca act ggc aag cac aag ggc tac ggc ttc att   829
Leu Ala Arg Asp Pro Thr Thr Gly Lys His Lys Gly Tyr Gly Phe Ile
240                 245                 250                 255

gag tac gag aag gcc cag tcg tcc caa gat gct gtg tct tcc atg aac   877
Glu Tyr Glu Lys Ala Gln Ser Ser Gln Asp Ala Val Ser Ser Met Asn
                260                 265                 270

ctc ttt gac ctg ggt ggc cag tac ttg cgg gtg ggc aag gct gtc aca   925
Leu Phe Asp Leu Gly Gly Gln Tyr Leu Arg Val Gly Lys Ala Val Thr
            275                 280                 285

ccg ccc atg ccc cta ctc aca cca gcc acg cct gga ggc ctc cca cct   973
Pro Pro Met Pro Leu Leu Thr Pro Ala Thr Pro Gly Gly Leu Pro Pro
        290                 295                 300

gcc gct gct gtg gca gct gct gca gcc act gcc aag atc aca gct cag   1021
Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Lys Ile Thr Ala Gln
    305                 310                 315

gaa gca gtg gcc gga gca gcg gtg ctg ggt acc ctg ggc aca cct gga   1069
Glu Ala Val Ala Gly Ala Ala Val Leu Gly Thr Leu Gly Thr Pro Gly
320                 325                 330                 335

ctg gtg tcc cca gca ctg acc ctg gcc cag ccc ctg ggc act ttg ccc   1117
Leu Val Ser Pro Ala Leu Thr Leu Ala Gln Pro Leu Gly Thr Leu Pro
                340                 345                 350

cag gct gtc atg gct gcc cag gca cct gga gtc atc aca ggt gtg acc   1165
```

```
Gln Ala Val Met Ala Ala Gln Ala Pro Gly Val Ile Thr Gly Val Thr
            355                 360                 365

cca gcc cgt cct cct atc ccg gtc acc atc ccc tcg gtg gga gtg gtg   1213
Pro Ala Arg Pro Pro Ile Pro Val Thr Ile Pro Ser Val Gly Val Val
        370                 375                 380

aac ccc atc ctg gcc agc cct cca acg ctg ggt ctc ctg gag ccc aag   1261
Asn Pro Ile Leu Ala Ser Pro Pro Thr Leu Gly Leu Leu Glu Pro Lys
    385                 390                 395

aag gag aag gaa gaa gag gag ctg ttt ccc gag tca gag cgg cca gag   1309
Lys Glu Lys Glu Glu Glu Glu Leu Phe Pro Glu Ser Glu Arg Pro Glu
400                 405                 410                 415

atg ctg agc gag cag gag cac atg agc atc tcg ggc agt agc gcc cga   1357
Met Leu Ser Glu Gln Glu His Met Ser Ile Ser Gly Ser Ser Ala Arg
                420                 425                 430

cac atg gtg atg cag aag ctg ctc cgc aag cag gag tct aca gtg atg   1405
His Met Val Met Gln Lys Leu Leu Arg Lys Gln Glu Ser Thr Val Met
            435                 440                 445

gtt ctg cgc aac atg gtg gac ccc aag gac atc gat gat gac ctg gaa   1453
Val Leu Arg Asn Met Val Asp Pro Lys Asp Ile Asp Asp Asp Leu Glu
        450                 455                 460

ggg gag gtg aca gag gag tgt ggc aag ttc ggg gcc gtg aac cgc gtc   1501
Gly Glu Val Thr Glu Glu Cys Gly Lys Phe Gly Ala Val Asn Arg Val
    465                 470                 475

atc atc tac caa gag aaa caa ggc gag gag gag gat gca gaa atc att   1549
Ile Ile Tyr Gln Glu Lys Gln Gly Glu Glu Glu Asp Ala Glu Ile Ile
480                 485                 490                 495

