

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5512125号
(P5512125)

(45) 発行日 平成26年6月4日 (2014.6.4)

(24) 登録日 平成26年4月4日 (2014.4.4)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 A
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D

請求項の数 36 (全 117 頁)

(21) 出願番号	特願2008-530030 (P2008-530030)	(73) 特許権者	506277410
(86) (22) 出願日	平成18年9月12日 (2006.9.12)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ ミシガン
(65) 公表番号	特表2009-507492 (P2009-507492A)		アメリカ合衆国 48109 ミシガン州 アナーバー ヒューロン パークウェイ 1600 セカンド フロア オフィス オブ テクノロジー トランスファー
(43) 公表日	平成21年2月26日 (2009.2.26)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/035507	(73) 特許権者	503146324
(87) 国際公開番号	W02007/033187		ザ ブリガム アンド ウィメンズ ホス ピタル インコーポレイテッド The Brigham and Wom en's Hospital, Inc. アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2115 ボストン フランシス ストリ ート 75
(87) 国際公開日	平成19年3月22日 (2007.3.22)		
審査請求日	平成21年7月7日 (2009.7.7)		
(31) 優先権主張番号	60/716,436		
(32) 優先日	平成17年9月12日 (2005.9.12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/730,358		
(32) 優先日	平成17年10月27日 (2005.10.27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺癌における再発性遺伝子融合

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 患者から採取された試料を供給する段階；ならびに

(b) 試料における、TMPRSS2遺伝子の転写制御領域由来の5'部分およびERG、ETV1およびETV4から成る群より選択されるETSファミリーメンバー遺伝子由来の3'部分を有する遺伝子融合の存在または非存在を検出する段階

を含む、患者から採取された試料において前立腺癌細胞を検出するための方法であって、試料における遺伝子融合の存在が患者における前立腺癌を示す、方法。

【請求項 2】

TMPRSS2遺伝子の転写制御領域がTMPRSS2遺伝子のプロモーター領域を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

TMPRSS2遺伝子のプロモーター領域がTMPRSS2遺伝子のアンドロゲン応答エレメント (ARE) を含む、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

段階(b)が、TMPRSS2遺伝子の転写制御領域由来の5'部分およびETSファミリーメンバー遺伝子由来の3'部分を有するゲノムDNAの染色体再配列を検出する段階を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

段階(b)が、TMPRSS2遺伝子の転写制御領域由来の5'部分およびETSファミリーメンバー

10

20

遺伝子由来の3'部分を有するキメラmRNA転写産物を検出する段階を含む、請求項1記載の方法。

【請求項6】

段階(b)が核酸シーケンシング技術を用いてキメラmRNA転写産物を検出する段階を含む、請求項4または5記載の方法。

【請求項7】

段階(b)が核酸ハイブリダイゼーション技術を用いてキメラmRNA転写産物を検出する段階を含む、請求項4または5記載の方法。

【請求項8】

段階(b)が、in situハイブリダイゼーション(ISH)、マイクロアレイ、およびノーザンブロットからなる群より選択される核酸ハイブリダイゼーション技術を用いてキメラmRNA転写産物を検出する段階を含む、請求項7記載の方法。

10

【請求項9】

段階(b)が核酸増幅方法を用いてキメラmRNA転写産物を検出する段階を含む、請求項4または5記載の方法。

【請求項10】

段階(b)が、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、転写介在増幅(TMA)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、鎖置換増幅(SDA)、および核酸配列に基づいた増幅(NASBA)からなる群より選択される核酸増幅方法を用いてキメラmRNA転写産物を検出する段階を含む、請求項9記載の方法。

20

【請求項11】

段階(b)が、TMPRSS2遺伝子の転写制御領域のERG、ETV1およびETV4から成る群より選択されるETSファミリーメンバー遺伝子への融合に起因するアミノ末端が切り詰められたETSファミリーメンバータンパク質を検出する段階を含む、請求項1記載の方法。

【請求項12】

段階(b)が、TMPRSS2遺伝子の転写制御領域由来のアミノ末端部分およびERG、ETV1およびETV4から成る群より選択されるETSファミリーメンバー遺伝子由来のカルボキシ末端部分を有するキメラタンパク質を検出する段階を含む、請求項1記載の方法。

【請求項13】

段階(b)がタンパク質シーケンシング技術を用いてタンパク質を検出する段階を含む、請求項11または12記載の方法。

30

【請求項14】

段階(b)がイムノアッセイを用いてタンパク質を検出する段階を含む、請求項11または12記載の方法。

【請求項15】

段階(b)が、免疫沈降；ウェスタンブロット；ELISA；免疫組織化学；免疫細胞化学；フローサイトメトリー；およびイムノPCRからなる群より選択されるイムノアッセイを用いてタンパク質を検出する段階を含む、請求項14記載の方法。

【請求項16】

試料が、組織、血液、尿、精液、前立腺分泌物、および前立腺細胞からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

40

【請求項17】

遺伝子融合がTMPRSS2およびERGの融合であり、かつ方法が、遺伝子融合におけるゲノム欠失の存在または非存在に基づいて前立腺細胞を特徴付ける段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項18】

欠失が第21染色体上のTMPRSS2とERG遺伝子の間のゲノムDNAの欠失である、請求項17記載の方法。

【請求項19】

欠失がERG遺伝子のエクソン1の欠失を含む、請求項18記載の方法。

50

【請求項 2 0】

欠失がTMPRSS2遺伝子のエキソン3の欠失を含む、請求項18記載の方法。

【請求項 2 1】

2.8メガベースと2.85メガベースの間のゲノムDNAが欠失している、請求項18記載の方法

。

【請求項 2 2】

欠失がポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて検出される、請求項20記載の方法。

【請求項 2 3】

PCRが、SEQ ID NO:55～SEQ ID NO:56からなる群より選択されるプライマーを用いて行われる、請求項22記載の方法。

10

【請求項 2 4】

欠失の存在が患者における転移性前立腺癌を示す、請求項18記載の方法。

【請求項 2 5】

以下のうちの少なくとも1つを含む、患者において前立腺癌を診断するための組成物：

(a)TMPRSS2遺伝子の転写制御領域由来の5'部分がERG遺伝子由来の3'部分に融合する接合部にハイブリダイズする少なくとも15ヌクレオチドの配列を含む標識プローブ；

(b)TMPRSS2遺伝子の転写制御領域のERG遺伝子への融合に起因するアミノ末端が切り詰められたETSファミリーメンバータンパク質に対する抗体；または

(c)TMPRSS2遺伝子の転写制御領域由来のアミノ末端部分およびERG遺伝子由来のカルボキシ末端部分を有するキメラタンパク質に対する抗体。

20

【請求項 2 6】

ETSファミリーメンバー遺伝子がERG遺伝子である、請求項1～16のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 7】

ERG遺伝子がERG1である、請求項17～24、26のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 8】

ETSファミリーメンバー遺伝子がETV1遺伝子である、請求項1～16のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 9】

ETSファミリーメンバー遺伝子がETV4遺伝子である、請求項1～16のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 3 0】

ERG遺伝子がERG1である、請求項25記載の組成物。

【請求項 3 1】

以下のうちの少なくとも1つを含む、患者において前立腺癌を診断するための組成物：

(a)TMPRSS2遺伝子の転写制御領域由来の5'部分がETV1遺伝子由来の3'部分に融合する接合部にハイブリダイズする少なくとも15ヌクレオチドの配列を含む標識プローブ；

(b)TMPRSS2遺伝子の転写制御領域のETV1 遺伝子への融合に起因するアミノ末端が切り詰められたETSファミリーメンバータンパク質に対する抗体；または

(c)TMPRSS2遺伝子の転写制御領域由来のアミノ末端部分およびETV1遺伝子由来のカルボキシ末端部分を有するキメラタンパク質に対する抗体。

40

【請求項 3 2】

以下のうちの少なくとも1つを含む、患者において前立腺癌を診断するための組成物：

(a)TMPRSS2遺伝子の転写制御領域由来の5'部分がETV4 遺伝子由来の3'部分に融合する接合部にハイブリダイズする少なくとも15ヌクレオチドの配列を含む標識プローブ；

(b)TMPRSS2遺伝子の転写制御領域のETV4遺伝子への融合に起因するアミノ末端が切り詰められたETSファミリーメンバータンパク質に対する抗体；または

(c)TMPRSS2遺伝子の転写制御領域由来のアミノ末端部分およびETV4 遺伝子由来のカルボキシ末端部分を有するキメラタンパク質に対する抗体。

【請求項 3 3】

50

請求項25、30～32のいずれかに記載の1つまたは複数の組成物を含むキット。

【請求項34】

以下を含む組成物：

(a) TMPRSS2遺伝子の転写制御領域由来の5'部分およびERG遺伝子由来の3'部分を含む遺伝子融合物；

(b) 前記遺伝子融合物の5'部分に相補的であり、前記遺伝子融合物の5'部分にハイブリダイズした少なくとも15ヌクレオチドの配列を含む第一標識プローブ；および

(c) 前記遺伝子融合物の3'部分に相補的であり、前記遺伝子融合物の3'部分にハイブリダイズした少なくとも15ヌクレオチドの配列を含む第二標識プローブ。

【請求項35】

以下を含む組成物：

(a) TMPRSS2遺伝子の転写制御領域由来の5'部分およびETV1遺伝子由来の3'部分を含む遺伝子融合物；

(b) 前記遺伝子融合物の5'部分に相補的であり、前記遺伝子融合物の5'部分にハイブリダイズした少なくとも15ヌクレオチドの配列を含む第一標識プローブ；および

(c) 前記遺伝子融合物の3'部分に相補的であり、前記遺伝子融合物の3'部分にハイブリダイズした少なくとも15ヌクレオチドの配列を含む第二標識プローブ。

【請求項36】

以下を含む組成物：

(a) TMPRSS2遺伝子の転写制御領域由来の5'部分およびETV4遺伝子由来の3'部分を含む遺伝子融合物；

(b) 前記遺伝子融合物の5'部分に相補的であり、前記遺伝子融合物の5'部分にハイブリダイズした少なくとも15ヌクレオチドの配列を含む第一標識プローブ；および

(c) 前記遺伝子融合物の3'部分に相補的であり、前記遺伝子融合物の3'部分にハイブリダイズした少なくとも15ヌクレオチドの配列を含む第二標識プローブ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、限定されるわけではないが、癌マーカーを含む、癌診断、研究、および治療のための組成物ならびに方法に関する。特に、本発明は、前立腺癌についての診断マーカーおよび臨床的標的としての再発性遺伝子融合に関する。

【0002】

本出願は、2005年9月12日に出願された仮特許出願第60/716,436号、2006年3月3日に出願された仮特許出願第60/779,041号、2005年10月27日に出願された仮特許出願第60/730,358号、および2006年4月28日に出願された仮特許出願第60/795,590号の優先権を主張し、それらは、全体が参照により本明細書に組み入れられている。

【0003】

本発明は、National Institutes of Health Prostate SPOR P50CA69568、R01 CA97063、U01 CA111275、およびNIH認可番号AG022404により一部援助された。政府は本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

癌研究における中心的な目標は、原因として発癌に結びつけられる変化した遺伝子を同定することである。塩基置換、挿入、欠失、転位置、ならびに染色体の増加および消失を含む体細胞性突然変異のいくつかの型が同定されており、それらのすべては、結果として、発癌遺伝子または腫瘍抑制遺伝子の活性の変化を生じる。1900年代前半に初めて仮説として取り上げられたが、今、癌における染色体再配列の因果的役割についての有力な証拠がある(Rowley, Nat Rev Cancer 1:245 (2001)(非特許文献1))。再発性染色体異常は、主

10

20

30

40

50

として、白血病、リンパ腫、および肉腫の特徴を示していると考えられた。よりずっと一般的で、ヒト癌に関連した罹患率および死亡率の相対的に大きな割合に寄与する上皮性腫瘍(癌腫)は、既知の疾患特異的染色体再配列の1%未満を占める(Mitelman, Mutat Res 462:247 (2000)(非特許文献2))。血液学的悪性腫瘍は、しばしば、バランスのとれた疾患特異的染色体再配列により特徴付けられるが、たいていの固形腫瘍は、過多の非特異的染色体異常を有する。固形腫瘍の核型複雑性は、癌進化または進行を通して獲得される二次変化によると考えられる。

【0005】

染色体再配列の2つの一次機構が記載されている。1つの機構において、1つの遺伝子のプロモーター/エンハンサーエレメントが、プロトオンコジーンに隣接して再配列され、それに従って、発癌性タンパク質の発現の変化を引き起こす。この型の転座は、免疫グロブリン(IG)およびT細胞受容体(TCR)遺伝子のMYCへの並置により例示され、それぞれ、B細胞悪性腫瘍およびT細胞悪性腫瘍におけるこの発癌遺伝子の活性化へ導く(Rabbitts, Nature 372:143 (1994)(非特許文献3))。第二の機構において、再配列は、結果として、2つの遺伝子の融合を生じ、それが、新しい機能または変化した活性を有する可能性がある融合タンパク質を産生する。この転座の原型的例は、慢性骨髄性白血病(CML)におけるBCR-ABL遺伝子融合である(Rowley, Nature 243:290 (1973)(非特許文献4); de Klein et al., Nature 300:765 (1982)(非特許文献5))。重要なことには、この所見は、BCR-ABLキナーゼを標的にするのに成功しているメシル酸イマチニブ(Gleevec)の合理的開発へ導いた(Deininger et al., Blood 105:2640 (2005)(非特許文献6))。従って、一般的な上皮性腫瘍において再発性遺伝子再配列を同定することは、患者処置はもちろん、制癌剤発見の試みにとっても重大な意味を有しうる。

【0006】

【非特許文献1】 Rowley, Nat Rev Cancer 1:245 (2001)

【非特許文献2】 Mitelman, Mutat Res 462:247 (2000)

【非特許文献3】 Rabbitts, Nature 372:143 (1994)

【非特許文献4】 Rowley, Nature 243:290 (1973)

【非特許文献5】 de Klein et al., Nature 300:765 (1982)

【非特許文献6】 Deininger et al., Blood 105:2640 (2005)

【発明の開示】

【0007】

発明の概要

本発明は、限定されるわけではないが、患者由来の試料を供給する段階; ならびに、試料における、アンドロゲン制御遺伝子(androgen regulated gene)(ARG)の転写制御領域由来の5'部分およびETSファミリーメンバー遺伝子由来の3'部分を有する遺伝子融合の存在または非存在を検出する段階を含む、患者において前立腺癌を診断するための方法であって、試料における遺伝子融合の存在が患者における前立腺癌を示す、方法を提供する。ARGはTMPRSS2またはPSAでありうる。ETSファミリーメンバー遺伝子は、ERG、ETV1(ER81)、FLI1、ETS1、ETS2、ELK1、ETV6(TEL1)、ETV7(TEL2)、GABP α 、ELF1、ETV4(E1AF; PEA3)、ETV5(ERM)、ERF、PEA3/E1AF、PU.1、ESE1/ESX、SAP1(ELK4)、ETV3(METS)、EWS/FLI1、ESE1、ESE2(ELF5)、ESE3、PDEF、NET(ELK3; SAP2)、NERF(ELF2)、またはFEVでありうる。ARGの転写制御領域は、ARGのプロモーター領域を含みうる。ARGのプロモーター領域はさらに、ARGのアンドロゲン応答エレメント(ARE)を含みうる。

【0008】

試料における遺伝子融合の存在または非存在を検出する段階は、ARGの転写制御領域由来の5'部分およびETSファミリーメンバー遺伝子由来の3'部分を有するゲノムDNAの染色体再配列を検出する段階を含みうる。核酸シーケンシング、核酸ハイブリダイゼーション、および核酸増幅を含む様々な技術が、ゲノムDNAの染色体再配列を検出するために用いられうる。核酸ハイブリダイゼーション技術には、インサイチュールハイブリダイゼーション(ISH)、マイクロアレイ、およびサザンブロットが挙げられる。核酸増幅技術には、ポリ

メラゼ連鎖反応(PCR)、逆転写ポリメラゼ連鎖反応(RT-PCR)、転写介在増幅(transcription-mediated amplification)(TMA)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、鎖置換増幅(strand displacement amplification)(SDA)、および核酸配列に基づいた増幅(nucleic acid sequence based amplification)(NASBA)が挙げられる。

【0009】

試料における遺伝子融合の存在または非存在を検出する段階は、代わりとして、ARGの転写制御領域由来の5'部分およびETSファミリーメンバー遺伝子由来の3'部分を有するキメラmRNA転写産物を検出する段階を含みうる。核酸シーケンシング、核酸ハイブリダイゼーション、および核酸増幅を含む様々な技術が、キメラmRNAを検出するために用いられる。核酸ハイブリダイゼーション技術には、インサイチューハイブリダイゼーション(ISH)(例えば、蛍光インサイチューハイブリダイゼーション(FISH))、マイクロアレイ、およびノーザンブロットが挙げられる。核酸増幅技術には、ポリメラゼ連鎖反応(PCR)、逆転写ポリメラゼ連鎖反応(RT-PCR)、転写介在増幅(transcription-mediated amplification)(TMA)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、鎖置換増幅(strand displacement amplification)(SDA)、および核酸配列に基づいた増幅(nucleic acid sequence based amplification)(NASBA)が挙げられる。

【0010】

試料における遺伝子融合の存在または非存在を検出する段階はまた、代わりとして、ARGの転写制御領域のETSファミリーメンバー遺伝子への融合に起因するアミノ末端が切り詰められたETSファミリーメンバータンパク質を検出する段階、またはARGの転写制御領域由来のアミノ末端部分およびETSファミリーメンバー遺伝子由来のカルボキシ末端部分を有するキメラタンパク質を検出する段階を含みうる。以下を含む様々な技術が、切り詰められたETSファミリーメンバータンパク質またはキメラタンパク質を検出するために用いられる：タンパク質シーケンシング；およびイムノアッセイ。イムノアッセイ技術には、免疫沈降、ウェスタンブロット、ELISA、免疫組織化学、免疫細胞化学、フローサイトメトリー、およびイムノPCRが挙げられる。

【0011】

本発明はさらに、限定されるわけではないが、患者において前立腺癌を診断するための組成物およびキットを提供する。組成物およびキットは以下を含みうる：ARGの転写制御領域由来の5'部分がETSファミリーメンバー遺伝子由来の3'部分に融合する接合部にハイブリダイズする配列を含む単一の標識プローブ；第一標識プローブがARGの転写制御領域にハイブリダイズする配列を含み、かつ第二標識プローブがETSファミリーメンバー遺伝子にハイブリダイズする配列を含む、1組の標識プローブ；第一増幅オリゴヌクレオチドがARGの転写制御領域にハイブリダイズする配列を含み、かつ第二増幅オリゴヌクレオチドがETSファミリーメンバー遺伝子にハイブリダイズする配列を含む、1組の増幅オリゴヌクレオチド；ARGの転写制御領域のETSファミリーメンバー遺伝子への融合に起因するアミノ末端が切り詰められたETSファミリーメンバータンパク質に対する抗体；またはARGの転写制御領域由来のアミノ末端部分およびETSファミリーメンバー遺伝子由来のカルボキシ末端部分を有するキメラタンパク質に対する抗体。

【0012】

本発明はまた、限定されるわけではないが、以下の段階を含む、患者において前立腺癌を処置するための方法を提供する：アンドロゲン制御遺伝子(ARG)の転写制御領域由来の5'部分およびETSファミリーメンバー遺伝子由来の3'部分を有する遺伝子融合の少なくとも1つの生物活性を阻害する作用物質を患者に投与する段階。ARGはTMPRSS2またはPSAでありうる。ETSファミリーメンバー遺伝子は、ERG、ETV1(ER81)、FLI1、ETS1、ETS2、ELK1、ETV6(TEL1)、ETV7(TEL2)、GABP α 、ELF1、ETV4(E1AF; PEA3)、ETV5(ERM)、ERF、PEA3/E1AF、PU.1、ESE1/ESX、SAP1(ELK4)、ETV3(METS)、EWS/FLI1、ESE1、ESE2(ELF5)、ESE3、PDEF、NET(ELK3; SAP2)、NERF(ELF2)、またはFEVでありうる。ARGの転写制御領域は、ARGのプロモーター領域を含みうる。ARGのプロモーター領域はさらに、ARGのアンドロゲン応答エレメント(ARE)を含みうる。作用物質は、小分子、siRNA、アンチセンス核酸、または抗体

でありうる。

【0013】

本発明のさらなる態様は、下記の説明および実施例に提供されている。

【0014】

定義

本発明の理解を促進するために、いくつかの用語および句が下記に定義される。

【0015】

本明細書に用いられる場合、「遺伝子融合」という用語は、キメラゲノムDNA、キメラメッセンジャーRNA、第一遺伝子の少なくとも一部の第二遺伝子の少なくとも一部への融合に起因する切り詰められたタンパク質、またはキメラタンパク質を指す。遺伝子融合は、

10

【0016】

本明細書に用いられる場合、「転写制御領域」という用語は、5'非翻訳領域(5'UTR)とも呼ばれる、遺伝子の非コード上流制御配列を指す。

【0017】

本明細書に用いられる場合、「アンドロゲン制御遺伝子」という用語は、発現がアンドロゲン(例えば、テストステロン)によって惹起または増強される遺伝子または遺伝子の部分を指す。アンドロゲン制御遺伝子のプロモーター領域は、アンドロゲンまたはアンドロゲンシグナル伝達分子(例えば、下流シグナル伝達分子)と相互作用する「アンドロゲン応答エレメント」を含みうる。

20

【0018】

本明細書に用いられる場合、「検出する」、「検出すること」、または「検出」という用語は、検出可能に標識された組成物を発見するもしくは識別する一般的な行為かまたは検出可能に標識された組成物の特定の観察のいずれかを表現しうる。

【0019】

本明細書に用いられる場合、「遺伝子融合の少なくとも1つの生物活性を阻害する」という用語は、直接的に遺伝子融合タンパク質を接触させること、遺伝子融合mRNAもしくはゲノムDNAを接触させること、遺伝子融合ポリペプチドの立体構造的変化を引き起こすこと、遺伝子融合タンパク質レベルを減少させること、またはシグナル伝達パートナーとの遺伝子融合の相互作用に干渉して、遺伝子融合の標的遺伝子の発現に影響を及ぼすことを介して、(例えば、本明細書に記載の活性を含むがそれらに限定されない)本発明の遺伝子融合の任意の活性を減少させる任意の作用物質を指す。インヒビターはまた、上流シグナル伝達分子を妨害することにより遺伝子融合生物活性を間接的に制御する分子を含む。

30

【0020】

本明細書に用いられる場合、「siRNA」という用語は、低分子干渉RNAを指す。いくつかの態様において、siRNAは、約18~25ヌクレオチド長の二重鎖、または二本鎖領域を含む；しばしば、siRNAは、各鎖の3'末端に約2個から4個までの不對ヌクレオチドを含む。siRNAの二重鎖または二本鎖領域の少なくとも1つの鎖は、標的RNA分子と実質的に相同である、または実質的に相補的である。標的RNA分子と相補的な鎖は、「アンチセンス鎖」である；標的RNA分子と相同な鎖は、「センス鎖」であり、siRNAアンチセンス鎖と相補的でもある。siRNAはまた、追加の配列を含みうる；そのような配列の非限定的例には、連結配列、またはループ、加えてステム、および他の折り畳み構造が挙げられる。siRNAは、無脊椎動物で、および脊椎動物でRNA干渉を誘発する際、および植物で転写後遺伝子サイレンシング中に配列特異的RNA分解を誘発する際、重要な媒介物として機能するようだ。

40

【0021】

「RNA干渉」、または「RNAi」という用語は、siRNAによる遺伝子発現のサイレンシングまたは減少させることを指す。それは、サイレンシングされる遺伝子の配列と二重鎖領域において相同であるsiRNAにより惹起される、動物および植物における配列特異的、転写後遺伝子サイレンシングの過程である。遺伝子は、染色体へ組み込まれて存在する、もしくはゲノムへ組み込まれていないトランスフェクションベクターに存在し、生物体に内因

50

性または外因性でありうる。遺伝子の発現は、完全にかまたは部分的にかのいずれかで阻害される。RNAiはまた、標的RNAの機能を阻害すると考えられうる；標的RNAの機能は完全または部分的でありうる。

【0022】

本明細書に用いられる場合、「癌の病期」という用語は、癌の進行のレベルの定性的または定量的評価を指す。癌の病期を決定するために用いられる基準には、限定されるわけではないが、腫瘍のサイズおよび転移の程度(例えば、局部または遠隔)が挙げられる。

【0023】

本明細書に用いられる場合、「遺伝子移入系」という用語は、核酸配列を含む組成物を細胞または組織へ送達する任意の手段を指す。例えば、遺伝子移入系には、限定されるわけではないが、ベクター(例えば、レトロウイルスの、アデノウイルスの、アデノ随伴ウイルスの、および他の核酸に基づいた送達系)、裸の核酸のマイクロインジェクション、ポリマーに基づいた送達系(例えば、リポソームに基づいた、および金属粒子に基づいた系)、微粒子銃注入などが挙げられる。本明細書に用いられる場合、「ウイルスの遺伝子移入系」は、試料の所望の細胞または組織への送達を促進するウイルスのエレメント(例えば、無傷ウイルス、改変ウイルス、および核酸またはタンパク質のようなウイルスの成分)を含む遺伝子移入系を指す。本明細書に用いられる場合、「アデノウイルス遺伝子移入系」という用語は、アデノウイルス科に属する無傷または変化したウイルスを含む遺伝子移入系を指す。

【0024】

本明細書に用いられる場合、「部位特異的組換え標的配列」という用語は、組換え因子についての認識配列および組換えが起こる位置を提供する核酸配列を指す。

【0025】

本明細書に用いられる場合、「核酸分子」という用語は、限定されるわけではないが、DNAまたはRNAを含む、任意の核酸含有分子を指す。その用語は、限定されるわけではないが、4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、プソイドイソシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、 β -D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシブトキソシン、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、および2,6-ジアミノプリンを含む、DNAおよびRNAの既知塩基類似体のいずれかを含む配列を含む。

【0026】

「遺伝子」という用語は、ポリペプチド、前駆体、またはRNA(例えば、rRNA、tRNA)の産生に必要なコード配列を含む核酸配列(例えば、DNA)を指す。ポリペプチドは、完全長コード配列により、または完全長もしくは断片の所望の活性もしくは機能的性質(例えば、酵素活性、リガンド結合、シグナル伝達、免疫原性など)が保持される限りコード配列の任意の部分によりコードされうる。その用語はまた、構造遺伝子のコード領域、ならびに遺伝子が完全長mRNAの長さに対応するようにどちらの末端にも約1kbまたはそれ以上の距離にわたって、5'末端および3'末端の両方においてコード領域に隣接して位置する配列を含む。コード領域の5'側に位置し、かつmRNA上に存在する配列は、5'非翻訳配列と呼ばれる。コード領域の3'側または下流に位置し、かつmRNA上に存在する配列は、3'非翻訳配

列と呼ばれる。「遺伝子」という用語は、遺伝子のcDNA型およびゲノム型の両方を含む。遺伝子のゲノム型またはクローンは、「イントロン」または「介在領域」もしくは「介在配列」と名付けられた非コード領域で分断されるコード領域を含む。イントロンは、核RNA(hnRNA)へ転写される遺伝子のセグメントである；イントロンは、エンハンサーのような制御エレメントを含みうる。イントロンは、核または一次転写産物から除去される、または「スプライシングによって出される(spliced out)」；それゆえに、イントロンはメッセンジャーRNA(mRNA)転写産物に存在しない。mRNAは、翻訳中、新生ポリペプチドにおけるアミノ酸の配列または順序を特定するように機能する。

【0027】

本明細書に用いられる場合、「異種性遺伝子」という用語は、その天然の環境にない遺伝子を指す。例えば、異種性遺伝子は、一つの種由来の、もう一つの種へ導入された遺伝子を含む。異種性遺伝子はまた、どこか変化している(例えば、突然変異した、複数コピーに追加された、非天然制御配列に連結されたなど)生物体原産の遺伝子を含む。異種性遺伝子は、異種性遺伝子配列が、典型的には、染色体においてその遺伝子配列と付随しているのを天然では見出されないDNA配列に連結されている、または天然では見出されない染色体の部分と付随している(例えば、遺伝子が正常には発現しない座位に発現した遺伝子)点において、内因性遺伝子から区別される。

【0028】

本明細書に用いられる場合、「オリゴヌクレオチド」という用語は、短い長さの一本鎖ポリヌクレオチド鎖を指す。オリゴヌクレオチドは、典型的には、長さが200残基未満(例えば、15と100の間)であるが、本明細書に用いられる場合、その用語はまた、より長いポリヌクレオチド鎖を含むことを意図される。オリゴヌクレオチドは、それらの長さによって呼ばれる。例えば、24残基のオリゴヌクレオチドは「24-mer」と呼ばれる。オリゴヌクレオチドは、自己ハイブリダイズすることにより、または他のポリヌクレオチドにハイブリダイズすることにより、二次および三次構造を形成することができる。そのような構造には、限定されるわけではないが、二重鎖、ヘアピン、十字形、屈曲、および三重鎖を挙げることができる。

【0029】

本明細書に用いられる場合、「相補的な」または「相補性」という用語は、塩基対形成ルールによって関係付けられるポリヌクレオチド(すなわち、ヌクレオチドの配列)に関して用いられる。例えば、配列「5'-A-G-T-3'」は、配列「3'-T-C-A-5'」と相補的である。相補性は、核酸の塩基の一部のみが塩基対形成ルールに従ってマッチしている「部分的」でありうる。または、核酸間に「完全な」または「全体の」相補性がありうる。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率および強度に有意な効果を生じる。これは、増幅反応、および核酸間の結合に依存する検出方法において特に重要である。

【0030】

「相同性」という用語は、相補性の程度を指す。部分的相同性または完全な相同性(すなわち、同一性)がありうる。完全に相補的な核酸分子が標的核酸にハイブリダイズするのを少なくとも部分的に阻害する核酸分子である部分的に相補的な配列は、「実質的に相同性」である。完全に相補的な配列の標的配列へのハイブリダイゼーションの阻害は、ハイブリダイゼーションアッセイ(サザンまたはノーザンブロット、溶液ハイブリダイゼーションなど)を用いて低ストリンジェンシーの条件下で試験されうる。実質的に相同的な配列またはプローブは、低ストリンジェンシーの条件下で、完全に相同的な核酸分子の標的への結合(すなわち、ハイブリダイゼーション)において競合する、および結合を阻害する。これは、低ストリンジェンシーの条件が非特異的結合が許されるほどのものであると言うことではない；低ストリンジェンシー条件は、2つの配列のお互いとの結合が特異的な(すなわち、選択的な)相互作用であることを必要とする。非特異的結合の非存在は、実質的に非相補的である(例えば、約30%未満の同一性)第二の標的の使用により試験されうる；非特異的結合の非存在下において、プローブは第二の非相補的標的にハイブリダイズ

10

20

30

40

50

しない。

【0031】

cDNAまたはゲノムクローンのような二本鎖核酸配列に関して用いられる場合、「実質的に相同的な」という用語は、上記のような低ストリンジエンシーの条件下で二本鎖核酸配列の一方の、または両方の鎖にハイブリダイズすることができる任意のプローブを指す。

【0032】

遺伝子は、一次RNA転写産物の示差的なスプライシングにより生成される複数のRNA種を産生しうる。同じ遺伝子のスプライスバリエーションであるcDNAは、配列同一性または完全な相同性(両方のcDNA上に同じエキソンまたは同じエキソンの部分の存在を表す)領域、および完全な非同源性(例えば、cDNA 1上にエキソン「A」の存在を表し、cDNA 2は代わりにエキソン「B」を含む)の領域を含む。2つのcDNAは配列同一性の領域を含むため、それらは、両方のcDNA上に見出される配列を含む遺伝子全体または遺伝子の部分に由来するプローブに両方ともハイブリダイズする；2つのスプライスバリエーションは、それゆえに、そのようなプローブと、およびお互いと実質的に相同である。

【0033】

一本鎖核酸配列に関して用いられる場合、「実質的に相同的な」という用語は、上記のような低ストリンジエンシーの条件下で一本鎖核酸配列をハイブリダイズすることができる任意のプローブ(すなわち、それは一本鎖核酸配列の相補体である)を指す。

【0034】

本明細書に用いられる場合、「ハイブリダイゼーション」という用語は、相補的な核酸の対形成に関して用いられる。ハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションの強度(すなわち、核酸間の会合の強度)は、核酸間の相補性の程度、含まれる条件のストリンジエンシー、形成されたハイブリッドの T_m 、および核酸内のG:C比のような因子により影響を及ぼされる。構造内に相補的な核酸の対形成を含む単一分子は、「自己ハイブリダイズ」していると言われる。

【0035】

本明細書に用いられる場合、「ストリンジエンシー」という用語は、核酸ハイブリダイゼーションが行われる、温度、イオン強度、および有機溶媒のような他の化合物の存在の条件に関して用いられる。「低ストリンジエンシー条件」下において、対象となる核酸配列は、その厳密な相補体、単一の塩基ミスマッチを含む配列、密接に関連した配列(例えば、90%またはそれ以上の相同性をもつ配列)、および部分的相同性のみを有する配列(例えば、50~90%相同性をもつ配列)にハイブリダイズする。「中位のストリンジエンシー条件」下において、対象となる核酸配列は、その厳密な相補体、単一の塩基ミスマッチを含む配列、および密接に関連した配列(例えば、90%またはそれ以上の相同性)にのみハイブリダイズする。「高ストリンジエンシー条件」下において、対象となる核酸配列は、その厳密な相補体、および(温度のような条件に依存して)単一の塩基ミスマッチを含む配列にのみハイブリダイズする。換言すれば、高ストリンジエンシーの条件下において、単一の塩基ミスマッチを含む配列へのハイブリダイゼーションを排除するために温度が上げられる。

【0036】

核酸ハイブリダイゼーションに関して用いられる場合の「高ストリンジエンシー条件」は、約500ヌクレオチド長のプローブが用いられる場合、5X SSPE(43.8g/l NaCl、6.9g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 、および1.85g/l EDTA、NaOHで7.4に調整されたpH)、0.5% SDS、5Xデンハルト試薬、および100 $\mu\text{g/ml}$ 変性サケ精子DNAからなる溶液における42°Cでの結合またはハイブリダイゼーション、続いて、0.1X SSPE、1.0% SDSを含む溶液における42°Cでの洗浄と等価な条件を含む。

【0037】

核酸ハイブリダイゼーションに関して用いられる場合の「中位のストリンジエンシー条件」は、約500ヌクレオチド長のプローブが用いられる場合、5X SSPE(43.8g/l NaCl、6.9g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 、および1.85g/l EDTA、NaOHで7.4に調整されたpH)、0.5% SDS、5Xデンハ

10

20

30

40

50

ルト試薬、および100 µg/ml変性サケ精子DNAからなる溶液における42℃での結合またはハイブリダイゼーション、続いて、1.0X SSPE、1.0% SDSを含む溶液における42℃での洗浄と等価な条件を含む。

【0038】

「低ストリンジェンシー条件」は、約500ヌクレオチド長のプローブが用いられる場合、5X SSPE(43.8g/l NaCl、6.9g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 、および1.85g/l EDTA、NaOHで7.4に調整されたpH)、0.1% SDS、5Xデンハルト試薬[50Xデンハルト液は、500mlあたり以下を含む：5g フィコール(Ficoll)(Type 400, Pharmacia)、5g BSA(フラクションV; Sigma)]、および100 µg/ml変性サケ精子DNAからなる溶液における42℃での結合またはハイブリダイゼーション、続いて、5X SSPE、0.1% SDSを含む溶液における42℃での洗浄と等価な条件を含む。

10

【0039】

多数の等価な条件が低ストリンジェンシー条件を含むように用いられうることは当技術分野において周知である；プローブの長さおよび性質(DNA、RNA、塩基組成)、ならびに標的の性質(DNA、RNA、塩基組成、溶液中に存在した、または固定化された、など)、ならびに塩および他の成分の濃度(例えば、ホルムアミド、デキストラン硫酸、ポリエチレングリコールの存在または非存在)のような因子が考慮され、ハイブリダイゼーション溶液は、上で列挙された条件と異なるが等価な低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションの条件を生じるように変化されうる。加えて、高ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイゼーションを促進する条件(例えば、ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄段階の温度を増加させる、ハイブリダイゼーション溶液におけるホルムアミドの使用など)は、

20

【0040】

本明細書に用いられる場合、「増幅オリゴヌクレオチド」という用語は、標的核酸、またはその相補体にハイブリダイズし、核酸増幅反応に関与するオリゴヌクレオチドを指す。増幅オリゴヌクレオチドの例は、鋳型核酸にハイブリダイズし、増幅過程でポリメラーゼにより伸長される3'OHを含む「プライマー」である。増幅オリゴヌクレオチドのもう一つの例は、ポリメラーゼにより伸長されないが(例えば、それが3'ブロック化末端を有するため)、増幅に関与する、または増幅を促進するオリゴヌクレオチドである。増幅オリゴヌクレオチドは、任意で、増幅反応に関与するが、標的核酸と相補的ではない、または標的核酸に含まれない、修飾ヌクレオチドもしくは類似体、または追加のヌクレオチドを含んでもよい。増幅オリゴヌクレオチドは、標的または鋳型配列と相補的ではない配列を含みうる。例えば、プライマーの5'領域は、標的核酸に非相補的であるプロモーター配列を含みうる(「プロモーター-プライマー」と呼ばれる)。当業者は、プライマーとして機能する増幅オリゴヌクレオチドが、5'プロモーター配列を含むように改変され、それによって、プロモーター-プライマーとして機能しうることを理解していると思われる。同様に、プロモーター-プライマーは、プロモーター配列の除去、またはプロモーター配列を含まない合成により改変され、それでもなおプライマーとして機能しうる。3'ブロック化増幅オリゴヌクレオチドは、プロモーター配列を供給し、重合のための鋳型として働きうる(「プロモータープロバイダー」と呼ばれる)。

30

【0041】

本明細書に用いられる場合、「プライマー」という用語は、核酸鎖に相補的であるプライマー伸長産物の合成が誘導される条件下に(すなわち、ヌクレオチド、およびDNAポリメラーゼのような誘導剤の存在下で、かつ適切な温度およびpHに)置かれた場合、合成の開始点として働く能力がある、精製された制限酵素消化物においてのように自然発生したか、または合成によって作製されたかを問わず、オリゴヌクレオチドを指す。プライマーは、好ましくは、増幅における最大の効率のために一本鎖であるが、代わりに、二本鎖であってもよい。二本鎖である場合には、プライマーは最初、伸長産物を調製するために用いられる前にその鎖を分離するように処理される。好ましくは、プライマーはオリゴデオキシリボヌクレオチドである。プライマーは、誘導剤の存在下で伸長産物の合成をプライムするのに十分、長くなければならない。プライマーの正確な長さは、温度、プライマーの