gtc aag atc ttt gtg gag ttt tcc ata gcc tct gag act cat aag gcc   1597
```

Val Lys Ile Phe Val Glu Phe Ser Ile Ala Ser Glu Thr His Lys Ala
500 505 510

atc cag gcc ctc aat ggc cgc tgg ttt gct ggc cgc aag gtg gtg gct 1645
Ile Gln Ala Leu Asn Gly Arg Trp Phe Ala Gly Arg Lys Val Val Ala
515 520 525

gaa gtg tac gac cag gag cgt ttt gat aac agt gac ctc tct gcg tga 1693
Glu Val Tyr Asp Gln Glu Arg Phe Asp Asn Ser Asp Leu Ser Ala
530 535 540

cagtggtccc tctccccgga cttgcacttg ttccttgttt cctctgggtt ttatagtgat 1753

acagtggtgt ccccggggcc aggcgcgctc tgcccagccc agcctacagt gcggataaag 1813

gtgcggatgc tgctggccct gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1853

<210> 20
<211> 542
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Met Ala Thr Ala Thr Ile Ala Leu Gln Val Asn Gly Gln Gln Gly Gly
1 5 10 15
Gly Ser Glu Pro Ala Ala Ala Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Asp Lys
20 25 30
Trp Lys Pro Pro Gln Gly Thr Asp Ser Ile Lys Met Glu Asn Gly Gln
35 40 45
Ser Thr Ala Ala Lys Leu Gly Leu Pro Pro Leu Thr Pro Glu Gln Gln
50 55 60
Glu Ala Leu Gln Lys Ala Lys Lys Tyr Ala Met Glu Gln Ser Ile Lys
65 70 75 80
Ser Val Leu Val Lys Gln Thr Ile Ala His Gln Gln Gln Gln Leu Thr
85 90 95

Asn Leu Gln Met Ala Ala Gln Arg Gln Arg Ala Leu Ala Ile Met Cys
100 105 110
Arg Val Tyr Val Gly Ser Ile Tyr Tyr Glu Leu Gly Glu Asp Thr Ile
115 120 125
Arg Gln Ala Phe Ala Pro Phe Gly Pro Ile Lys Ser Ile Asp Met Ser
130 135 140
Trp Asp Ser Val Thr Met Lys His Lys Gly Phe Ala Phe Val Glu Tyr
145 150 155 160
Glu Val Pro Glu Ala Ala Gln Leu Ala Leu Glu Gln Met Asn Ser Val
165 170 175
Met Leu Gly Gly Arg Asn Ile Lys Val Gly Arg Pro Ser Asn Ile Gly
180 185 190
Gln Ala Gln Pro Ile Ile Asp Gln Leu Ala Glu Glu Ala Arg Ala Phe
195 200 205
Asn Arg Ile Tyr Val Ala Ser Val His Gln Asp Leu Ser Asp Asp Asp
210 215 220
Ile Lys Ser Val Phe Glu Ala Phe Gly Lys Ile Lys Ser Cys Thr Leu
225 230 235 240
Ala Arg Asp Pro Thr Thr Gly Lys His Lys Gly Tyr Gly Phe Ile Glu
245 250 255
Tyr Glu Lys Ala Gln Ser Ser Gln Asp Ala Val Ser Ser Met Asn Leu
260 265 270
Phe Asp Leu Gly Gly Gln Tyr Leu Arg Val Gly Lys Ala Val Thr Pro
275 280 285
Pro Met Pro Leu Leu Thr Pro Ala Thr Pro Gly Gly Leu Pro Pro Ala
290 295 300
Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Lys Ile Thr Ala Gln Glu
305 310 315 320
Ala Val Ala Gly Ala Ala Val Leu Gly Thr Leu Gly Thr Pro Gly Leu
325 330 335
Val Ser Pro Ala Leu Thr Leu Ala Gln Pro Leu Gly Thr Leu Pro Gln
340 345 350
Ala Val Met Ala Ala Gln Ala Pro Gly Val Ile Thr Gly Val Thr Pro
355 360 365
Ala Arg Pro Pro Ile Pro Val Thr Ile Pro Ser Val Gly Val Val Asn
370 375 380

Pro Ile Leu Ala Ser Pro Pro Thr Leu Gly Leu Leu Glu Pro Lys Lys
385 390 395 400
Glu Lys Glu Glu Glu Glu Leu Phe Pro Glu Ser Glu Arg Pro Glu Met
405 410 415
Leu Ser Glu Gln Glu His Met Ser Ile Ser Gly Ser Ser Ala Arg His
420 425 430
Met Val Met Gln Lys Leu Leu Arg Lys Gln Glu Ser Thr Val Met Val
435 440 445
Leu Arg Asn Met Val Asp Pro Lys Asp Ile Asp Asp Asp Leu Glu Gly
450 455 460
Glu Val Thr Glu Glu Cys Gly Lys Phe Gly Ala Val Asn Arg Val Ile
465 470 475 480
Ile Tyr Gln Glu Lys Gln Gly Glu Glu Glu Asp Ala Glu Ile Ile Val
485 490 495
Lys Ile Phe Val Glu Phe Ser Ile Ala Ser Glu Thr His Lys Ala Ile
500 505 510
Gln Ala Leu Asn Gly Arg Trp Phe Ala Gly Arg Lys Val Val Ala Glu
515 520 525
Val Tyr Asp Gln Glu Arg Phe Asp Asn Ser Asp Leu Ser Ala
530 535 540

<210> 21
<211> 1853
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (65)..(1693)

<400> 21
atcgcgcgag acagcggaag gagcaagagt gggaggcgcg cgcggaggcc gcgacggacg 60

caag atg gcg acg gcg acc ata gct ctc cag gtc aat ggc cag caa gga 109
Met Ala Thr Ala Thr Ile Ala Leu Gln Val Asn Gly Gln Gln Gly

```
      1               5                  10                  15

ggg ggg tcc gag ccg gcg gcg gcg gcg gca gtg gtg gca gcg gga gac   157
Gly Gly Ser Glu Pro Ala Ala Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Asp
                20                  25                  30

aaa tgg aaa cct cca cag ggc aca gac tcc atc aag atg gag aac ggg   205
Lys Trp Lys Pro Pro Gln Gly Thr Asp Ser Ile Lys Met Glu Asn Gly
            35                  40                  45

cag agc aca gcc gcc aag ctg ggg ctg cct ccc ctg acg ccc gag cag   253
Gln Ser Thr Ala Ala Lys Leu Gly Leu Pro Pro Leu Thr Pro Glu Gln
        50                  55                  60

cag gag gcc ctt cag aag gcc aag aag tac gcc atg gag cag agc atc   301
Gln Glu Ala Leu Gln Lys Ala Lys Lys Tyr Ala Met Glu Gln Ser Ile
    65                  70                  75

aag agt gtg ctg gtg aag cag acc atc gcg cac cag cag cag cag ctc   349
Lys Ser Val Leu Val Lys Gln Thr Ile Ala His Gln Gln Gln Gln Leu
80                  85                  90                  95

acc aac ctg cag atg gcg gct cag cgg cag cgg gcg ctg gct atc atg   397
Thr Asn Leu Gln Met Ala Ala Gln Arg Gln Arg Ala Leu Ala Ile Met
                100                 105                 110

tgc cac gtc tac gtg ggc tct atc tac tat gag ctg ggg gag gac acc   445
Cys His Val Tyr Val Gly Ser Ile Tyr Tyr Glu Leu Gly Glu Asp Thr
            115                 120                 125

atc cgc cag gcc ttt gcc ccc ttt ggc ccc atc aag agc atc gac atg   493
Ile Arg Gln Ala Phe Ala Pro Phe Gly Pro Ile Lys Ser Ile Asp Met
        130                 135                 140

tcc tgg gac tcc gtc acc atg aag cac aag ggc ttt gcc ttc gtg gag   541
Ser Trp Asp Ser Val Thr Met Lys His Lys Gly Phe Ala Phe Val Glu
```