40

50

源、および方法の用途を含む多くの因子に依存する。

【0042】

本明細書に用いられる場合、「プローブ」という用語は、対象となるもう一つのオリゴヌクレオチドの少なくとも一部にハイブリダイズする能力がある、精製された制限酵素消化物においてのように自然発生したか、または合成によって、組換え技術によって、もしくはPCR増幅によって作製されたかを問わず、オリゴヌクレオチド(すなわち、ヌクレオチドの配列)を指す。プローブは、一本鎖または二本鎖でありうる。プローブは、特定の遺伝子配列の検出、同定、および単離に有用である。本発明に用いられる任意のプローブは、限定されるわけではないが、酵素(例えば、ELISA、および酵素に基づいた組織化学的アッセイ)、蛍光、放射性、および発光系を含む任意の検出系で検出可能であるように、任意の「レポーター分子」で標識されることが企図される。本発明が何か特定の検出系または標識に限定されることは意図されない。

10

【0043】

「単離されたオリゴヌクレオチド」または「単離されたポリヌクレオチド」においてのような、核酸に関して用いられる場合の「単離された」という用語は、それが通常、その天然源において付随している少なくとも1つの成分または混入物から同定および分離されている核酸配列を指す。単離された核酸は、それが天然で見出されるそれとは異なる形または設定でそのように存在する。対照的に、単離されていない核酸は、それらが天然で存在する状態で見出されるDNAおよびRNAのような核酸である。例えば、与えられたDNA配列(例えば、遺伝子)は、隣接遺伝子に近接して宿主細胞染色体上に見出される；特定のタンパク質をコードする特定のmRNA配列のようなRNA配列は、多数のタンパク質をコードする多数の他のmRNAとの混合物として細胞に見出される。しかしながら、与えられたタンパク質をコードする単離された核酸は、例として、核酸が天然細胞のとは異なる染色体位置にある、または別なふうに、天然で見出されるものとは異なる核酸配列に隣接している、与えられたタンパク質を通常発現する細胞におけるそのような核酸を含む。単離された核酸、オリゴヌクレオチド、またはポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖の形で存在しうる。単離された核酸、オリゴヌクレオチド、またはポリヌクレオチドが、タンパク質を発現するために利用されることになっている場合、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、最低でもセンス鎖またはコード鎖を含むが(すなわち、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは一本鎖でありうる)、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方を含みうる(すなわち、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは二本鎖でありうる)。

20

30

【0044】

本明細書に用いられる場合、「精製された」または「精製すること」という用語は、試料からの成分(例えば、混入物)の除去を指す。例えば、抗体は、混入している非免疫グロブリンタンパク質の除去により精製される；それらはまた、標的分子に結合しない免疫グロブリンの除去により精製される。非免疫グロブリンタンパク質の除去および/または標的分子に結合しない免疫グロブリンの除去は、結果として、試料における標的反応性免疫グロブリンのパーセントの増加を生じる。もう一つの例において、組換えポリペプチドは、細菌宿主細胞に発現し、ポリペプチドは、宿主細胞タンパク質の除去により精製される；組換えポリペプチドのパーセントはそれにより、試料において増加する。

40

【0045】

発明の詳細な説明

本発明は、前立腺癌における再発性遺伝子融合の発見に基づいている。本発明は、遺伝子融合を直接的にかまたは間接的にかのいずれかで検出またはターゲットする、診断方法、研究方法、および治療方法を提供する。本発明はまた、診断、研究、および治療の目的のための組成物を提供する。

【0046】

I. 遺伝子融合

本発明は、前立腺癌を示す再発性遺伝子融合を同定する。遺伝子融合は、アンドロゲン制御遺伝子(ARG)およびETSファミリーメンバー遺伝子の染色体再配列の結果である。それ

50

らの再発にも関わらず、ARGがETSファミリーメンバー遺伝子に融合する接合部は様々である。遺伝子融合は、典型的には、ARGの転写制御領域由来の5'部分およびETSファミリーメンバー遺伝子由来の3'部分を含む。再発性遺伝子融合は、前立腺癌についての診断マーカーおよび臨床的標的としての用途をもつ。

【0047】

A. アンドロゲン制御遺伝子

アンドロゲンホルモンにより制御される遺伝子は、ヒト前立腺の正常な生理学的機能にとって決定的重要性をもつ。それらはまた、前立腺癌腫の発生および進行に寄与する。認められているARGには、限定されるわけではないが、以下が挙げられる：TMPRSS2；PSA；PSMA；KLK2；SNRK；Seladin-1；およびFKBP51(Paoloni-Giacobino et al., Genomics 44:309 (1997); Velasco et al., Endocrinology 145(8):3913 (2004))。特に、TMPRSS2(NM_005656)は、他の正常なヒト組織と比較して前立腺上皮において高く発現していることが実証されている(Lin et al., Cancer Research 59:4180 (1999))。TMPRSS2遺伝子は第21染色体上に位置する。この遺伝子は、pterから41,750,797～41,801,948bpに位置する(合計51,151bp；マイナス鎖配向)。ヒトTMPRSS2タンパク質配列はGenBankアクセッション番号AAC51784(Swiss Proteinアクセッション番号015393)に、対応するcDNAはGenBankアクセッション番号U75329に見出される(Paoloni-Giacobino, et al., Genomics 44:309 (1997)も参照)。

【0048】

ARGの転写制御領域は、プロモーター領域を含む、ARGのコード領域または非コード領域を含みうる。ARGのプロモーター領域はさらに、ARGのアンドロゲン応答エレメント(ARE)を含みうる。特に、TMPRSS2についてのプロモーター領域が、GenBankアクセッション番号AJ276404により提供される。

【0049】

B. ETSファミリーメンバー遺伝子

転写因子のETSファミリーは、遺伝子発現を調節する細胞内シグナル伝達経路を制御する。下流エフェクターとして、それらは、特定の標的遺伝子を活性化する、または抑制する。上流エフェクターとして、それらは、多数の成長因子受容体の空間的および時間的発現に関与する。このファミリーのほぼ30個のメンバーが同定され、生理学的および病理学的過程の幅広い範囲に関与している。これらには、限定されるわけではないが、以下が挙げられる：ERG；ETV1(ER81)；FLI1；ETS1；ETS2；ELK1；ETV6(TEL1)；ETV7(TEL2)；GABP α ；ELF1；ETV4(E1AF；PEA3)；ETV5(ERM)；ERF；PEA3/E1AF；PU.1；ESE1/ESX；SAP1(ELK4)；ETV3(METS)；EWS/FLI1；ESE1；ESE2(ELF5)；ESE3；PDEF；NET(ELK3；SAP2)；NERF(ELF2)；およびFEV。例示的なETSファミリーメンバー遺伝子配列は図9に示されている。

【0050】

特に、ERG(NM_004449)は、他の正常なヒト組織と比較して前立腺上皮において高く発現していることが実証されている。ERG遺伝子は第21染色体上に位置する。その遺伝子は、pterから38,675,671～38,955,488塩基対に位置する。ERG遺伝子は合計279,817bp；マイナス鎖配向である。対応するERG cDNAおよびタンパク質配列は、それぞれ、GenBankアクセッション番号M17254およびGenBankアクセッション番号NP04440(Swiss Proteinアクセッション番号P11308)で与えられている。

【0051】

ETV1遺伝子は第7染色体上に位置する(GenBankアクセッション番号NC_000007.11；NC_06703.11；およびNT_007819.15)。その遺伝子は、pterから13,708,330～13,803,555塩基対に位置する。ETV1遺伝子は合計95,225bp、マイナス鎖配向である。対応するETV1 cDNAおよびタンパク質配列は、それぞれ、GenBankアクセッション番号NM_004956およびGenBankアクセッション番号NP_004947(Swiss Proteinアクセッション番号P50549)で与えられている。

【0052】

ヒトETV4遺伝子は第14染色体上に位置する(GenBankアクセッション番号NC_000017.9；N

10

20

30

40

50

T_010783.14; およびNT_086880.1)。その遺伝子は、pterから38,960,740~38,979,228塩基対にある。ETV4遺伝子は合計18,488bp、マイナス鎖配向である。対応するETV4 cDNAおよびタンパク質配列は、それぞれ、GenBankアクセッション番号NM_001986およびGenBankアクセッション番号NP_01977(Swiss Proteinアクセッション番号P43268)で与えられている。

【0053】

C. ARG/ETS遺伝子融合

上で記載されているように、本発明は、ARGのETSファミリーメンバー遺伝子への融合を提供する。例示的な遺伝子融合配列は、図36に示されている。すべての関連する遺伝子(TMPRSS2、ERG、ETV1、およびETV4)について、GenBank参照配列IDが提供され、エキソンは、UCSCヒトゲノムの2004年5月のアセンブリ(May 2004 assembly of the UCSC Human Genome)を用いて整列している。すべての同定された融合について、図36は、TMPRSS2遺伝子の始めから融合およびETSファミリーメンバー遺伝子のストップコドンまでの完全な配列を提供する。公開されたバリエーションのそれぞれについての寄託されたGenBank配列もまた提供されている。いくつかのTMPRSS2:ERGおよびTMPRSS2:ETV1融合は、TMPRSS2およびETSファミリーメンバー遺伝子の限界点エキソンにより記載されている。例えば、TMPRSS2:ERGは、TMPRSS2のエキソン1をERGのエキソン4~11へ融合しているのだが、TMPRSS2:ERG(1,4)として同定される。

【0054】

ARGのETSファミリーメンバー遺伝子への融合は、DNA、RNA、またはタンパク質として検出できる。最初に、遺伝子融合は、ARGの転写制御領域由来の5'部分およびETSファミリーメンバー遺伝子由来の3'部分を有するゲノムDNAの染色体再配列として検出できる。いったん転写されたならば、遺伝子融合は、ARGの転写制御領域由来の5'部分およびETSファミリーメンバー遺伝子由来の3'部分を有するキメラmRNAとして検出できる。いったん翻訳されたならば、遺伝子融合は、ARGの転写制御領域のETSファミリーメンバー遺伝子への融合に起因するアミノ末端が切り詰められたETSファミリーメンバータンパク質; ARGの転写制御領域由来のアミノ末端部分およびETSファミリーメンバー遺伝子由来のカルボキシ末端部分を有するキメラタンパク質; または上方制御されているが、他の点では区別がつかない天然のETSファミリーメンバータンパク質として検出できる。切り詰められたETSファミリーメンバータンパク質およびキメラタンパク質は、アミノ酸配列、翻訳後プロセッシング、および/または二次、三次、もしくは四次構造においてそれらのそれぞれの天然タンパク質と異なりうる。そのような違いは、存在するならば、遺伝子融合の存在を同定するために用いられうる。検出の特定の方法は下により詳細に記載されている。

【0055】

ある特定の遺伝子融合は、前立腺癌において他のものより多く見られる。本発明は、前立腺癌の50~80%をTMPRSS2のERG、ETV1、ETV4、またはFLI1との再発性遺伝子融合を有すると同定している。それらのうち、50~70%はTMPRSS2-ERGであって、その50%~60%が第21染色体上のTMPRSS2座とERG座の間の遺伝的情報の欠失に起因し(下により詳細に記載されている)、5~10%はTMPRSS2-ETV1であり、1~2%はTMPRSS2-ETV4であり、1~2%はTMPRSS2-FLI1である。

【0056】

本発明の開発の経過中に行われた実験は、ある特定の融合遺伝子が融合転写産物を発現するが、他のものは機能的転写産物を発現しないことを示した(Tomlins et al., Science, 310:644-648 (2005); Tomlins et al., Cancer Research 66:3396-3400 (2006))。

【0057】

本発明の開発の経過中に行われたさらなる実験は、染色体21q22.2-3上のTMPRSS2とERGの間に位置する有意なゲノム欠失を同定した。欠失は、TMPRSS2:ERG融合陽性PCA試料に見られた。欠失は、コンセンサス領域に現れているが、この領域内で可変性を示す。Parisらによる以前に発表された研究(Hum. Mol. Genet. 13:1303-13(2004))において、CGH分析は、TMPRSS2から6kbセントロメア側であるCTD-210307 BACにおける欠失を検出した。これ

らの欠失は、臨床的に局在したPCA試料の12.5%(9/27)に、および転移性PCA試料の33%(5/15)に観察された。これらの結果は、最新研究からのSNPアレイデータを支持し、どちらのPCA欠失も進行と共により多く見られるようになること、または欠失がより急速に進行する傾向にあるPCAにおいてより頻繁に同定されることを示唆する。TMPRSS2:ERG再配列の顕著な腫瘍内均一性を考慮すれば、これらの分子サブタイプが異なる疾患進行特性と関連している可能性がより高い。

【0058】

49.2%がERGの再配列を含む118個の臨床的に局在したPCA症例が評価された。イントロンの欠失が、これらのTMPRSS2:ERG融合陽性症例の60.3%に観察された。ERGの著しい過剰発現をもつほとんどすべてのPCA試料は、再配列を有し、過剰発現は、再配列とほぼ同じ数の症例において生じている。Oncomine、公的に利用可能な遺伝子発現データの一覧、を用いて、共通の欠失部位の領域に位置する4個の有意に下方制御された遺伝子が同定された(図16)。

【0059】

本発明は特定の機構に限定されない。実際、機構の理解は、本発明を実施するのに必要ではない。とはいえ、結果は、全PCAの半分近くがTMPRSS2:ERG再配列によって定義されることを示唆している。これらの腫瘍の大多数は、オリゴヌクレオチドSNPアレイゲノム分析によればサイズが可変性である、イントロンの欠失を示す。しかしながら、およそ30~40%は欠失を示さず、従って、TMPRSS2およびERGの平衡転座を含む可能性があった。この欠失の程度における可変性は、CMLについて観察されているように、疾患進行と関連している可能性がある。最新の研究は、腫瘍病期およびリンパ節状態との有意な臨床的関連を同定した。欠失を含むTMPRSS2:ERG再配列された腫瘍はまた、PSA生化学的不全のより高い率への傾向を示した。

【0060】

本発明の開発の経過中に行われたさらなる実験は、長期追跡調査で初期前立腺癌の静観コホートにおけるTMPRSS2:ERG遺伝子融合の存在に基づく転移または前立腺癌特異的死を生じるリスクを探究した。TMPRSS2:ERG遺伝子融合の頻度は92個の症例を用いて評価された。この集団ベースのコホートにおけるTMPRSS2:ERG遺伝子融合の頻度は、15.2%(14/92)であり、2つの病院ベースのコホートで観察された50%頻度より低かった。本発明は特定の機構に限定されない。実際、機構の理解は、本発明を実施するのに必要ではない。とはいえ、TMPRSS2:ERG遺伝子融合前立腺癌におけるこの違いは、民族および人種の遺伝的違いによる可能性がある。これらの違いはまた、他の非集団ベースの研究と比較した、この静観コホートにおける高悪性度症例のより低いパーセンテージによって説明されうる。

【0061】

TMPRSS2:ERG遺伝子融合と遠隔転移および前立腺癌特異的死の発生との間の有意な関連が観察され、3.6の累積発生率($P=0.004$ 、95%信頼区間=1.5~8.9)であった。これらのデータは、TMPRSS2:ERG遺伝子融合前立腺癌がより攻撃的な表現型をもつことを示唆している。さらなる実験は、TMPRSS2:ERG遺伝子融合におけるゲノム欠失が進行性および/または転移性前立腺癌と相関することを示した(例えば、実施例5参照)。

【0062】

本発明はまた、アンドロゲンが、TMPRSS2:ERG陽性細胞系において、おそらくAREを通して、ERGの過剰発現を誘導できることを実証している。本発明は特定の機構に限定されない。実際、機構の理解は、本発明を実施するのに必要ではない。とはいえ、集合的に、結果は、TMPRSS2の上流のAREを通してのETSファミリー活性の調節不全が前立腺癌発生を促進しうることを示唆している。

【0063】

遺伝子融合発現の存在、分子サブタイプ、または量は疾患の病期、攻撃性、または進行と相関することが予想される。ETSファミリーメンバー遺伝子を含む類似した再発性遺伝子融合は他の上皮癌に起こることがさらに予想される。

【0064】

II. 抗体

本発明の遺伝子融合タンパク質は、それらの断片、誘導体、および類似体を含めて、下記の診断方法、研究方法、および治療方法において用途をもつ抗体を産生するための免疫原として用いられうる。抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、ヒト化、一本鎖、またはFab断片でありうる。当業者に公知の様々な手順が、そのような抗体および断片の作製ならびに標識に用いられうる。例えば、Burns, ed., Immunochemical Protocols, 3rd ed., Humana Press (2005); Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Kozbor et al., Immunology Today 4:72 (1983); Kohler and Milstein, Nature 256:495 (1975)を参照。切り詰められたETSファミリーメンバータンパク質またはキメラタンパク質とそれらのそれぞれの天然タンパク質の間の違いを利用する抗体または断片が特に好ましい。

10

【0065】

III. 診断適用

本発明は、遺伝子融合を直接的にかまたは間接的にかのいずれかで検出する、DNA、RNA、およびタンパク質に基づいた診断方法を提供する。本発明はまた、診断目的での組成物およびキットを提供する。

【0066】

本発明の診断方法は、定性的または定量的でありうる。定量的診断方法は、例えば、カットオフまたは閾値により緩慢性癌と攻撃的癌の間を識別するために、用いられうる。適用可能な場合、定性的または定量的診断方法はまた、標的、シグナル、または媒介物の増幅を含みうる(例えば、ユニバーサルプライマー)。

20

【0067】

最初のアッセイは、遺伝子融合の存在を確認しうるが、特定の融合を同定しない。第二のアッセイは、その後、必要に応じて、特定の融合のアイデンティティを決定するために行われる。第二アッセイは最初のアッセイとは異なる検出テクノロジーを用いうる。

【0068】

本発明の遺伝子融合は、多重またはパネル形式で他のマーカーと共に検出されうる。マーカーは、単独または遺伝子融合と組み合わせてのそれらの予測値について選択される。例示的な前立腺癌マーカーには、限定されるわけではないが、以下が挙げられる：AMACR/P504S(米国特許第6,262,245号)；PCA3(米国特許第7,008,765号)；PCGEM1(米国特許第6,828,429号)；タンパク質/P501S、P503S、P504S、P509S、P510S、前立腺/P703P、P710P(米国公開特許第20030185830号)；ならびに米国特許第5,854,206号および第6,034,218号および米国公開特許第20030175736号に開示されたもの、それぞれの特許は全体として参照により本明細書に組み入れられている。他の癌、疾患、感染症、および代謝状態についてのマーカーもまた、多重またはパネル形式における包含として企図される。

30

【0069】

本発明の診断方法はまた、疾患の病期、攻撃性、もしくは進行、または転移の存在もしくはリスクと特定の遺伝子融合を相関させるデータを参照して改変されうる。究極的には、本発明の方法により提供される情報は、医師が特定の患者について最善の処置方法を選択するのを援助する。

40

【0070】

A. 試料

遺伝子融合を含むのではないかと疑われる任意の患者試料が、本発明の方法に従って試験されうる。非限定的例として、試料は、組織(例えば、前立腺生検試料、または前立腺摘除術により得られる組織試料)、血液、尿、精液、前立腺分泌物、またはそれらの画分(例えば、血漿、血清、尿上清、尿細胞ペレット、または前立腺細胞)でありうる。尿試料は、好ましくは、前立腺由来の前立腺細胞を尿路へ流れさせる、細心の直腸指診(DRE)直後に収集される。

【0071】

患者試料は、典型的には、遺伝子融合もしくは遺伝子融合を含む細胞を単離する、また

50

は遺伝子融合もしくは遺伝子融合を含む細胞について試料を濃縮するように設計された予備処理を必要とする。限定されるわけではないが、以下を含む、当業者に公知の様々な技術がこの目的のために用いられうる：遠心分離；免疫捕獲；細胞溶解；および核酸標的捕獲(例えば、全体として参照により本明細書に組み入れられる、欧州特許第1 409 727号を参照)。

【0072】

B. DNAおよびRNA検出

本発明の遺伝子融合は、限定されるわけではないが、以下を含む当業者に公知の様々な核酸技術を用いてゲノムDNAまたはキメラmRNAの染色体再配列として検出されうる：核酸シーケンシング；核酸ハイブリダイゼーション；および核酸増幅。

10

【0073】

1. シーケンシング

核酸シーケンシング技術の例証となる非限定的例には、限定されるわけではないが、チェーンターミネーター(サンガー)シーケンシングおよびダイターミネーターシーケンシングが挙げられる。当業者は、RNAは細胞においてより安定性が低く、ヌクレアーゼ攻撃をより受けやすいため、実験的には、RNAは通常、シーケンシングの前にDNAへ逆転写される。

【0074】

チェーンターミネーターシーケンシングは、修飾ヌクレオチド基質を用いるDNA合成反応の配列特異的停止を用いる。伸長は、鋳型DNA上の特定の部位で、その領域における鋳型に相補的な短い放射性、または他の標識の、オリゴヌクレオチドプライマーを用いることにより開始される。オリゴヌクレオチドプライマーは、DNAポリメラーゼ、標準の4つのデオキシヌクレオチド塩基、および低濃度の1つの連鎖停止ヌクレオチド、最も一般的にはジデオキシヌクレオチド、を用いて伸長される。この反応は、4つの別々のチューブにおいて、塩基のそれぞれが交代でジデオキシヌクレオチドとなって、繰り返される。DNAポリメラーゼによる連鎖停止ヌクレオチドの制限された取り込みは、結果として、その特定のジデオキシヌクレオチドが用いられている位置においてのみ停止される一連の関連DNA断片を生じる。各反応チューブについて、断片が、スラブポリアクリルアミドゲルまたは粘性ポリマーで充填されたキャピラリーチューブにおける電気泳動によりサイズ分離される。配列は、ゲルの上端から下端まで走査する時、どのレーンが標識プライマーからの可視化マークを生じるかを読み取ることにより決定される。

20

30

【0075】

ダイターミネーターシーケンシングは、代わりに、ターミネーターを標識する。完全なシーケンシングは、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーターのそれぞれを、異なる波長で蛍光を発する別々の蛍光色素で標識することにより単一反応で行われうる。

【0076】

2. ハイブリダイゼーション

核酸ハイブリダイゼーション技術の例証となる非限定的例には、限定されるわけではないが、インサイチュールハイブリダイゼーション(ISH)、マイクロアレイ、およびサザンまたはノーザンブロットが挙げられる。

40

【0077】

インサイチュールハイブリダイゼーション(ISH)は、組織(インサイチュール)の一部もしくは切片、または組織が十分小さい場合には、組織全体(ホールマウントISH)において特定のDNAまたはRNA配列の位置を特定するために標識相補的DNAまたはRNA鎖を用いるハイブリダイゼーションの一種である。DNA ISHは、染色体の構造を決定するために用いられうる。RNA ISHは、組織切片またはホールマウント内でmRNAおよび他の転写産物を測定し、位置を特定するために用いられる。試料細胞および組織は、通常、標的転写産物を所定の場所に固定するために、およびプローブの接近を増加させるために、処理される。プローブは、高温で標的配列にハイブリダイズし、その後、過剰プローブは洗い流される。放射性標識、蛍光標識、または抗原標識のいずれかの塩基で標識されたプローブは、それぞれ、

50

オートラジオグラフィー、蛍光顕微鏡法、または免疫組織化学法のいずれかを用いて、組織において位置特定化および定量化される。ISHはまた、同時に2つまたはそれ以上の転写産物を検出するために、放射性または他の非放射性標識で標識された2つまたはそれ以上のプローブを用いることができる。

【0078】

2.1 FISH

いくつかの態様において、融合配列は、蛍光インサイチュールハイブリダイゼーション(FISH)を用いて検出される。本発明のための好ましいFISHアッセイは、細菌人工染色体(BAC)を利用する。これらは、ヒトゲノムシーケンシングプロジェクトにおいて広範に用いられており(Nature 409:953-958 (2001)参照)、多くの情報源、例えば、NCBI、を通して位置づけられうる特定のBACを含むクローンは、配給業者を通して入手できる。ヒトゲノム由来の各BACクローンは、明確にそれを同定する参照名が与えられている。これらの名前は、対応するGenBank配列を見つけるために、および配給業者にクローンのコピーを注文するために用いられうる。

【0079】

いくつかの態様において、検出アッセイは、ETV1についてのプローブ(例えば、bac RP11-692L4)、c-ERG:t-ERG分裂についての1セットのプローブ(例えば、bac RP11-24A11およびt-ERGについてのプローブとしてRP11-372017またはRP11-137J13)を利用するFISHアッセイである。他の態様において、FISHアッセイは、ETV1欠失または増幅について1セットのプローブで試験することにより行われ、一方のプローブはETV1座にまたがる(例えば、bac RP11-692L4)、かつ他方のプローブは第7染色体にハイブリダイズする(例えば、その染色体のセントロメア上のプローブ)。なおさらなる態様において、方法は、ERG欠失または増幅について1セットのプローブ、ERG座にまたがる1つ(例えば、bac RP11-476D17)および第21染色体上の1つの参照プローブ(例えば、PR11-32L6; RP11-752M23; RP11-1107H21; RP11-639A7; またはRP11-1077M21)、で試験することにより行われる。さらに他の態様において、方法は、TMPRSS2欠失/増幅について1セットのプローブ、TMPRSS2(例えばRP11-121A5; RP11-120C17; PR11-814F13; またはRR11-535H11)座にまたがる1つおよび第21染色体上の1つの参照プローブ(例えば、PR11-32L6; RP11-752M23; RP11-1107H21; RP11-639A7; またはRP11-1077M21)、で試験することにより行われる。いくつかの態様において、方法はさらに、限定されるわけではないが、RP11-121A5; RP11-120C17; PR11-814F13; およびRR11-535H11を含む群より選択されるプローブを用いるハイブリダイゼーションを含む。

【0080】

本発明はさらに、ヒト前立腺細胞、ヒト前立腺組織上で、または該ヒト前立腺細胞もしくはヒト前立腺組織を囲む体液上でFISHアッセイを行う方法を提供する。いくつかの態様において、アッセイは、限定されるわけではないが、RP11-372017; RP11-137J13; RP11-692L4; RP11-476D17; PR11-32L6; RP11-752M23; RP11-1107H21; RP11-639A7; RP11-1077M21; RP11-121A5; RP11-120C17; PR11-814F13; およびRR11-535H11を含む群より選択されるプローブを利用するハイブリダイゼーション段階を含む。

【0081】

本発明に関する再配列を検出するためのFISHプロトコールに用いられうる特定のBACクローンは以下のとおりである：

- ・ETV1-TMPRSS2融合について試験するために、ETV1にまたがる1つのプローブおよびTMPRSS2座にまたがる1つが用いられうる：

ETV1についてのBAC：RP11-692L4

TMPRSS2についてのBAC：RP11-121A5、(RP11-120C17、PR11-814F13、RR11-535H11)

- ・ERG転座をc-ERG:t-ERG分裂についてのセットのプローブで試験すること：

c-ERGについてのBAC：RP11-24A11

t-ERGについてのBAC：RP11-372017、RP11-137J13

- ・ETV1欠失/増幅をセットのプローブ、ETV1座にまたがる1つおよび第7染色体上の1つの参照プローブ、で試験すること：

ETV1についてのBAC：RP11-692L4

・ERG欠失/増幅をセットのプローブ、ERG座にまたがる1つおよび第21染色体上の1つの参照プローブ、で試験すること：

ERGについてのBAC：RP11-476D17

第21染色体上の参照プローブについてのBAC：*

・TMPRSS2欠失/増幅をセットのプローブ、TMPRSS2座にまたがる1つおよび第21染色体上の1つの参照プローブ、で試験すること：

TMPRSS2についてのBAC：RP11-121A5、(RP11-120C17、PR11-814F13、RR11-535H11)

第21染色体上の参照プローブについてのBAC：PR11-32L6、RP11-752M23、RP11-1107H21、RP11-639A7、(RP11-1077M21)。

10

【0082】

TMPRSS2とERGの間の融合を結果として生じる欠失突然変異を検出するための最も好ましいプローブは、RP11-24A11およびRP11-137J13である。これらのプローブまたは上記のものは、適切な蛍光または他のマーカーで標識され、その後、ハイブリダイゼーションに用いられる。本明細書に提供された実施例セクションは、欠失を測定するために効果的である1つの特定のプロトコルを示すが、当業者は、このアッセイの多くのバリエーションが等しく十分に用いられうることを認識していると思われる。特定のプロトコルは当技術分野において周知であり、本発明に容易に適応しうる。方法に関する手引きは、以下を含む多くの参考文献から得られうる：In situ Hybridization: Medical Applications (eds. G.R. Coulton and J. de Belleruche), Kluwer Academic Publishers, Boston (1992); In situ Hybridization: In Neurobiology; Advances in Methodology (eds. J.H. Eberwine, K.L. Valentino, and J.D. Barchas), Oxford University Press Inc., England (1994); In situ Hybridization: A Practical Approach (ed. D.G. Wilkinson), Oxford University Press Inc., England (1992); Kuo, et al., Am. J. Hum. Genet. 49:112-119 (1991); Klinger, et al., Am. J. Hum. Genet. 51:55-65 (1992); および Ward, et al., Am. J. Hum. Genet. 52:854-865 (1993)。市販されているキット、およびFISHアッセイを行うためのプロトコルを提供するキットもある(例えば、Oncor, Inc., Gaithersburg, MDから入手できる)。方法に関する手引きを提供する特許には、米国特許第5,225,326号；第5,545,524号；第6,121,489号；および第6,573,043号が挙げられる。これらの参考文献のすべては、全体として参照により本明細書に組み入れられ、当技術分野における類似した参考文献、および本明細書における実施例セクションに提供された情報と共に、特定の実験室にとって都合の良い手順の段階を確立するために用いられうる。

20

30

【0083】

下の表13は、FISHプローブとして使用を見出す追加のBACクローンを示す。

【0084】

(表13)

遺伝子	染色体	参照配列	5' BAC	3' BAC	ペアード
EHF	11p13	NM_012153	RP5-1135K18	RP5-1002E13	2
ELF1	13q14	NM_172373	RP11-88n4	RP11-53f19	
ELF2	4q28	NM_201999.1	RP11-22o8	RP11-375P1	
ELF3	1q32	NM_004433	RP11-25B7	RP11-246J15	
ELF4	Xq25	NM_001421	RP5-875H3	RP4-753P9	
ELF5	11p13	NM_001422.2	RP5-1002E13	RP5-1135K18	2
ELK1	Xp11	NM_005229	RP1-54B20	RP1-306D1	
ELK3	12q22	NM_005230	RP11-69E3	RP11-510I5	
ELK4	1q32	NM_001973.2	RP11-131E5	RP11-249h15	10
ERF	19q13	NM_006494.1	RP11-208I3	RP11-317E13	
ERG	21q22	NM_004449.3	RP11-137J13	RP11-24A11	1
ETS1	11q24	NM_005238.2	RP11-254C5	RP11-112m22	
ETS2	21q22	NM_005239.4	RP11-24A11	RP11-137J13	1
ETV1	7p21	NM_004956.3	RP11-1149J13	RP11-34C22	
ETV2	19q13	NM_014209.1	RP11-32h17	RP11-92j4	
ETV3	1q23	NM_005240.1	RP11-91G5	RP11-1038N13	3
ETV4	17q21	NM_001986.1	RP11-436J4	RP11-100E5	
ETV5	3q27	NM_004454.1	RP11-379C23	RP11-1144N13	
ETV6	12p13	NM_001987.3	RP11-90N7	RP11-59h1	
ETV7	6p21	NM_016135.2	RP3-431A14	RP1-179N16	20
FEV	2q35	NM_017521.2	RP11-316O14	RP11-129D2	
FLI1	11q24	NM_002017.2	RP11-112M22	RP11-75P14	
FLJ16478	1q23	NM_001004341	RP11-91G5	RP11-1038N13	3
SPDEF	6p21	NM_012391.1	RP11-79j23	RP11-119c22	
SPI1	11p11	NM_016135.2	RP11-56e13	RP11-29o22	
SPIB	19q13	NM_003121.2	RP11-510I16	RP11-26P14	
SPIC	12q23	NM_152323.1	RP11-426H24	RP11-938C1	
TMPRSS2	21q22	NM_005656.2	RP11-35C4	RP11-120C17	

【0085】

2.2 マイクロアレイ

異なる種類の生物学的アッセイはマイクロアレイと呼ばれ、限定されるわけではないが、以下が挙げられる：DNAマイクロアレイ(例えば、cDNAマイクロアレイおよびオリゴヌクレオチドマイクロアレイ)；タンパク質マイクロアレイ；組織マイクロアレイ；トランスフェクションまたは細胞マイクロアレイ；化合物マイクロアレイ；および抗体マイクロアレイ。遺伝子チップ、DNAチップ、またはバイオチップとして一般的に知られているDNAマイクロアレイは、発現プロファイリング、または数千個の遺伝子についての発現レベルを同時にモニターすることを目的としてアレイを形成する固体表面(例えばガラス、プラスチック、またはシリコンチップ)へ付着した微視的DNAスポットの収集体である。貼り付けられたDNAセグメントはプローブとして知られ、その数千個が単一のDNAマイクロアレイに用いられうる。マイクロアレイは、疾患細胞および正常細胞における遺伝子発現を比較することにより疾患遺伝子を同定するために用いられうる。マイクロアレイは、限定されるわけではないが、以下を含む様々なテクノロジーを用いて組み立てられうる：鋭く尖ったピンでのスライドガラス上へのプリンティング；あらかじめ作製されたマスクを用いるフォトリソグラフィー；動的マイクロミラーデバイスを用いるフォトリソグラフィー；インクジェットプリンティング；または微小電極アレイ上の電気化学。

【0086】

サザンおよびノーザンブロッティングは、それぞれ、特定のDNAまたはRNA配列を検出するために用いられる。試料から抽出されたDNAまたはRNAを断片化し、マトリックスゲル上で電気泳動的に分離し、膜フィルターへ転写する。フィルターに結合したDNAまたはRNAを、対象となる配列と相補的な標識プローブとのハイブリダイゼーションに供する。フィル

ターに結合した、ハイブリダイズされたプローブを検出する。手順の変形は逆ノーザンブロットであり、膜に貼り付いている基質核酸が、単離されたDNA断片の収集物であり、プローブが組織から抽出され、標識されたRNAである。

【0087】

3. 増幅

ゲノムDNAおよびキメラmRNAの染色体再配列は、検出の前に、または検出と同時に増幅されうる。核酸増幅技術の例証となる非限定的な例には、限定されるわけではないが、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、転写介在増幅(TMA)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、鎖置換増幅(SDA)、および核酸配列に基づいた増幅(NASBA)が挙げられる。当業者は、ある特定の増幅技術(例えば、PCR)はRNAが増幅の前にDNAに逆転写されることを必要とするが(例えば、RT-PCR)、他の増幅技術はRNAを直接的に増幅する(例えば、TMAおよびNASBA)ことを認識していると思われる。

【0088】

一般的にPCRと呼ばれるポリメラーゼ連鎖反応(その全体が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第4,683,195号、第4,683,202号、第4,800,159号、および第4,965,188号)は、標的核酸配列のコピー数を指数関数的に増加させるために、変性、プライマー対の逆鎖へのアニーリング、およびプライマー伸長の複数サイクルを用いる。RT-PCRと呼ばれるバリエーションにおいて、逆転写酵素(RT)がmRNAから相補DNA(cDNA)を生成するために用いられ、その後、cDNAはPCRにより増幅され、DNAの複数コピーを生じる。PCRの他の様々な置換について、例えば、米国特許第4,683,195号、第4,683,202号、および第4,800,159号; Mullis et al., Meth. Enzymol. 155:335 (1987); およびMurakawa et al., DNA 7:287 (1988)(それぞれ、全体として参照により本明細書に組み入れられている)を参照。

【0089】

一般的にTMAと呼ばれる転写介在増幅(例えば、米国特許第5,480,784号および第5,399,491号、それぞれは全体として参照により本明細書に組み入れられている)は、標的配列の複数のRNAコピーが自己触媒的に追加のコピーを生成する実質的に一定の温度、イオン強度、およびpHの条件下で、標的核酸配列の複数コピーを自己触媒的に合成する。例えば、米国特許第5,399,491号および第5,824,518号(それぞれは全体として参照により本明細書に組み入れられている)を参照。米国公開特許第20060046265号(全体として参照により本明細書に組み入れられている)に記載されたバリエーションにおいて、TMAは、任意で、TMA方法感度および精度を向上させるために遮断成分、停止成分、および他の変更成分の使用を組み入れる。

【0090】

一般的にLCRと呼ばれるリガーゼ連鎖反応(全体として参照により本明細書に組み入れられている、Weiss, R., Science 254:1292 (1991))は、標的核酸の隣接領域にハイブリダイズする2セットの相補的なDNAオリゴヌクレオチドを用いる。DNAオリゴヌクレオチドは、熱変性、ハイブリダイゼーション、およびライゲーションの反復サイクルにおいて、DNAリガーゼにより共有結合し、検出可能な二本鎖のライゲーションされたオリゴヌクレオチド産物を生じる。

【0091】

一般的にSDAと呼ばれる鎖置換増幅(Walker, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:392-396 (1992); 米国特許第5,270,184号および第5,455,166号、それぞれは全体として参照により本明細書に組み入れられている)は、対のプライマー配列を標的配列の逆鎖へアニールすること、二重鎖ヘミホスホロチオネート化プライマー伸長産物を生じうるdNTP α Sの存在下におけるプライマー伸長、半修飾化制限エンドヌクレアーゼ認識部位のエンドヌクレアーゼ媒介性ニッキング、ならびに存在する鎖を置換し、プライマーアニーリング、ニッキング、および鎖置換の次のラウンドのための鎖を生じ、結果として、産物の幾何級数的な増幅を生じるためのニックの3'末端からのポリメラーゼ媒介性プライマー伸長のサイクルを用いる。好熱性SDA(tSDA)は、本質的に同じ方法においてより高い温度で好熱性エンドヌクレアーゼおよびポリメラーゼを用いる(欧州特許第0 684 315号)。

【0092】

他の増幅方法には、例えば、以下が挙げられる：一般的にNASBAと呼ばれる、核酸配列に基づいた増幅(全体として参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第5,130,238号)；一般的にQ β レプリカーゼと呼ばれる、プローブ分子自身を増幅するためにRNAレプリカーゼを用いるもの(全体として参照により本明細書に組み入れられている、Lizardi et al., BioTechnol. 6:1197 (1988))；転写に基づいた増幅方法(Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173 (1989))；および自律的配列複製(Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874 (1990)、それぞれは全体として参照により本明細書に組み入れられている)。公知の増幅方法のさらなる考察について、Persing, David H., 「In Vitro Nucleic Acid Amplification Techniques」, Diagnostic Medical Microbiology: Principles and Applications (Persing et al., Eds.), pp. 51-87 (American Society for Microbiology, Washington, DC (1993))を参照。

10

【0093】

4. 検出方法

増幅されていない、または増幅された遺伝子融合核酸は、任意の通常的手段により検出されうる。例えば、遺伝子融合は、検出可能に標識されたプローブとのハイブリダイゼーションおよびその結果生じるハイブリッドの測定により検出されうる。検出方法の例証となる非限定的例は下に記載されている。

【0094】

一つの例証となる検出方法、ハイブリダイゼーションプロテクションアッセイ(HPA)は、化学発光オリゴヌクレオチドプローブ(例えば、アクリジニウムエステル標識(AE)プローブ)を標的配列にハイブリダイズする段階、ハイブリダイズされていないプローブ上に存在する化学発光標識を選択的に加水分解する段階、および照度計において残りのプローブから生じる化学発光を測定する段階を含む。例えば、米国特許第5,283,174号およびNorman C. Nelson et al., Nonisotopic Probing, Blotting and Sequencing, ch. 17 (Larry J. Kricka ed., 2d ed. 1995)を参照(それぞれは全体として参照により本明細書に組み入れられている)。

20

【0095】

もう一つの例証的な検出方法は、リアルタイムでの増幅過程の定量的評価を提供する。「リアルタイム」での増幅過程の評価は、増幅反応中に連続的にまたは定期的にかのいずれかで反応混合物における単位複製配列の量を測定する段階、および測定された値を用いて、試料に最初に存在した標的配列の量を計算する段階を含む。リアルタイム増幅に基づいた、試料に存在する最初の標的配列の量を測定するための様々な方法は当技術分野において周知である。これらには、米国特許第6,303,305号および第6,541,205号(それぞれは全体として参照により本明細書に組み入れられている)に開示された方法が挙げられる。試料に最初に存在する標的配列の量を測定するための方法であるが、リアルタイム増幅に基づいていないもう一つの方法は、全体として参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第5,710,029号に開示されている。

30

【0096】

増幅産物は、大多数がステム-ループ構造を有する様々な自己ハイブリダイズ性プローブの使用を通してリアルタイムに検出されうる。そのような自己ハイブリダイズ性プローブは、プローブが自己ハイブリダイズした状態であるか、または標的配列へのハイブリダイゼーションによって変化した状態かに依存して、それらが異なって検出できるシグナルを放射するように標識される。非限定的例として、「分子トーチ」は、連結領域(例えば非ヌクレオチドリンカー)により接続され、かつ所定のハイブリダイゼーションアッセイ条件下でお互いにハイブリダイズする、自己相補性の別個の領域(「標的結合ドメイン」および「標的閉鎖ドメイン」と呼ばれる)を含む一種の自己ハイブリダイズ性プローブである。好ましい態様において、分子トーチは、長さが1塩基から約20塩基までである、標的結合ドメインにおいて一本鎖塩基領域を含み、鎖置換条件下で増幅反応物に存在する標的配列へのハイブリダイゼーションにとって接近しやすい。鎖置換条件下で、分子トーチ

40

50

の、完全または部分的に相補的でありうる2つの相補的領域のハイブリダイゼーションは、標的結合ドメインに存在する一本鎖領域に結合して標的閉鎖ドメインの全部または一部を置換する標的配列の存在下を除いては、支持される。分子トーチの標的結合ドメインおよび標的閉鎖ドメインは、検出可能な標識、または分子トーチが自己ハイブリダイズした場合、分子トーチが標的配列にハイブリダイズした場合とは異なるシグナルが生じ、それにより、ハイブリダイズされていない分子トーチの存在下で試験試料においてプローブ：標的二重鎖の検出を可能にするように位置したペアの相互作用性標識(例えば、発光/消光剤)を含む。分子トーチおよび相互作用性標識ペアの様々な型は、全体として参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第6,534,274号に開示されている。

【0097】

10

自己相補性を有する検出プローブのもう一つの例は、「分子ビーコン」である。分子ビーコンは、標的相補性配列を有する核酸分子、増幅反応物に存在する標的配列の非存在下においてプローブを閉鎖型立体構造に保持する親和性ペア(または核酸アーム)、およびプローブが閉鎖型立体構造である場合に相互作用する標識ペアを含む。標的配列および標的相補性配列のハイブリダイゼーションは、親和性ペアのメンバーを分離させ、それにより、プローブを開放型立体構造へシフトする。開放型立体構造へのシフトは、例えば、フルオロフォアおよび消光剤(例えば、DABCYLおよびEDANS)でありうる、標識ペアの相互作用の低下により検出できる。分子ビーコンは、全体として参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第5,925,517号および第6,150,097号に開示されている。

【0098】

20

他の自己ハイブリダイズ性プローブは当業者に周知である。非限定的例として、米国特許第5,928,862号(全体として参照により本明細書に組み入れられている)に開示されたもののような相互作用標識を有するプローブ結合ペアは、本発明で用いるのに適応しうる。一塩基多型(SNPs)を検出するために用いられるプローブ系もまた、本発明に利用されうる。さらなる検出系には、全体として参照により本明細書に組み入れられている米国公開特許第20050042638に開示されているような、「分子スイッチ」が挙げられる。インターカレート性色素および/または蛍光色素を含むもののような他のプローブもまた、本発明において増幅産物の検出に有用である。例えば、米国特許第5,814,447号(全体として参照により本明細書に組み入れられている)を参照。

【0099】

30

C. タンパク質検出

本発明の遺伝子融合は、限定されるわけではないが、以下を含む当業者に公知の様々なタンパク質技術を用いて、切り詰められたETSファミリーメンバータンパク質またはキメラタンパク質として検出されうる：タンパク質シーケンシング；およびイムノアッセイ。

【0100】

1. シーケンシング

タンパク質シーケンシング技術の例証となる非限定的例には、限定されるわけではないが、質量分析およびエンドマン分解が挙げられる。

【0101】

40

質量分析は、原理上は、任意のサイズのタンパク質をシーケンシングするが、計算的にはサイズが増加するにつれてより困難になる。タンパク質はエンドプロテアーゼにより消化され、結果として生じる溶液は、高圧液体クロマトグラフィーカラムに通過させる。このカラムの終端において、溶液は、狭いノズルから出て、高陽電位に荷電して、質量分析計ヘスプレーされる。液滴上の電荷は、単一イオンのみが残るまでそれらを断片化させる。ペプチドは、その後、断片化され、断片の質量-電荷比が測定される。質量スペクトルは、コンピューターにより分析され、しばしば、断片の配列を決定するために以前にシーケンシングされたタンパク質のデータベースに対して比較される。その後、その過程は、異なる消化酵素で繰り返され、配列における重複はタンパク質についての配列を構築するために用いられる。

【0102】

50

エドマン分解反応において、シーケンシングされるべきペプチドは固体表面(例えば、ポリブレンでコーティングされたガラス繊維)上へ吸着される。デドマン試薬、フェニルイソチオシアネート(PTC)が、吸着されたペプチドへ12%トリメチルアミンの弱塩基性の緩衝溶液と共に添加され、N末端アミノ酸のアミン基と反応する。末端アミノ酸誘導体は、その後、無水酸の添加により選択的に切り離されうる。誘導体は異性体になって、置換フェニルチオヒダントインを生じるが、それは洗い出されて、クロマトグラフィーにより同定されることができ、そのサイクルが繰り返されうる。各段階の効率、約98%であり、約50個のアミノ酸が信頼性を以て決定されるのを可能にする。

【0103】

2. イムノアッセイ

イムノアッセイの例証となる非限定的例には、限定されるわけではないが、以下が挙げられる：免疫沈降；ウェスタンブロット；ELISA；免疫組織化学；免疫細胞化学；フローサイトメトリー；およびイムノPCR。当業者に公知の様々な技術を用いて検出可能に標識された(例えば、比色性、蛍光性、化学発光性、または放射性)ポリクローナルまたはモノクローナル抗体がイムノアッセイで用いるのに適している。

【0104】

免疫沈降は、抗原を、その抗原に特異的な抗体を用いて溶液から沈降させる技術である。その方法は、細胞抽出物に存在するタンパク質複合体を、複合体中にあると考えられるタンパク質を標的にすることにより、用いられうる。複合体は、プロテインAおよびプロテインGのような最初は細菌から単離された不溶性抗体結合性タンパク質により溶液から引き出される。抗体はまた、溶液から外へ容易に単離されうるセファロースビーズと結合しうる。洗浄後、沈殿物は、質量分析、ウェスタンブロットティング、または複合体中の成分を同定するための他の方法のいくつでも用いて分析されうる。

【0105】

ウェスタンブロットまたはイムノブロットは、組織ホモジネートまたは抽出物の与えられた試料においてタンパク質を検出するための方法である。それは、質量により変性タンパク質を分離するためにゲル電気泳動を用いる。タンパク質はその後、ゲルから、典型的にはポリビニルジフルオリドまたはニトロセルロース膜上へ転写され、そこで、それらは対象となるタンパク質に特異的な抗体を用いて探索される。結果として、研究者は、与えられた試料においてタンパク質の量を調べ、いくつかの群間でレベルを比較することができる。

【0106】

酵素結合免疫吸着アッセイの省略形のELISAは、試料において抗体または抗原の存在を検出するための生化学的技術である。それは最低限の2つの抗体を利用し、その1つは抗原に特異的であり、他方は酵素に結合している。第二抗体は、色素生産性または蛍光発生性基質にシグナルを生じさせる。ELISAのバリエーションには、サンドイッチELISA、競合的ELISA、およびELISPOTが挙げられる。ELISAは試料において抗原の存在かまたは抗体の存在かのいずれかを評価するために行われうるため、それは、血清抗体濃度を測定するにとっても、およびまた抗原の存在を検出するにとっても有用なツールである。

【0107】

免疫組織化学および免疫細胞化学は、組織または細胞における抗原の、それらのそれぞれの抗体への結合の原理によって、それぞれ、組織切片または細胞においてタンパク質の位置を特定する方法を指す。可視化は、抗体を発色タグまたは蛍光タグでタグを付けることにより可能にされる。色タグの典型的な例には、限定されるわけではないが、西洋ワサビペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼが挙げられる。フルオロフォアタグの典型的な例には、限定されるわけではないが、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)またはフィコエリトリン(PE)が挙げられる。

【0108】

フローサイトメトリーは、液体の流れに懸濁した微視的粒子を数える、調べる、および選別するための技術である。それは、光学的/電子的検出装置を通して流れる単細胞の物

10

20

30

40

50

理的および/または化学的特性の同時的多パラメーター的分析を可能にする。単一周波数または色の光(例えば、レーザー)ビームが、流体力学的に集中された液体流上へ向けられる。いくつかの検出器は、流れが光ビームを通過する地点に照準される;光ビームと一致した1種(前方散乱)、およびそれと直角をなす数種(側方散乱(SSC)またはFSC)、および1種または複数の蛍光の検出器。ビームを通過する各懸濁粒子は、どうかして光を散乱させ、粒子中の蛍光化学物質は、励起されて、光源より低い周波数の光を放射しうる。散乱光および蛍光の組み合わせは、検出器によって捉えられ、各検出器における輝度、各蛍光放射ピークについてのもの、の変動を分析することにより、各個々の粒子の物理的および化学的構造について様々な事実を推定することが可能である。FSCは細胞容積と関連し、SSCは粒子の密度または内部複雑性(例えば、核の形、細胞質顆粒の型、または膜粗度)と関連する。

10

【0109】

免疫ポリメラーゼ連鎖反応(IPCR)は、抗体に基づいたイムノアッセイにおいてシグナル発生を増加させるために核酸増幅技術を利用する。PCRのタンパク質等価が存在しない、すなわち、タンパク質は、核酸がPCR中に複製されるのと同じ様式で複製されることができないため、検出感度を増加させる唯一の方法は、シグナル増幅による。標的タンパク質は、オリゴヌクレオチドに直接的または間接的に結合している抗体に結合する。結合していない抗体は洗い流され、残りの結合した抗体が増幅されたそれらのオリゴヌクレオチドを有する。タンパク質検出は、リアルタイム方法を含む標準核酸検出方法を用いる増幅されたオリゴヌクレオチドの検出を介して生じる。

20

【0110】

D. データ分析

いくつかの態様において、コンピューターに基づいた分析プログラムは、検出アッセイにより生じた生データ(例えば、所定のマーカーの存在、非存在、または量)を臨床医のための予測値のデータへ翻訳するために用いられる。臨床医は、任意の適切な手段を用いて予測値を評価できる。従って、いくつかの好ましい態様において、本発明は、遺伝学または分子生物学の教育を受けている可能性が高くない臨床医が、生データを理解する必要がないというさらなる恩恵を提供する。データは、臨床医にその最も有用な形で直接的に提示される。その後、臨床医は、被験体の治療を最適化するためにすぐに情報を利用することができる。

30

【0111】

本発明は、アッセイを行う実験室、情報提供者、医療関係者、および被験体との往復で、情報を受信する、処理する、および発信する能力がある任意の方法を企図する。例えば、本発明のいくつかの態様において、試料(例えば、生検、または血清もしくは尿試料)は被験体から採取され、生データを作成するために、世界のどこに位置しようが(例えば、被験体が居住する、または情報が最終的に用いられる国とは異なる国に)、プロファイリングサービス(例えば、医療施設における臨床検査室、ゲノムプロファイリング企業など)へ付託される。試料が組織または他の生体試料を含む場合、被験体は、試料を採取され、プロファイリングセンターへ送るために医療センターを訪れてもよい、または被験体は試料(例えば、尿試料)を自ら収集し、それをプロファイリングセンターへ直接送ってもよい。試料が以前に測定された生物学的情報を含む場合、情報は、被験体によりプロファイリングサービスへ直接、送ってもよい(例えば、情報を含む情報カードは、コンピューターによりスキャンされ、データが電子通信システムを用いてプロファイリングセンターのコンピューターへ送信されうる)。いったんプロファイリングサービスに受領されたならば、試料は処理され、被験体にとって望まれる診断的または予後の情報に特異的なプロファイルが作成される(すなわち、発現データ)。

40

【0112】

その後、プロファイルデータは、処置を行う臨床医による解釈に適した形式に整えられる。例えば、生発現データを提供するよりむしろ、整えられた形式は、被験体についての診断またはリスク評価(例えば、癌が存在していることの可能性)を特定の処置選択肢につ

50

いての推奨と共に提示されうる。データは、任意の適切な方法により臨床医に示されうる。例えば、いくつかの態様において、プロファイリングサービスは、臨床医のために印刷されうる(例えば、治療の時点で)、またはコンピューターモニター上で臨床医に示されうる報告を作成する。

【0113】

いくつかの態様において、情報は、治療の時点で、または地方の施設において、最初に分析される。その後、生データはさらなる分析のために、および/または臨床医もしくは患者に有用な情報へ生データを変換するために、中央処理施設へ送られる。中央処理施設は、データ分析のプライバシー(全データは統一セキュリティプロトコルを以て中央施設に保存される)、速さ、および均一性の利点を提供する。中央処理施設は、その後、被験体の処置後のデータの行方を管理することができる。例えば、電子通信システムを用いて、中央施設は、臨床医、被験体、または研究者へデータを提供することができる。

10

【0114】

いくつかの態様において、被験体は、電子通信システムを用いてデータに直接、アクセスすることができる。被験体は、その結果に基づいてさらなる治療介入またはカウンセリングを選択しうる。いくつかの態様において、データは、研究用途に用いられる。例えば、データは、疾患の特定の状態または病期の有用な指標としてのマーカーの包含または排除をさらに最適化するために用いられうる。

【0115】

E. インビボイメージング

20

本発明の遺伝子融合はまた、限定されるわけではないが、以下を含むインビボイメージング技術を用いて検出されうる：放射性核種イメージング；陽電子放出断層撮影法(PET)；コンピューター体軸断層撮影法；X線または磁気共鳴映像法；蛍光検出；および化学発光検出。いくつかの態様において、インビボイメージング技術は、動物(例えば、ヒトまたは非ヒド哺乳動物)において癌マーカーの存在または発現を可視化するために用いられる。例えば、いくつかの態様において、癌マーカーmRNAまたはタンパク質は、癌マーカーに特異的な標識抗体を用いて標識される。特異的に結合し、かつ標識された抗体は、限定されるわけではないが、放射性核種イメージング、陽電子放出断層撮影法、コンピューター体軸断層撮影法、X線または磁気共鳴映像法、蛍光検出、および化学発光検出を含むインビボイメージング方法を用いて個体において検出されうる。本発明の癌マーカーに対する抗体を作製するための方法は下に記載されている。

30

【0116】

本発明のインビボイメージング方法は、本発明の癌マーカーを発現する癌(例えば、前立腺癌)の診断に有用である。インビボイメージングは、癌を示すマーカーの存在を可視化するために用いられる。そのような技術は、不快な生検の使用なしで診断を可能にする。本発明のインビボイメージング方法はまた、癌患者へ予後を提供するのに有用である。例えば、転移する可能性の高い癌を示すマーカーの存在が検出されうる。本発明のインビボイメージング方法はさらに、身体の他の部分において転移性癌を検出するために用いられうる。

【0117】

40

いくつかの態様において、本発明の癌マーカーに特異的な試薬(例えば、抗体)は蛍光標識される。標識抗体は、被験体へ導入される(例えば、経口で、または非経口で)。蛍光標識抗体は、任意の適切な方法を用いて(例えば、参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第6,198,107号に記載された装置を用いて)検出される。

【0118】

他の態様において、抗体は放射性標識される。インビボ診断のための抗体の使用は、当技術分野において周知である。Sumerdonら(Nucl. Med. Biol. 17:247-254 [1990])は、標識としてインジウム-111を用いる腫瘍の放射免疫シンチグラフィックイメージングについての最適化抗体-キレート剤を記載している。Griffinら(J Clin Onc 9:631-640 [1991])は、再発性結腸直腸癌を有するのではないかと疑われる患者で腫瘍を検出するにおけるこ

50

の作用物質の使用を記載している。磁気共鳴映像法のための標識と類似した常磁性イオンを含む作用物質の使用は、当技術分野において公知である(Lauffer, Magnetic Resonance in Medicine 22:339-342 [1991])。用いられる標識は、選択されるイメージング様式に依存する。インジウム-111、テクネチウム-99m、またはヨード-131のような放射性標識は、平面スキャンまたは単光子放出コンピューター断層撮影法(SPECT)について用いられる。フッ素-19のような陽電子放出型標識もまた、陽電子放出断層撮影法(PET)に用いられる。MRIについて、ガドリニウム(III)またはマンガン(II)のような常磁性イオンが用いられる。

【0119】

スカンジウム-47(3.5日間)、ガリウム-67(2.8日間)、ガリウム-68(68分間)、テクネチウム-99m(6時間)、およびインジウム-111(3.2日間)のような1時間から3.5日までの範囲である半減期をもつ放射性金属は、抗体への結合に利用できるが、そのうち、ガリウム-67、テクネチウム-99m、およびインジウム-111は γ カメライメージングに好ましく、ガリウム-68は陽電子放出断層撮影法に好ましい。

【0120】

そのような放射性金属で抗体を標識する有用な方法は、例えば、In-111およびTc-99mについてKhawら(Science 209:295 [1980])により、およびScheinbergら(Science 215:1511 [1982])により記載されているように、ジエチレントリアミンペンタ酢酸(DTPA)のような二官能性キレート剤を用いる。他のキレート剤もまた用いることができるが、1-(p-カルボキシメトキシベンジル)EDTAおよびDTPAの無水カルボキシ炭酸は、それらの使用が抗体の免疫反応性に実質的に影響を及ぼすことなく結合を可能にするため、有利である。

【0121】

DTPAをタンパク質へ結合するためのもう一つの方法は、アルブミンのIn-111での標識についてだが、抗体の標識に適応しうるHnatowichら(Int. J. Appl. Radiat. Isot. 33:327 [1982])により記載されているように、DTPAの環状無水物の使用による。DTPAとのキレート化を用いない、抗体をTc-99mで標識する適切な方法は、Crockfordら(参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第4,323,546号)の予備ハンダ付け(pretinning)方法である。

【0122】

免疫グロブリンをTc-99mで標識する好ましい方法は、血漿タンパク質についてWongら(Int. J. Appl. Radiat. Isot., 29:251 [1978])により記載されたものであり、最近、抗体を標識することについてWongら(J. Nucl. Med., 23:229 [1981])によって適用するのに成功した。

【0123】

特異的抗体に結合した放射性金属の場合、できる限り高い比率の放射性標識を抗体分子へその免疫特異性を破壊することなく導入することが同様に望ましい。さらなる改善は、抗体上の抗原結合部位が保護されるのを保証するために、本発明の特定の癌マーカーの存在下で放射標識を実施することにより達成されうる。抗原は標識後、切り離される。

【0124】

なおさらなる態様において、インビボバイオフォトニックイメージング(Xenogen, Alameda, CA)がインビボイメージングに利用される。このリアルタイムインビボイメージングはルシフェラーゼを利用する。ルシフェラーゼ遺伝子は、細胞、微生物、および動物へ取り込まれる(例えば、本発明の癌マーカーとの融合タンパク質として)。活性である時、それは光を放射する反応へ導く。CCDカメラおよびソフトウェアは、イメージを捕捉し、それを分析するために用いられる。

【0125】

F. 組成物およびキット

本発明の診断方法で用いる組成物は、限定されるわけではないが、プローブ、増幅オリゴヌクレオチド、および抗体を含む。特に好ましい組成物は、ARGがETSファミリーメンバー遺伝子に融合する場合のみ産物を検出する。これらの組成物は以下を含む：ARGの転写

10

20

30

40

50

制御領域由来の5'部分がETSファミリーメンバー遺伝子由来の3'部分に融合する接合部にハイブリダイズする(すなわち、遺伝子融合接合部にまたがる)配列を含む単一の標識プローブ；第一増幅オリゴヌクレオチドがARGの転写制御領域にハイブリダイズする配列を含み、かつ第二増幅オリゴヌクレオチドがETSファミリーメンバー遺伝子にハイブリダイズする配列を含む、1対の増幅オリゴヌクレオチド；ARGの転写制御領域のETSファミリーメンバー遺伝子への融合に起因するアミノ末端が切り詰められたETSファミリーメンバータンパク質に対する抗体；またはARGの転写制御領域由来のアミノ末端部分およびETSファミリーメンバー遺伝子由来のカルボキシ末端部分を有するキメラタンパク質に対する抗体。

【0126】

しかしながら、他の有用な組成物は以下を含む：第一標識プローブがARGの転写制御領域にハイブリダイズする配列を含み、かつ第二標識プローブがETSファミリーメンバー遺伝子にハイブリダイズする配列を含む、1対の標識プローブ。

【0127】

単独で、または本発明の他の組成物と組み合わせての、これらの組成物のいずれかがキットの形で提供されうる。例えば、単一の標識プローブおよび増幅オリゴヌクレオチドの対は、本発明の遺伝子融合の増幅および検出のためのキットにおいて提供されうる。キットはさらに、適切な対照および/または検出試薬を含みうる。

【0128】

本発明のプローブおよび抗体組成物はまた、アレイの形で提供されうる。

【0129】

IV. 予後診断適用

本発明の開発の経過中に行われた実験は、本発明の遺伝子融合と前立腺癌をもつ患者の予後の間の密接な相関を実証した(例えば、下の実施例5参照)。特に、融合がTMPRSS2とERGの間にあるゲノムDNAの欠失に起因する症例において、癌細胞がより攻撃的な表現型を呈することが見出されている。従って、いくつかの態様において、介在DNAの欠失があるTMPRSS2とERGの間の遺伝子融合を検出する能力があるアッセイが、予後を提供し、医師が適切な治療戦略を決定するのを助けるために用いられる。例えば、いくつかの態様において、この特定の再配列を有する腫瘍をもつ患者は、彼らの予後はその再配列を欠く患者より有意に悪いため、より集中的に処置される。

【0130】

任意のアッセイが、上で考察された型の再配列(例えば、上で記載されたもの)を有する細胞が存在するかどうかを決定するために用いられうる。

【0131】

本発明は、最も好ましくは、前立腺癌患者についての予後を得ることに関連して用いられるが、他の上皮細胞腫瘍もまた調べることができ、本明細書に記載されたアッセイおよびプローブは、これらの腫瘍由来の癌性細胞が、それらを特に攻撃的にさせる可能性が高い、すなわち、侵襲性および転移性である可能性が高い、再配列を有するかどうかを決定するのに用いられうる。この手順を用いて特徴付けられうる腫瘍の例には、乳房、肺、結腸、卵巣、子宮、食道、胃、肝臓、腎臓、脳、皮膚、および筋肉の腫瘍が挙げられる。アッセイはまた、細胞系および動物モデルにおいてこれらの癌を研究する研究者にとって価値がある。

【0132】

本発明の開発の経過中に行われたさらなる実験は、染色体欠失が、欠失した領域に位置する1つまたは複数の遺伝子の発現の喪失があるかどうかを決定するために試料をアッセイすることにより検出されうることを実証した。例えば、TMPRSS2とERGの間に融合を形成するにおいて、典型的には、約2.8メガベースのゲノムDNAが欠失し、これが起こった時、この領域にある少なくとも4つの遺伝子が失われる。これらは、ETS2遺伝子、WRB遺伝子、PCP4遺伝子、およびMX1遺伝子である。癌性前立腺細胞におけるこれらのうちの1つまたは複数の減少が不良な予後を示唆する。

【0133】

従って、いくつかの態様において、本発明は、少なくとも第一および第二プローブを用いてFISHアッセイを行う段階であって、第一プローブが少なくとも15ヌクレオチド長(例えば、少なくとも15、20、35など)である；第一蛍光標識に結合している；および、第一配列がアンドロゲン応答性遺伝子(例えば、TMPRSS2遺伝子)またはETSファミリー遺伝子(例えば、ERG遺伝子、ETV1遺伝子、またはETV4遺伝子)のいずれかの少なくとも一部を含む、ヒトゲノムにおいて第一配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする；ならびに第二プローブが少なくとも15ヌクレオチド長である；第一蛍光標識とは異なる第二蛍光標識に結合している；および、第一配列とは異なり、かつアンドロゲン応答性遺伝子(例えば、TMPRSS2遺伝子)またはETSファミリー遺伝子(例えば、ERG遺伝子、ETV1遺伝子、またはETV4遺伝子)の少なくとも一部を含む第二配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、段階を含む、癌関連再配列を示す染色体DNAの欠失について上皮細胞をアッセイする方法を提供する。

10

【0134】

さらなる態様において、本発明は、上皮細胞の検査試料を得る段階；限定されるわけではないが、ETS2；WRB；PCP4；およびMX1を含む群より選択される1つまたは複数の遺伝子の発現のレベルを測定するように上皮細胞の試料をアッセイする段階；段階b)で測定された発現レベルを対照試料におけるレベルと比較する段階；および検査試料における遺伝子について測定された発現のレベルが対照試料についてのそれより低い場合には、欠失が起きていると結論づける段階を含む、癌関連再配列を示すゲノムDNAの欠失について上皮細胞(例えば、前立腺細胞)をアッセイするための方法を提供する。

20

【0135】

V. 薬物スクリーニング適用

いくつかの態様において、本発明は、薬物スクリーニングアッセイ(例えば、抗癌薬についてスクリーニングするための)を提供する。本発明のスクリーニング方法は、本発明の方法を用いて同定された癌マーカー(例えば、限定されるわけではないが、TMPRSS2とERG、ETV1、ETV4、およびFLI1遺伝子融合を含む)を利用する。例えば、いくつかの態様において、本発明は、癌マーカー遺伝子の発現を変化させる(例えば、減少させる)化合物についてスクリーニングする方法を提供する。化合物または作用物質は、例えば、プロモーター領域と相互作用することにより転写に干渉しうる。化合物または作用物質は、融合から生じたmRNAに干渉しうる(例えば、RNA干渉、アンチセンステクノロジーなどにより)。化合物または作用物質は、融合の生物活性の上流または下流である経路に干渉しうる。いくつかの態様において、候補化合物は、癌マーカーに対して向けられるアンチセンスまたは干渉RNA剤(例えば、オリゴヌクレオチド)である。他の態様において、候補化合物は、本発明の癌マーカー制御因子もしくは発現産物に特異的に結合し、かつその生物学的機能を阻害する抗体または小分子である。

30

【0136】

一つのスクリーニング方法において、候補化合物は、癌マーカーを発現する細胞と化合物を接触させ、その後、候補化合物の発現への効果についてアッセイすることにより、癌マーカー発現を変化させるそれらの能力について評価される。いくつかの態様において、候補化合物の癌マーカー遺伝子の発現への効果は、細胞により発現する癌マーカーmRNAのレベルを検出することによりアッセイされる。mRNA発現は、任意の適切な方法により検出されうる。他の態様において、候補化合物の、癌マーカー遺伝子の発現への効果は、癌マーカーによりコードされるポリペプチドのレベルを測定することによりアッセイされる。発現したポリペプチドのレベルは、限定されるわけではないが、本明細書に開示されたものを含む任意の適切な方法を用いて測定されうる。

40

【0137】

具体的には、本発明は、本発明の癌マーカーに結合する、例えば癌マーカー発現もしくは癌マーカー活性、へ阻害(または刺激)効果を生じる、または、例えば癌マーカー基質の発現もしくは活性、へ刺激もしくは阻害効果を生じる、モジュレーター、すなわち、候補もしくは試験化合物または作用物質(例えば、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣体、

50

ペプチド、小分子、または他の薬物)を同定するためのスクリーニング方法を提供する。このように同定された化合物は、治療プロトコルにおいて標的遺伝子(例えば、癌マーカー遺伝子)産物の活性を直接的かまたは間接的にかのいずれかで調節するために、標的遺伝子産物の生物学的機能を詳しく述べるために、または正常な標的遺伝子相互作用を乱す化合物を同定するために、用いられうる。癌マーカーの活性または発現を阻害する化合物は、増殖性障害、例えば、癌、特に前立腺癌、の処置において有用である。

【0138】

一つの態様において、本発明は、癌マーカータンパク質もしくはポリペプチド、またはその生物活性部分の基質である候補または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。もう一つの態様において、本発明は、癌マーカータンパク質もしくはポリペプチドまたはその生物活性部分に結合する、または癌マーカータンパク質もしくはポリペプチドまたはその生物活性部分の活性を調節する、候補または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。

10

【0139】

本発明の試験化合物は、生物学的ライブラリー；ペプチドライブラリー(ペプチドの機能性を有するが、酵素分解に抵抗性であるがそれにもかかわらず生物活性を保持する新規な非ペプチドバックボーンをもつ分子のライブラリー；例えば、Zuckennann et al., J. Med. Chem. 37:2678-85 [1994]参照)；空間的アドレス可能な並列固相または溶液相ライブラリー；逆重畳積分を必要とする合成ライブラリー方法；「1ビーズ1化合物」ライブラリー方法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー方法を含む当技術分野において公知のコンビナトリアルライブラリー方法における多数のアプローチのいずれかを用いて得られうる。生物学的ライブラリーおよびペプチドライブラリーアプローチは、ペプチドライブラリーと共に用いるのに好ましいが、他の4つのアプローチは、化合物のペプチド、非ペプチドオリゴマー、または小分子ライブラリーに適用できる(Lam (1997) Anticancer Drug Des. 12:145)。

20

【0140】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、当技術分野において、例えば、以下に見出されうる：DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6909 [1993]；Erb et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422 [1994]；Zuckermann et al., J. Med. Chem. 37:2678 [1994]；Cho et al., Science 261:1303 [1993]；Carrell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059 [1994]；Carrell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061 [1994]；およびGallop et al., J. Med. Chem. 37:1233 [1994]。

30

【0141】

化合物のライブラリーは、溶液中に(例えば、Houghten, Biotechniques 13:412-421 [1992])、またはビーズ(Lam, Nature 354:82-84 [1991])、チップ(Fodor, Nature 364:555-556 [1993])、細菌もしくは孢子(米国特許第5,223,409号；参照により本明細書に組み入れられている)、プラスミド(Cull et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865-1869 [1992])上に、またはファージ(Scott and Smith, Science 249:386-390 [1990]；Devlin Science 249:404-406 [1990]；Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87:6378-6382 [1990]；Felici, J. Mol. Biol. 222:301 [1991])上に提示されうる。

40

【0142】

一つの態様において、アッセイは、癌マーカーmRNAもしくはタンパク質またはその生物活性部分を発現する細胞を試験化合物と接触させ、試験化合物の、癌マーカーの活性を調節する能力を測定する、細胞に基づいたアッセイである。試験化合物の、癌マーカー活性を調節する能力を測定することは、例えば、酵素活性における変化、mRNAの破壊などをモニターすることにより達成されうる。

【0143】

化合物、例えば、癌マーカー基質またはモジュレーター、への癌マーカーの結合を調節する試験化合物の能力もまた評価されうる。これは、例えば、化合物、例えば基質、の癌マーカーへの結合が複合体において標識された化合物、例えば基質、を検出することによ

50

り測定されうるように、化合物、例えば基質、を放射性同位元素または酵素標識と結合させることにより、達成されうる。

【0144】

または、癌マーカーは、複合体における癌マーカーの癌マーカー基質への結合を調節する試験化合物の能力をモニターするために、放射性同位元素または酵素標識と結合する。例えば、化合物(例えば、基質)は、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^3H で、直接的にかまたは間接的にかのいずれかで標識され、放射性同位元素は、放射線放射の直接的カウンティングにより、またはシンチレーションカウンティングにより検出されうる。または、化合物は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素的に標識され、酵素標識が、適切な基質の生成物への変換の測定により検出されう

10

【0145】

化合物(例えば、癌マーカー基質)の癌マーカーと相互作用する能力は、その反応体のいずれかの標識の有無に関わらず、評価されうる。例えば、マイクロフィジオメーターが、化合物の癌マーカーとの相互作用を、化合物も癌マーカーもどちらの標識も無しで、検出するために用いられうる(McConnell et al., Science 257:1906-1912 [1992])。本明細書に用いられる場合、「マイクロフィジオメーター」(例えば、Cytosensor)は、細胞がその環境を酸性化する速度を光アドレス電位差測定センサー(light-addressable potentiometric sensor)(LAPS)を用いて測定する分析装置である。この酸性化速度における変化は、化合物と癌マーカーの間の相互作用の指標として用いられうる。

20

【0146】

さらにもう一つの態様において、癌マーカータンパク質またはその生物活性部分を試験化合物に接触させ、試験化合物の癌マーカータンパク質、mRNA、またはその生物活性部分に結合する能力が評価される、無細胞アッセイが提供される。本発明のアッセイで用いられうる癌マーカーまたはmRNAの好ましい生物活性部分は、基質または他のタンパク質との相互作用に関与する断片、例えば、高い表面確率スコアをもつ断片、を含む。

【0147】

無細胞アッセイは、標的遺伝子タンパク質および試験化合物の反応混合物を、2つの成分が相互作用して結合し、それに従って、取り出しおよび/または検出されうる複合体を形成するのを可能にするのに十分な条件下および時間で調製することを含む。

30

【0148】

2つの分子間の相互作用はまた、例えば、蛍光エネルギー移動(FRET)を用いて、検出されうる(例えば、Lakowicz et al., 米国特許第5,631,169号; Stavrianopoulos et al., 米国特許第4,968,103号参照; それぞれは参照により本明細書に組み入れられている)。フルオロフォア標識は、第一ドナー分子の放出した蛍光エネルギーが第二の「アクセプター」分子上の蛍光標識により吸収され、その蛍光標識が立ち代わって、吸収されたエネルギーにより蛍光を発することができるよう、選択される。

【0149】

または、「ドナー」タンパク質分子は、単に、トリプトファン残基の自然蛍光エネルギーを利用しうる。「アクセプター」分子標識が「ドナー」のそれと識別されうるように異なる波長の光を放射する標識が選択される。標識間のエネルギー移動の効率は、分子を分離する距離に関連しているため、分子間の空間的關係が評価されうる。結合が分子間で起きる状況において、「アクセプター」分子標識の蛍光放射が最大になるはずである。FRET結合事象は、当技術分野において周知の標準蛍光検出手段を通して(例えば、蛍光計を用いて)便利に測定されうる。

40

【0150】

もう一つの態様において、癌マーカータンパク質またはmRNAの標的分子に結合する能力を測定することは、リアルタイム生体分子相互作用分析(BIA)を用いて達成されうる(例えば、Sjolander and Urbaniczky, Anal. Chem. 63:2338-2345 [1991]およびSzabo et al., Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705 [1995]参照)。「表面プラズモン共鳴」または「

50

BIA」は、反応体のいずれをも標識することなく、生体特異的相互作用をリアルタイムに検出する(例えば、BIAcore)。結合表面における質量の変化は、結果として、表面近くでの光の屈折率の変化を生じ(表面プラズモン共鳴(SPR)の光学現象)、それが結果として、生物学的分子間のリアルタイム反応の表示として用いられうる検出可能なシグナルを生じる。

【0151】

一つの態様において、標的遺伝子産物または試験物質は、固相上に繋ぎとめられる。固相上に繋ぎとめられた標的遺伝子産物/試験化合物複合体は、反応の終わりに検出される。好ましくは、標的遺伝子産物が固相上に繋ぎとめられうる、かつ試験化合物(繋ぎとめられていない)は、本明細書に考察された検出可能な標識で直接的にかまたは間接的に

10

【0152】

癌マーカー、抗癌マーカー抗体、またはその標的分子を固定することが、そのタンパク質の一方または両方の非複合体化型から複合体化型の分離を容易にするために、加えてアッセイの自動化に適応させるために、望ましくありうる。試験化合物の癌マーカータンパク質への結合、または候補化合物の存在下および非存在下における癌マーカータンパク質の標的分子との相互作用は、反応物を含むのに適した任意の容器内で達成されうる。そのような容器の例には、マイクロタイタープレート、試験管、および微小遠心管が挙げられる。一つの態様において、タンパク質の一方または両方がマトリックスに結合するのを可能にするドメインを付加する融合タンパク質が提供されうる。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ-癌マーカー融合タンパク質またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ/標的融合タンパク質は、グルタチオンセファロースビーズ(Sigma Chemical, St. Louis, MO)またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着されることができ、その後、それは、試験化合物、または試験化合物および非吸着標的タンパク質かもしくは癌マーカータンパク質のいずれかと結合し、混合物は、複合体形成の助けとなる条件下で(例えば、塩およびpHについての生理学的状態で)インキュベートされる。インキュベーション後、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルは、いずれの非結合成分も除去するために洗浄され、ビーズの場合マトリックスは固定され、複合体は、例えば上記のように、直接的にかまたは間接的にかのいずれかで測定される。

20

【0153】

または、複合体は、マトリックスから解離され、癌マーカー結合または活性のレベルが標準技術を用いて測定されうる。癌マーカータンパク質かまたは標的分子かのいずれかをマトリックス上に固定するための他の技術には、ビオチンおよびストレプトアビジンの結合を用いることが挙げられる。ビオチン化癌マーカータンパク質または標的分子は、当技術分野において公知の技術(例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals, Rockford, IL)を用いてビオチン-NHS(N-ヒドロキシ-スクシンイミド)から調製され、ストレプトアビジンコーティング化96ウェルプレート(Pierce Chemical)のウェルに固定されうる。