```
    145                 150                 155

tat gag gtc ccc gaa gct gca cag ctg gcc ttg gag cag atg aac tcg   589
Tyr Glu Val Pro Glu Ala Ala Gln Leu Ala Leu Glu Gln Met Asn Ser
160                 165                 170                 175

gtg atg ctg ggg ggc agg aac atc aag gtg ggc aga ccc agc aac ata   637
Val Met Leu Gly Gly Arg Asn Ile Lys Val Gly Arg Pro Ser Asn Ile
                180                 185                 190

ggg cag gcc cag ccc atc ata gac cag ttg gct gag gag gca cgg gcc   685
Gly Gln Ala Gln Pro Ile Ile Asp Gln Leu Ala Glu Glu Ala Arg Ala
            195                 200                 205

ttc aac cgc atc tac gtg gcc tct gtg cac cag gac ctc tca gac gat   733
Phe Asn Arg Ile Tyr Val Ala Ser Val His Gln Asp Leu Ser Asp Asp
        210                 215                 220

gac atc aag agc gtg ttt gag gcc ttt ggc aag atc aag tcc tgc aca   781
Asp Ile Lys Ser Val Phe Glu Ala Phe Gly Lys Ile Lys Ser Cys Thr
    225                 230                 235

ctg gcc cgg gac ccc aca act ggc aag cac aag ggc tac ggc ttc att   829
Leu Ala Arg Asp Pro Thr Thr Gly Lys His Lys Gly Tyr Gly Phe Ile
240                 245                 250                 255

gag tac gag aag gcc cag tcg tcc caa gat gct gtg tct tcc atg aac   877
Glu Tyr Glu Lys Ala Gln Ser Ser Gln Asp Ala Val Ser Ser Met Asn
                260                 265                 270

ctc ttt gac ctg ggt ggc cag tac ttg cgg gtg ggc aag gct gtc aca   925
Leu Phe Asp Leu Gly Gly Gln Tyr Leu Arg Val Gly Lys Ala Val Thr
            275                 280                 285

ccg ccc atg ccc cta ctc aca cca gcc acg cct gga ggc ctc cca cct   973
Pro Pro Met Pro Leu Leu Thr Pro Ala Thr Pro Gly Gly Leu Pro Pro
```

290 295 300

gcc gct gct gtg gca gct gct gca gcc act gcc aag atc aca gct cag 1021
Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Thr Ala Lys Ile Thr Ala Gln
305 310 315

gaa gca gtg gcc gga gca gcg gtg ctg ggt acc ctg ggc aca cct gga 1069
Glu Ala Val Ala Gly Ala Ala Val Leu Gly Thr Leu Gly Thr Pro Gly
320 325 330 335

ctg gtg tcc cca gca ctg acc ctg gcc cag ccc ctg ggc act ttg ccc 1117
Leu Val Ser Pro Ala Leu Thr Leu Ala Gln Pro Leu Gly Thr Leu Pro
340 345 350

cag gct gtc atg gct gcc cag gca cct gga gtc atc aca ggt gtg acc 1165
Gln Ala Val Met Ala Ala Gln Ala Pro Gly Val Ile Thr Gly Val Thr
355 360 365

cca gcc cgt cct cct atc ccg gtc acc atc ccc tcg gtg gga gtg gtg 1213
Pro Ala Arg Pro Pro Ile Pro Val Thr Ile Pro Ser Val Gly Val Val
370 375 380

aac ccc atc ctg gcc agc cct cca acg ctg ggt ctc ctg gag ccc aag 1261
Asn Pro Ile Leu Ala Ser Pro Pro Thr Leu Gly Leu Leu Glu Pro Lys
385 390 395

aag gag aag gaa gaa gag gag ctg ttt ccc gag tca gag cgg cca gag 1309
Lys Glu Lys Glu Glu Glu Glu Leu Phe Pro Glu Ser Glu Arg Pro Glu
400 405 410 415

atg ctg agc gag cag gag cac atg agc atc tcg ggc agt agc gcc cga 1357
Met Leu Ser Glu Gln Glu His Met Ser Ile Ser Gly Ser Ser Ala Arg
420 425 430

cac atg gtg atg cag aag ctg ctc cgc aag cag gag tct aca gtg atg 1405
His Met Val Met Gln Lys Leu Leu Arg Lys Gln Glu Ser Thr Val Met

435 440 445

gtt ctg cgc aac atg gtg gac ccc aag gac atc gat gat gac ctg gaa 1453
Val Leu Arg Asn Met Val Asp Pro Lys Asp Ile Asp Asp Asp Leu Glu
450 455 460

ggg gag gtg aca gag gag tgt ggc aag ttc ggg gcc gtg aac cgc gtc 1501
Gly Glu Val Thr Glu Glu Cys Gly Lys Phe Gly Ala Val Asn Arg Val
465 470 475

atc atc tac caa gag aaa caa ggc gag gag gag gat gca gaa atc att 1549
Ile Ile Tyr Gln Glu Lys Gln Gly Glu Glu Glu Asp Ala Glu Ile Ile
480 485 490 495

gtc aag atc ttt gtg gag ttt tcc ata gcc tct gag act cat aag gcc 1597
Val Lys Ile Phe Val Glu Phe Ser Ile Ala Ser Glu Thr His Lys Ala
500 505 510

atc cag gcc ctc aat ggc cgc tgg ttt gct ggc cgc aag gtg gtg gct 1645
Ile Gln Ala Leu Asn Gly Arg Trp Phe Ala Gly Arg Lys Val Val Ala
515 520 525

gaa gtg tac gac cag gag cgt ttt gat aac agt gac ctc tct gcg tga 1693
Glu Val Tyr Asp Gln Glu Arg Phe Asp Asn Ser Asp Leu Ser Ala
530 535 540

cagtggtccc tctccccgga cttgcacttg ttccttgttt cctctgggtt ttatagtgat 1753

acagtggtgt ccccggggcc aggcgcgctc tgcccagccc agcctacagt gcggataaag 1813

gtgcggatgc tgctggccct gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1853

<210> 22
<211> 542
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