30

【0154】

アッセイを行うために、非固定化成分は、繋ぎとめられた成分を含むコーティング化表面へ加えられる。反応が完了した後に、反応していない成分は、いずれの形成された複合体も固体表面上に固定されたままであるような条件下で除去される(例えば、洗浄により)。固相表面上に繋ぎとめられた複合体の検出は、いくつかの方法で達成されうる。前もって固定されていない成分があらかじめ標識されている場合、表面上に固定された標識の検出は、複合体が形成されたことを示す。前もって固定されていない成分があらかじめ標識されていない場合、間接的標識が、表面上に繋ぎとめられた複合体を検出するために用いられうる；例えば、固定化成分に特異的な標識抗体を用いて(抗体は、立ち代わって、例えば、標識抗IgG抗体で直接的に標識されうる、または間接的に標識されうる)。

40

【0155】

このアッセイは、癌マーカータンパク質または標的分子に反応性であるが、癌マーカータンパク質のその標的分子への結合に干渉しない抗体を利用して行われる。そのような抗

50

体は、プレートのウェルへ誘導体化され、結合していない標的または癌マーカータンパク質は抗体結合によりウェルに捕捉されうる。GST固定化複合体について上で記載されたものに加えて、そのような複合体を検出するための方法には、癌マーカータンパク質または標的分子に反応性の抗体を用いる複合体の免疫検出、および癌マーカータンパク質または標的分子に関連した酵素活性を検出することに頼る酵素結合アッセイが挙げられる。

【0156】

または、無細胞アッセイは、液相で行われうる。そのようなアッセイにおいて、反応生成物は、限定されるわけではないが、以下を含むいくつかの標準技術のいずれかにより、未反応成分から分離される：分画遠心法(例えば、Rivas and Minton, Trends Biochem Sci 18:284-7 [1993]参照)；クロマトグラフィー(ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー)；電気泳動(例えば、Ausubel et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology 1999, J. Wiley: New York参照)；および免疫沈降(例えば、Ausubel et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology 1999, J. Wiley: New York参照)。そのような樹脂およびクロマトグラフィー技術は当業者に公知である(例えば、Heegaard J. Mol. Recognit 11:141-8 [1998]；Hageand Tweed J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl 699:499-525 [1997]参照)。さらに、蛍光エネルギー移動もまた、溶液からの複合体のさらなる精製なしに結合を検出するために、本明細書に記載されているように、便利に利用されうる。

【0157】

アッセイは、癌マーカータンパク質、mRNA、またはその生物活性部分を、癌マーカーを結合してアッセイ混合物を形成する既知の化合物と接触させる段階、アッセイ混合物を試験化合物と接触させる段階、および癌マーカータンパク質またはmRNAと相互作用する試験化合物の能力を測定する段階を含み、癌マーカータンパク質またはmRNAと相互作用する試験化合物の能力を測定する段階が、既知の化合物と比較して、癌マーカーもしくはその生物活性部分に優先的に結合する、または標的分子の活性を調節する、試験化合物の能力を測定する段階を含む。

【0158】

癌マーカーがインビボでタンパク質のような1つもしくは複数の細胞または細胞外高分子と相互作用できる範囲内において、そのような相互作用のインヒビターは有用である。均一なアッセイはインヒビターを同定するために用いられうる。

【0159】

例えば、標的遺伝子産物および相互作用的な細胞または細胞外結合パートナー産物のあらかじめ形成された複合体は、標的遺伝子産物またはそれらの結合パートナーのいずれかが標識されるが、標識により生じるシグナルが複合体形成により消されるように調製される(例えば、イムノアッセイについてこのアプローチを利用する、参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第4,109,496号を参照)。あらかじめ形成された複合体由来の種の1つと競合して、置換する試験物質の添加は、結果として、バックグラウンドを超えるシグナルの発生を生じる。このようにして、標的遺伝子産物-結合パートナー相互作用を乱す試験物質が同定されうる。または、癌マーカータンパク質は、癌マーカーに結合する、または相互作用して、癌マーカー活性に関与する他のタンパク質(「癌マーカー結合タンパク質」または「癌マーカー-bp」)を同定するために、ツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイ(例えば、米国特許第5,283,317号；Zervos et al., Cell 72:223-232 [1993]；Madura et al., J. Biol. Chem. 268:12046-12054 [1993]；Bartel et al., Biotechniques 14:920-924[1993]；Iwabuchi et al., Oncogene 8:1693-1696[1993]；およびBrent WO 94/10300参照；それぞれは参照により本明細書に組み入れられている)において「おとりタンパク質」として用いられうる。そのような癌マーカー-bpは、癌マーカータンパク質もしくは、例えば、癌マーカー媒介性シグナル伝達経路の下流エレメントのような標的によるシグナルのアクチベーターまたはインヒビターでありうる。

【0160】

癌マーカー発現のモジュレーターもまた同定されうる。例えば、細胞混合物または無細胞

10

20

30

40

50

胞混合物を、候補化合物と接触させ、癌マーカーmRNAまたはタンパク質の発現を、候補化合物の非存在下における癌マーカーmRNAまたはタンパク質の発現のレベルと比較して評価する。癌マーカーmRNAまたはタンパク質の発現が、候補化合物の存在下において、その非存在下においてより多い場合、候補化合物は、癌マーカーmRNAまたはタンパク質発現の刺激剤と同定される。または、癌マーカーmRNAまたはタンパク質の発現が、候補化合物の存在下において、その非存在下においてより少ない(すなわち、統計学的に有意に、より少ない)場合、候補化合物は、癌マーカーmRNAまたはタンパク質発現のインヒビターと同定される。癌マーカーmRNAまたはタンパク質発現のレベルは、癌マーカーmRNAまたはタンパク質を検出するための本明細書に記載された方法により測定されうる。

【0161】

10

調節剤は、細胞に基づいた、または無細胞アッセイを用いて同定され、癌マーカータンパク質の活性を調節する作用物質の能力は、インビボで、例えば、疾患についての動物モデルのような動物(例えば、前立腺癌もしくは転移性前立腺癌をもつ動物；または動物(例えば、ヒト)由来の前立腺癌の異種移植片、もしくは前立腺癌の転移(例えば、リンパ節、骨、または肝臓への)に起因する癌由来の細胞、もしくは前立腺癌細胞系由来の細胞を有する動物)において、確認されうる。

【0162】

本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイにより同定された新規な作用物質に関する(例えば、癌治療の下記の説明を参照)。従って、そのような作用物質での処置の、効力、毒性、副作用、または作用の機構を測定するために適切な動物モデル(本明細書に記載されたもののような)において本明細書に記載されているように同定された作用物質(例えば、癌マーカー調節剤、アンチセンス癌マーカー核酸分子、siRNA分子、癌マーカー特異的抗体、または癌マーカー結合パートナー)をさらに用いることは、本発明の範囲内である。さらになお、上記のスクリーニングアッセイにより同定された新規な作用物質は、例えば、本明細書に記載されているような処置に用いられうる。

20

【0163】

VI. 治療的適用

いくつかの態様において、本発明は、癌(例えば、前立腺癌)についての治療を提供する。いくつかの態様において、治療は、癌マーカー(例えば、限定されるわけではないが、TMPRSS2とのERG、ETV1、およびETV4遺伝子融合を含む)を直接的にまたは間接的にターゲットする。

30

【0164】

A. RNA干渉およびアンチセンス治療

いくつかの態様において、本発明は、癌マーカーの発現をターゲットする。例えば、いくつかの態様において、本発明は、本発明の癌マーカーをコードする核酸分子の融合を調節し、最終的には発現される癌マーカーの量を調節するのに用いる、オリゴマーアンチセンスまたはRNAi化合物、特にオリゴヌクレオチド(例えば、上記の薬物スクリーニング方法で同定されたもの)を含む組成物を用いる。

【0165】

1. RNA干渉(RNAi)

40

いくつかの態様において、RNAiは、融合タンパク質機能を阻害するために利用される。RNAiは、ヒトを含むたいの真核生物において外来遺伝子の発現を制御するための進化的に保存された細胞防御を表す。RNAiは、典型的には、二本鎖RNA(dsRNA)により引き起こされ、dsRNAに応答して一本鎖標的RNA相同体の配列特異的mRNA分解をもたらす。mRNA分解の媒介物は、低分子干渉RNA二重鎖(siRNA)であり、通常には、細胞において酵素切断により長いdsRNAから生成される。siRNAは、一般的に、約21ヌクレオチド長(例えば、21~23ヌクレオチド長)であり、2ヌクレオチドの3'-オーバーハングにより特徴付けられる塩基対形成構造を有する。小さなRNA、またはRNAiの細胞への導入後、その配列は、RISC(RNA誘導サイレンシング複合体)と呼ばれる酵素複合体へ送達されると考えられている。RISCは、標的を認識し、それをエンドヌクレアーゼで切断する。より大きなRNA配列が細胞へ

50

送達された場合には、RNアーゼIII酵素(ダイサー)がより長いdsRNAを21~23nt ds siRNA断片に変えることを言及しておく。いくつかの態様において、RNAiオリゴヌクレオチドは、融合タンパク質の接合領域をターゲットするように設計される。

【0166】

化学合成されたsiRNAは、培養体細胞における哺乳動物遺伝子機能のゲノムワイド分析のための強力な試薬になっている。遺伝子機能の確証についてのそれらの価値以上に、siRNAはまた、遺伝子特異的治療剤として大きな可能性をもっている(参照により本明細書に組み入れられている、Tuschl and Borkhardt, *Molecular Intervent.* 2002;2(3):158-67)。

【0167】

siRNAの動物細胞へのトランスフェクションは、結果として、特定の遺伝子の強力な長期的転写後サイレンシングを生じる(Caplen et al., *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2001;98:9742-7; Elbashir et al., *Nature* 2001;411:494-8; Elbashir et al., *Genes Dev.* 2001;15:188-200;およびElbashir et al., *EMBO J.* 2001;20:6877-88、すべては参照により本明細書に組み入れられている)。siRNAでRNAiを行うための方法および組成物は、例えば、参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第6,506,559号に記載されている。

【0168】

siRNAは、ターゲットされたRNA、およびひいては、タンパク質の量を、しばしば、検出不可能なレベルまで、低下させるのに並はずれて効果的である。サイレンシング効果は、数ヶ月間、持続することができ、標的RNAとsiRNAの中央領域の間の1ヌクレオチドミスマッチがしばしば、サイレンシングを妨げるのに十分であるため、並はずれて特異的である(Brummelkamp et al., *Science* 2002;296:550-3;およびHolen et al., *Nucleic Acids Res.* 2002;30:1757-66、両方は参照により本明細書に組み入れられている)。siRNAの設計における重要な因子は、siRNA結合のための接近可能な部位の存在である。Bahoia(J. Biol. Chem., 2003;278:15991-15997;参照により本明細書に組み入れられている)らは、効果的なsiRNAを設計するためにmRNAにおいて接近可能な部位を見出すためのスキニングアレイと呼ばれる一種のDNAアレイの使用を記載する。これらのアレイは、配列における各塩基の段階的付加による物的障壁(マスク)を用いて合成される、サイズが単量体からある特定の最大値までの範囲であるオリゴヌクレオチド、通常にはコマー(Comer)、を含む。従って、アレイは、標的遺伝子の領域の完全オリゴヌクレオチド相補体を表す。標的mRNAのこれらのアレイへのハイブリダイゼーションは、標的mRNAのこの領域の徹底的な接近しやすさプロフィールを提供する。そのようなデータは、効力および標的特異性を保持するようにオリゴヌクレオチドの長さとは結合親和性の間の妥協に達することが重要である、アンチセンスオリゴヌクレオチド(7mersから25mersまでの範囲である)の設計において有用である(Sohail et al., *Nucleic Acids Res.*, 2001;29(10):2041-2045)。siRNAを選択するためのさらなる方法および事柄は、例えば、WO 05054270、WO 05038054A1、WO 03070966A2、*J Mol Biol* 2005 May 13;348(4):883-93、*J Mol Biol* 2005 May 13;348(4):871-81、および*Nucleic Acids Res.* 2003 Aug 1;31(15):4417-24(それぞれは全体として参照により本明細書に組み入れられている)に記載されている。加えて、siRNAの選択に用いるソフトウェア(例えば、MWGオンラインsiMAX siRNA設計ツール)が、市販されている、または公的に利用可能である。

【0169】

2. アンチセンス

他の態様において、融合タンパク質発現は、本発明の癌マーカーをコードする1つまたは複数の核酸と特異的にハイブリダイズするアンチセンス化合物を用いて調節される。オリゴヌクレオチド化合物のその標的核酸との特異的なハイブリダイゼーションは、核酸の正常な機能に干渉する。標的核酸の機能の、それに特異的にハイブリダイズする化合物によるこの調節は、一般的に、「アンチセンス」と呼ばれる。干渉されうるDNAの機能には、複製および転写が挙げられる。干渉されうるRNAの機能は、例えば、RNAのタンパク質翻

訳の部位への転位置、RNAからのタンパク質の翻訳、1つまたは複数のmRNA種を生じうるRNAのスプライシング、およびRNAに関与しうる、またはRNAにより促進されうる触媒活性のようなすべての重要な機能を含む。標的核酸機能へのそのような干渉の全体的効果は、本発明の癌マーカーの発現の調節である。本発明との関連において、「調節」とは、遺伝子の発現における増加(刺激)かまたは減少(阻害)のいずれかを意味する。例えば、発現が阻害されて、腫瘍増殖を防ぐ可能性がある。

【0170】

アンチセンスとして特定の核酸をターゲットすることが好ましい。本発明との関連において、アンチセンス化合物を特定の核酸へ「ターゲットすること」は、多段階過程である。その過程は、通常、機能が調節されることになっている核酸配列の同定から始まる。これは、例えば、発現が、特定の障害もしくは疾患状態に関連している細胞遺伝子(または遺伝子から転写されたmRNA)、または感染体由来の核酸分子でありうる。本発明において、標的は、本発明の癌マーカーをコードする核酸分子である。ターゲティング過程もまた、所望の効果、例えば、タンパク質の発現の検出または調節、が結果として生じるように起こるためのアンチセンス相互作用についてのこの遺伝子内の部位の決定を含む。本発明の関連内において、好ましい遺伝子内部位は、遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF)の翻訳開始または終結コドンを含む領域である。翻訳開始コドンは、典型的には5'-AUG(転写されたmRNA分子において；対応するDNA分子においては5'-ATG)であるため、翻訳開始コドンはまた、「AUGコドン」、「スタートコドン」、または「AUGスタートコドン」と呼ばれている。少数の遺伝子は、RNA配列5'-GUG、5'-UUG、または5'-CUGを有する翻訳開始コドンを持ち、5'-AUA、5'-ACG、および5'-CUGは、インビボで機能することが示されている。従って、「翻訳開始コドン」および「スタートコドン」という用語は、どの場合にも開始アミノ酸は典型的にはメチオニン(真核生物において)またはホルミルメチオニン(原核生物において)であるにしても、多くのコドン配列を含みうる。真核生物および原核生物の遺伝子は、2つまたはそれ以上の選択的スタートコドンを有する場合があります、それらのいずれか1つが、特定の細胞型もしくは組織において、または特定の1組の条件下で、翻訳開始に優先的に利用されうる。本発明との関連において、「スタートコドン」および「翻訳開始コドン」は、そのようなコドンの配列に関わらず、本発明の腫瘍抗原をコードする遺伝子から転写されたmRNA分子の翻訳を開始するためにインビボで用いられるコドンを指す。

【0171】

遺伝子の翻訳終結コドン(または「ストップコドン」)は、3つの配列(すなわち、5'-UAA、5'-UAG、および5'-UGA；対応するDNA配列は、それぞれ、5'-TAA、5'-TAG、および5'-TGAである)のうちの1つを有しうる。「スタートコドン領域」および「翻訳開始コドン領域」という用語は、翻訳開始コドンからいずれかの方向(すなわち、5'または3')に約25個から約50個までの連続したヌクレオチドを含むそのようなmRNAまたは遺伝子の一部を指す。同様に、「ストップコドン領域」および「翻訳終結コドン領域」という用語は、翻訳終結コドンからいずれかの方向(すなわち、5'または3')に約25個から約50個までの連続したヌクレオチドを含むそのようなmRNAまたは遺伝子の一部を指す。

【0172】

翻訳開始コドンと翻訳終結コドンの間の領域を指す、オープンリーディングフレーム(ORF)または「コード領域」もまた、効果的にターゲットされうる領域である。他の標的領域には、翻訳開始コドンから5'方向であって、それに従って、mRNAまたは遺伝子上の対応するヌクレオチドの5'キャップ部位と翻訳開始コドンの間のヌクレオチドを含むmRNAの部分(5'非翻訳領域(5'UTR))、および翻訳終結コドンから3'方向であって、それに従って、mRNAまたは遺伝子上の対応するヌクレオチドの翻訳終結コドンと3'末端の間のヌクレオチドを含むmRNAの部分(3'非翻訳領域(3'UTR))が挙げられる。mRNAの5'キャップは、5'-5'トリリン酸結合を介してmRNAの最も5'側の残基に連結されたN7-メチル化グアノシン残基を含む。mRNAの5'キャップ領域は、5'キャップ構造それ自身、加えてキャップに隣接した最初の50ヌクレオチドを含むとみなされる。キャップ領域もまた好ましい標的領域で

ありうる。

【0173】

いくつかの真核生物のmRNA転写産物は直接的に翻訳されるが、多くは、それが翻訳される前に転写産物から切除される、「イントロン」として知られた、1つまたは複数の領域を含みうる。残りの(かつ、それゆえに翻訳された)領域は、「エキソン」として知られ、共にスプライスされて、連続的なmRNA配列を形成する。mRNAスプライス部位(すなわち、イントロン-エキソン接合部)もまた好ましい標的領域であることができ、異常なスプライシングが疾患に結びつけられる、または特定のmRNAスプライス生成物の過剰生成が疾患に結びつけられる状況において特に有用である。再配列または欠失による異常な融合接合部もまた好ましい標的である。イントロンもまた、例えばDNAまたはプレmRNAヘターゲットされるアンチセンス化合物についての効果的な、かつそれゆえに好ましい、標的領域でありうることがまた見出されている。

10

【0174】

いくつかの態様において、アンチセンス阻害についての標的部位は、市販されているソフトウェアプログラム(例えば、Biognostik, Gottingen, Germany; SysArris Software, Bangalore, India; Antisense Research Group, University of Liverpool, Liverpool, England; GeneTrove, Carlsbad, CA)を用いて同定される。他の態様において、アンチセンス阻害についての標的部位は、参照により本明細書に組み入れられている、PCT公開第WO 0198537A2に記載された接近可能部位方法を用いて同定される。

【0175】

いったん1つまたは複数の標的部位が同定されたならば、所望の効果を与えるのに十分、標的に相補的である(すなわち、十分に良く、かつ十分な特異性を以てハイブリダイズする)オリゴヌクレオチドが選択される。例えば、本発明の好ましい態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、スタートコドンへ、または近くヘターゲットされる。

20

【0176】

本発明との関連において、アンチセンス組成物および方法に関しての「ハイブリダイゼーション」は、相補的ヌクレオシドまたはヌクレオチド塩基間のワトソン-クリック、フーグスティーン、または逆フーグスティーン水素結合でありうる水素結合を意味する。例えば、アデニンおよびチミンは、水素結合の形成を通して対形成する相補的核酸塩基である。アンチセンス化合物の配列は、特異的にハイブリダイズできるために、その標的核酸のそれと100%相補的である必要はない。アンチセンス化合物は、化合物の標的DNAまたはRNA分子への結合が、有用性の損失を引き起こす標的DNAまたはRNAの正常機能に干渉し、かつ特異的結合が望まれる条件下で(すなわち、インビボのアッセイまたは治療的処置の場合の生理学的条件下で、およびインビトロアッセイの場合、アッセイが行われる条件下で)アンチセンス化合物の非標的配列への非特異的結合を避けるのに十分な程度の相補性がある場合、特異的にハイブリダイズできる。

30

【0177】

アンチセンス化合物は、一般的に、研究試薬および診断として用いられる。例えば、特異性を以て遺伝子発現を阻害できるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、特定の遺伝子の機能を解明するために用いられうる。アンチセンス化合物はまた、例えば、生物学的経路の様々なメンバーの機能の間を区別するために、用いられる。

40

【0178】

アンチセンスの特異性および感度はまた、治療的用途として適用される。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、動物およびヒトでの疾患状態の処置における治療的部分として用いられている。アンチセンスオリゴヌクレオチドはヒトへ安全にかつ効果的に投与されており、多数の臨床試験が、現在、進行中である。オリゴヌクレオチドが、細胞、組織、および動物、特にヒト、の処置のための処置計画に有用であるように構成されうる有用な治療様式であることは、このように確立されている。

【0179】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、アンチセンス化合物の好ましい型であるが、本発

50

明は、限定されるわけではないが、下に記載されているようなオリゴヌクレオチド模倣体を含む他のオリゴマーアンチセンス化合物を含む。本発明によるアンチセンス化合物は、好ましくは、約8個から約30個までの核酸塩基を含む(すなわち、約8個から約30個までの結合した塩基)が、より長いおよびより短い配列の両方とも本発明との使用を見出しうる。特に好ましいアンチセンス化合物は、アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、よりいっそう好ましいのは、約12個から約25個の核酸塩基を含むものである。

【0180】

本発明に関して有用な好ましいアンチセンス化合物の特定の例には、改変バックボーンまたは非天然ヌクレオシド間結合を含むオリゴヌクレオチドが挙げられる。本明細書に定義されているように、改変バックボーンを有するオリゴヌクレオチドには、バックボーンにリン原子を保持するもの、およびバックボーンにリン原子を有しないものが挙げられる。本明細書の目的のために、ヌクレオシド間バックボーンにリン原子を有しない改変オリゴヌクレオチドもまた、オリゴヌクレオシドであるとみなされうる。

【0181】

好ましい改変オリゴヌクレオチドバックボーンには、例えば、ホスホロチオネート、キラルホスホロチオネート、ホスホロジチオネート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、3'-アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートを含むメチルならびに他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホラミデートおよびアミノアルキルホスホラミデートを含むホスホラミデート、チオノホスホオラミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、および通常の3'-5'結合を有するボラノホスフェート、これらの2'-5'結合型類似体、ヌクレオシド単位の隣接するペアが、3'-5'から5'-3'へ、または2'-5'から5'-2'へ結合している逆位方向性を有するものが挙げられる。様々な塩、混合塩、および遊離酸型もまた含まれる。

【0182】

リン原子を含まない好ましい改変オリゴヌクレオチドバックボーンは、短鎖アルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合ヘテロ原子およびアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、または1つもしくは複数の短鎖ヘテロ原子もしくは複素環式ヌクレオシド間結合により形成されるバックボーンを有する。これらには、モルホリノ結合(ヌクレオシドの糖部分から一部形成される)；シロキサンバックボーン；スルフィド、スルホキシド、およびスルホンバックボーン；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチルバックボーン；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチルバックボーン；アルケン含有バックボーン；スルファメートバックボーン；メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノバックボーン；スルホネートおよびスルホンアミドバックボーン；アミドバックボーン；ならびに混合N、O、S、およびCH₂成分部分を有する他のものが挙げられる。

【0183】

他の好ましいオリゴヌクレオチド模倣体において、ヌクレオチド単位の糖およびヌクレオシド間結合(すなわち、バックボーン)は新規な基と置換される。塩基単位は、適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。一つのそのようなオリゴマー化合物、優秀なハイブリダイゼーション性質をもつことが示されているオリゴヌクレオチド模倣体、はペプチド核酸(PNA)と呼ばれている。PNA化合物において、オリゴヌクレオチドの糖-バックボーンは、アミド含有バックボーン、特にアミノエチルグリシンバックボーン、と置換される。核酸塩基は、保持され、バックボーンのアミド部分のアザ窒素原子へ直接的にまたは間接的に結合している。PNA化合物の調製を教示する代表的な米国特許には、限定されるわけではないが、米国特許第5,539,082号；第5,714,331号；および第5,719,262号(それぞれは参照により本明細書に組み入れられている)が挙げられる。PNA化合物のさらなる教示は、Nielsen et al., Science 254:1497 (1991)に見出されうる。

【0184】

本発明の最も好ましい態様は、ホスホロチオネートバックボーンをもつオリゴヌクレオチド、ならびにヘテロ原子バックボーン、および特に、上記の米国特許第5,489,677号の-CH₂、--NH--O--CH₂--、--CH₂--N(CH₃)--O--CH₂--[メチレン(メチルイミノ)またはMMIバ

10

20

30

40

50

ックボーンとして知られている]、 $--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--$ 、 $--CH_2-N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2--$ 、および $--O--N(CH_3)--CH_2-CH_2--$ [天然ホスホジエステルバックボーンは $--O--P--O--CH_2--$ と表される]、および上記の米国特許第5,602,240号のアミドバックボーンをもつオリゴヌクレオチドである。上記の米国特許第5,034,506号のモルホリノバックボーン構造を有するオリゴヌクレオチドもまた好ましい。

【0185】

改変オリゴヌクレオチドはまた、1つまたは複数の置換糖部分を含みうる。好ましいオリゴヌクレオチドは、2'位に以下のうちの1つを含む：OH；F；O-、S-、もしくはN-アルキル；O-、S-、もしくはN-アルケニル；O-、S-、もしくはN-アルキニル；またはO-アルキル-O-アルキル、ただし、アルキル、アルケニル、およびアルキニルは、置換型または非置換型の $C_1\sim C_{10}$ アルキル、もしくは $C_2\sim C_{10}$ アルケニルおよびアルキニルでありうる。特に好ましいのは、 $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nOCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ 、および $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ 、(nおよびmは1から約10までである)である。他の好ましいオリゴヌクレオチドは、2'位に以下のうちの1つを含む： $C_1\sim C_{10}$ 低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリルまたはO-アラルキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、インターカレーター、オリゴヌクレオチドの薬物動態学的性質を改善するための基またはオリゴヌクレオチドの薬力学的性質を改善するための基、および類似した性質をもつ他の置換基。好ましい改変には、2'-メトキシエトキシ(2'-O-CH₂CH₂OCH₃、また2'-O-(2-メトキシエチル)または2'-MOEとしても知られている)(Martin et al., Helv. Chim. Acta 78:486 [1995])、すなわち、アルコキシアルコキシ基が挙げられる。さらなる好ましい改変には、2'-DMAOEとしても知られている2'-ジメチルアミノオキシエトキシ(すなわち、 $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ 基)、および2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(当技術分野において、2'-O-ジメチルアミノエトキシエチルまたは2'-DMAEOEとしても知られている)、すなわち、2'-O- $--CH_2--O--CH_2--N(CH_3)_2$ が挙げられる。

【0186】

他の好ましい改変には、2'-メトキシ(2'-O- $--CH_3$)、2'-アミノプロポキシ(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)および2'-フルオロ(2'-F)が挙げられる。類似した改変もまた、オリゴヌクレオチド上の他の位置、特に3'末端ヌクレオチド上または2'-5'結合型オリゴヌクレオチドにおける糖の3'位、および5'末端ヌクレオチドの5'位、になされうる。オリゴヌクレオチドはまた、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分のような糖模倣体を有しうる。

【0187】

オリゴヌクレオチドはまた、核酸塩基(当技術分野においてしばしば、単に「塩基」と呼ばれる)修飾または置換を含みうる。本明細書に用いられる場合、「非修飾型」または「天然の」核酸塩基は、プリン塩基アデニン(A)およびグアニン(G)、ならびにピリミジン塩基チミン(T)、シトシン(C)、およびウラシル(U)を含む。修飾核酸塩基は、5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサントシン、ヒポキサントシン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルならびに他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン、および2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよび5-ハロシトシン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシン、6-アゾウラシル、6-アゾシトシン、および6-アゾチミン、5-ウラシル(プソイドウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル、および他の8-置換アデニンならびにグアニン、5-ハロ、特に5-ブロモ、5-トリフルオロメチル、および他の5-置換ウラシルならびにシトシン、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニン、ならびに3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンのような他の合成および天然の核酸塩基を含む。さらなる核酸塩基は、米国特許第3,687,808号に開示されたものを含む。これらの核酸塩基の若干数は、本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を増加させるために特に有用である。これらには、2-アミノプロピルアデニン

、5-プロピニルウラシル、および5-プロピニルシトシンを含む、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、ならびにN-2、N-6、および0-6置換プリンが挙げられる。5-メチルシトシン置換は、核酸二重鎖安定性を0.6~1.2°C、増加させることが示されており、現在、好ましい塩基置換であり、特に、2'-0-メトキシエチル糖修飾と組み合わせられた場合、よりいっそう好ましい。

【0188】

本発明のオリゴヌクレオチドのもう一つの改変は、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、または細胞摂取を増強する1つもしくは複数の部分または複合物をオリゴヌクレオチドへ化学的に連結することを含む。そのような部分には、限定されるわけではないが、コレステロール部分、コール酸、チオエーテル(例えば、ヘキシル-S-トリチルチオール)、チオコレステロール、脂肪鎖(例えば、ドデカンジオールまたはウンデシル残基)、リン脂質(例えば、ジ-ヘキサデシル-ラック-グリセロールまたはトリエチルアンモニウム、1,2-ジ-0-ヘキサデシル-ラック-グリセロ-3-H-ホスホネート)、ポリアミン、またはポリエチレングリコール鎖、またはアダマンタン酢酸、パルミチル部分、またはオクタデシルアミンまたはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分のような脂質部分が挙げられる。

【0189】

当業者は、上記の改変を含むオリゴヌクレオチドを作製する方法を良く知っている。本発明は、上記のアンチセンスオリゴヌクレオチドに限定されない。任意の適切な改変または置換が利用されうる。

【0190】

与えられた化合物におけるすべての位置が均一に改変されることは必要ではなく、実際、1つより多い前記の改変が、単一の化合物に、またはオリゴヌクレオチド内の単一のヌクレオチドにでも、組み入れられうる。本発明はまた、キメラ化合物であるアンチセンス化合物を含む。本発明との関連における「キメラの」アンチセンス化合物または「キメラ」は、2つまたはそれ以上の化学的に異なる領域を含み、それぞれが少なくとも1つの単量体単位、すなわち、オリゴヌクレオチド化合物の場合、ヌクレオチド、から構成される、アンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは、典型的には、少なくとも1つの領域を含み、オリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ分解に対する抵抗性の増加、細胞摂取の増加、および/または標的核酸に対する結合親和性の増加をオリゴヌクレオチドへ与えるように改変されている。オリゴヌクレオチドの追加的領域は、RNA:DNAまたはRNA:RNAハイブリッドを切断する能力がある酵素についての基質として働きうる。例として、RNアーゼHは、RNA:DNA二重鎖のRNA鎖を切断する細胞エンドヌクレアーゼである。それゆえに、RNアーゼHの活性化は、結果として、RNA標的の切断を生じ、それにより、遺伝子発現のオリゴヌクレオチド阻害の効力を大いに増強する。その結果として、同じ標的領域にハイブリダイズするホスホロチオネートデオキシオリゴヌクレオチドと比較して、キメラオリゴヌクレオチドが用いられる場合、より短いオリゴヌクレオチドで、匹敵する結果がしばしば、得られうる。RNA標的の切断は、ゲル電気泳動、および必要ならば、当技術分野において公知の関連核酸ハイブリダイゼーション技術により日常的に検出されうる。

【0191】

本発明のキメラアンチセンス化合物は、上記のように、2つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチド、改変オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、および/またはオリゴヌクレオチド模倣体の複合構造として形成されうる。

【0192】

本発明はまた、下記のように、本発明のアンチセンス化合物を含む薬学的組成物および製剤を含む。

【0193】

B. 遺伝子治療

本発明は、本発明の癌マーカーの発現を調節するのに用いる任意の遺伝子操作の使用を

10

20

30

40

50

企図する。遺伝子操作の例には、限定されるわけではないが、遺伝子ノックアウト(例えば、組換えを用いて染色体から融合遺伝子を除去すること)、誘導性プロモーター有りまたは無しでのアンチセンス構築物の発現などが挙げられる。インビトロまたはインビボでの核酸構築物の細胞への送達は、任意の適切な方法を用いて行われうる。適切な方法は、所望の事象が起こる(例えば、アンチセンス構築物の発現)ように核酸構築物を細胞へ導入することである。遺伝子治療はまた、インビボで発現する(例えば、誘導性プロモーター(例えば、アンドロゲン応答性プロモーター)による刺激で)siRNAまたは他の干渉分子を送達するために用いられうる。

【0194】

遺伝情報を有する分子の細胞への導入は、限定されるわけではないが、裸のDNA構築物の直接的注入、該構築物を搭載した金粒子での砲撃、および例えば、リポソーム、バイオポリマーを用いる高分子媒介性遺伝子移入などを含む様々な方法のいずれかにより達成される。好ましい方法は、限定されるわけではないが、アデノウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、およびアデノ随伴ウイルスを含むウイルス由来の遺伝子送達媒体を用いる。レトロウイルスと比較してより高い効率のために、アデノウイルス由来のベクターが、インビボで核酸分子を宿主細胞へ移入するための好ましい遺伝子送達媒体である。アデノウイルスベクターは、動物モデルにおける様々な固形腫瘍への、および免疫不全マウスにおけるヒト固形腫瘍異種移植片への非常に効率的なインビボ遺伝子移入を提供することが示されている。遺伝子移入のためのアデノウイルスベクターおよび方法の例は、PCT公開WO 00/12738およびWO 00/09675、ならびに米国特許出願第6,033,908号、第6,019,978号、第6,001,557号、第5,994,132号、第5,994,128号、第5,994,106号、第5,981,225号、第5,885,808号、第5,872,154号、第5,830,730号、および第5,824,544号(それぞれは全体として参照により本明細書に組み入れられている)に記載されている。

【0195】

ベクターは、様々な方法で被験体に投与されうる。例えば、本発明のいくつかの態様において、ベクターは直接的注入を用いて腫瘍または腫瘍に関連した組織へ投与される。他の態様において、投与は、血液またはリンパの循環を通してである(例えば、全体として参照により本明細書に組み入れられている、PCT公開99/02685参照)。アデノウイルスベクターの例示的な用量レベルは、好ましくは、灌流液に加えられる 10^8 個 $\sim 10^{11}$ 個のベクター粒子である。

【0196】

C. 抗体治療

いくつかの態様において、本発明は、本発明の癌マーカー(例えば、TMPRSS2とのERG、ETV1、またはETV4融合)を発現する前立腺腫瘍をターゲットする抗体を提供する。任意の適切な抗体(例えば、モノクローナル、ポリクローナル、または合成)は、本明細書に開示された治療方法に利用されうる。好ましい態様において、癌治療に用いられる抗体はヒト化抗体である。抗体をヒト化するための方法は、当技術分野において周知である(例えば、米国特許第6,180,370号、第5,585,089号、第6,054,297号、および第5,565,332号参照；それぞれは参照により本明細書に組み入れられている)。

【0197】

いくつかの態様において、治療抗体は、本発明の癌マーカー(例えば、TMPRSS2とのERG、ETV1、またはETV4融合)に対して産生される抗体を含み、抗体は細胞毒性剤に結合している。そのような態様において、正常細胞をターゲットしない腫瘍特異的治療剤が作製され、それによって、伝統的な化学療法有害な副作用の多くを低減する。特定の適用について、治療剤は、抗体への付着として有用な作用物質として働く薬理的な作用物質、特に、内皮細胞の成長もしくは細胞分裂を絶つまたは抑制する能力を有する細胞毒性または別なふうに抗細胞性の作用物質、であることを構想される。本発明は、抗体に結合し、かつ活性型で送達されうる任意の薬理的な作用物質の使用を企図する。例示的な抗細胞性作用物質には、化学療法剤、放射性同位元素、および細胞毒素が挙げられる。本発明の治療抗体は、限定されるわけではないが、放射性同位元素(例えば、ヨード-131、ヨード-123、テク

ネチウム-99m、インジウム-111、レニウム-188、レニウム-186、ガリウム-67、銅-67、イットリウム-90、ヨード-125、またはアスタチン-211)、ステロイドのようなホルモン、代謝拮抗剤(例えば、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル、メトトレキサート、またはアミノプテリン；アントラサイクリン；マイトマイシンC)、ピンカアルカロイド(例えば、デメコルシン；エトポシド；ミトラマイシン)、およびクロラムブシルまたはメルファランのような抗腫瘍アルキル化剤を含む様々な細胞毒性部分を含みうる。他の態様は、凝固剤、サイトカイン、成長因子、細菌内毒素、または細菌内毒素のリピドA部分のような作用物質を含みうる。例えば、いくつかの態様において、治療剤は、少し例を挙げるだけでも、A鎖毒素、リボソーム不活性化タンパク質、 α -サルシン、アスペルギリン、レストリクトシン、リボスクレアーゼ、ジフテリア毒素、またはシュードモナス外毒素のような植物由来、真菌由来、または細菌由来の毒素を含む。いくつかの好ましい態様において、脱グルコシル化リシンA鎖が利用される。

10

【0198】

いずれにしても、これらのような作用物質は、必要に応じて、要求されるようなそれらのターゲティング、内部移行、ターゲットされた腫瘍細胞の部位での遊離または血液成分への提示を可能にする様式で、公知の結合テクノロジーを用いて、うまく抗体へ結合することが提案される(例えば、Ghose et al., Methods Enzymol., 93:280 [1983]参照)。

【0199】

例えば、いくつかの態様において、本発明は、本発明の癌マーカー(例えば、ERGまたはETV1融合)にターゲットされる免疫毒素を提供する。免疫毒素は、特異的ターゲティング剤、典型的には、腫瘍に方向づけられた抗体または断片の、毒素部分のような細胞毒性剤との結合体である。ターゲティング剤は、毒素を、ターゲットされる抗原を有する細胞へ向け、それにより選択的に殺す。いくつかの態様において、治療抗体は、高いインビボ安定性を提供する架橋剤を用いる(Thorpe et al, Cancer Res., 48:6396 [1988])。

20

【0200】

他の態様、特に、固形腫瘍の処置を含むこと、において、抗体は、血管内皮細胞の成長または細胞分裂を抑制することにより腫瘍血管構造に対して細胞毒性または別なふうな抗細胞性効果を生じるように設計される。この攻撃は、腫瘍局在的血管虚脱へ導き、腫瘍細胞、特に血管構造から遠位の腫瘍細胞、から酸素および栄養分を奪い、最終的には、細胞死および腫瘍壊死へ導くことを意図される。

30

【0201】

好ましい態様において、抗体に基づいた治療は、下記のように薬学的組成物として製剤化される。好ましい態様において、本発明の抗体組成物の投与は、結果として、癌における測定可能な減少(例えば、腫瘍の減少または消失)を生じる。

【0202】

D. 薬学的組成物

本発明はさらに、薬学的組成物(例えば、本発明の遺伝子融合の発現または活性を調節する薬剤を含む)を提供する。本発明の薬学的組成物は、局所的処置が望まれるかまたは全身的処置が望まれるかに、および処置されるべき領域に依存して、いくつかの方法で投与されうる。投与は、局所(眼、ならびに膣および直腸送達を含む粘膜へを含む)、肺(例えば、噴霧器による；気管内、鼻腔内、表皮、および経皮を含む、粉末もしくはエアゾールの吸入または通気による)、経口、または非経口でありうる。非経口投与には、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、もしくは筋肉内注射または注入；頭蓋内、例えば、髄腔内または脳室内、投与が挙げられる。

40

【0203】

局所投与のための薬学的組成物および製剤には、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、滴剤、坐剤、スプレー、液体、および粉末が挙げられうる。通常の薬学的担体、水性、粉末、または油性基剤、増粘剤などが必要なまたは望ましい場合がある。

【0204】

経口投与のための組成物および製剤には、粉末もしくは顆粒、水もしくは非水性媒質に

50

おける懸濁液もしくは溶液、カプセル、サッシェ、または錠剤が挙げられる。増粘剤、香味剤、希釈剤、乳化剤、分散剤、または結合剤が望ましい場合がある。

【0205】

非経口、髄腔内、または脳室内投与のための組成物および製剤には、緩衝剤、希釈剤、ならびに限定されるわけではないが、浸透促進剤、担体化合物、および他の薬学的に許容される担体または賦形剤のような他の適切な添加剤も含みうる滅菌水溶液が挙げられうる。

【0206】

本発明の薬学的組成物には、限定されるわけではないが、溶液、乳濁液、およびリポソーム含有製剤が挙げられる。これらの組成物は、限定されるわけではないが、あらかじめ形成された液体、自己乳化固体、および自己乳化半固体を含む様々な成分から作製されうる。

10

【0207】

便利には単位用量の形をとって提供されうるが、本発明の薬学的製剤は、製薬工業において周知の通常の技術に従って調製されうる。そのような技術は、活性成分を薬学的担体または賦形剤と会合させる段階を含む。一般的に、製剤は、活性成分を液体担体もしくは微粉化した固体担体または両方と均一かつ密接に会合させること、およびその後、必要に応じて、生成物を成形することにより調製される。

【0208】

本発明の組成物は、限定されるわけではないが、錠剤、カプセル、液体シロップ、軟ゲル、坐剤、および浣腸剤のような多くの可能な剤形のいずれかへ製剤化されうる。本発明の組成物はまた、水性、非水性、または混合媒質における懸濁液として製剤化されうる。水性懸濁液はさらに、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、および/またはデキストランを含む懸濁液の粘性を増加させる物質を含みうる。懸濁液はまた安定剤を含みうる。

20

【0209】

本発明の一つの態様において、薬学的組成物は、泡として製剤化され、用いられうる。薬学的泡は、限定されるわけではないが、乳濁液、マイクロエマルジョン、クリーム、ゼリー、およびリポソームのような製剤が挙げられる。実際は基本的に類似しているが、これらの製剤は、最終生成物の成分および粘稠度の点で異なる。

30

【0210】

細胞レベルでオリゴヌクレオチドの取り込みを増強する作用物質もまた、本発明の薬学的および他の組成物へ加えられうる。例えば、リポフェクチン(米国特許第5,705,188号)、陽イオン性グリセロール誘導体、のような陽イオン性脂質、およびポリリシン(WO 97/30731)のようなポリカチオン性分子もまた、オリゴヌクレオチドの細胞取り込みを増強する。

【0211】

本発明の組成物は、薬学的組成物に通常見出される他の補助成分を追加的に含みうる。従って、例えば、組成物は、例えば、止痒剤、収斂剤、局所的麻酔剤、もしくは抗炎症剤のような追加の、適合性の、薬学的活性物質を含みうる、または、色素、香味剤、保存剤、酸化防止剤、乳白剤、増粘剤、および安定剤のような本発明の組成物の様々な剤形を物理的に製剤化するのに有用な追加の物質を含みうる。しかしながら、加えられる場合、そのような物質は、本発明の組成物の成分の生物活性に過度には干渉すべきではない。製剤は滅菌され、必要に応じて、製剤の核酸と有害に相互作用しない助剤、例えば、潤滑剤、保存剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を及ぼすための塩、緩衝剤、着色剤、調味料、および/または芳香物質、などと混合されうる。

40

【0212】

本発明の特定の態様は、(a)1つまたは複数のアンチセンス化合物、および(b)非アンチセンス機構により機能する1つまたは複数の他の化学療法剤を含む薬学的組成物を提供する。そのような化学療法剤の例には、限定されるわけではないが、ダウノルビシン、ダク

50

チノマイシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、マイトマイシン、ナイトロジェンマスタード、クロラムブシル、メルファラン、シクロホスファミド、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン(CA)、5-フルオロウラシル(5-FU)、フロクスウリジン(5-FUdR)、メトトレキセート(MTX)、コルヒチン、ピンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド、テニポシド、シスプラチン、およびジエチルスチルベストロール(DES)のような抗癌薬が挙げられる。限定されるわけではないが、非ステロイド性抗炎症薬およびコルチコステロイドを含む抗炎症薬、ならびに限定されるわけではないが、リビビリン、ビダラビン、アシクロビル、およびガンシクロビルを含む抗ウイルス薬もまた、本発明の組成物に組み合わせられうる。他の非アンチセンス化学療法剤もまた、本発明の範囲内である。2つまたはそれ以上の組み合わせられる化合物は、いっしょに、または逐次的に、用いられうる。

10

【0213】

用量は、数日間から数ヶ月間まで続く処置の経過とともに、または治癒がもたらされる、もしくは疾患状態の減少が達成されるまで、処置されるべき疾患状態の重症度および応答性に依存する。最適な投薬計画は、患者の身体における薬物蓄積の測定から計算されうる。投与を行う医師は、最適な用量、投薬方法、および繰り返し率を容易に決定することができる。最適な用量は、個々のオリゴヌクレオチドの相対的効力に依存して変わる可能性があり、一般的に、インビトロおよびインビボの動物モデルにおいて効果的であることが見出されたEC₅₀に基づいて、または本明細書に記載された実施例に基づいて、推定されうる。一般的に、用量は、体重の1kgあたり0.01 μgから100gまでであり、1日に、1週間に、1ヶ月に、または1年に、1回または複数回、与えられうる。処置を行う医師は、体液または組織における薬物の測定された滞留時間および濃度に基づいて投薬についての繰り返し率を推定できる。処置の成功後、疾患状態の再発を防ぐために維持治療を被験体に受けさせることが望ましい場合があり、オリゴヌクレオチドは、1日に1回または複数回から20年間ごとに1回まで、体重の1kgあたり0.01 μgから100gまでの範囲である維持用量で投与される。

20

【0214】

VII. トランスジェニック動物

本発明は、本発明の外因性癌マーカー遺伝子(例えば、遺伝子融合)、またはその突然変異体およびバリエーション(例えば、切り詰めまたは一塩基多型)を含むトランスジェニック動物の作製を企図する。好ましい態様において、トランスジェニック動物は、野生型動物と比較して変化した表現型(例えば、マーカーの増加または減少した存在)を示す。そのような表現型の存在または非存在を分析するための方法には、限定されるわけではないが、本明細書に開示されたものが挙げられる。いくつかの好ましい態様において、トランスジェニック動物はさらに、腫瘍の増加もしくは減少した成長、または癌の徴候を示す。

30

【0215】

本発明のトランスジェニック動物は、薬物(例えば、癌治療)スクリーニングにおいて使用を見出す。いくつかの態様において、試験化合物(癌を処置するのに有用ではないかと思われる薬物)および対照化合物(例えば、プラシーボ)は、トランスジェニック動物および対照動物へ投与され、効果が評価される。

【0216】

40

トランスジェニック動物は、様々な方法によって作製されうる。いくつかの態様において、様々な発生段階における胚性細胞が、トランスジェニック動物の産生のためのトランスジーンを導入するために用いられる。胚性細胞の発生の段階に依存して異なる方法が用いられる。接合体は、マイクロインジェクションについての最良の標的である。マウスにおいて、雄性前核は、1~2ピコリットル(pl)のDNA溶液の再現可能な注入を可能にする直径が約20マイクロメートルのサイズに達する。遺伝子移入のための標的としての接合体の使用は、たいいていの場合、注入されたDNAが最初の卵割の前に宿主ゲノムへ組み入れられるという点で大きな利点をもつ(Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4438-4442 [1985])。結果として、トランスジェニック非ヒト動物の全細胞は、組み入れられたトランスジーンを有する。これはまた、一般的に、生殖細胞の50%がトランスジーンを

50

有するため、トランスジーンの創始者の子孫への効率的な伝達に反映される。米国特許第4,873,191号は、接合体のマイクロインジェクションについての方法を記載している；この特許の開示は全体として本明細書に組み入れられている。

【0217】

他の態様において、レトロウイルス感染は、トランスジーンを非ヒト動物へ導入するために用いられる。いくつかの態様において、レトロウイルスベクターは、レトロウイルスベクターを卵母細胞の囲卵腔へ注入することにより卵母細胞をトランスフェクションするために利用される(参照により本明細書に組み入れられている米国特許第6,080,912号)。他の態様において、発生中の非ヒト胚は、胞胚期ヘインビトロで培養されうる。この間に、卵割球はレトロウイルス感染のための標的でありうる(Janenich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:1260 [1976])。卵割球の効率的な感染は、透明帯を除去するための酵素処理により得られる(Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. [1986])。トランスジーンを導入するために用いられるウイルスベクター系は、典型的には、トランスジーンを有する複製欠損レトロウイルスである(Jahner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6927 [1985])。トランスフェクションは、ウイルス産生細胞の単層上で卵割球を培養することにより容易かつ効率的に得られる(Stewart, et al., EMBO J., 6:383 [1987])。または、感染は、後期に行われうる。ウイルスまたはウイルス産生細胞は、胞胚腔へ注入されうる(Jahner et al., Nature 298:623 [1982])。組み入れがトランスジェニック動物を形成する細胞のサブセットにおいてのみ生じるため、創始者の大部分は、トランスジーンについてモザイクである。さらに、創始者は、子孫において一般的に分離する、ゲノムにおける異なる位置にトランスジーンのようなレトロウイルス挿入を含みうる。加えて、妊娠中期胚の子宮内レトロウイルス感染により、たとえ低効率性でも、生殖細胞系列へトランスジーンを導入することも可能である(Jahner et al., 前記 [1982])。当技術分野にとって公知のトランスジェニック動物を作製するためにレトロウイルスまたはレトロウイルスベクターを用いるさらなる手段は、レトロウイルス粒子またはレトロウイルスを産生するマイトマイシンC処理細胞の、受精卵または初期胚の囲卵腔へのマイクロインジェクションを含む(PCT国際出願WO 90/08832 [1990]およびHaskell and Bowen, Mol. Reprod. Dev., 40:386 [1995])。

【0218】

他の態様において、トランスジーンは、胚性幹細胞へ導入され、トランスフェクションされた幹細胞は、胚を形成するために利用される。ES細胞は、インビトロの適切な条件下で着床前胚を培養することにより得られる(Evans et al., Nature 292:154 [1981]; Bradley et al., Nature 309:255 [1984]; Gossler et al., Proc. Acad. Sci. USA 83:9065 [1986];およびRobertson et al., Nature 322:445 [1986])。トランスジーンは、リン酸カルシウム共沈、プロトプラストまたはスフェロプラスト融合、リポフェクション、およびDEAE-デキストラン媒介性トランスフェクションを含む当技術分野にとって公知の様々な方法によるDNAトランスフェクションによりES細胞へ効率的に導入されうる。トランスジーンはまた、レトロウイルス媒介性形質転換により、またはマイクロインジェクションによりES細胞へ導入されうる。そのようなトランスフェクションされたES細胞は、その後、胞胚期胚の胞胚腔へのそれらの導入後、胚にコロニーを形成することができ、結果として生じるキメラ動物の生殖系列に寄与する(概説として、Jaenisch, Science 240:1468 [1988])。トランスフェクションされたES細胞の胞胚腔への導入の前に、トランスフェクションされたES細胞は、トランスジーンを組み込んでいるES細胞について濃縮するための様々な選択プロトコールに供せられうるが、トランスジーンがそのような選択のための手段を提供するとすればである。または、ポリメラーゼ連鎖反応は、トランスジーンを組み込んでいるES細胞についてスクリーニングするために用いられうる。この技術は、胞胚腔への移入の前の適切な選択条件下でのトランスフェクションされたES細胞の増殖についての必要性を除く。

【0219】

なお他の態様において、相同組換えは、遺伝子機能をノックアウトする、または欠失突

10

20

30

40

50

然変異体(例えば、切り詰め突然変異体)を作製するために利用される。相同組換えのための方法は、参照により本明細書に組み入れられている米国特許第5,614,396号に記載されている。

【0220】

実験

以下の実施例は、本発明の特定の好ましい態様および局面を実証し、かつさらに例証するために提供され、その範囲を限定すると解釈されるべきではない。

【0221】

実施例1

ERGおよびETV1遺伝子融合

10

A. 材料および方法

癌アウトライアープロファイル分析(Cancer Outlier Profile Analysis)(COPA)

COPA分析は、10,486個のマイクロアレイ実験を含むOncomine 3.0における132個の遺伝子発現データセットに関して行われた。加えて、99個の増幅レーザーキャプチャーマイクロダイセクションされた前立腺組織試料由来のデータがCOPA分析に含まれた。COPAは3段階を有する。第一に、遺伝子発現値は、中央値中心とし、各遺伝子の中央値発現値をゼロに設定する。第二に、中央絶対偏差(MAD)が計算され、各発現値をそのMADで割ることにより1に対してスケールされる。中央値およびMADは、平均値および標準偏差とは対照的に、アウト라이어発現値が分布推定値に不当に影響を及ぼさず、それに従って、事後正規化を保存するように、変換に用いられた。第三に、変換された発現値の75th、90th、および95thパーセンタイルは、各遺伝子について表にされ、その後、それらのパーセンタイルスコアにより順位付けられ、アウトライアープロファイルの優先順位リストを提供する。

20

【0222】

試料

利用される組織は、University of Michiganにおける前立腺全摘出術シリーズ由来、および迅速剖検プログラム(Rapid Autopsy Program)(Shah et al., Cancer Res 64, 9209(Dec 15, 2004))由来であり、両方とも、University of Michigan Prostate Cancer Specialized Program of Research Excellence (S.P.O.R.E.) Tissue Coreの一部である。

【0223】

組織はまた、University Hospital Ulm (Ulm, Germany)における前立腺全摘出術シリーズから得られた。すべての試料は、各それぞれの機関において、事前の機関内審査委員会の承認を得て、同意した患者から収集された。すべての試料由来の全RNAを、Trizol(Invitrogen)で製造会社の使用説明書に従って単離した。全RNAをまた、RWPE、PC3、PC3+AR(Dai et al., Steroids 61, 531 (1996))、LNCaP、VCaP、およびDuCaP細胞系から単離した。RNA完全性を、ホルムアルデヒド変性ゲル電気泳動またはAgilent Bioanalyzer 2100により検証した。市販されている良性前立腺組織全RNAのプール(CPP, Clontech)もまた用いた。

30

【0224】

定量的PCR(QPCR)

定量的PCR(QPCR)は、本質的には記載されているように(Chinnaiyan et al., Cancer Res 65, 3328(2005); Rubin et al., Cancer Res 64, 3814 (2004))、Applied Biosystems 7300リアルタイムPCRシステム上でSYBR Green色素を用いて行われた。簡単には、1~5 µgの全RNAを、ランダムプライマーまたはランダムプライマーおよびオリゴdTプライマーの存在下でSuperScript III(Invitrogen)を用いてcDNAへ逆転写した。すべての反応を、SYBR Green Master Mix(Applied Biosystems)ならびにフォワードプライマーおよびリバープライマーの両方の25ngで、製造会社に推奨されるサーモサイクリング条件を用いて行った。すべての反応を、融解曲線分析に供し、選択された実験からの生成物を、1.5%アガロースゲル上の電気泳動により分離した。各実験について、閾値レベルを、Sequence Detection Software version 1.2.2 (Applied Biosystems)を用いてQPCR反応の対数期中に設定した。各試料についてのハウスキーピング遺伝子グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロ

40

50

ゲナーゼ(GAPDH)に対する各標的遺伝子の量を、比較閾値サイクル(Ct)方法(Applied Biosystems User Bulletin #2)を用いて測定し、cDNA試料は、図凡例に記載された各実験についてのキャリブレーターとしての役割を果たした。すべてのオリゴヌクレオチドプライマーは、Integrated DNA Technologiesにより合成された。GAPDHプライマーは記載されているとおりであり(Vandesompele et al., Genome Biol 3, RESEARCH0034 (2002))、すべての他のプライマーは列挙されている(表4)。プライマーのほぼ等しい効率を、比較Ct方法を用いるために、前立腺癌cDNAまたはプラスミド鋳型の段階希釈を用いて確認した。

【0225】

cDNA末端のRNAリガーゼ媒介性迅速増幅(RLM-RACE)

cDNA末端のRNAリガーゼ媒介性迅速増幅を、GeneRacer RLM-RACEキット(Invitrogen)を用いて製造会社の使用説明書に従って行った。最初に、試料を、QPCRによるERGまたはETV1の発現に基づいて選択した。5マイクログラムの全RNAを、切り詰められたmRNAおよび非mRNAから5'リン酸を除去するために子ウシ腸ホスファターゼで処理し、タバコ酸性ピロホスファターゼでキャップ構造を除去した。GeneRacer RNA Oligoを完全長転写産物ヘライゲーションし、SuperScript IIIを用いて逆転写した。5'末端を得るために、第一鎖cDNAを、ETV1についてGeneRacer 5' PrimerおよびETV1エキソン4-5_r、またはERGについてGeneRacer 5' PrimerおよびERGエキソン4a_rもしくはERGエキソン4b_rを用いるPlatinum Taq High Fidelity(Invitrogen)で増幅した。プライマー配列は示されている(表S2)。産物を、1.5%アガロースゲル上で電気泳動により分離し、バンドを切除し、精製し、pCR 4-TOPOへTOPO TAクローニングした。少なくとも4つのコロニー由来の精製されたプラスミドDNAを、University of Michigan DNA Sequencing CoreによるABI Model 3730自動シーケンサー上でM13リバーサおよびM13フォワード(-20)プライマーまたはT3およびT7プライマーを用いて双方向でシーケンシングした。RLM-RACEされたcDNAを他のアッセイには用いなかった。

【0226】

TPRSS2:ERG融合についての逆転写PCR

上記のようにQPCRを用いてTPRSS2:ERG陽性症例を同定した後、同じcDNA試料を、Platinum Taq High FidelityおよびTPRSS2:ERGプライマーでPCR増幅した。産物を、上記のように、電気泳動により分離し、pCR 4-TOPOへクローニングし、シーケンシングした。

【0227】

インビトロのアンドロゲン応答性

RWPE、LNCaP、VCap DuCaP、PC3、およびヒトアンドロゲン受容体で安定にトランスフェクションされたPC3細胞(PC3+AR)(3)を、1%エタノール対照または1nMの合成アンドロゲンR1881で24時間、処理した。全RNAを、単離し、逆転写、ならびにERGエキソン5-6_fおよび_rプライマーでの上記のようなQPCRに供した。各試料についてのERG/GAPDHの相対量を、RWPE対照試料に対して校正した。

【0228】

蛍光インサイチューハイブリダイゼーション(FISH)

正常な末梢リンパ球および転移性前立腺癌試料MET-26およびMET-28由来のホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織切片が、間期蛍光インサイチューハイブリダイゼーション(FISH)分析に用いられた。加えて、間期FISHは、13個の臨床的に局在した前立腺癌および16個の転移性前立腺癌試料のFFPE切片由来のコアを含む組織マイクロアレイについて行われた。それぞれの遺伝子座の大部分にまたがるプローブを用いる2色、2シグナルアプローチが、TPRSS2およびETV1の融合を評価するために用いられた。ピオチン-14-dCTP BACクローンRP11-124L22がETV1座に用いられ、ジゴキシン-dUTP標識BACクローンRPP11-35CDがTPRSS2座に用いられた。ERGを含む遺伝子再配列を分析するために、ERG座にまたがる2つのプローブ(ピオチン-14-dCTP標識BACクローンRP11-476D17およびジゴキシン-dUTP標識BACクローンRPP11-95I21)を用いる分裂シグナルプローブストラテジーが用いられた。すべてのBACクローンは、Children's Hospital of Oakland Research Institute(CHORI)から得られた。組織分析の前に、すべてのプローブの完全性および純度が、正常な末梢リンパ

球の中期スプレッドへのハイブリダイゼーションにより検証された。組織ハイブリダイゼーション、洗浄、および色検出は記載されているように(Rubin et al., Cancer Res 64, 3814 (2004); Garraway et al., Nature 436, 117 (2005))行われた。

【0229】

B. 結果

癌アウトライアープロファイル分析

ここ数年、DNAマイクロアレイでの遺伝子発現プロファイリングは、癌トランスクリプトームを研究するための一般的な方法になってきた。マイクロアレイ研究は、癌の分子不均一性への大きな洞察力を提供しており、しばしば、腫瘍組織学、患者転帰、および処置応答に対応する疾患の新規な分子サブタイプを同定した(valk et al., N Engl J Med 350, 1617 (2004))。しかしながら、一般的に、トランスクリプトーム分析は、新規な原因の癌遺伝子の発見へ導いていない。結果として発癌遺伝子の著しい過剰発現を生じる再配列および高レベルコピー数変化は、トランスクリプトームデータにおいて明らかであるはずと仮定されたが、伝統的な分析アプローチによっては必ずしもそうではなかった。

【0230】

癌型の大多数において、発癌遺伝子活性化の不均一なパターンが観察されており、従って、癌試料群に渡る遺伝子の一般的な活性化について探索する伝統的な分析方法(例えば、t検定またはシグナル対ノイズ比)は、そのような発癌遺伝子発現プロファイルを見出すことができない。その代わりとして、症例のサブセットにおける著しい過剰発現について探索する方法が必要とされている。本発明の開発の経過中に行われた実験は、結果として、癌アウトライアープロファイル分析(COPA)の開発を生じた。COPAは、遺伝子発現プロファイルの中央値および中央絶対偏差に基づいた単純数値変換を適用することによりアウトライアープロファイルを際立たせて同定しようと努める(Ross et al., Blood 102, 2951 (2003))。このアプローチは、図5Aに図解されている。COPAは、10,486個のマイクロアレイ実験を表す132個の遺伝子発現データセットの寄せ集めを含むOncomineデータベース(Bittner et al., Nature 406, 536 (2000))に適用された。COPAは、再発性再配列または高レベル増幅が起こることが知られている特定の癌型における遺伝子についていくつかのアウトライアープロファイルを正しく同定した。分析は、Cancer Gene Census(Vasselli et al., Proc Natl Acad Sci USA 100, 6958 (2003))により定義されているように、Oncomineデータセットにおいて上位10個のアウトライアープロファイルにランク付けされた既知の原因の癌遺伝子のアウトライアープロファイルに焦点を当てられた(表1および表3)。例えば、Valkらの急性骨髄性白血病(AML)データセットにおいて、RUNX1T1(ETO)は、95thパーセンタイルにおける最も強いアウトライアープロファイルを有し、AMLのサブセットにおけるこの遺伝子の既知の転座および発癌性活性と一致した(Davis et al., Proc Natl Acad Sci USA 100, 6051 (2003))(表1)。アウトライアープロファイルは、RUNX1(AML1)およびRUNX1T1(ETO)を融合する文書化されたt(8;21)転座を有する症例と正確に結びついた(図5B)。同様に、Rossらの急性リンパ芽球性白血病(ALL)データセットにおいて、PBX1は、90thパーセンタイルにおける最も強いアウトライアープロファイルを示し、ALLのサブセットにおいて起こることが知られているE2A-PBX1転座と一致した(Segal et al., J Clin Oncol 21, 1775 (2003))(表1)。この場合もやはり、アウトライアープロファイルは、ALLのこのパネルにおける特徴付けられたt(1;19)E2A-PBX1転座と完全に相関した(図S1C)。

【0231】

前立腺癌におけるETSファミリーメンバーERGおよびETV1についてのアウトライアープロファイルの同定

新規なCOPA予測を次に調べた。いくつかの独立したデータセットにおいて、COPAは、ERGおよびETV1、ユーイング肉腫および骨髄性白血病における発癌性転座に関与することが知られている2つのETSファミリー転写因子、についての前立腺癌における強いアウトライアープロファイルを同定した(Lapointe et al., Proc Natl Acad Sci USA 101, 811 (2004); Tian et al., N Engl J Med 349, 2483 (2003))。Dhanasekaranら(Keats et al., Bl

10

20

30

40

50

ood 105, 4060 (2005)), Welshら(Dhanasekaran et al., Faseb J 19, 243 (2005)), およびLapointeら(Wang et al., Lancet 365, 671 (2005))の前立腺癌遺伝子発現データセットにおいて、ERGは、75thパーセンタイルにおける最も高いスコアをつけるアウトライアープロファイルを有したが、LapointeらおよびTomlinsら(Welsh et al., Cancer Res 61, 5974 (2001))のデータセットにおいて、ETV1は、90thパーセンタイルにおける最も高いスコアをつけるアウトライアープロファイルを有した(表1)。合計で、COPAは、7つの独立した前立腺癌プロファイリング研究において、上位10個のアウトライアー遺伝子内にERGまたはETV1を9回、ランク付けた。ERGおよびETV1の両方は、ユーイング肉腫における発癌性転座に関与している。EWS遺伝子の5'活性化ドメインの、ERG(t(21;22)(q22;q12))またはETV1(t(7;22)(p21;q12))のようなETSファミリーメンバーの高度に保存された3' DNA結合ドメインへの融合は、ユーイング肉腫の特徴を示す(Lapointe et al., 前記; Zhan et al., Blood 99, 1745 (2002); Fonseca et al., Cancer Res 64, 1546 (2004))。ETSファミリーメンバーに関係する転座は発癌性形質転換において機能的に重複性であるため、典型的には、転座の1つの型のみが、ユーイング肉腫の各症例に観察される。

【0232】

ERGおよびETV1が同じように前立腺癌の発生に関与する場合には、それらのアウトライアープロファイルはお互いに排他的であるはずである、すなわち、各症例は2つの遺伝子のうちの1つのみを過剰発現するはずであることが予想された。機能的重複性遺伝子、または同じ発癌経路における遺伝子での突然変異は、腫瘍の進行において同時選択されそうにない。ERGおよびETV1の接合発現プロファイルがいくつかの前立腺癌データセットに渡って調べられ、それらはお互いに排除的なアウトライアープロファイルを示すことが見出された。異なるマイクロアレイプラットフォームを用いて肉眼的に解剖された前立腺組織をプロファイリングした2つの大規模トランスクリプトーム研究(Wang et al., 前記; Cheok et al., Nat Genet 34, 85 (2003))からのERGおよびETV1発現プロファイルが同定された(図1A、左および中央パネル)。Lapointeらの研究は、良性前立腺組織、臨床的に局在した前立腺癌、および転移性前立腺癌をプロファイリングし、ERGおよびETV1アウトライアー発現が前立腺癌に限定されており、一方、Glinskyらによる研究は、臨床的に局在した前立腺癌試料のみをプロファイリングした。両方の研究において、前立腺癌は、ERGまたはETV1を排他的に発現した(図1A、右パネル)。同様の結果は、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション(LCM)により得られた99個の前立腺組織試料のプロファイリング研究に見出された(Welsh et al., 前記)。ERGまたはETV1のいずれかの排他的アウトライアー発現(図1B、右パネル)に加えて、LCM研究からの結果は、ETV1およびERGが、前立腺癌または転移性前立腺癌由来の上皮細胞においてのみ過剰発現するが、推定の前駆病変前立腺上皮内腫瘍(PIN)または隣接した良性上皮においては過剰発現しないことを実証した。観察された排他的アウトライアーパターンが、活性化遺伝子が複数のパートナーと融合できる他の転座と一致しているかどうかを直接的に決定するために、Zhanらの多発性骨髄腫データセット(Dhanasekaran et al., Nature 412, 822 (2001))を調べた。免疫グロブリン重鎖プロモーターのCCND1またはFGFR3への再発性融合、それぞれ、t(11,14)またはt(4,14)は、多発性骨髄腫の特定のサブセットを特徴付ける(Wigle et al., Cancer Res 62, 3005 (2002))。CCND1は75thパーセンタイルにおける最高スコアリングアウトライアーであり、FGFR3は95thパーセンタイルにおける3番目に高いスコアリングアウトライアーであったように(表1)、これらの転座は、アウトライアープロファイル分析において反映された(図1C)。2つの症例を除いて、骨髄腫試料は、CCND1またはFGFR3の排他的過剰発現を示した(図1C、右パネル)。総合すれば、複数の前立腺癌データセットに渡るERGおよびETV1のアウトライアープロファイルは、様々なヒト悪性腫瘍における他の原因の突然変異と一致している。個々の前立腺癌試料におけるERGまたはETV1の排他的過剰発現は、活性化遺伝子が、多発性骨髄腫においてのように、生物学的重複性パートナー遺伝子と融合できる他の腫瘍と一致している。

【0233】

前立腺癌におけるTMPRSS2のERGまたはETV1への再発性遺伝子融合の発見

個々の前立腺癌試料におけるERGおよびETV1過剰発現の機構を次に決定した。ERGまたはETV1を過剰発現する前立腺癌細胞系および臨床検体を、定量的PCR(QPCR)を行うことにより同定した(図2A)。LNCaP前立腺癌細胞系およびホルモン抵抗性転移性前立腺癌で死亡した患者から得られた2つの検体(MET-26RP、前立腺における残存原発性癌腫、およびMET-26LN、リンパ節転移)はQPCRによりETV1を著しく過剰発現した(図2A)。この患者由来の前立腺における残存癌腫のみならず、異なる解剖学的部位由来の5つの独立した転移巣もまた、DNAマイクロアレイ分析によりETV1を過剰発現し(Welsh et al., 前記)、ETV1活性化が広範な転移の前に原発腫瘍に起こったことを示唆した。リンパ節転移もまた、ホルモン抵抗性転移性前立腺癌(MET-28LN)で死亡した第二の患者、およびERGを過剰発現する2つの前立腺癌細胞系、VCaPおよびDuCaPから同定された(図2A)。これらの細胞系は、ホルモン抵抗性前立腺癌をもつ第三の患者由来の脊椎転移(VCaP)および硬膜転移(DuCaP)から独立して単離された(Golub et al., Science 286, 531 (1999); Rosenwald et al., Cancer Cell 3, 185 (2003))。これらの2つの細胞系における共通のERGの過剰発現は、この場合もやはり、ERG活性化が広範な転移前に起こったことを示唆する。総合すれば、これらの結果は、特定の遺伝的事象が、前立腺腫瘍形成中に個々の試料においてERGまたはETV1を活性化しうることを示唆する。

【0234】

これらの遺伝的事象を特徴付けるための努力において、高ERGまたはETV1発現をもつ試料を、それらのそれぞれの座(7p21.2および21q22.3)における染色体増幅について試験した。ゲノムDNAにおけるQPCRにより、それぞれの転写産物過剰発現を有する試料(Sotiriou et al., Proc Natl Acad Sci USA 100, 10393 (2003))におけるERGまたはETV1の増幅は見出されなかった。次に、DNA再配列の発生をアッセイした。上記のQPCRに用いられるプライマーは、ユーイング肉腫におけるERGおよびETV1についての既知の切断点の5'側に位置していたため、同じ転座が前立腺癌に起こることはありそうになかった。従って、ETV1エキソンの発現レベルを、ETV1過剰発現を示した、上で同定された試料においてQPCRをエキソンウォーキングすることにより測定した。ETV1エキソン2~7にまたがる5つのプライマー対を用い、LNCaP細胞は、すべての測定されたETV1エキソンの本質的に均一な過剰発現を示し、両方のMET26検体は、ETV1エキソン4~7と比較してETV1エキソン2および3の発現における>90%低下を示した(図2B)。この結果についての可能性のある説明は、選択的スプライシング、新規な癌特異的アイソフォーム、または報告されていない再配列を含む。

【0235】

完全長ETV1転写産物を特徴付けるために、cDNA末端の5'RNAリガーゼ媒介性迅速増幅(RLM-RACE)を、LNCaP細胞およびMET26-LNについて行った。加えて、RLM-RACEを、MET28-LNにおいてERGの完全長転写産物を得るために行った。RLM-RACE cDNAからのETV1のPCR増幅について、完全転写産物の5'末端にライゲーションされたRNAオリゴヌクレオチドに相補的なフォワードプライマー、およびエキソン4、LNCaP細胞およびMET26-LNにおいて過剰発現した最も5'側のエキソン、におけるリバースプライマーを用いた。上記と類似したストラテジーを利用して、ERGのエキソン4がMET28-LNにおいて過剰発現することが測定された。このエキソンにおけるリバースプライマーを、RLM-RACE cDNAのPCR増幅に利用した。クローニングされた産物のシーケンシングにより、前立腺特異的遺伝子TMPRSS2(28)(21q22.2)のMET26-LNにおけるETV1との、およびMET28-LNにおけるERGとの融合が明らかにされた(図2C)。MET26-LNにおいて、2つのRLM-RACE PCR産物を同定した。第一の産物、TMPRSS2:ETV1aは、結果として、TMPRSS2の完全なエキソン1の、ETV1のエキソン4の始めとの融合を生じた(図2C)。第二の産物、TMPRSS2:ETV1bは、結果として、TMPRSS2のエキソン1および2の、ETV1のエキソン4の始めとの融合を生じた(図6)。両方の産物は、MET26-LNがエキソン2および3における過剰発現の喪失を示した上記のエキソンウォーキングQPCRと一致した。MET28-LNにおいて、単一のRLM-RACE PCR産物を同定し、シーケンシングにより、TMPRSS2の完全なエキソン1の、ERGのエキソン4の始めとの融合(TMPRSS2:ERGα)が明らかにされた(図2C)。

【0236】

前立腺癌におけるTMPRSS2:ERGおよびTMPRSS2:ETV1遺伝子融合の確証

これらの結果に基づいて、TMPRSS2におけるフォワードプライマーならびにERGおよびETV1のエキソン4におけるリバースプライマーを有するQPCRプライマー対を設計した。SYBR Green QPCRを、臨床的に局在した前立腺癌および転移性前立腺癌の42個の症例由来の試料のパネルに渡って両方のプライマーを用いて行い、代表的な結果を描いた(図2、DおよびE)。これらの結果は、高レベルのETV1またはERG発現をもつ試料のみが、TMPRSS2とのそれぞれの融合産物を発現することを実証している。QPCRは結果として、いくつかの陰性試料において35サイクル後の測定可能な産物を生じたが、融解曲線分析により、陽性および陰性試料における別個の産物が明らかにされ、40サイクルQPCR分析後の産物のゲル電気泳動により、陰性融合試料においてプライマー二量体のみが明らかにされた(図2、DおよびE)。プライマー二量体の形成は、高GC含量(80.3%)によりTMPRSS2のエキソン1において全体にプライマーを設計することの困難によって一部、説明されうる。しかしながら、TMPRSS2:ERGa、TMPRSS2:ETV1a、およびTMPRSS2:ETV1b融合の特異的発現は、それぞれの融合にまたがるフォワードプライマーでのTaqman QPCRを用いて確認され、いずれの場合でも、産物は、SYBR Green QPCRと同じ症例において検出されるのみであった(Sotiriou et al., 前記)。SYBR Green QPCRに用いられたプライマーの特異性および単位複製配列をさらに確認するために、標準逆転写PCRを、TMPRSS2:ERGaを発現する試料のパネルについてSYBR Green QPCRと同じプライマーを用いて行った。類似したサイズの産物が得られ、クローニングされた産物のシーケンシングにより、TMPRSS2:ERGaの存在が確認された。高レベルのETV1またはERGをそれぞれ、発現したが、QPCRにより転座の証拠を示さなかった2つの症例、PCA16およびPCA17(図2、DおよびE)を同定した。PCA16においてETV1プライマーで産生された産物のシーケンシングにより、融合転写産物の証拠が明らかにされず、PCA17においてERGプライマーでいずれの産物も得ることができなかったため、RLM-RACEはこれらの結果を支持した。同様の結果はLNCaP細胞について得られ、上記のエキソンウォーキングQPCRと一致して、RLMRACEまたはQPCRによる融合の証拠はなかった。

【0237】

前立腺癌試料におけるETSファミリーメンバーとのTMPRSS2融合転写産物の証拠の要約

RLM-RACE産物のシーケンシング、QPCR、およびRT-PCR産物のシーケンシングを含むTMPRSS2:ERGおよびTMPRSS2:ETV1融合転写産物についての3つの異なるアッセイからの結果は、表2に要約されている。すべての試料において行われることになっているTMPRSS2融合についてのQPCRに加えて、これらの融合の存在を、選択された試料についていくつかの技術を用いて確認した。例えば、PCA1(前立腺癌試料1)において、TMPRSS2:ERGaは、RLMRACE産物のシーケンシング、QPCR、およびRT-PCR産物のシーケンシングを用いて同定された。QPCR融解曲線分析およびQPCR産物のゲル電気泳動により、PCA4は、予想より大きい単位複製配列を産生した。その後のRLM-RACE分析は、TMPRSS2の完全なエキソン1の、ERGのエキソン2の始めとの融合(TMPRSS2:ERGb)を確認した(図6)。TMPRSS2:ERGb接合部にまたがるフォワードプライマーでのTaqman QPCRは、PCA4においてのみTMPRSS2:ERGbの存在を確認し、TMPRSS2:ERGa接合部にまたがるフォワードプライマーでのTaqman QPCRは、この検体において産物を生じなかった(27)。TMPRSS2:ERGおよびTMPRSS2:ETV1融合の証拠は、QPCRまたはDNAマイクロアレイにより、それぞれ、ERGまたはETV1を過剰発現した症例においてのみ見出された。これらの結果は、アウトライナー分析に観察された排他的発現と一致している。

【0238】

蛍光インサイチューハイブリダイゼーション(FISH)はTMPRSS2:ETV1転座およびERG再配列を確認する

TMPRSS2:ETV1およびTMPRSS2:ERG融合転写産物の存在を確認した後、染色体レベルにおけるこれらの再配列の証拠は、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)検体上での間期蛍光インサイチューハイブリダイゼーション(FISH)を用いて得られた。以下の2つの異なるプローブストラテジーが用いられた：TMPRSS2:ETV1転座を検出するための2色の融合シグナルアプローチ、およびERG座の再配列を検出するための2色の分裂シグナルアプローチ。これらのプローブストラテジーは、RLM-RACE、MET26、およびMET28に最初に用いられた2つ