```
Met Ala Thr Ala Thr Ile Ala Leu Gln Val Asn Gly Gln Gln Gly Gly
 1               5                  10                  15
Gly Ser Glu Pro Ala Ala Ala Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Asp Lys
            20                  25                  30
Trp Lys Pro Pro Gln Gly Thr Asp Ser Ile Lys Met Glu Asn Gly Gln
        35                  40                  45
Ser Thr Ala Ala Lys Leu Gly Leu Pro Pro Leu Thr Pro Glu Gln Gln
    50                  55                  60
Glu Ala Leu Gln Lys Ala Lys Lys Tyr Ala Met Glu Gln Ser Ile Lys
65                  70                  75                  80
Ser Val Leu Val Lys Gln Thr Ile Ala His Gln Gln Gln Gln Leu Thr
                85                  90                  95
Asn Leu Gln Met Ala Ala Gln Arg Gln Arg Ala Leu Ala Ile Met Cys
            100                 105                 110
Arg Val Tyr Val Gly Ser Ile Tyr Tyr Glu Leu Gly Glu Asp Thr Ile
        115                 120                 125
Arg Gln Ala Phe Ala Pro Phe Gly Pro Ile Lys Ser Ile Asp Met Ser
    130                 135                 140
Trp Asp Ser Val Thr Met Lys His Lys Gly Phe Ala Phe Val Glu Tyr
145                 150                 155                 160
Glu Val Pro Glu Ala Ala Gln Leu Ala Leu Glu Gln Met Asn Ser Val
                165                 170                 175
Met Leu Gly Gly Arg Asn Ile Lys Val Gly Arg Pro Ser Asn Ile Gly
            180                 185                 190
Gln Ala Gln Pro Ile Ile Asp Gln Leu Ala Glu Glu Ala Arg Ala Phe
        195                 200                 205
Asn Arg Ile Tyr Val Ala Ser Val His Gln Asp Leu Ser Asp Asp Asp
    210                 215                 220
Ile Lys Ser Val Phe Glu Ala Phe Gly Lys Ile Lys Ser Cys Thr Leu
225                 230                 235                 240
Ala Arg Asp Pro Thr Thr Gly Lys His Lys Gly Tyr Gly Phe Ile Glu
                245                 250                 255
Tyr Glu Lys Ala Gln Ser Ser Gln Asp Ala Val Ser Ser Met Asn Leu
```

260 265 270

Phe Asp Leu Gly Gly Gln Tyr Leu Arg Val Gly Lys Ala Val Thr Pro

275 280 285

Pro Met Pro Leu Leu Thr Pro Ala Thr Pro Gly Gly Leu Pro Pro Ala

290 295 300

Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Lys Ile Thr Ala Gln Glu

305 310 315 320

Ala Val Ala Gly Ala Ala Val Leu Gly Thr Leu Gly Thr Pro Gly Leu

325 330 335

Val Ser Pro Ala Leu Thr Leu Ala Gln Pro Leu Gly Thr Leu Pro Gln

340 345 350

Ala Val Met Ala Ala Gln Ala Pro Gly Val Ile Thr Gly Val Thr Pro

355 360 365

Ala Arg Pro Pro Ile Pro Val Thr Ile Pro Ser Val Gly Val Val Asn

370 375 380

Pro Ile Leu Ala Ser Pro Pro Thr Leu Gly Leu Leu Glu Pro Lys Lys

385 390 395 400

Glu Lys Glu Glu Glu Glu Leu Phe Pro Glu Ser Glu Arg Pro Glu Met

405 410 415

Leu Ser Glu Gln Glu His Met Ser Ile Ser Gly Ser Ser Ala Arg His

420 425 430

Met Val Met Gln Lys Leu Leu Arg Lys Gln Glu Ser Thr Val Met Val

435 440 445

Leu Arg Asn Met Val Asp Pro Lys Asp Ile Asp Asp Asp Leu Glu Gly

450 455 460

Glu Val Thr Glu Glu Cys Gly Lys Phe Gly Ala Val Asn Arg Val Ile

465 470 475 480

Ile Tyr Gln Glu Lys Gln Gly Glu Glu Glu Asp Ala Glu Ile Ile Val

485 490 495