の症例について確認された(図3)。TMPRSS2およびETV1についてのプローブを用いて、正常な末梢リンパ球(NPL)は、1ペアの赤色シグナルおよび1ペアの緑色シグナルを示した(図3A)。MET26は、プローブ重複を示す1ペアのシグナルの融合を示し(図3B、黄色矢じり)、この試料におけるTMPRSS2:ETV1転写産物の発現と一致した。加えて、ETV1についての2つの残りのシグナルにより示されているように、ETV1座の一貫した低レベル増幅が同定された(図3B、赤色矢じり)。同様に、ERG座の5'および3'領域にまたがるプローブを用いて、NPLにおいて1ペアの黄色シグナルが観察された(図3C)。MET28において、1ペアのプローブは、ERG座における再配列を示す離れた緑色シグナルおよび赤色シグナルへ分裂した(図3D、緑色および赤色矢印)。この結果は、この症例におけるTMPRSS2:ERG転写産物の発現と一致している。これらの結果に基づいて、上記の個々のFISH分析を、局在性前立腺癌の13個の症例および転移性前立腺癌の16個の症例からのコアを含む連続的組織マイクロアレイについて行った(図3E)。マトリックスにより示されているように、29個の症例のうちの23個(79.3%)は、TMPRSS2:ETV1融合(7個の症例)またはERG再配列(16個の症例)の証拠を示した。加えて、29個の症例のうちの12個(41.4%)がETV1座における低レベル増幅の証拠を示した。以前の報告は、ETV1のゲノム位置、7pを局在性および転移性前立腺癌において最もよく増幅される領域の一つであると同定している(Slamon et al., Science 235, 177 (1987))。しかしながら、ETV1増幅はERG再配列を有する6個の症例において起こり、本発明の転写産物データは、高ERG発現およびTMPRSS2:ERG融合を有する19個の試料のうちのいずれもまた高ETV1発現を有しないことを実証しているため、7p増幅がETV1発現を作動させるとは思われな

い。さらになお、ETV1増幅およびTMPRSS2:ETV1融合の両方がFISHにより存在する場合、個々のETV1シグナルのみが増幅され、融合したシグナルは増幅されない。いずれにせよ、このFISH分析からの結果は、上記の転写産物データと一致した、ゲノムレベルにおけるTMPRSS2:ETV1およびERG再配列の存在を実証している。

【0239】

TMPRSS2はアンドロゲン制御遺伝子であり、ERGとの融合は、結果として、ERGのアンドロゲン制御を生じる。TMPRSS2は、最初に、LNCaP細胞において発現がアンドロゲンにより増加する前立腺特異的遺伝子であると同定され、また、そのプロモーターにアンドロゲン応答性エレメント(ARE)を含む(Huang et al., Lancet 361, 1590 (2003); Schwartz et al., Cancer Res 62, 4722 (2002))。その後の研究は、正常および腫瘍性前立腺組織における高発現を確認し、TMPRSS2は、アンドロゲン感受性前立腺細胞系においてアンドロゲン制御されることを実証した(Schwartz et al., Cancer Res 62, 4722 (2002); Ferrando et al., Cancer Cell 1, 75 (2002); Chen et al., Mol Biol Cell 14, 3208 (2003); LaTulippe et al., Cancer Res 62, 4499 (2002))。加えて、アンドロゲンは、アンドロゲン非感受性前立腺癌細胞系PC3においてTMPRSS2の発現を増加させないが、PC3細胞におけるアンドロゲン受容体の安定な発現は、結果として、TMPRSS2がアンドロゲン応答性になることを生じる(Schwartz et al., 前記; Ferrando et al., 前記; Chen et al., 前記; LaTulippe et al., 前記)。対照的に、アンドロゲンで処理されたLNCaP前立腺細胞系のマイクロアレイ研究は、ERGまたはETV1をアンドロゲン応答性であると同定せず(Jain et al., Cancer Res 64, 3907 (2004))、それらのプロモーター配列の調査により、コンセンサスAREが明らかにされなかった(Sotiriou et al., 前記)。各細胞系において3つの独立したアッセイにより確認された(表2)、DuCaPおよびVCaP細胞系におけるTMPRSS2:ERG融合は、結果として、ERGのアンドロゲン制御を生じるだろうと予想された。ERG発現についてアッセイするためにQPCRを用いて、ERGがVCaPおよびDuCaP細胞の両方において高く発現していたにもかかわらず、合成アンドロゲンR1881での処理は、未処理の対照と比較して、DuCaP細胞において2.57倍、およびVCaP細胞において5.02倍、ERGの発現を増加させた(図4)。ERGの発現は、R1881処理後、未処理の対照と比較して、RWPE(1.37倍)、LNCaP(0.86倍)、PC3(1.28倍)、およびアンドロゲン受容体を発現するPC3細胞(0.73倍)において、最小で、本質的に変化しなかった。

【0240】

同じ試料のマイクロアレイ分析は、ERGが、DuCaPおよびVCaP細胞においてのみアンドロ

ゲンに応答して上方制御されることを確認した(Sotiriou et al., 前記)。本発明は特定の機構に限定されない。実際、機構の理解は本発明を実施するために必要ではない。とはいえ、これらの結果は、TMPRSS2とのそれぞれの融合が存在する場合、前立腺癌におけるERGまたはETV1の異常な発現についての可能性のある機構を示唆することが予想される。

【0241】

表1. 癌アウトライアープロファイル分析(COPA)。強いアウトライアープロファイルを有した、癌において原因の突然変異を起こすことが知られた遺伝子。「X」は、獲得された特徴的な転座の文献証拠を表す。「XX」は特定の転座、加えてその転座について特徴付けられた特定の研究における試料の文献証拠を表す。「Y」は既知の増幅と一致していることを表す。「**」は前立腺癌におけるERGおよびETV1アウトライアープロファイルを表す。

10

【0242】

(表1)

ランク	%	スコア	研究	癌	遺伝子	証拠	
			Valk et al., N Engl J				
1	95	20.056	Med 350, 1617 (2004)	白血病	<i>RUNX1T1</i>	XX	
1	95	15.4462	Vasselli et al., PNAS USA 100, 6958 (2003)	腎臓	<i>PRO1073</i>	X	
1	90	12.9581	Ross et al., Blood 102, 2951 (2003).	白血病	<i>PBX1</i>	XX	10
1	95	10.03795	Lapointe et al., PNAS USA 101, 811 (Jan 20, 2004)	前立腺	<i>ETV1</i>	**	
1	90	9.1163		前立腺	<i>ETV1</i>	**	
1	90	7.4557	Tian et al., N Engl J Med 349, 2483 (2003)	骨髄腫	<i>WHSC1</i>	X	20
1	75	5.4071	Dhanasekaran et al., Nature 412, 822 (2001)	前立腺	<i>ERG</i>	**	
1	75	4.3628	Welsh et al., Cancer Res 61, 5974 (2001)	前立腺	<i>ERG</i>	**	
1	75	4.3425	Zhan et al., Blood 99, 1745 (2002)	骨髄腫	<i>CCND1</i>	X	
1	75	3.4414	Lapointe et al., supra	前立腺	<i>ERG</i>	**	30
1	75	3.3875	Dhanasekaran et al., Faseb J 19, 243 (2005)	前立腺	<i>ERG</i>	**	
2	90	6.7029		前立腺	<i>ERG</i>	**	
3	95	13.3478	Zhan et al., supra	骨髄腫	<i>FGFR3</i>	X	
4	75	2.5728	Huang et al., Lancet 361, 1590 (2003)	乳房	<i>ERBB2</i>	Y	40
6	90	6.6079	Sotiriou et al., PNAS USA 100, 10393 (2003)	乳房	<i>ERBB2</i>	Y	
9	95	17.1698	Glinsky et al., J Clin Invest 113, 913 (2004)	前立腺	<i>ETV1</i>	**	
9	90	6.60865	Nielsen et al.,	肉腫	<i>SSX1</i>	X	

Lancet 359, 1301

(2002)

9 75 2.2218 Yu et al., J Clin 前立腺 *ERG* **
 Oncol 22, 2790
 (2004)

【0243】

表2は、前立腺癌試料および細胞系におけるETSファミリーメンバーの地位へのTMPRSS2融合の要約を示す。すべてのアッセイについて、陽性結果は「+」で示され、陰性結果は「-」で示される。空白の細胞は、特定のアッセイがその試料について行われなかったことを示す。定量的PCR(QPCR)によるERGまたはETV1の過剰発現が示され、アスタリスクでマークを付けられた試料は、試料がまたcDNAマイクロアレイによりアッセイされて、過剰発現が確認されたことを示す。TMPRSS2:ERGまたはTMPRSS2:ETV1遺伝子融合を検出するために、過剰発現したETSファミリーメンバーについて選択された試料を、RLM-RACEに供し、シーケンシング後、TMPRSS2融合をもつ試料が示されている。すべての試料は、QPCRによりTMPRSS2:ETV1およびTMPRSS2:ERG発現についてアッセイされた。選択された症例はまた、QPCRについてと同じTMPRSS2融合プライマーを用いて逆転写PCR(RT-PCR)により増幅され、単位複製配列はシーケンシングされた。TMPRSS2:ETV1またはTMPRSS2:ERG融合について

【0244】

(表2)

症例	試料	QPCR 発現	TMPRSS2:ETSファミリーメンバー遺伝子融合アッセイ				TMPRSS2 :ETS
			RLM- RACE シーケンシング	QPCR TMPRSS2: ETV1	QPCR TMPRSS2: ERG	RT-PCR シーケンシング	ファミリー メンバー 融合
1	MET26-LN	ETV1*	+	+	-		+
1	MET26-RP	ETV1*		+	-		+

2	MET28-B	ERG		-	+		+	10
2	MET28-PTLN	ERG		-	+		+	
2	MET28-41	ERG		-	+		+	
2	MET28-LN	ERG	+	-	+		+	
3	MET16-44	ERG		-	+		+	
3	MET16-47	ERG		-	+		+	20
4	MET3	ERG*		-	+		+	
5	MET18-23	ERG*		-	+	+	+	
6	PCA1	ERG*	+	-	+	+	+	
7	PCA2	ERG*		-	+	+	+	
8	PCA3	ERG*		-	+	+	+	
9	PCA4	ERG*	+	-	+		+	
10	PCA5	ERG*	+	-	+		+	
11	PCA6	ERG*		-	+		+	
12	PCA7	ERG*	+	-	+		+	
13	PCA8	ERG*		-	+		+	30
14	PCA9	ERG*		-	+		+	
15	PCA10	ERG*		-	+		+	
16	PCA11	ERG*		-	+		+	
17	PCA12	ERG*		-	+		+	
18	PCA13	ERG*		-	+		+	
19	PCA14	ERG*		-	+		+	
20	PCA15	ERG*		-	+		+	
21	PCA16	ETV1*	-	-	-		-	
22	PCA17	ERG*	-	-	-		-	40
23	MET30-LN	-		-	-		-	
24	MET17-12	-		-	-		-	
25	MET20-76	-		-	-		-	
26	MET22-61	-		-	-		-	

27	MET5-7	-		-	-	-	
28	PCA18	-		-	-	-	
29	PCA19	-		-	-	-	
30	PCA20	-		-	-	-	
31	PCA21	-		-	-	-	
32	PCA22	-		-	-	-	
33	PCA23	-		-	-	-	
34	PCA24	-		-	-	-	10
35	PCA25	-		-	-	-	
36	PCA26	-		-	-	-	
37	PCA27	-		-	-	-	
38	PCA28	-		-	-	-	
39	PCA29	-		-	-	-	
40	PCA30	-		-	-	-	
41	PCA31	-		-	-	-	
42	PCA32	-		-	-	-	
細胞系	VCap	ERG	+	-	+	+	20
細胞系	DUCaP	ERG		-	+	+	
細胞系	LnCaP	ETV1	-	-	-	-	
細胞系	DU145	-		-	-	-	
細胞系	PC3	-		-	-	-	30
細胞系	RWPE	-		-	-	-	

【0245】

表3. 癌アウトライアープロファイル分析(COPA)。Oncomineにおける研究の上位10個にアウトライアープロファイルを有する癌において原因の突然変異を起こすことが知られている遺伝子が示されている。「X」は、獲得された特徴的な転座の文献証拠を表す。「XX」は特定の転座、加えて特定の研究における試料がその転座について特徴付けられたことの文献証拠を表す。「Y」は既知の増幅と一致していることを表す。「**」は前立腺癌におけるERGおよびETV1アウトライアープロファイルを表す。

40

【0246】

(表3)

ランク	%	スコア	研究	癌	参考文献	遺伝子	証拠
					Nature		
1	90	21.9346	Bittner et al.	黒色腫	406, 536 (2000)	CDH1	
1	95	20.056	Valk et al.	白血病	Nature 406, 536 (2000)	RUNX1T1	XX
1	95	15.4462	Vasselli et al.	腎臓	PNAS USA 100, 6958 (2003)	PRO1073	X (12)
1	95	14.2008	Segal et al.	肉腫	J Clin Oncol 21, 1775 (2003)	MYH11	
1	90	12.9581	Ross et al.	白血病	Blood 102, 2951 (2003)	PBX1	XX
1	95	10.03795	Lapointe et al.	前立腺	PNAS USA 101, 811 (2004)	ETV1	**
1	90	9.1163		前立腺		ETV1	**
1	90	7.4557	Tian et al.	骨髓腫	N Engl J Med 349, 2483 (2003)	WHSC1	X (16)
1	75	5.4071	Dhanasekaran et al.	前立腺	Faseb J 19, 243 (2005)	ERG	**
1	75	5.2067	Wang et al.	乳房	Lancet 365, 671 (2005)	FOXO3A	
1	75	4.3628	Welsh et al.	前立腺	Cancer Res 61, 5974 (2001)	ERG	**
1	75	4.3425	Zhan et al.	骨髓腫	Blood 99, 1745 (2002)	CCND1	X (21)
1	75	3.724	Cheok et al.	白血病	Nat Genet	PCSK7	

10

20

30

40

					34, 85 (May, 2003) PNAS USA 101, 811 (2004)	ERG	**	
1	75	3.4414	Lapointe et al.	前立腺				
1	75	3.3875	Dhanasekaran et al.	前立腺	Nature 412, 822 (2001) Cancer Res 62, 3005 (2002) Blood 102, 2951 (2003) Science 286, 531 (1999) Science 286, 531 (1999) Nat Genet 34, 85 (May, 2003)	ERG	**	10
1	75	2.5913	Wigle et al.	肺		IGH@		
2	90	12.7953	Ross et al.	白血病		HOXA9		20
2	95	9.2916	Golub et al.	白血病		TRA@		
2	95	9.2916	Golub et al.	白血病		TRD@		
2	90	8.2292	Cheok et al.	白血病		SSX2		30
2	90	6.7029		前立腺		ERG	**	
3	95	13.3478	Zhan et al.	骨髓腫	Blood 99, 1745 (2002) Nat Genet 34, 85 (May, 2003)	FGFR3	X (21)	
3	95	10.2267	Cheok et al.	白血病		ARHGAP26		40
3	90	5.9174		前立腺		REL		
3	75	2.6162	Rosenwald et al.	リンパ腫	Cancer Cell 3, 185 (2003)	TCL1A		

3	75	2.036	Sotiriou et al.	乳房	PNAS USA 100, 10393 (2003)	RAD51L1		
4	75	8.4985	Bittner et al.	黒色腫	Nature 406, 536 (2000)	TP53		
4	90	5.4881	Golub et al.	白血病	Science 286, 531 (1999)	LCK		10
4	75	2.5728	Huang et al.	乳房	Lancet 361, 1590 (2003)	ERBB2	Y(29)	
4	75	2.0229	Schwartz et al.	卵巣	Cancer Res 62, 4722 (2002)	IGL@		20
6	90	17.3733	Ferrando et al.	白血病	Cancer Cell 1, 75 (2002)	ZBTB16		
6	95	9.1267	Chen et al.	胃	Mol Biol Cell 14, 3208 (2003)	FGFR2		
6	90	6.6079	Sotiriou et al.	乳房	PNAS USA 100, 10393 (2003)	ERBB2	Y(29)	30
6	75	5.7213	LaTulippe et al.	前立腺	Cancer Res 62, 4499 (2002)	NF1		
6	75	5.2752	Jain et al.	内分泌腺	Cancer Res 64, 3907 (2004)	PHOX2B		40
6	90	4.8383	Lapointe et al.	前立腺	PNAS USA 101, 811	LAF4		

					(2004)			
					Nature			
6	90	4.1779	Alizadeh et al.	リンパ腫	403, 503	IRTA1		
					(2000)			
					N Engl J			
6	90	3.6325	Rosenwald et al.	リンパ腫	Med 346,	IRTA1		
					1937			
					(2002)			10
					Mol Biol			
6	75	1.85865	Chen et al.	肝臓	Cell 13,	HMGA1		
					1929			
					(2002)			
					Proc Natl			
					Acad Sci			
7	95	4.7561	Alon et al.	結腸	U S A 96,	NONO		
					6745			
					(1999)			20
					Mol Biol			
7	75	1.8133	Chen et al.	肝臓	Cell 13,	GPC3		
					1929			
					(2002)			
					Blood			
8	90	4.7068	Lacayo et al.	白血病	104, 2646	EVI1		
					(2004)			
					Blood			30
8	90	4.7068	Lacayo et al.	白血病	104, 2646	MDS1		
					(2004)			
					J Clin			
9	95	17.1698	Glinsky et al.	前立腺	Invest	ETV1	**	
					113, 913			
					(2004)			
9	90	15.3889	Ferrando et al.	白血病	Ferrando	MN1		
					et al.,			
					Cancer			40
					Cell 1, 75			
					(2002)			
					Lancet			
9	90	6.60865	Nielsen et al.	肉腫	359, 1301	SSX1	X (42)	
					(2002)			
9	90	4.4875	Lapointe et al.	前立腺	PNAS	CHEK2		

					USA 101, 811 (2004) J Clin Oncol 22, 2790 (2004) Segal et al., J Clin		
9	75	2.2218	Yu et al.	前立腺		ERG	**
10	95	10.6036	Segal et al.	肉腫	Oncol 21, 1775 (2003)	KIT	

10

【0247】

表4. この研究に用いられたオリゴヌクレオチドプライマー。すべてのプライマーについて、遺伝子、塩基、およびエキソン(UCSC Genome Browserを用いるヒトゲノムの2004年5月アセンブリ(May 2004 assembly of the Human Genome)に関するテキストに記載された参照配列のアラインメントによる)が列挙されている。フォワードプライマーは「f」で、リバープライマーは「r」で示されている。

20

【0248】

(表4)

遺伝子	塩基	エキソン	プライマー	配列5' から3' へ	SEQ ID NO
ETV1	193- 216	2	Exon 2- 3_f	AACAGAGATCTGGCTCATGATTCA	1
ETV1	268- 245	3	Exon 2- 3_r	CTTCTGCAAGCCATGTTTCCTGTA	2
ETV1	248- 271	3-4	Exon 3- 4_f	AGGAAACATGGCTTGCAGAAGCTC	3
ETV1	305- 280	4	Exon 3- 4_r	TCTGGTACAAACTGCTCATCATTGTC	4
ETV1	269- 294	4	Exon 4- 5_f	CTCAGGTACCTGACAATGATGAGCAG	5
ETV1	374- 351	5	Exon 4- 5_r	CATGGACTGTGGGGTTCTTTCTTG	6
ETV1	404- 429	5	Exon 5- 6_f	AACAGCCCTTTAAATTCAGCTATGGA	7
ETV1	492- 472	6	Exon 5- 6_r	GGAGGGCCTCATTCCCCTTG	8
ETV1	624- 645	6-7	Exon 6- 7_f	CTACCCCATGGACCACAGATTT	9
ETV1	771- 750	7	Exon 6- 7_r	CTTAAAGCCTTGTGGTGGGAAG	10
ERG	574- 597	5-6	Exon 5- 6_f	CGCAGAGTTATCGTGCCAGCAGAT	11
ERG	659- 636	6	Exon 5- 6_r	CCATATTCTTTCACCGCCCACTCC	12
NA	NA	NA	Generace r 5'_f	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	13
ETV1	374- 351	5	Exon 4- 5_r	CATGGACTGTGGGGTTCTTTCTTG	14
ERG	284- 263	4	Exon 4a_r	GGCGTTCGCTAGGCACACTCAA	15
ERG	396- 377	4	Exon 4b_r	CCTGGCTGGGGGTTGAGACA	16
TMPRS S2	-4 - 17	1	TMPRSS 2:ERG_f	TAGGCGCGAGCTAAGCAGGAG	17
ERG	276- 252	4	TMPRSS 2:ERG_r	GTAGGCACACTCAAACAACGACTGG	18
TMPRS S2	1-19	1	TMPRSS 2:ETV1_f	CGCGAGCTAAGCAGGAGGC	19
ETV1	339- 318	4-5	TMPRSS 2:ETV1_r	CAGGCCATGAAAAGCCAACTT	20

【 0 2 4 9 】

実施例2

ETV4遺伝子融合

10

20

30

40

50

A. 材料および方法

プロファイリング研究におけるETSファミリー発現

前立腺癌においてETSファミリーメンバーの発現を調べるために、Oncomineデータベース(Rhodes et al., Neoplasia 2004;6:1-6)に存在する2つの前立腺癌プロファイリング研究が利用された(Lapointe et al., Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:811-6およびTomlins et al., Science 2005;310:644-8)。ETSドメインを含む遺伝子は、Interproフィルター「Ets」(Interpro ID:IPR000418)により同定された。ヒートマップ表示は、「遺伝子につき中央値中心」オプションを用いてOncomineにおいて作成され、色の対比は、ERGおよびETV1示差的発現を際立たせるために設定された。

【0250】

10

試料

前立腺癌組織(PCA1~5)は、Research Excellence (S.P.O.R.E.) Tissue CoreのUniversity of Michigan Prostate Cancer Specialized Programの一部である、University of Michiganにおける前立腺全摘出術シリーズ由来であった。すべての試料は、患者のインフォームド Consent および事前の機関内審査委員会承認を得て収集された。全RNAは、Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA)で製造会社の使用説明書に従って単離された。市販されている良性前立腺組織全RNAのプール(CPP, Clontech, Mountain View, CA)もまた用いられた。

【0251】

20

定量的PCR(QPCR)

QPCRは、記載されているように(Tomlins et al., 前記)、Applied Biosystems 7300リアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems, Foster City, CA)上でSYBR Green色素を用いて行われた。各試料についてハウスキーピング遺伝子グルセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)に対する各標的遺伝子の量が報告された。標的遺伝子の相対量は、良性前立腺組織(CPP)のプールからの相対量に対して校正された。すべてのオリゴヌクレオチドプライマーは、Integrated DNA Technologies(Coralville, IA)により合成された。GAPDHプライマーは記載されている(Vandesompele et al., Genome Biol 2002;3:RESEARCH0034)。ETV4のエキソンについてのプライマーは以下のとおりである(5'から3'へ列挙されている)：

ETV4_exon2-f: CCGGATGGAGCGGAGGATGA (SEQ ID NO:21), EQ ID NO:21),

30

ETV4_exon2-r: CGGGCGATTTGCTGCTGAAG (SEQ ID NO:22), ETV4_exon3-f:

GCCGCCCCCTCGACTCTGAA (SEQ ID NO:23), ETV4_exon4-r:

GAGCCACGTCTCCTGGAAGTGACT (SEQ ID NO:24), ETV4_exon11-f:

CTGGCCGGTTCTTCTGGATGC (SEQ ID NO:25), ETV4_exon12-r:

CGGGCCGGGGAATGGAGT (SEQ ID NO:26),

ETV4_3'UTR-f: CCTGGAGGGTACCGGTTTGTCA (SEQ ID NO:27), ETV4_3'UTR-r:

CCGCCTGCCTCTGGGAACAC (SEQ ID NO:28)

40

。エキソンは、UCSC Genome Browserを用いてヒトゲノムの2004年5月リリース(May 2004 freeze)でのETV4(NM_001986.1)についてのRefSeqのアラインメントにより番号を付けられた。TMPRSS2:ETV4融合転写産物のQPCR確認について、TMPRSS2:ETV4aおよびTMPRSS2:ETV4b転写産物の両方を検出する

TMPRSS2:ETV4a-f(AAATAAGTTTGTAAGAGGAGCCTCAGCATC (SEQ

ID NO:29)) およびTMPRSS2:ETV4b-f(ATCGTAAAGAGCTTTTCTCCCCGC (SEQ ID

NO:30))

50

がETV4_exon4-rと共に用いられた。

【0252】

cDNA末端のRNAリガーゼ媒介性迅速増幅(RLM-RACE)

RLM-RACEは、記載されているように(Tomlins et al., 前記)、GeneRacer RLM-RACEキット(Invitrogen)を用いて製造会社の使用説明書に従って行われた。ETV4の5'末端を得るために、PCA5由来の第一鎖cDNAを、GeneRacer 5'プライマーおよびETV4_exon4-rまたはETV4_exon7-r

(GAAAGGGCTGTAGGGGCGACTGT

(SEQ ID NO:31))

を用いて増幅した。産物を、記載されているように(Tomlins et al., 前記)、クローニングし、シーケンシングした。TMPRSS2:ETV4転写産物の等価5'末端は、両方のプライマー対から得られた。

【0253】

蛍光インサイチューハイブリダイゼーション(FISH)

ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織切片が間期FISHに用いられた。脱パラフィンされた組織を、80℃において、0.2M HClで10分間、2x SSCで10分間、処理し、Proteinase K(Invitrogen)で10分間、消化した。組織およびBACプローブを、94℃で5分間、同時変性させ、37℃で一晩、ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、洗浄は、0.1% Tween-20を含む2x SSCで5分間であり、蛍光検出は、フルオレセインに結合した抗ジゴキシゲニン(Roche Applied Science, Indianapolis, IN)およびAlexa Fluor 594に結合したストレプトアビジン(Invitrogen)を用いて行われた。スライドは、DAPIを含むProLong Gold Antifade Reagent(Invitrogen)において対比染色され、マウントされた。スライドは、Leica DMRA蛍光顕微鏡(Leica, Deerfield, IL)を用いて調べられ、CytoVisionソフトウェアシステム(Applied Imaging, Santa Clara, CA)を用いてCCDカメラでイメージングされた。

【0254】

すべてのBACは、BACPAC Resource Center(Oakland, CA)から得られ、プローブ位置は、正常な末梢リンパ球の中期スプレッドへのハイブリダイゼーションにより検証された。TMPRSS2:ETV4融合の検出について、RP11-35C4(TMPRSS2の5'側)が、ETV4の3'側に位置した複数のBAC(ETV4の遠位から近位へ：RP11-266I24、RP11-242D8、およびRP11-100E5)と共に用いられた。ETV4再配列の検出について、RP11-436J4(ETV4の5'側)が、ETV4の3'側の複数のBACと共に用いられた。各ハイブリダイゼーションについて、癌性細胞の領域は、病理学者により同定され、試料あたり100個の細胞が数えられた。TMPRSS2:ETV4融合についての報告された細胞数はRP11-242D8を用い、同様の結果は、すべての3'ETV4 BACで得られた。PCA5において追加の再配列を排除するために、FISHは、ETV4の3'側の2つのプローブ(RP11-266I24およびRP11-242D8)、ERG分裂シグナルプローブ(RP11-95I21およびRP11-476D17)、およびTMPRSS2:ETV1融合プローブ(RP11-35C4およびRP11-124L22)で行われた。BAC DNAは、QIAfilter Maxi Prepキット(Qiagen, Valencia, CA)を用いて単離され、プローブは、ジゴキシゲニン-またはビオチン-ニックトランスレーション混合物(Roche Applied Science)を用いて合成された。

【0255】

B. 結果

最初のCOPAスクリーニングは、ERGまたはETV1とのTMPRSS2融合の特徴付けへと導いた(実施例1)。これらの遺伝子融合について陰性の前立腺癌が他のETSファミリーメンバーに関わる再配列を有することがさらに予想された。Oncomineデータベースから前立腺癌プロファイリング研究においてモニターされたすべてのETSファミリーメンバーの発現を質問することにより(Rhodes et al., 前記)、ETSファミリーメンバーETV4の著しい過剰発現が、2つの研究 — 肉眼的に解剖された組織をプロファイリングした1つ(Lapointe et al., 前記)(図7A)、およびレーザーキャプチャーマイクロダイセクション(LCM)された組織1

10

20

30

40

50

をプロファイリングした他方(図7B)のそれぞれから単一の前立腺癌症例において同定された。これらの症例はERGまたはETV1を過剰発現せず、かついずれの良性前立腺組織も過剰発現を示さなかったため、TMPRSS2との融合はこれらの症例においてETV4の過剰発現の原因であることが予想された。ELF3もまた、わずかの前立腺癌症例において過剰発現したが、両方の研究において、正常な前立腺組織試料もまた、著しいELF3過剰発現を示し、良性および癌性組織の両方における遺伝子融合作動性発現はありそうにないことを示している。従って、ETV4過剰発現症例(ここではPCA5と名付けられている)はさらに分析された。

【0256】

全RNAを、PCA5から単離し、ETV4の過剰発現を確認するためにエキソンウォーキング定量的PCR(QPCR)を用いた。QPCRは、ETV4のエキソン3'～エキソン2が、プールされた良性前立腺組織(CPP)(～900倍)およびETV4を過剰発現しない前立腺癌と比較してこの症例において著しく過剰発現し、TMPRSS2:ERG陽性(PCA1～2)かまたは陰性(PCA3～4)のいずれかであることを実証した(図8A)。しかしながら、PCA5における遠位領域に対してETV4のエキソン2の発現における劇的な減少(>99%)が観察され、TMPRSS2:ERGおよびTMPRSS2:ETV1陽性症例において前に観察されているように(Tomlins et al., 前記)、可能性のあるTMPRSS2との融合を示している。

【0257】

PCA5においてETV4転写産物の5'末端を同定するために、cDNA末端のRNAリガーゼ媒介性迅速増幅(RLM-RACE)を、エキソン7におけるリバープライマーを用いて行った。RLM-RACEにより、2つの転写産物が明らかにされ、それぞれは、ETV4由来の配列に融合したTMPRSS2の約8kb上流に位置する配列からなる5'末端を含んだ(図8B)。具体的には、TMPRSS2:ETV4aの5'末端は、TMPRSS2の上流のこの領域由来の47塩基対を有し、一方、TMPRSS2:ETV4bの5'末端は同じ末端の13塩基対を有した。両方の転写産物のこれらの5'末端は、ETV4のエキソン3のすぐ5'側のイントロンの9塩基対、およびエキソン3の報告された参照配列からETV4のエキソン7におけるリバープライマーまでからなる同じ連続したひと続きに融合した。

【0258】

PCA5における両方の転写産物の存在ならびにCPPおよびPCA1～4におけるそれらの非存在は、QPCRを用いて確認された。TMPRSS2由来の既知のエキソンに関わる融合転写産物の存在をさらに排除するために、QPCRを、TMPRSS2のエキソン1におけるフォワードプライマーおよびETV4エキソン4リバープライマーを用いて行い、予想どおり、CPPまたはPCA1～5においていずれの産物も検出されなかった。

【0259】

ETV4制御不全をもつ他の前立腺癌が、TMPRSS2:ERGおよびTMPRSS2:ETV1転写産物と構造的により類似したTMPRSS2:ETV4融合転写産物(TMPRSS2由来の既知のエキソンを含む)を含むかどうかは知られていない。本明細書で報告されたTMPRSS2:ETV4融合は、TMPRSS2のすぐ上流のよく特徴付けられたAREを含まない。しかしながら、本明細書に記載されたTMPRSS2:ETV4転写産物に存在するTMPRSS2配列の上流に位置するアンドロゲン応答性エンハンサーについての証拠が存在する(Rabbitts, Nature 1994;372:143-9)。いずれにせよ、この融合転写産物に関わるETV4エキソンのみの著しい過剰発現は、遺伝子融合がETV4の制御不全の原因であることを強く示唆している。合わせて、TMPRSS2:ETV4融合転写産物の構造は、転写されたTMPRSS2配列よりむしろ、TMPRSS2の上流の制御エレメントがETSファミリーメンバーの制御不全を作動させるという結論を支持する。

【0260】

RLM-RACEおよびQPCRにより実証されているように、TMPRSS2(21q22)およびETV4(17q21)を囲むゲノム座の融合を確認するために、間期蛍光インサイチュアライズ(FISH)が用いられた。TMPRSS2の5'側およびETV4の3'側のプローブを用いて、TMPRSS2およびETV4座の融合は、PCA5由来の癌性細胞の65%に観察された(図8D)。ETV4の再配列のさらなる確認として、ETV4の5'側および3'側のプローブを用いて、PCA5由来の癌性細胞の64%が分裂シグナルを示した。FISHはまた、追加の再配列を排除するためにETV4の3'側の2つ

のプローブ、ERG分裂シグナルプローブ、およびTMPRSS2:ETV1融合プローブを用いてPCA5に関して行われ、各ハイブリダイゼーションについて陰性結果が得られた。

【0261】

総合すれば、たいていの分析方法は一貫した制御解除を示さないプロファイルを無視し (Eisen et al., Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:14863-8; Golub et al., Science 1999;286:531-7; Tusher et al., Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:5116-21)、それに従って、まれ(98個の症例のうち2個)と思われる前立腺癌におけるETV4を同定することができないだろうため、その結果は、腫瘍遺伝子発現においてアウトライアープロファイルを注意深く調べることの効用を浮き彫りにしている。TMPRSS2:ERGおよびTMPRSS2:ETV1融合の同定と組み合わせて、本明細書に提示された結果は、AREの破壊またはTMPRSS2の上流のエ

10

【0262】

実施例3

遺伝子融合RNAの検出

この実施例は、APTIMA製剤試薬ならびに適切な標的特異的オリゴヌクレオチド、プライマーおよびプローブでそれぞれスパイクされるHPA検出を用いる、4つの別々の定性的アッセイにおける4つの遺伝子融合：TMPRSS2:ETV1a、TMPRSS2:ETV1b、TMPRSS2:ERGa、およびTMPRSS2:ERGbの配列を含むRNA (IVT) の標的捕獲、増幅、ならびに定性的検出を記載する。表5は、アッセイで用いられるオリゴヌクレオチドの配列を示す。

20

【0263】

(表5)

遺伝子融合	配列 (5' から	SEQ ID NO
TMPRSS2 exon1/標的捕獲	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATTTTCUCGAUUCGUCCUCCG	59
TMPRSS2 exon1/標的捕獲	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATTTTAUCGCGCGCUUGAUUCGUC	60
TMPRSS2 exon1/Non-T7	GAGGGCGAGGGGCGGGGAGCGCC	61
TMPRSS2 exon2/Non-T7	CCTATCATTACTCGATGCTGTTGATAACAGC	62
ETV1a/b exon4/T7	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAACTTTCAGCCTGATA	63
ERGb exon2/T7	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACTCTGTGAGTCATTTGTCTTGCTT	64
ERGa exon4/T7	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCAGCACTCAAACAACGACTG	65
TMPRSS2exon1:ETV1a接合部/AE	GCGCGGCAG-CUCAGGUACCUAGC	66
TMPRSS2exon2:ETV1b接合部/AE	GCUUUGAACUCA-CUCAGGUACCUAGC	67
TMPRSS2exon1:ERGa接合部/AE	GAGCGCGGCAG-GAAGCCUUAUCAGUUG	68
TMPRSS2exon1:ERGb接合部/AE	GAGCGCGGCAG-GUUAUUCAGGAUCUUU	69

30

【0264】

A. 材料および方法

RNA標的捕獲

溶解緩衝液は、15mMリン酸二水素ナトリウム一水和物、15mMリン酸水素二ナトリウム無水物、1.0mM EDTA二ナトリウム二水和物、1.0mM EGTA遊離酸、および110mMラウリル硫酸リチウム、pH6.7を含んだ。

40

【0265】

標的捕獲試薬は、pH6.4で、250mM HEPES、310mM水酸化リチウム、1.88M塩化リチウム、100mM EDTA遊離酸、および250 μg/ml 共有結合したdT₁₄オリゴマーを有する1ミクロン磁気粒子SERA-MAG MG-CM Carboxylate Modified (Seradyn, Inc., Indianapolis, Indiana)を含んだ。

【0266】

洗浄溶液は、pH7.5で、10mM HEPES、6.5mM水酸化ナトリウム、1mM EDTA、0.3%(v/v)エタノール、0.02%(w/v)メチルパラベン、0.01%(w/v)プロピルパラベン、150mM塩化ナトリウム、0.1%(w/v)ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)を含んだ。

【0267】

50

RNA増幅および検出

増幅試薬は、pH7.5で、26.7mM rATP、5.0mM rCTP、33.3mM rGTP、および5.0mM rUTP、125mM HEPES、8%(w/v)トレハロース二水和物、1.33mM dATP、1.33mM dCTP、1.33mM dGTP、および1.33mM dTTPを含む3.6mL溶液の凍結乾燥形であった。増幅試薬は、9.7mLの増幅試薬再構成溶液において再構成された(下記参照)。使用前に、15pmolの各プライマーオリゴマーが加えられた。

【0268】

増幅試薬再構成溶液は、0.4%(v/v)エタノール、0.10%(w/v)メチルパラベン、0.02%(w/v)プロピルパラベン、33mM KCl、30.6mM MgCl₂、0.003%フェノールレッドを含んだ。

【0269】

酵素試薬は、pH7.0で、20mM HEPES、125mM N-アセチル-L-システイン、0.1mM EDTA二ナトリウム二水和物、0.2%(v/v) TRITON7 X-100界面活性剤、0.2Mトレハロース二水和物、0.90RTU/mLモロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)逆転写酵素、および0.20U/mL T7 RNAポリメラーゼを含む1.45mL溶液の凍結乾燥形であった。1ユニット(RTU)の活性は、MMLV逆転写酵素について37℃で15分間に5.75fmol cDNAの合成および放出として定義され、T7 RNAポリメラーゼについて、1ユニット(U)の活性は、37℃で20分間に5.0fmol RNA転写産物の産生として定義される。酵素試薬は、3.6mLの酵素試薬再構成溶液において再構成された(下記参照)。

【0270】

酵素試薬再構成溶液は、pH7.0で、50mM HEPES、1mM EDTA、10%(v/v) TRITON7 X-100、120mM塩化カリウム、20%(v/v)グリセロール無水物を含んだ。

【0271】

ハイブリダイゼーション試薬は、pH4.7で、100mMコハク酸遊離酸、2%(w/v)ラウリル硫酸リチウム、100mM水酸化リチウム、15mMアルドリチオール-2、1.2M塩化リチウム、20mM EDTA遊離酸、3.0%(v/v)エタノールを含んだ。

【0272】

選択試薬は、pH8.5で、600mMホウ酸、182.5mM水酸化ナトリウム、1%(v/v) TRITON7 X-100を含んだ。

【0273】

検出試薬は、1mM硝酸および32mM過酸化水素を含む検出試薬I、ならびに1.5M水酸化ナトリウムを含む検出試薬IIを含んだ。

【0274】

B. アッセイプロトコール

標的捕獲

1. IVT原液の希釈液を、反応チューブあたり400 μL試料について指示されたコピーレベルでのSTMへ作製することにより試料を調製する。
2. 繰り返しピペッターを用いて、100 μLのTCRをTCOと共に適切な反応チューブへ加える。
3. マイクロピペッターを用いて、400 μLの各試料を適切にラベル表示されているものへ加える。
4. チューブをシーリングカードで覆い、手で穏やかにラックを振る。ボルテックスしてはいけない。ラックを水浴中、62 ° ± 1℃で30 ± 5分間、インキュベートする。
5. ラックを水浴から取り出し、チューブの底を吸収材料でふき取って乾燥させる。
6. シーリングカードがしっかりと取り付けられていることを確実にする。必要ならば、新しいシーリングカードと取り替え、ぴったりと密閉する。
7. シーリングカードを取り外さずに、ラックを室温で30 ± 5分間、インキュベートする。
8. ラックをTCS磁気基盤上に5 ~ 10分間、置く。
9. APTIMA洗浄溶液を分配マニホールドを通してポンプで汲み出すことにより分配装置ポンプラインに呼び水を入れる。ライン中に気泡がなく、すべての10個のノズルが液体の定常流を送達しているようにシステムを通して十分な液体をポンプで汲み出す。

10

20

30

40

50

10. 真空ポンプを作動させ、吸引マニホールドとトラップボトルの間の最初のコネクターで吸引マニホールドを外す。真空計が25in. Hgより大きい値を示すことを確実にする。この示度に達するのに15秒間かかりうる。マニホールドを再び接続し、真空計が7in. Hgと12in. Hgの間であることを確実にする。すべての標的捕獲段階が完了するまで真空ポンプを点けたままにしておく。

11. 吸引マニホールドをチップの最初のセットへしっかりと取り付ける。チップがチューブの底と短時間、接触するまでチップを最初のTTUへ下げることにより全液体を吸引する。チップをチューブの底に接触した状態にしておいてはいけない。

12. 吸引が完了した後、チップをそれらの元のチップカセットへと取り出す。残りのTTUについて、各検体のための専用チップを用いて吸引段階を繰り返す。

10

13. 各TTUの上に分配マニホールドを置き、分配装置ポンプを用いて、1.0mLのAPTIMA洗浄溶液をTTUの各チューブへ送達する。

14. チューブをシーリングカードで覆い、TCSからラックを取り出す。マルチチューブボルテックスミキサー上で1回、ボルテックスする。

15. ラックをTCS磁気基盤上に5～10分間、置く。

16. 全液体を段階13および14においてのように吸引する。

17. 最終吸引後、ラックをTCS基盤から取り出し、全液体が吸引されていることを確実にするために視覚的にチューブを点検する。少しの液体でも目に見える場合には、ラックをTCS基盤上へ戻して2分間、置き、各検体について前に用いられた同じチップを用いてそのTTUについて吸引を繰り返す。

20

【0275】

プライマーアニーリングおよび増幅

1. 繰り返しピペッターを用いて、分析物特異的プライマーを含む再構成された増幅試薬の75 μ Lを各反応チューブへ加える。ラックにおけるすべての反応混合物はその時、色が赤であるはずである。

2. 繰り返しピペッターを用いて、200 μ Lの油試薬(Oil Reagent)を加える。

3. チューブをシーリングカードで覆い、マルチチューブボルテックスミキサー上でボルテックスする。

4. ラックを水浴中、62 $^{\circ}$ $\pm$ 1 $^{\circ}$ Cで10 $\pm$ 5分間、インキュベートする。

5. ラックを42 $^{\circ}$ $\pm$ 1 $^{\circ}$ Cで5 $\pm$ 2分間における水浴へ移す。

30

6. ラックが水浴中のまま、注意深くシーリングカードを取り外し、繰り返しピペッターを用いて、25 μ Lの再構成された酵素試薬を各反応混合物へ加える。すべての反応物はその時、色がオレンジであるはずである。

7. すぐにチューブを新しいシーリングカードで覆い、水浴から取り出し、ラックを手で穏やかに振ることにより反応物を混合する。

8. ラックを42 $^{\circ}$ $\pm$ 1 $^{\circ}$ Cで60 $\pm$ 15分間、インキュベートする。

【0276】

ハイブリダイゼーション

1. ラックを前増幅水浴から取り出し、後増幅区域へ移す。100 μ Lの再構成されたプローブ試薬を分析物特異的プローブと共に繰り返しピペッターを用いて加える。すべての反応混合物はその時、色が黄であるはずである。

40

2. チューブをシーリングカードで覆い、マルチチューブボルテックスミキサー上で10秒間、ボルテックスする。

3. ラックを62 $^{\circ}$ $\pm$ 1 $^{\circ}$ Cの水浴中、20 $\pm$ 5分間、インキュベートする。

4. ラックを水浴から取り出し、室温で5 $\pm$ 1分間、インキュベートする。

【0277】

選択

1. 繰り返しピペッターを用いて、250 μ Lの選択試薬を各チューブへ加える。すべての反応物はその時、色が赤であるはずである。

2. チューブをシーリングカードで覆い、10秒間、または色が均一になるまでボルテック

50

スし、ラックを水浴中、 $62^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ で 10 ± 1 分間、インキュベートする。

3. ラックを水浴から取り出す。ラックを室温で 15 ± 3 分間、インキュベートする。

【0278】

TTUの読み取り

1. 試験を完了するための自動検出試薬IおよびIIの十分な容量があることを確実にする。
2. 1つの空のTTUをカセット位置番号1に置くことによりリーダー照度計を整備し、洗浄プロトコルを行う。
3. TTUを照度計へ入れ、HC+Rev Bプロトコルを実行する。

【0279】

C. 結果

結果は、TMPRSS2:ERGおよびTMPRSS2:ETV1遺伝子融合IVTのそれぞれがTCRへスパイクされている、4つのアッセイについて表6～9に示されている。

【0280】

(表6) TMPRSS2:ETV1a(コピーIVT/反応)

0	4,945
0	4,599
10	2,185,959
10	2,268,090
10	2,284,908
100	2,270,369
100	2,302,023
100	2,272,735
1,000	2,279,627
1,000	2,285,742

【0281】

(表7)

TMPRSS2:ETV1b(コピーIVT/反応)	RLU
0	7,743
0	6,622
0	7,370
0	6,181
0	7,409
10	7,712
10	7,178
10	7,302
10	8,430
10	8,331
100	774,792
100	285,712
100	3,361,878
100	1,349,368
100	2,757,334
1,000	3,647,502
1,000	3,790,087
1,000	3,813,812
1,000	3,753,743
1,000	3,667,242

【0282】

(表8)

TMPRSS2:ERGa (コピー IVT/反応)	RLU
0	7,938
0	7,505
10	2,043,379
10	387,408
10	978,457
100	2,332,764
100	2,445,544
100	2,530,239

10

【0283】

(表9)

TMPRSS2:ERGb (コピー IVT/反応)	RLU
0	5,978
0	6,284
10	2,700,069
10	2,768,541
100	2,883,091
100	2,779,233
1,000	2,857,247
1,000	2,957,914

20

【0284】

実施例4

遺伝子融合についてのFISHアッセイ

この実施例は、29個の前立腺癌試料のうちの23個がERGまたはETV1における再配列を有することを実証するために蛍光インサイチュールハイブリダイゼーション(FISH)の使用を記載する。細胞系実験は、TMPRSS2のアンドロゲン応答性プロモーターエレメントが前立腺癌においてETSファミリーメンバーの過剰発現を媒介することを示唆している。これらの結果は、癌腫の発生、ならびに前立腺癌の分子診断および処置において意味をもっている。

30

【0285】

下記は、FISHアッセイに用いられた特異的BACプローブのリストである。

【0286】

FISHによりETSファミリーメンバーにおける異常を検査するための臨床的FISHアッセイ

- ・ ETV1-TMPRSS2融合を、ETV1にまたがる1つのプローブおよびTMPRSS2座にまたがる1つを用いて検査すること

ETV1についてのBAC：RP11-692L4

TMPRSS2についてのBAC：RP11-121A5、(RP11-120C17、PR11-814F13、RR11-535H11)

- ・ ERG転座をc-ERG:t-ERG分裂についてのセットのプローブを用いて検査すること：

40

c-ERGについてのBAC：RP11-24A11

t-ERGについてのBAC：RP11-372017、RP11-137J13

- ・ ETV1欠失/増幅をセットのプローブ、ETV1座にまたがる1つおよび第7染色体上の1つの参照プローブ、を用いて検査すること：

ETV1についてのBAC：RP11-692L4

第7染色体上の参照プローブについてのBAC：染色体のセントロメア上の市販のプローブ

- ・ ERG欠失/増幅をセットのプローブ、ERG座にまたがる1つおよび第21染色体上の1つの参照プローブ、を用いて検査すること：

ERGについてのBAC：RP11-476D17

第21染色体上の参照プローブについてのBAC：*

50

・TMPRSS2欠失/増幅をセットのプローブ、TMPRSS2座にまたがる1つおよび第21染色体上の1つの参照プローブ、を用いて検査すること：

TMPRSS2についてのBAC：RP11-121A5、(RP11-120C17、PR11-814F13、RR11-535H11)

第21染色体上の参照プローブについてのBAC：*

*第21染色体上の参照プローブについてのBAC：PR11-32L6、RP11-752M23、RP11-1107H21、RP11-639A7、(RP11-1077M21)

【0287】

実施例5

TMPRSS2:ERG融合関連性欠失

この実施例は、TMPRSS2:ERG融合に関連した、染色体21q22.2-3上のERGとTMPRSS2の間に位置する一般的な欠失の存在を記載する。疾患進行と臨床アウトカムの間の関係は、ヒトPCA試料、6個の細胞系、および13個の異種移植片の幅広い範囲を用いて調べられた。

【0288】

A. 材料および方法

臨床試料

この研究に用いられた前立腺試料は、IRB承認プロトコル下で収集された。すべての臨床的に局在したPCA試料は、病理学報告における観察者間の差を排除するために、1人の病理学者により特徴付けられ、グリーンソン(Gleason)スコアを割り当てられた。臨床的に局在したPCA試料は、University of Ulmにおいて進行中の研究プロトコルの一部として収集された。ホルモン抵抗性試料は、University of Michiganの迅速剖検プログラムから採られた。

【0289】

FISH実験は、214人の患者由来の897個の組織コア(組織スポット)から構成された2つのPCAアウトカムアレイ上で行われた。患者人口統計の要約は表10に提示されている。すべての患者は、1989年と2001年の間にUniversity of Ulm(Ulm, Germany)において骨盤内リンパ節切除術と共に前立腺全摘出術を受けている。術前PSAは、1ng/mlと314ng/mlの間(平均36ng/ml)の範囲であった。平均および最大追跡調査は、それぞれ、3.4年間および8.4年間であった。

【0290】

細胞系および異種移植片

アンドロゲン非依存性(PC-3、DU-145、HPV10、および22Rv1)およびアンドロゲン感受性(LNCaP)PCA細胞系は、American Type Culture Collection(Manassas, VA)から購入され、それらの合成培地で維持された。HPV10は、HPV18 DNA(18)でのトランスフェクションにより形質転換された高悪性度PCA(グリーンソンスコア4+4=8)からの細胞に由来した。22Rv1は、マウスにおいて親のアンドロゲン依存性CWR22異種移植片の去勢誘導性退行および再発後に連続的に増殖した異種移植片由来のヒトPCA上皮細胞系である。VCAP細胞系は、University of Michiganにおける迅速剖検プログラムの一部としての脊椎転移性病変由来であった。

【0291】

LuCaP 23.1、35、73、77、81、86.2、92.1、および105は、アンドロゲン非依存性ホルモン抵抗性疾患PCAをもつ患者由来であった。LuCaP 49および115は、アンドロゲン依存性PCAをもつ患者由来であった。LuCaP 58は、臨床的に進行した転移性疾患をもつ未処置の患者由来であり、LuCaP 96は、ホルモン抵抗性PCAをもつ患者において増殖した前立腺由来腫瘍から樹立された。LuCaP 49(大網塊から樹立された)およびLuCaP 93はホルモン非感受性(アンドロゲン受容体[AR]陰性)小細胞PCAである。これらの2つの異種移植片は、神経内分泌性表現型を示す。LuCaP 23.1は、SCIDマウスにおいて維持され、他の異種移植片は、雄BALB/c nu/nuマウスにおいて腫瘍を移植することにより維持される。

【0292】

間期FISHを用いるTMPRSS2:ERG融合状態の測定

TMPRSS2:ERGの転座についてのFISH分析は上でおよび以前に記載されている(Tomlins, e

10

20

30

40

50

t al., Science 310:644-8 (2005))。この分裂アッセイは図11および14に示されている。染色体21q22.2上のERG再配列を分析するために、それぞれ、ERG座の隣接するセントロメア領域およびテロメア領域にまたがる、ビオチン-14-dCTP標識BACクローンRP11-24A11(最終的に、結合して赤色シグナルを生じる)およびジゴキシゲニン-dUTP標識BACクローンRP11-137J13(最終的に、結合して緑色シグナルを生じる)からなる、分裂プローブ系が適用された。すべてのBACクローンは、BACPAC Resource Center, Children's Hospital Oakland Research Institute (CHORI), Oakland, CAから得られた。

【0293】

この分裂プローブ系を用いて、ERG再配列を含まない核は、並列した赤色および緑色シグナルの2つのペアを示す。並列した赤色-緑色シグナルは、黄色の融合シグナルを形成する。ERG再配列を含む核は、各細胞において、転座対立遺伝子についての単一の赤色および緑色シグナルならびに非転座対立遺伝子についての組み合わせられた黄色シグナルを結果として生じる、1つの並列した赤色-緑色シグナルペアの分裂を示す。組織分析の前に、すべてのプローブの完全性および純度が、正常な末梢リンパ球中期スプレッドへのハイブリダイゼーションにより検証された。組織ハイブリダイゼーション、洗浄、および蛍光検出は、以前に記載されているように行われた(Garraway, et al., Nature 436:117-22 (2005); Rubin, et al., Cancer Res. 64:3814-22 (2004))。少なくとも1つのTMAコアが、2つのTMAから59%PCA症例において評価されることができた。このアッセイに関する技術的困難は、評価すべき診断材料の不在、弱いプローブシグナル、および正確な診断を妨げる重なった細胞を含んだ。分析の残りは、評価されうる臨床的に局在したPCAの118個の症例に焦点を当てた。15個の症例は、同様に評価されうる、対応するホルモン未処置の転移性リンパ節試料を有した。

【0294】

試料は、適切なフィルター、CCD(電荷結合素子)カメラ、およびCytoVision FISHイメージングおよび捕捉ソフトウェア(Applied Imaging, San Jose, CA)を備えたOlympus BX-51蛍光顕微鏡を用いて100x油浸対物レンズ下で分析された。検査の評価は、両方とも間期FISH実験を分析する経験を有する2人の病理学者により独立して行われた。各症例について、症例あたり少なくとも100個の核にスコアをつけようと試みられた。両方の病理学者の結果の間の有意な差が見出された場合には、その症例は第三の病理学者により審査された。

【0295】

オリゴヌクレオチドSNPアレイ分析

SNPアレイは、対立遺伝子の遺伝子型を特定することを意図されるが、SNPアレイデータは、ヘテロ接合性の消失(Lieberfarb, et al., Cancer Res 63:4781-5 (2003); Lin, et al., Bioinformatics 20:1233-40 (2004))、およびコピー数変化の検出(Zhao, et al., Cancer Cell 3:483-95 (2003))に関する情報を提供できる。SNPアレイ分析を用いて、黒色腫(MITF)(Garraway, et al., Nature 436:117-22 (2005))およびPCA(TPD52)(Rubin, et al., Cancer Res. 64:3814-22 (2004))を含む様々な癌において増幅された遺伝子を同定および確認することが可能であった。

【0296】

100Kアレイ上でのSNP検出は、ゲノム発現量における低下から始まった。250ngのゲノムDNAの2つのアリコート、XbaI、HindIIIで別々に消化した。消化された断片を独立して、オリゴヌクレオチドリンカーに連結した。結果として生じた生成物を、単一のPCRプライマーを用いて、200~2000bp PCR断片が増幅される条件下で増幅した。これらの断片はゲノムの細画分を表す。アレイ上にタイリングされたSNPは、それらはこれらのXbaIおよびHindIII断片内にあるように前もって選択されており、アレイ上でロバストに検出されるように確認されている。DNAの引き出された増幅プールを、その後、HindIIIおよびXbaIオリゴヌクレオチドSNPアレイを分離するために、標識し、さらに断片化し、ハイブリダイズした。

【0297】

アレイはGeneChip Scanner 3000でスキャンされた。ジェノタイピングコールおよびシ

グナル定量化は、GeneChip Operating System 1.1.1およびAffymetrix Genotyping Tools 2.0ソフトウェアで得られた。90%を超えるジェノタイピングコール率をもつアレイのみがさらに分析された。生データファイルの予備的処理をし、dChipSNPにおいて可視化した(Lin, et al., Bioinformatics 20:1233-40 (2004))。特に、予備的処理は、1セットの不変プローブを用いるベースラインアレイに対するアレイデータ標準化、およびモデルベース(PM/MM)方法を用いる各試料に関する各SNPについての単一強度値を得るためのその後の処理を含んだ(Li, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 98:31-6 (2001))。

【0298】

TMPRSS2:ERGおよびTMPRSS2:ETV1融合転写産物についての定量的PCR

QPCRは、MJ ResearchからのDNAエンジンOpticon 2機上でSYBR Green色素(Qiagen)を用いて行われた。全RNAを、ランダム六量体の存在下でTAQMAN逆転写試薬(Applied Biosystems)を用いてcDNAへ逆転写した。すべてのQPCR反応は、SYBR Green Master Mix(Qiagen)を用いて行われた。すべてのオリゴヌクレオチドプライマーは、Integrated DNA Technologiesで設計された。Tomlinら(Science 310:644-8 (2005))により記載され、かつ融合に特異的であるプライマーが利用された。

TMPRSS2:ERG_f:TAGGCGCGAGCTAAGCAGGAG (SEQ ID NO:55),

TMPRSS2:ERG_r: GTAGGCACACTCAAACAACGACTGG (SEQ ID NO:56),

TMPRSS2:ETV1_f CGCGAGCTAAGCAGGAGGC, (SEQ ID NO:57)

TMPRSS2:ETV-1_r: CAGGCCATGAAAAGCCAAACTT (SEQ ID NO:58)

【0299】

GAPDHプライマーは以前に記載された(Vandesompele, et al., Genome Biol 3:RESEARCH 0034 (2002))。10 μMolのフォワードおよびリバースプライマーが用いられ、手順は、製造会社の推奨のサーモサイクリング条件に従って行われた。閾値レベルは、Opticon Monitor分析ソフトウェアversion 2.02を用いてQPCR反応の対数期中に設定された。各試料についてのハウスキーピング遺伝子グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)に対する各標的遺伝子の量を、比較閾値サイクル(Ct)方法(Applied Biosystems User Bulletin #2)を用いて測定した。すべての反応を、融解曲線分析に供し、選択された実験からの産物を、2%アガロースゲル上での電気泳動により分離した。

【0300】

統計学

臨床的および病理学的パラメーターは、再配列状態および欠失の存在との関連について探査された。カイ二乗検定およびフィッシャーの直接確率検定が適切に用いられた。 Kaplan-Meier分析は、病理学およびゲノム変化パラメーターの前立腺特異的抗原無再発生存曲線を作成するために用いられた。ログランク検定は、関連性の統計学的有意性を評価するために用いられた。事前の新補助ホルモンアブレーション治療をもつ患者は排除された。すべての統計学は、0.05の有意水準を以て、Windows用のSPSS 13.0(SPSS Inc., Chicago, IL)を用いて行われた。

【0301】

B. 結果

TMPRSS2:ERG遺伝子再配列と関連した第21染色体上の欠失の検出

PCAにおいてTMPRSS2:ERG再配列の頻度を特徴付けるために、Tomlinら(Science 310:644-8 (2005))により記載されたアッセイから改変されたFISHアッセイが利用された。最初のFISHアッセイは、ERG上のセントロメア3'末端およびテロメア5'末端に位置する2つのプローブを用いた。新しいアッセイは、5'プローブをテロメア方向に移動させた(図14)。PCAスクリーニング組織マイクロアレイ(TMA)を用いて、TMPRSS2:ERG再配列(図11Aおよび11B)を示すPCAの約70%がまた、テロメア5'ERGプローブに対応する緑色シグナルの喪失を示し(図11Cおよび11D)、この染色体領域が欠失したことを示唆した。100KオリゴヌクレオチドSNPアレイは、これらの欠失の程度を特徴付けるために用いられた。細胞系、異種移植片

、ならびにホルモン未処置およびホルモン抵抗性転移性PCA試料を含む30個のPCA試料を取り調べることにより、染色体21q23上のERGとTMPRSS2の間のゲノム損失が同定された(図12A～C)。

【0302】

TMPRSS2:ERGおよびTMPRSS2:ETV1についての再配列状態は、これらの30個のPCAについてFISHおよび/またはqPCRにより測定された(図12A、灰色および明るい青色の棒)。LuCaP 49、LuCaP 93、ULM LN 13、MET6-9、MET18-2、MET24-28、およびMET28-27についてTMPRSS2座とERG座の間の領域を含む別個のゲノム損失が、TMPRSS2:ERG再配列陽性試料に観察された。これらの別個の欠失の程度は不均一であった。TMPRSS2座とERG座の間の領域を含む第21染色体上のより広範なゲノム損失は、LuCaP 35、LuCaP 86.2、LuCaP 92.1、およびMET3-81に観察された。VCaP細胞系および異種移植片LuCaP 23.1は、この領域に損失を示さなかった。試料のサブセット45%(11個のうちの5個)について、欠失は、ERGイントロン3の近くで起こる。試料の大多数64%(11個のうちの7個)について、欠失は、TMPRSS2上に位置したSNPの近くで終わる(テロメア方向での次のSNPは約100Kbp離れている)。VCaP細胞系は、第21染色体全体に沿ってコピー数増加を示す。

10

【0303】

TMPRSS2:ERG再配列陽性腫瘍について、71%(7個のうちの5個)のホルモン抵抗性PCAは、TMPRSS2座とERG座の間の欠失を示すが、欠失は、25%(4個のうちの1個)のホルモン未処置の転移性PCA試料において同定されるのみであった(ULM LN 13)。欠失の開始点 — 38.765 Mbにおいてかまたは38.911Mbにおいてかのいずれか — により区別される2つの別個のサブクラスを有する欠失境界についての有意な均一性がある。標準PCA細胞系(PC-3、LNCaP、DU-145、またはCWR22(22Rv1))のいずれも、TMPRSS2:ERGまたはTMPRSS2:ETV1融合を示さなかった。LuCaP 49(大網塊から樹立された)およびLuCaP 93、両方ともホルモン非感受性(アンドロゲン受容体[AR]陰性)小細胞PCA、を含むLuCaP異種移植片のいくつかは、欠失を含むTMPRSS2:ERG融合を示す。

20

【0304】

ERGのコピー数増加が、TMPRSS2:ERG再配列有りおよび無しの両方の症例の小さなサブセットに観察された。ホルモン抵抗性PCA由来のVCaP細胞系は、第21染色体上に有意なコピー数増加を示し(図12A～C)、FISHにより確認された。

【0305】

原発前立腺癌試料およびホルモン未処置のリンパ節転移におけるTMPRSS2:ERG再配列

30

これらの観察の頻度および可能性のある臨床的有意性を特徴付けるために、118個の臨床的に局在したPCA症例がFISHにより調べられた。臨床的および病理学的人口統計は、表10に提示されている。この患者のコホートは、高い腫瘍悪性度(グリーソン悪性度)、病理学的病期、および治療前のPSAレベルにより示されているように、疾患再発の高いリスクがある。PCAの広い領域が顕微鏡的に研究されうる、このコホートからの標準組織切片を用いて、TMPRSS2:ERG再配列が、与えられた腫瘍について均一であることが観察された。TMA実験はこれらの観察を確認した。3～6個のコアが腫瘍の異なる領域から採取されたPCA症例において、100%一致が、TMPRSS2:ERG再配列状態(すなわち、存在または非存在)について観察された。欠失を含むTMPRSS2:ERG再配列を有する症例において、その症例の97.9%(94/96)で、同じ患者由来のTMAコアの全部に欠失が観察されたことも観察された。

40

【0306】

(表10) 前立腺全摘出術により処置された、臨床的に局在した前立腺癌を有する118人の男性の臨床的および病理学的人口統計*

		数	カラムN%
年齢	<=中央値	55	50.0%
	>中央値	55	50.0%
術前PSA (ng/ml)	<= 4	6	8.2%
	>4 かつ < 10	13	17.8%
	>= 10	54	74.0%
グリーソンスコア合計	< 7	7	6.0%
	= 7	51	43.6%
	> 7	59	50.4%
核悪性度	1	-	-
	2	38	35.5%
	3	69	64.5%
病理学的病期(pT)	PT2	26	22.2%
	PT3a	34	29.1%
	PT3b	57	48.7%
切除縁状態	陰性	30	27.8%
	陽性	78	72.2%
リンパ節状態 (pN)	N ₀	52	44.1%
	N ₁	56	47.5%
	N ₂	10	8.5%
PSA再発	いいえ	34	48.6%
	はい	36	51.4%

* 全118症例について全データポイントが入手できたわけではない。

【0307】

TMPRSS2:ERG再配列は、原発PCA試料の49.2%、およびホルモン未処置の転移性LN試料の41.2%において同定された(図13A)。テロメアプローブ(緑色シグナル)の欠失(図1C~D)は、TMPRSS2:ERG再配列を有する、原発PCA試料の60.3%(35/58)およびホルモン未処置のリンパ節の42.9%(3/7)において観察された。

【0308】

マッチさせた原発腫瘍およびホルモン未処置のリンパ節腫瘍がある15個の症例において、TMPRSS2:ERG再配列状態について100%一致があり、ペアの47%(15個のうちの7個)が再配列を示した。テロメア(緑色シグナル)プローブの欠失は、そのペアの42.9%(7個のうちの3個)において一致して見られた。

【0309】

TMPRSS2:ERG再配列状態および前立腺癌進行

再配列状態と臨床的および病理学的パラメーターとの間の関連が観察された(図13)。欠

失を含むTMPRSS2:ERG再配列は、腫瘍の進行期(pT)($p=0.03$)(図13B)、および局所的骨髄リンパ節への転移性疾患の存在(pN_0 対 pN_{1-2})($p=0.02$)をもつPCA症例のより高いパーセンテージにおいて観察された。追跡調査データが入手できた70人の患者についての欠失有りおよび無しのTMPRSS2:ERG再配列と前立腺特異的抗原(PSA)生化学的不全により測定されるような臨床アウトカムとの関連もまた評価された。グリーソン悪性度、腫瘍病期、核グレードおよびリンパ節状態は、PSA生化学的不全の良い予測変数であった(すべての p 値 <0.0005)。一変量レベルにおいて、FISHアッセイにより測定されるような欠失を含まないTMPRSS2:ERG再配列したPCA症例におけるPSA無再発延命効果を示唆する傾向が観察された。

【0310】

実施例6

致死性前立腺癌と関連したTMPRSS2:ERG遺伝子融合

前の研究において、TMPRSS2(21q22.3)の、5'非翻訳領域のETS転写因子ファミリーメンバー、ERG(21q22.2)、ETV1(7p21.2)(Tomlins, et al., Science 310:644-8 (2005))、またはETV4(Tomlins, et al., Cancer Res. 66(7):3396-400 (2006))のいずれかとの遺伝子融合が、前立腺癌の大多数においてETS遺伝子の過剰発現についての機構を提供している。さらになお、アンドロゲン制御遺伝子、TMPRSS2、の発癌遺伝子との融合は、疾患進行がこれらの分子サブタイプに基づいて変わりうることを示唆している。遺伝子融合についての最も一般的な機構は、TMPRSS2とERGの間のゲノムDNAの約2.8メガベースの損失である(図17AおよびB)。この実施例は、一般的なTMPRSS2:ERG遺伝子融合の存在に基づいた転移または前立腺癌特異的死のリスクを記載する。

【0311】

A. 方法

研究集団は、Andrenら(J. Urol. 175(4):1337-40 (2006))により記載されているように、経尿道的前立腺切除(TURP)または症候性良性前立腺過形成についての経膀胱腺腫摘出により1977年と1991年の間にOrebro University Hospital, Swedenにおいて初期前立腺癌(T1a-b, Nx, M0)と診断された男性を含む。診断時でのベースライン評価は、理学的検査、胸部X線撮影法、骨スキャン、および骨格X線撮影法(必要に応じて)を含んだ。結節病期診断は行われなかった。この評価は遠隔転移についての証拠を提供しなかったため、患者は期待をもって追跡され、診断から最初の2年間は6ヶ月間ごとに、およびその後、12ヶ月間隔で、臨床検査、検査室検査、および骨スキャンを受けた。骨スキャンにより測定されるような転移を発生した患者は、それらが症状を示した場合には、アンドロゲン枯渇療法で処置された。

【0312】

コホートにおける死因は、研究調査員による医療記録の再調査により決定された。Swedish Death Registerと比較した死因に関する確証研究は、90%より高い一致を示し、いずれの死因の組織的な過小または過大報告もなかった(Johansson, et al., Lancet 1(8642):799-803 (1989))。死亡率に関するコホートの追跡調査は、100%であり、2005年10月まで追跡調査に失われた患者はいなかった。研究終了点は、遠隔転移または前立腺癌特異的死の発生と定義された(中央値追跡調査期間9.1年間、最大27年間)。

【0313】

すべてのTURP試料は、以前に記載されているように(J. Urol. 175(4):1337-40 (2006))、前立腺癌の診断を確認する、グリーソンスコアおよび核グレードを決定する、ならびに全身腫瘍組織量を推定するために1人の病理学者により再検査された。組織マイクロアレイは手動アレイヤーを用いて構築された(Rubin, et al., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 14(6):1424-32 (2005))。前立腺癌におけるTMPRSS2:ERG再配列の頻度は、Tomlinsら(Science 310:644-8 (2005))により最初に記載されたアッセイから改変された蛍光インサイチューハイブリダイゼーション(FISH)アッセイを用いて評価された。新しいアッセイは、5'プローブをテロメア方向に約600kb、移動させた。少なくとも1つのTMAコアが前立腺癌症例のうちの92個において評価されることができた。

【0314】

B. 結果

局所癌と診断された男性のこの集団に基づいたコホートにおいて、TMPRSS2:ERG融合の頻度は15.2%(14/92)であった(図17AおよびB)。TMPRSS2:ERG融合陽性腫瘍は、より高いグリーソンスコアを有する可能性がより高かった(両側 $P=0.14$)(表11)。融合状態および致死性前立腺癌の関係を評価するために、累積発生率回帰が用いられた。3.6の累積発生率(CIR)($P=0.004$ 、95%信頼区間[CI]=1.5~8.9)をもつTMPRSS2:ERG遺伝子融合と転移または疾患特異的死の間の有意な関連(図17C)が観察された。グリーソンスコアに合わせて調整される場合、CIRは2.4であった($P=0.07$ および95%CI=0.9~6.1)。本発明は特定の機構に限定されない。実際、機構の理解は、本発明を実施するのに必要ではない。とはいえ、与えられた腫瘍での細胞におけるTMPRSS2:ERG遺伝子融合の均一性、および浸潤性前立腺癌においてのみ(前立腺上皮内腫瘍と比較して)のその存在に基づいて、これが、グリーソンパターンの表現型の背後の生物学に、一部、寄与している可能性がある初期事象であることが予想される。

【0315】

(表11) TMPRSS2:ERG遺伝子融合状態により層別化された局在性前立腺癌について期待をもって管理された男性のコホートについての予後因子

変数	TMPRSS2:ERG融合状態		P値*
	陰性	陽性	
患者数	78	14	
診断時の年齢、年	73 (60 to 103)	73 (58 to 90)	.683
グリーソンスコア**			
グリーソンスコア<7	48 (61.5%)	3 (21.4%)	.014
グリーソンスコア=7	20 (25.6%)	6 (42.9%)	
グリーソンスコア>7	10 (12.8%)	5 (35.7%)	
病理学的病期			
pT1a	28 (35.9%)	2 (14.3%)	.112
pT1b	50 (64.1%)	12 (85.7%)	
核悪性度***			
1	53 (67.9%)	7 (53.8%)	.585
2	18 (23.1%)	4 (30.8%)	
3	7 (9.0%)	2 (15.4%)	
状態****			
転移または癌死なしの12年間生存	20 (25.6%)	1 (7.1%)	.016
12年以内の他の原因による死	45 (57.7%)	6 (42.9%)	
前立腺癌による遠位転移または死	13 (16.7%)	7 (50.0%)	

* TMPRSS2:ERG融合を有する被験体およびTMPRSS2:ERG融合を有しない被験体の臨床的パラメーターは、それぞれ、連続型変数およびカテゴリ変数についてt検定またはカイ二乗検定の使用により比較された。

** グリーソンスコアは、主要および少数のグリーソンパターンを合計することにより得

られる。

***1つの症例について核グレードは評価されなかった。

****2005年10月現在で、少なくとも12年間生き、かつ転移を発生していないまたは前立腺癌で死んでいない個体は、長期生存者として分類される。12年間より少なく生き、かつ転移を発生しなかった個体は、短期生存者として分類される。

【0316】

実施例7

前立腺癌をもつ患者の尿におけるTMPRSS2:ETS融合の検出

A. 材料および方法

尿収集、RNA単離および増幅

尿試料は、針生検かまたは前立腺全摘出術のいずれかの前に直腸指診後患者から得られた。尿は、DNA/RNA保存剤を含む尿収集カップ(Sierra Diagnostics)へ排泄された。RNAの単離について、最低限の30mlの尿を、400rpm、4°Cで15分間、遠心分離した。RNAlater(Ambion)を尿沈殿物へ加え、RNA単離まで-20°Cで保存した。全RNAを、Qiagen RNeasy Micro キットを用いて製造会社の使用説明書に従って単離した。全RNAを、OmniPlex Whole Transcriptome Amplification(WTA)キット(Rubicon Genomics)を用いて製造会社の使用説明書に従って増幅した(Tomlins et al., Neoplasia 8:153 [2006])。25ナノグラムの全RNAをWTAライブラリー合成に使い、cDNAライブラリーを、WTA PCR増幅の1ラウンドに供した。増幅産物を、QIAquick PCR Purificationキット(Qiagen)を用いて精製した。細胞系概念実証実験については、VCaPまたはLNCaP細胞の指示された数を1mlの滅菌尿へスパイクし、試料を排泄された尿についてのように処理した。

【0317】

定量的PCR

定量的PCR(QPCR)は、本質的には記載されているように(Tomlins et al., Neoplasia 8:153 [2006], Tomlins et al., Science 310:644 [2005], 上記の実施例1)、WTA増幅cDNAからERG、ETV1、およびTMPRSS2:ERG転写産物を検出するために用いられた。各QPCR反応について、10ngのWTA増幅cDNAを鋳型として用いた。ERG、ETV1、PSA、およびGAPDHについての反応は、2x Power SYBR Green Master Mix(Applied Biosystems)ならびにフォワードおよびリバースプライマーの両方の25ngを用いた。TMPRSS2:ERGαについての反応は、2x Taqman Universal PCR Master Mixならびに最終濃度の900nMのフォワードおよびリバースプライマー、ならびに250nMプローブを用いた。Taqmanアッセイについて、38サイクルより大きいCt値をもつ試料は、増幅を示さないとみなされた。すべての試料について、ERGおよびETV1の量は、GAPDHの量に対して標準化された。尿における前立腺細胞の不十分な回収を示すPSAの不适当的な増幅をもつ試料は、さらなる分析から排除された。ERG(エキソン5_6フォワード)およびETV1(エキソン6_7)²、GAPDH³、ならびにPSA⁴のプライマーは記載されているとおりであった。TMPRSS2:ERGαに特異的なTaqmanプライマーおよびプローブ(MGB標識)は以下のとおりである。

TM-ERGa2_MGB-f;CGCGGCAGGAAGCCTTA (SEQ ID NO:70)

TM-ERGa2_MGB-r;TCCGTAGGCACACTCAAACAAC (SEQ ID NO:71),

TM-ERGa2_MGB-probe;5'-MGB-CAGTTGTGAGTGAGGACC-NFQ-3' (SEQ ID NO:72)

【0318】

蛍光インサイチューハイブリダイゼーション(FISH)

マッチさせた針生検からの4μm厚さのホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)は、前に記載されているように(実施例2およびTomlins et al., Cancer Res 66:3396 [2006])、間期蛍光インサイチューハイブリダイゼーション(FISH)に用いられ、処理され、ハイブリダイズされた。ERG再配列を検出するためのBACプローブ、RP11-95I21(ERGに対する5')およびRP11-476D17(ERGに対する3')は、前に記載されているように(Tomlin et al., Cancer Res

10

20

30

40

50

66:3396 [2006]; Tomlins et al., Science 310:644 [2005]; 上記の実施例1および2)、調製された。

【0319】

B. 結果

この実施例は、直腸指診後、尿へ脱落した前立腺癌細胞におけるTMPRSS2:ETS融合転写産物の存在により前立腺癌を検出するための非侵襲性方法を記載する。結果は図33に示されている。概念実証として、高レベルのERGおよびTMPRSS2:ERG(VCaP)または高レベルのETV1(LNCaP)を発現する前立腺癌細胞系をスパイクされた滅菌尿が用いられた。図33Aに示されているように、定量的PCR(QPCR)により、1,600個の細胞でのVCaPにおいて排他的にERG過剰発現を、16,000個の細胞でのLNCaPにおいて排他的にETV1過剰発現を検出することは可能であった。

10

【0320】

スパイクされたVCaPおよびLNCaP細胞の数をGAPDH C_t (閾値サイクル) 値に相関させることにより、場合によっては、直腸指診後に患者から得られた尿がERGまたはETV1過剰発現を信頼性をもって検出するには不十分な細胞数を含むことが観察された。従って、前立腺癌を有するのではないかと疑われる患者の尿から収集された全RNAは、QPCR分析の前にOmniPlex Whole Transcriptome Amplificationを用いて増幅された。このストラテジーを用いて、尿が前立腺癌を検出するための針生検の前の直腸指診後に得られた、16人の患者のコホートが評価された。その後の針生検の評価は、このコホートが、良性前立腺をもつ4人の患者、高悪性度前立腺上皮内腫瘍(HGPIN)をもつ1人、および前立腺癌をもつ11人を含むことを実証した。加えて、尿が前立腺全摘出術の前の直腸指診後に収集された、前立腺癌をもつ3人の患者のコホートが評価された。

20

【0321】

コホート特徴は表12に提示されている。各尿検体は、一意的な患者由来であり、IDを割り当てられた。試料の源(生検前または前立腺全摘出術前(RP))が示されている。針生検後の診断(良性、高悪性度前立腺上皮内腫瘍(HGPIN)、および前立腺癌(PCa))が示されている。針生検後に前立腺癌を有すると診断された患者について、主要なグリーソン、少数グリーソン、およびグリーソン合計のスコアが示されている。すべての患者について、生検前のPSA(ng/ml)および年齢が、入手可能な場合には、報告されている。

【0322】

(表12)

30

試料源	診断	生検 グリーンソン主要	生検 グリーンソン 少数	生検 グリーンソン スコア	生検前PSA (ng/ml)
生検前	良性				4.7
生検前	良性				8.3
生検前	良性				6.7
生検前	良性				4
生検前	HGPIN				9.7
生検前	Pca	3	4	7	3.3
生検前	Pca	3	3	6	5.99
生検前	Pca	3	3	6	2.8
生検前	Pca	3	3	6	5.9
生検前	Pca	4	4	8	10.6
生検前	Pca				
生検前	Pca	4	5	9	11.8
生検前	Pca	3	4	7	5.5
生検前	Pca	3	3	6	3.8
生検前	Pca	4	5	9	19.3
生検前	処置されたPca	3	3	6	
RP前	Pca				
RP前	Pca				
RP前	Pca				