Lys Ile Phe Val Glu Phe Ser Ile Ala Ser Glu Thr His Lys Ala Ile

500 505 510

Gln Ala Leu Asn Gly Arg Trp Phe Ala Gly Arg Lys Val Val Ala Glu

515 520 525

Val Tyr Asp Gln Glu Arg Phe Asp Asn Ser Asp Leu Ser Ala

530 535 540

<210> 23
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 23
acaaggttgg ctaaagga 18

<210> 24
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 24
atgcttctgc tgcctctt 18

<210> 25
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 25
acgcctatct cctcacctt 19

<210> 26
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 26
tggctgagca ggaaagac 18

<210> 27
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 27
gcacctggag tcatcaca 18

<210> 28
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 28
cgcagaacca tcactgtag 19

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 29
ggagtctaca gtgatggttc 20

<210> 30
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 30
tcctggtcgt acacttca 18

<210> 31
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 31
gcctcagagt gcatcgac 18

<210> 32
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 32
tccacagaaa caacatcg 18

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 33
tggagaaaat ctggcaccac 20

<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 34
aatggtgatg acctggccgt 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/10676

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/68, G01N33/53

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)
Int.Cl[7] C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/68, G01N33/53

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)
WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/55350 A1 (HUMAN GENOME SCI. INC.), 21 September, 2000 (21.09.00), & AU 200038694 A & EP 1163358 A1	1-37,39-41, 43-46,49-55, 57-63, 65-100, 102-104, 106-109, 112-118, 120-126,128
X	WO 01/64835 A2 (HYSEQ INC.), 07 September, 2001 (07.09.01), & AU 200138347 A	1-34,66-97

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] 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 document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
31 October, 2003 (31.10.03)	18 November, 2003 (18.11.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/10676

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	SULLIVAN, K.F. et al., Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere., J.Cell.Biol., 1994, Vol.127, No.3, pages 581 to 592	129-138, 143-152 139-140,142, 153-154,156
P,X	TOMONAGA, T. et al., Overexpression and mis-targeting of centromere protein-A in human primary colorectal cancer., Cancer Res., 01 July, 2003 (01.07.03), Vol.63, No.13, pages 3511 to 3516	1-37,39-41, 43-46,49-55, 57-63, 65-100, 102-104, 106-109, 112-118, 120-126, 128-140, 142-154,156

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/10676

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.: 38, 42, 47-48, 56, 64, 101, 105, 110-111, 119, 127, 141, 155

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 38, 42, 47 to 48, 56, 64, 101, 105, 110 to 111, 119, 127, 141 and 155 pertains to diagnostic methods to be practiced on the human body

2. [ ] Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The invention according to claim 1 relates to a nucleic acid molecule containing, e.g., a polynucleotide encoding FIR having the base sequence represented by SEQ ID NO:1, while the invention according to claim 129 relates to a nucleic acid molecule containing, e.g., a polynucleotide encoding CENP-A having the base sequence represented by SEQ ID NO:3. Thus, these inventions are not considered as being so linked as to form a single general inventive concept. Thus, the inventions as claimed in claims 1 to 37, 39 to 41, 43 to 46, 49 to 55, 57 to 63, 65 to 100, 102 to 104, 106 to 109, 112 to 118, 120 to 126, 128 to 140, 142 to 154 and 156 are divided into 2 groups of inventions and these groups of inventions are not (continued to extra sheet)

1. [X] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[X] No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

considered as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０３／１０６７６

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl[7] C12N 15/12, C07K 14/47, C07K 16/18, C12Q 1/68, G01N 33/53

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl[7] C12N 15/12, C07K 14/47, C07K 16/18, C12Q 1/68, G01N 33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X	WO 00/55350 A1 (HUMAN GENOME SCI. INC.) 2000.09.21 & AU 200038694 A & EP 1163358 A1	1-37, 39-41, 43-46, 49-55, 57-63, 65-100, 102-104, 106-109, 112-118, 120-126, 128
X	WO 01/64835 A2 (HYSEQ INC.) 2001.09.07 & AU 200138347 A	1-34, 66-97

☒ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
３１．１０．０３	18.11.03

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	高堀　栄二 印	４Ｂ　９２８１
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８	

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（１９９８年７月）

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X A	SULLIVAN, K. F. et al. Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. J. Cell Biol. 1994, Vol. 127, No. 3, p. 581-592	129-138, 143-152 139-140, 142, 153-154, 156
P, X	TOMONAGA, T. et al. Overexpression and mistargeting of centromere protein-A in human primary colorectal cancer. Cancer Res. 2003. Jul. 1, Vol. 63, No. 13, p. 3511-3516	1-37, 39-41, 43-46, 49-55, 57-63, 65-100, 102-104, 106-109, 112-118, 120-126, 128-140, 142-154, 156

国際調査報告	国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０３／１０６７６

第Ⅰ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第８条第３項（ＰＣＴ１７条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1．☒ 請求の範囲 38, 42, 47-48, 56, 64, 101, 105, 110-111, 119, 127, 141, 155 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲３８、４２、４７－４８、５６、６４、１０１、１０５、１１０－１１１、１１９、１２７、１４１、１５５は、人の診断方法に関するものである。

2．☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3．☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第３文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲１に記載された発明は、配列番号１に記載の塩基配列を有するＦＩＲをコードするポリヌクレオチド等を含む核酸分子に係る発明であるのに対し、請求の範囲１２９に記載された発明は、配列番号３に記載の塩基配列を有するＣＥＮＰ－Ａをコードするポリヌクレオチド等を含む核酸分子に係る発明であるから、両発明は単一の一般的発明概念を形成するものとは認められない。したがって、請求の範囲１－３７、３９－４１、４３－４６、４９－５５、５７－６３、６５－１００、１０２－１０４、１０６－１０９、１１２－１１８、１２０－１２６、１２８－１４０、１４２－１５４、１５６に記載された発明は、２つの発明群に区分され、当該発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。

1．☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。