【0323】

針生検コホートから、ERGの著しい過剰発現をもつ5人の患者が同定され、そのうちの1人は針生検によりHGPINを有すると診断され、一方、残りの4人は前立腺癌を有すると診断された。前立腺全摘出術コホートから、前立腺癌をもつ3人の患者のうちの1人は高いERG発現を有すると同定された(図33B)。ETV1過剰発現は、どちらのコホートからのいかなる患者においても検出されなかった。ERGを過剰発現する試料におけるTMPRSS2:ERGの発現を確認するために、TMPRSS2:ERGaを特異的に増幅するために設計されたTaqManプライマー/プローブが利用された。このアッセイは、TMPRSS2:ERGaを発現するVCaP細胞由来の産物をロバストに増幅した(Tomlins et al., Science 310:644 [2005])。加えて、ERGを過剰発現した前立腺癌をもつ患者由来の6個の尿試料のうちの5個はまた、TMPRSS2:ERGaを発現したが(Ct値29.8~38.9)、ERG過剰発現をもたない患者由来の10個の試料のうちのどれもTMPRSS2:ERGaを発現しなかった。1個の試料が、TMPRSS2:ERGaの発現なしでERGを過剰発現したため、この試料は、TMPRSS2:ERGbまたはつい最近、同定された融合転写産物のような融合転写産物の他のアイソフォームを発現する可能性が高い(Soller et al., Genes Chromosomes Cancer 45:717 [2006]; Yoshimoto et al., Neoplasia 8:465:2006)。TMPRSS2:ERG融合転写産物の存在がTMPRSS2:ERG陽性癌性組織の存在を示すことを確認するために、蛍光インサイチューハイブリダイゼーション(FISH)が、それぞれの症例由来のマッチさせた組織切片上でERG再配列を検出するために設計されたプローブを用いて行われた。マッチさせた組織は、尿における検出可能なTMPRSS2:ERG転写産物および癌の診断を有する3人の患者、尿における検出可能なTMPRSS2:ERG転写産物および高悪性度PINの診断を有する1人の患者、ならびに検出可能なTMPRSS2:ERG転写産物無しで、癌の診断を有する2人の患者から得られた。図33Bに示されているように、癌と診断されたが尿に検出可能なTMPRSS2:ERG転写産物をもたない両方の患者は、FISHにより癌性組織においてERG再配列を含まなかった。癌と診断され、かつ尿に検出可能なTMPRSS2:ERG転写産物を有するすべての3人の患者もまた、FISHにより癌性組織においてERG再配列を示した。最後に、高悪性度PINの診断をもち、尿に検出可能なTMPRSS2:ERG転写産物を有する患者は、高悪性度PIN組織においてERG再配列を示さなかった。これは、この患者が、結果として尿に検出可能なTMPRSS2:ERG転

10

20

30

40

50

写産物の存在を生じる、前立腺の他の場所に診断されていない癌を有する可能性があることを示している。

【0324】

実施例8

前立腺癌におけるTMPRSS2およびETSファミリー遺伝子融合

この研究は、臨床的に局在した前立腺癌について外科的に処置された111人のアメリカ人男性のスクリーニングに基づいたコホートにおけるTMPRSS2およびETSファミリー遺伝子再配列についての頻度の総合的分析を記載する。

【0325】

A. 材料および方法

研究対象集団、臨床データ、および前立腺試料収集：

臨床的に局在した前立腺癌の供給源として、癌および良性組織を表すコアーを含む組織マイクロアレイ(TMA)が、最初の単独療法(すなわち、補助もしくは新補助ホルモン療法または放射線療法無し)としてUniversity of Michiganにおいて前立腺全摘出術を受けた111人の男性から構築された。前立腺全摘出術シリーズは、University of Michigan Prostate Cancer Specialized Program of Research Excellence (SPORE) Tissue Coreの一部である。3つのコア(直径0.6mm)が、TMAを構築するためにそれぞれの代表的な組織ブロックから採取された。TMA構築プロトコールは記載されている(Kononen et al., Nat. Med. 4:844 [1998]; Rubin et al., Am J surg Pathol 26:312 [2002])。詳細な臨床的、病理学的、およびTMAデータは、前に記載されているように(Manley et al., Am J. Pathol. 159:837 [2001])、安全なリレーショナルデータベース上で維持される。

【0326】

間期蛍光インサイチューハイブリダイゼーションアッセイを用いるTMPRSS2-ETS遺伝子融合の評価

4μm厚さの組織マイクロアレイ切片が、前に記載されているように(Tomlins et al., Science 310:644 [2005]; Tomlins et al., Cancer Res 66:3396 [2006])、間期蛍光インサイチューハイブリダイゼーション(FISH)に用いられ、処理され、ハイブリダイズされた。スライドを、Axioplan ImagingZ1顕微鏡(Carl Zeiss)を用いて調べ、Metaferイメージ分析システム(Meta Systems, Altlussheim, Germany)においてISISソフトウェアシステムを用いてCCDカメラでイメージングした。FISHシグナルは、形態学的に無傷で、かつ重なっていない核において病理学者により手作業で(100x油浸)スコアを付けられ、症例由来の3つのコアにおいて利用可能な最低限30個の細胞または最大数の癌細胞が記録された。30個の評価可能な細胞を含まない症例は、不十分なハイブリダイゼーションとして報告された。すべてのBACは、BACPAC Resource Center (Oakland, CA)から得られ、プローブ位置は、正常な末梢リンパ球の中期スプレッドへのハイブリダイゼーションにより検証された。TMPRSS2、ERG、およびETV4再配列の検出について、本発明者らは、以下のプローブを用いた：RP11-35C4(TMPRSS2の5'側)およびRP11-120C17(TMPRSS2の3'側)、RP11-95I21(ERGの5'側)およびRP11-476D17(ERGの3'側)、ならびにRP11-100E5(ETV4の5'側)およびRP11-436J4(ETV4の3'側)。TMPRSS2-ETV1融合の検出について、RP11-35C4(TMPRSS2の5'側)がRP11-124L22(ETV1の3'側)と共に用いられた。BAC DNAは、QIAfilter Maxi Prepキット(Qiagen, Valencia, CA)を用いて単離され、プローブは、ジゴキシゲニン-またはビオチン-ニックトランスレーション混合物(Roche Applied Science, Indianapolis, IN)を用いて合成された。ジゴキシゲニンおよびビオチン標識プローブは、それぞれ、フルオレセイン結合型抗ジゴキシゲニン抗体(Roche Applied Science)およびAlexa 594結合型ストレプトアビジン(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて検出された。

【0327】

分裂(TMPRSS2、ERG、ETV4)または融合(TMPRSS2-ETV1)プローブストラテジーが、染色体レベルで再配列を検出するために用いられた。DAPI染色核におけるTMPRSS2、ERG、およびETV4についての正常なシグナルパターンは、共局在した緑色および赤色シグナルの2ペアにより示された。これらのプローブについて、再配列は、その2つの共局在したシグナル

の1つの分裂により確認された。TMPRSS2-ETV1融合について、離れた赤色および緑色の2ペアが正常として記録されたが、離れたものの1ペアおよび共局在したシグナルの1ペアが再配列として記録された。

【0328】

B. 結果および考察

この実施例は、臨床的に局在した前立腺癌について外科的に処置されたアメリカ人男性の大きなスクリーニングに基づいたコホートにおけるTMPRSS2およびETS転写因子遺伝子再配列のシグネチャーを鳥瞰する総合的分析を記載する。TMPRSS2分裂プローブFISHアッセイアプローチは、図34に示されているように、既知のETSファミリーパートナー、ERG、ETV1、ETV4、および他の未知のパートナーとの前立腺癌における遺伝子再配列の全体的頻度を検出するために用いられた。3つの既知のETSパートナー(ERG、ETV1、およびETV4)について陰性の前立腺癌は他のETSファミリーメンバーに関わる再配列を含みうると仮定された。結果は、臨床的に局在した前立腺癌におけるTMPRSS2およびETSファミリー遺伝子再配列の複雑な分子シグネチャーを実証している(図35AおよびB)。全体のTMPRSS2は評価可能な症例の65%において再配列していたが、ERG、ETV1、およびETV4は、評価可能な症例の55%、2%、および2%において再配列していた(図35A)。TMPRSS2再配列をもつ症例の40.5%において、3'プローブの喪失が観察され、遺伝子融合の機構としてのTMPRSS2とERGの間の染色体欠失と一致した。これらの結果は、前立腺癌における高頻度のTMPRSS2:ETS融合を確認し、TMPRSS2:ERGがはるかに最もよく起こる型であることを示した以前の研究を確認した(Tomlins et al., Science 310:644; Pomeroy et al., Cancer Res 66:3396 [2006]; Yoshimoto et al., Neoplasia 8:4665 [2006]; Soller et al., Genes Chromosomes Cancer 45:717 [2006]; Wang et al., Cancer Res 66:8347 [2006]および上記実施例)。

【0329】

同様の結果は、コホートが、すべての4つのプローブが評価可能である症例だけに限定された場合に観察された(図35AおよびB)。この分析は、どの症例も複数のETSファミリーメンバーの再配列を示さなかったため、TMPRSS2:ETS再配列がお互いに排他的であることを確認した。この分析はまた、ERG、ETV1、またはETV4再配列をもつ24個の症例のうちの3個がTMPRSS2アッセイにより検出されたため、単一のTMPRSS2アッセイがほとんど全部のETS再配列を効果的に検出できることを実証している。5'ERGプローブが欠失していたすべての9個の症例において、3'TMPRSS2プローブの欠失が同定された。

【0330】

さらになお、ERG、ETV1、またはETV4の再配列無しで、再配列の存在を示すTMPRSS2プローブの分裂を有する2個の症例(症例32および36)、ならびにETV1および/またはETV4は評価されることができない場合のERG再配列無しのTMPRSS2再配列を有する症例が同定された。これらの症例は、TMPRSS2が、前立腺癌において、新規なETSファミリーメンバーまたは関係のない発癌遺伝子とパートナーを組んでいる可能性があることを示唆する。

【0331】

合わせると、これらの結果は、単一のTMPRSS2アッセイが前立腺癌において診断的および予後的情報を提供できることを示唆している。

【0332】

実施例9

PSA遺伝子融合

FISHは、PSAの5'側および3'側に位置するプローブについてのFISHにより分裂シグナルを示す症例を同定するために用いられた。PSA分裂を検出するために用いられる5'BACおよび3'BACは、それぞれ、RP11-510I16およびRP11-26P14である。PSA遺伝子融合のパートナーはまだ同定されていない。これらの同じプローブはまた、ETSファミリーメンバーSPIBにおいて、それがPSAに非常に近く位置しているため、分裂を拾い上げる。

【0333】

実施例10

FLI1過剰発現

FLI1発現は、FLI1遺伝子融合を含まない異なる細胞試料においてアッセイされた。FLI1の5'および3'エキソンの発現は、高FLI1発現をもつ症例から測定された。結果は図18に示されている。5'および3'転写産物存在量における差は検出されなかった。RACEもまた、融合転写産物を示さなかった。FLI1は、対照試料と比較して前立腺癌において過剰発現する。Flil1増幅のプライマー、加えてTaqManプローブは図37に示されている。

【0334】

FISHはまた、再配列の存在を示す、FLI1についての分裂シグナルを有する試料を同定するために用いられたが、これらの症例はFISHによりTMPRSS2:FLI1を有しない。BACプローブは表13に示されている。これらの症例はまた高FLI1発現を有する。

【0335】

10

実施例11

組織マイクロアレイ

組織マイクロアレイは、遺伝子融合の存在についてアッセイするために用いられた。用いられたTMAは、前立腺癌進行アレイ、前立腺癌アウトカムアレイ、温剖検アレイ、前立腺癌スクリーニングアレイ、Erg陰性前立腺癌アレイ、および個々の前立腺癌症例を含んだ。以下の遺伝子プローブは、組織マイクロアレイ上で用いられた：TMPRSS2-ETV1融合プローブ、Erg分裂プローブ、TMPRSS2分裂プローブ、ETV1分裂プローブ、ETV4分裂プローブ、およびFLI1分裂プローブ。

【0336】

加えて、Erg分裂プローブがアウトカムアレイ上で用いられた。結果は以下のとおりである：陰性症例：30個、陽性症例：29個、境界症例：1個。Erg陽性症例のより高いグリーソンスコア(≥ 7)との弱い関連があった。

20

【0337】

タンパク質アレイおよび質量分析は、ERG2についての核内相互作用物質を同定するために用いられた。結果は図21に示されている。

【0338】

実施例12

Erg発現のアンドロゲン制御

この実施例はErg発現のアンドロゲン制御を記載する。LNCap(TMPRSS2-ERG-)およびVCaP(TMPRSS2-ERG+)細胞系が用いられた。細胞を、様々な量のR1881と48時間、接触させた。Erg、PSA(+対照)、および β -チューブリン(-対照)の発現をアッセイした。結果は図19に示されている。ERG発現は、VCaP細胞においてアンドロゲン依存性であるが、LNCaP細胞においてはそうではないことを見出された。

30

【0339】

実施例13

ペプチド抗体およびアクアプローブ作製

図22~25は、ペプチド抗体作製に用いるための、およびアクアプローブを作製するための、ERG1、ETV1、FLI-1、およびETV4の配列(下線を引いた)を示す。プライマーは、すべてのETSファミリーメンバーについてApplied Biosystemsにより設計される。発現は、前立腺癌症例においてモニターされ、高発現が、可能性のある遺伝子融合の指標およびFISH

40

【0340】

実施例14

LnCaP細胞におけるETV1

この実施例は、VCaPおよびLNCaPにおけるアンドロゲンに対する転写応答の分析を記載する。PSAのような、両方の細胞系において異なって発現したいくつかの転写産物を検出することに加えて、VCaPまたはLNCaP細胞における独特に制御不全のいくつかの転写産物もまた同定された。この分析は、ETV1をLNCaP細胞においてアンドロゲンに対して排他的に応答すると同定した。LNCaP細胞におけるETV1の過剰発現と組み合わせて、FISHは、LNCaP細胞においてETV1座を取り調べるために用いられた。

50

【0341】

A. 材料および方法

細胞系

前立腺癌細胞系LNCaP(もともとリンパ節前立腺癌転移由来)およびVCaP(Korenchuk, S. et al., *In vivo* 15, 163-8 (2001))(もともと脊椎前立腺癌転移由来)がこの研究に用いられた。マイクロアレイ研究について、0.1%エタノールまたはエタノールに溶解された1nMの合成アンドロゲンメチルトリエノロン(R1881, NEN Life Science Products, Boston, MA)での48時間の処理前に、VCaPおよびLNCaP細胞を、活性炭ストリッピング化血清含有培地中で、24時間増殖させた。定量的PCR(QPCR)研究について、細胞を、活性炭ストリッピング化血清含有培地中で24時間、増殖させ、0.1%エタノール、アセトンに溶解されたCaso 10
dex(10uM、ビカルタミド、AstraZeneca Pharmaceuticals, Wilmington, DE)、またはエタノールに溶解されたflutamide(10uM, Sigma, St. Louis, MO)とプレインキュベートした。2時間後、0.1%エタノールまたは0.5nMのR1881を加え、細胞を48時間後、収集した。全RNAをすべての試料からTrizol(Invitrogen, Carlsbad, CA)で製造会社の使用説明書に従って単離した。RNAの完全性を、ホルムアルデヒド変性ゲル電気泳動またはAgilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)により検証した。

【0342】

マイクロアレイ分析

この研究に用いられたcDNAマイクロアレイは、アレイが32,448個のフィーチャーを含むことを除いて、本質的には記載されているように構築された。アレイのプリンティングおよび後処理についてのプロトコルはインターネット上で入手できる。cDNAマイクロアレイ分析は本質的には記載されているように行われた。簡単には、対照およびR1881処理のV 20
CaPならびにLNCaP細胞系由来の全RNAを逆転写し、cy5蛍光色素で標識した。対照のVCaPまたはLNCaP試料由来のプールされた全RNAを逆転写し、それぞれの細胞系からのすべてのハイブリダイゼーションについてcy3蛍光色素で標識した。標識産物をその後、混合し、cDNAアレイにハイブリダイズさせた。イメージにフラグを付け、Genepixソフトウェアパッケージ(Axon Instruments Inc., Union City, CA)を用いて標準化した。データは、アレイにより中央値中心とし、試料の少なくとも80%において発現値を有する遺伝子のみが分析に用いられた。

【0343】

定量的PCR(QPCR)

QPCRは、記載されているように(Tomlins et al., *Cancer Res* 66, 3396-400 (2006); Tomlins et al., *Science* 310, 644-8 (2005)), Applied Biosystems 7300 Real Time PCR システム(Applied Biosystems, Foster City, CA)上でSYBR Green色素を用いて行われた。各試料についてハウスキーピング遺伝子グルセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)に対する各標的遺伝子の量が報告された。各細胞系および/または実験における標的遺伝子の相対量は、対照に対して校正された。すべてのオリゴヌクレオチドプライマーは、Integrated DNA Technologies(Coralville, IA)により合成された。GAPDH(Vandesompele et al., *Genome Biol* 3, RESEARCH0034 (2002)), PSA(Specht et al., *Am J Pathol* 158, 419-29 (2001)), ERG(エキソン5-6_fおよびエキソン5-6_r)、およびETV1(エキソン6-7_fおよびエキソン6-7_r)プライマー(Tomlins et al., *Science* 310, 644-8 (2005)) 40
は記載されているとおりであった。

【0344】

蛍光インサイチューハイブリダイゼーション(FISH)

中期スプレッドは、標準技術を用いて正常な末梢リンパ球(NPL)およびLNCaP細胞から調製された。スライドを、プローブの添加前に、2x SSCで2分間、70%エタノールで2分間、および100%エタノールで2分間、処理した。スライドにカバースリップを載せ、75°Cで2分間、インキュベートし、37°Cで一晩、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は、2x SSCで42°C、5分間、続いてPBST中の3回洗浄であった。蛍光検出は、フルオレセインに結合した抗ジゴキシゲニン(Roche Applied Science, Indianapolis, IN)、お 50

よびAlexa Fluor 594に結合したストレプトアビジン(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて行われた。スライドは、DAPIを含むProLong Gold Antifade Reagent(Invitrogen)において対比染色され、マウントされた。スライドは、Zeiss Axio Imager Z1蛍光顕微鏡(Zeiss, Thornwood, NY)を用いて調べられ、ISISソフトウェア(Metasystems, Altussheim, Germany)を用いてCCDカメラでイメージングされた。

【0345】

すべてのBACは、BACPAC Resource Center(Oakland, CA)から得られ、プローブ位置は、正常な末梢リンパ球の中期スプレッドへのハイブリダイゼーションにより検証された。染色体7p上のETV1領域へのハイブリダイゼーションについて、以下の4つのBACが用いられた(テロメアからセントロメアへ): RP11-124L22, RP11-313C20, RP11-703A4、およびRP11-1149J13。染色体14qへの局在化について、FISHは、BAC RP11-483K13をマッピングしたが、本発明者らはまた、NPLを用いて14qにハイブリダイズすることを確認した。BAC DNAは、QIAFilter Maxi Prepキット(Qiagen, Valencia, CA)を用いて単離され、プローブは、ジギキゲン-またはビオチン-ニックトランスレーション混合物(Roche Applied Science)を用いて合成された。

【0346】

B. 結果

結果は、図26~28に示されている。図26は、LNCaP前立腺癌細胞系におけるETV1の過剰発現およびアンドロゲン制御を示す。図26Aは、VCaPおよびLNCaP前立腺癌細胞系におけるアンドロゲン制御遺伝子の発現シグネチャーを示す。媒体処理(灰色)と比較した、1nM合成アンドロゲンR1881(緑色)によりいずれかの細胞系において誘導または抑制を示す遺伝子のヒートマップ(3,499個のフィーチャー、 $p < 0.05$ および倍数変化比率 ≥ 1.5)。各行は遺伝子を表す; 各列は試料を表す。黄色および青色セルは、カラースケールに従って、それぞれ、過剰発現または発現不足を示す。灰色セルは欠測データを示す。各細胞系についてのデータは、対応する対照試料を中心とする。ヒートマップにおけるPSA、ERG、およびETV1の位置が示され、それらの発現は挿入図に示されている。図26Bは、定量的PCR(QPCR)によるVCaPおよびLNCaP細胞の両方におけるアンドロゲンによるPSA誘導の確認を示す。LNCaP(赤色)およびVCaP(青色)細胞系におけるPSAの相対的発現(GAPDHに対して標準化された)はQPCRにより測定された。細胞は、示されているように、抗アンドロゲンCasodexもしくはFlutamideの存在下または非存在下において媒体または1nM R1881で48時間、処理された。各試料におけるPSAの相対量は、各細胞系についての対照試料における量に対して較正された。図26Cは、LNCaP細胞におけるアンドロゲンによるETV1誘導を示す。Bと同じ試料を用いて、ETV1の相対量はQPCRにより測定された。図26Dは、ETV1がLNCaP細胞において著しく過剰発現することを示す。PSA、ETV1、およびERGの相対的発現は、QPCRにより各細胞系からの48時間対照試料において測定された。各試料における標的遺伝子の相対量は、両方の細胞系からのPSAの平均量に対して較正された。LNCaPとVCaPの間のERGおよびETV1における倍数差が示されている。

【0347】

図27はLNCaP細胞におけるETV1の再配列を示す。図27Aは、蛍光インサイチュールハイブリダイゼーション(FISH)にプローブとして用いられたBACの概略図を示す。7p21(ETV1座および周囲のBACを含む)および14q32における位置および座標は、UCSC Genome Browserを用いてヒトゲノムの2004年5月フリーズ(May 2004 freeze)において決定された。この研究に用いられるBACは、番号が付けられた長方形として示されている。ETV1およびDGKBの位置が示され、矢じり形が転写の方向を示している。図27Bは、RP11-124L22およびRP11-1149J13が正常な末梢リンパ球(NPL)において第7染色体へ共局在することを示す。中期スプレッド(上部パネル)または間期細胞(下部パネル)上のRP11-124L22(BAC#1)およびRP11-1149J13(BAC#4)の局在は、NPLにおいてFISHにより測定された。すべての中期写真について、第7染色体上のシグナルは矢印により示されており、第14染色体上のシグナルは対応するプローブ色の矢じり形により示されている。中期スプレッドの情報領域のより高い倍率は、ボックスに示されている。図27Cは、中期スプレッド(上部パネル)および間期細胞(下部パネル

)上のBAC#1およびBAC#4の局在がニア(near)4倍体LNCaP細胞系において測定されたことを示す。第7染色体上の2つの共局在したシグナル、第7染色体上の2つの赤色シグナル、および異なる染色体上の2つの緑色シグナルが観察された。図27Dは、LNCaP細胞における第14染色体へ局在したRP11-124L22からのシグナルを示す。RP11-124L22(BAC#1)がLNCaP中期スプレッド上でRP11-483K13(BAC#5、染色体14qへFISHマッピングされた)と共ハイブリダイズしたことを除いて、Cにおいてのとおりであった。RP11-483K13からの4つの赤色シグナルは染色体14qへ局在する；2つの緑色シグナルは染色体7pへ局在し、2つの緑色シグナルは染色体14qへ局在する。

【0348】

図28は、ETV1座全体がLNCaP細胞において第14染色体へ挿入されていることを示す。図28Aは、この実験に用いられたBACの概略図を示す。図28Bは、中期スプレッド(上部パネル)および間期細胞(下部パネル)上のRP11-124L22(BAC#1)およびRP11-313C20(BAC#2)の局在がLNCaP細胞においてFISHにより測定されたことを示す。中期スプレッドにおいて、共局在したシグナルの2ペアは、第7染色体(黄色矢印)および第14染色体(黄色矢じり形)上で観察された。

【0349】

これらの結果は、ETV1座全体が第7染色体から第14染色体へ転座していることを実証する。第14染色体上の挿入の上流のゲノム配列は知られていないが、この領域が、LNCaP細胞においてのみ観察された高レベルのETV1およびアンドロゲン応答性を作動させる、AREを含む可能性が高い。これらの結果は、LNCaP細胞が、ヒト前立腺癌に見られたETS遺伝子融合のインビトロモデルとしての使用を見出すことを示唆している。

【0350】

実施例15

PCAにおけるETSファミリーメンバーのノックダウン

この実施例は、前立腺癌におけるETSファミリーメンバーのノックダウンを記載する。siRNAが、LNCaPおよびVCaPにおいてETV1およびERGの発現をノックダウンするために用いられた。定量的PCRはノックダウンを確認するために用いられた。結果は図29および30に示されている。ノックダウンは増殖に影響を及ぼさなかった。shRNAを発現するレンチウイルスは、安定なノックダウンのために作製される。

【0351】

マイクロアレイは、ERG発現がVCaP細胞(TMPRSS2:ERG融合を有する)においてノックダウンされた場合、どの遺伝子が異なって発現するかを測定するためにAgilent 44K Whole Genomeアレイで行われた。この実験について、以下の3つの状態が用いられた：ERGについてのDharmacon siRNA(ERGs)を用いるノックダウン、ルシフェラーゼ(対照)のノックダウン、およびトランスフェクションされていない(untrans)VCaP細胞。ERG/untransの3つのハイブリダイゼーションおよび対照/untransの2つが行われた。遺伝子はすべての5つの実験において存在しているように呼ばれ、0.5未満の標準偏差(両方の状態についての平均の)をもち、 <0.75 または >1.5 のERGと対照の間の倍数差を示した。ERGdifferentialフィールドは、ERGと対照ノックダウン実験の間の倍数差を示し、1未満の値は、その遺伝子がERGノックダウンにおいて発現が不足していることを意味する(ERG自身、この分析において第81位にある)。

【0352】

実施例16

トランスジェニックマウス

本発明の遺伝子融合、加えてETSおよびアンドロゲン応答性遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスが作製される。図31は、マウスを作製するのに用いるウイルス過剰発現系を示す。図32は、トランスジェニックマウスにおけるゲノム挿入の概略図を示す。そのようなマウスは、研究(例えば、機構研究)および薬物スクリーニング適用において使用を見出す。

【0353】

実施例17

TMPRSS2:ERGの同定

上で記載されているように(実施例1)、TMPRSS2のERGへの融合が観察された。TMPRSS2:ERG遺伝子融合からの発現したタンパク質を測定するために、PCRが、VCaP前立腺癌細胞系から、エキソン4の始めにおける融合切断点からエキソン11における推定ストップコドンまでのERG(NM_004449)の部分を増幅し、ストップコドンのすぐ上流に3x Flagタグを挿入するために用いられた。産物を、pCR8/GW/TOPO TA(Invitrogen)へTAクローニングし、双方向でシーケンシングした。シーケンシングにより、2つの別個のアイソフォームの存在が明らかにされ、本明細書では、ERG1(ERGアイソフォーム1由来のエキソン6

(NM_182918,

10

GGGGTGCAGCTTTTATTTTCCCAAATACTTCAGTATATCCTGAAGCTACGCAAA
GAATTACAAGTAGGCCAG; SEQ ID NO:73)

を含む)およびERG2(このエキソンを含まない)と名付けられた。産物をpLenti6/V5-DESTデスチネーションベクターへGatewayクローニングした。このプラスミドを、ERGタンパク質産生のためにPHINX細胞へ直接的にトランスフェクションした。

【0354】

A. 方法

トランスフェクションアッセイ：Phinx細胞を、ERG2かまたは空ベクターのいずれかでFugeneトランスフェクション試薬(Roche)を用いて製造会社の使用説明書のとおりトランスフェクションした。合計10個の150mm直径プレートを各構築物に用いた。細胞をトランスフェクションから48時間後、収集し、下記のように、免疫沈降アッセイに用いた。

【0355】

タンパク質溶解および免疫沈降：細胞を、プロテアーゼインヒビターを含む氷冷PBS中で洗浄し、1%NP40を含むTBS中でのホモジナイゼーションにより溶解した。タンパク質を含む上清を、Bradford's Protein Assay(Biorad Laboratories, Hercules, CA)を用いて製造会社の使用説明書のとおり、それらのタンパク質含量を測定した。すべての試料からの等量のタンパク質(15ml緩衝液中約30mg)を免疫沈降研究に用いた。EZVIEW Red ANTI-FLAG M2 Affinity Gel(Sigma, St Louis, MO)の50%スラリーの約200マイクロリットルを各試料へ加え、4℃で一晩、インキュベートした。免疫沈降物を、0.1%NP40を含むTBSおよびTBS単独でそれぞれ3回、洗浄した。結合したタンパク質を、FLAGペプチド(Sigma, St Louis, MO)を用いて製造会社の使用説明書のとおり、溶出させた。溶出を3回、行った。溶出物におけるタンパク質を、50%TCA(Sigma, St Louis, MO)を用いて沈殿させた。沈殿物を、氷冷アセトンで3回、洗浄し、Laemmli緩衝液に再懸濁し、4~20%BIS-TRISゲル(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)上で電気泳動した。ゲルを質量分析適合性銀染色(Silver Quest, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)で染色した。ERG2に対応するバンドおよびベクターレーンにおける対応する領域をそれぞれ、6個の1cmの小片へと切り取った。ゲル小片のそれぞれを、より高い分子量領域から始まってゲル上を下降して、バンド1~6と名付けた。従って、バンド1は、高分子量タンパク質を含む領域に対応し、一方、バンド6は低分子量の領域に対応する。ERG2のその天然の分子量(約55kDa)に基づいて、バンド4および5中に移動すると思われる。ERG2配列同定を3回繰り返し、データをすべての実験から確かなものにした。

【0356】

タンパク質同定

ゲルバンドを収集し、Silver Stain Kitに提供されている脱染溶液を用いて製造会社の使用説明書のとおり(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)、脱染した。ゲル消化を、1M重炭酸アンモニウム、pH9中、Porcine Trypsin(1:50, Promega Corporation, Madison, WI)を用いて行った。消化は、37℃で16時間、行われた。24時間の終わりにトリプシン活性を3%ギ酸を用いて停止させた。ペプチドを50%アセトニトリルを用いて抽出した。ペプ

50

チドを乾燥させ、0.1%ギ酸を含む2%アセトニトリル中に再懸濁し、Paradigm HPLCポンプに取り付けられた0.075mm×150mm C18カラム(Michrome Bio Resources Inc.)を用いる逆相クロマトグラフィーにより分離した。ペプチドを、溶媒Aが0.1%ギ酸/2%アセトニトリルである、45-min 5～95%B(0.1%ギ酸/95%アセトニトリル)勾配を用いて溶出した。Finnigan LTQ質量分析計(Thermo Electron Corp.)は、スペクトルを得るために用いられ、その器械は、動的排除を可能にしてデータ依存性様式で作動した。完全MSスキャンにおける3つの最も大量のペプチドイオン上のMS/MSスペクトルが得られた。スペクトルは、MASCOT検索ツールを用いて複合の同一ではないNCBIヒト参照配列データベースに対して検索される。これらのデータベース検索結果は、PeptideProphetプログラムを用いてペプチド割当精度について確認される。これは混合モデルである；検索結果スコア、およびトリプシン末端の数を含む様々なペプチド特徴に基づいて正しいペプチド同定の確率を割り当てる期待値最大化評価。第二プログラム、ProteinProphetは、タンパク質によりペプチドを分類し、正しいタンパク質割当の確率を割り当てうるそれらの確率を組み合わせるために用いられる。識別力は、結局ペプチド分類情報および可能なマルチヒットタンパク質の状態ということになるNSP値、すなわち同胞ペプチドの数として個々のペプチド確率のその後の再推定で増加する。

10

【0357】

結果：

(表14) 範囲マップ(ERG2)

注：E*BAND*-*はERG1実験におけるERG2ペプチドを表す

20

MIQTVDPDPA HI... (SEQ ID NO:74)				NCBI N末端,	BAND05-
20060217				SEQ ID NO	
MASTIKEALS	VVSEDQSLFE	CAYGTPHLAK	TEMTASSSSD	40	74
			SSSSD	BAND03-20060206	75
YGQTSKMSPR	VPQQDWLSQP	PARVTIKMEC	NPSQVNGSRN	80	76
	VPQQDWLSQP	PAR		BAND01-20060217	77
	VPQQDWLSQP	PAR		BAND02-20060206	78
	VPQQDWLSQP	PAR		BAND02-20060209	79
	VPQQDWLSQP	PAR		BAND02-20060217	80
YGQTSKMS	VPQQDWLSQP	PAR		BAND03-20060206	81
	VPQQDWLSQP	PAR		BAND03-20060209	82
	VPQQDWLSQP	PAR		BAND03-20060217	83
	VPQQDWLSQP	PAR		BAND04-20060206	84
	VPQQDWLSQP	PAR	MEC NPSQVNGSR	BAND04-20060209	85
	VPQQDWLSQP	PAR		BAND04-20060217	86
	VPQQDWLSQP	PAR		BAND05-20060217	87
	SPDECSVAKG	GKMVGSPDTV	GMNYGSYMEE	KHMPPPNMTT	120
			HMPPPNMTT	BAND01-20060206	89
			HMPPPNMTT	BAND02-20060206	90
			HMPPPNMTT	BAND02-20060209	91
		NYGSYMEE	KHMP	BAND02-20060217	92
	MVGSPDTV	GMNYGSYMEE	KHMPPPNMTT	BAND03-20060206	93
			HMPPPNMTT	BAND03-20060209	94
			HMPPPNMTT	BAND04-20060206	95
	MVGSPDTV	GMNYGSYMEE	KHMPPPNMTT	BAND04-20060209	96
	MVGSPDTV	GMNYGSYMEE	KHMPPPNMTT	BAND04-20060217	97
NERRVIVPAD	PTLWSTDHVR	QWLEWAVKEY	GLPDVNILFF	160	98
NER VIVPAD	PTLWSTDHVR	QWLEWAVKEY	GLPDVNILFF	BAND01-20060206	99
NER		EY	GLPDVNILFF	BAND02-20060206	100
NER				BAND02-20060209	101
NER VIVPAD	PTLWSTDHVR	QWLEWAVK		BAND03-20060206	102
NERRVIVPAD	PTLWSTDHVR	EY	GLPDVNILFF	BAND03-20060209	103
NER VIVPAD	PTLWSTDHVR	QWLEWAVKEY	GLPDVNILFF	BAND04-20060206	104
NERRVIVPAD	PTLWSTDHVR	QWLEWAVKEY	GLPDVNILFF	BAND04-20060209	105
NERRVIVPAD	PTLWSTDHVR			BAND04-20060217	106
		EY	GLPDVNILFF	BAND05-20060206	107
QNIDGKELCK	MTKDDFORLT	PSYNADILLS	HLHYLRETPL	200	108
QNIDGK	LT	PSYNADILLS	HLHYLRETPL	BAND01-20060206	109
			ETPL	BAND01-20060217	110
QNIDGK			ETPL	BAND02-20060206	111
			ETPL	BAND02-20060217	112
			ETPL	BAND03-20060206	113
QNIDGK	LT	PSYNADILLS	HLHYLRETPL	BAND03-20060209	114
			ETPL	BAND03-20060217	115
QNIDGK	LT	PSYNADILLS	HLHYLRETPL	BAND04-20060206	116
QNIDGK	LT	PSYNADILLS	HLHYLRETPL	BAND04-20060209	117
	LT	PSYNADILLS	HLHYLRETPL	BAND04-20060217	118
QNIDGK				BAND05-20060206	119
		PSYNADILLS	HLHYLRETPL	BAND05-20060217	120
PHLTSDDVDK	ALQNSPRLMH	ARNTGGAFFI	FPNTSVYPEA	240	121
	PRLMH	ARNT		BAND01-20060206	122
PHLTSDDVDK				BAND01-20060206	123
PHLTSDDVDK	ALQNSPR			BAND01-20060217	124

10

20

30

PHLTSDDVDK ALQNSPR		BAND02-20060206	125
PHLTSDDVDK ALQNSPR		BAND02-20060217	126
PHLTSDDVDK ALQNSPR		BAND03-20060206	127
PHLTSDDVDK		BAND03-20060209	128
PHLTSDDVDK ALQNSPR		BAND03-20060217	129
PHLTSDDVDK ALQNSPR		BAND04-20060206	130
PHLTSDDVDK ALQNSPR		BAND04-20060209	131
	RNT	BAND04-20060209	132
PHLTSDDVDK ALQNSPR		BAND04-20060217	133
PHLTSDDVDK ALQNSPR		BAND05-20060217	134
<u>TQRITTRPDL PYEPPRRSAW TGHGHPTPQS KAAQSPSTV</u>		280	135
DLPYEPPR		BAND01-20060206	136
	SAW TGHGHPTPQS KAAQSPSTV	BAND01-20060206	137
PYEPPRR		BAND01-20060217	138
	SAW TGHGHPTPQS KAAQSPSTV	BAND02-20060206	139
	SAW TGHGHPTPQS KAAQSPSTV	BAND02-20060209	140
PYEPPRRSAW	TGHGHPTPQS KAAQSPSTV	BAND02-20060217	141
	SAW TGHGHPTPQS KAAQSPSTV	BAND03-20060206	142
	SAW TGHGHPTPQS KAAQSPSTV	BAND03-20060209	143
DL PYEPPRR		BAND03-20060217	144
	PYEPPRRSAW TGHGHPTPQS KAAQSPSTV	BAND04-20060206	145
DL PYEPPRRSAW	TGHGHPTPQS KAAQSPSTV	BAND04-20060209	146
	DL PYEPPRR	BAND04-20060209	147
	DL PYEPPRRSAW TGHGHPTPQS KAAQSPSTV	BAND04-20060217	148
	AAQSPSTV	BAND05-20060206	149
	SAW TGHGHPTPQS KAAQSPSTV	BAND05-20060209	150
DL PYEPPRRSAW	TGHGHPTPQS KAAQSPSTV	BAND05-20060217	151
	SAW TGHGHPTPQS KAAQSPSTV	BAND06-20060209	320
<u>EKTEDQRPQL DPYQILGPTS SRLANPGSGQ IQLWQFLLEL</u>			152
PK		BAND01-20060206	153
	TEDQRPQL DPYQILGPTS SR	BAND01-20060217	154
PKTEDQRPQL	DPYQILGPTS SR	BAND02-20060206	155
PKTEDQRPQL	DPYQILGPTS SR	BAND02-20060209	156
PKTEDQRPQL	DPYQILGPTS SR	BAND02-20060217	157
PKTEDQRPQL	DPYQILGPTS SR	BAND03-20060206	158
PKTEDQRPQL	DPYQILGPTS SR	BAND03-20060209	159
	TEDQRPQL DPYQILGPTS SR	BAND03-20060217	160
PKTEDQRPQL	DPYQILGPTS SR	BAND04-20060206	161
PKTEDQRPQL	DPYQILGPTS SR	BAND04-20060209	162
PKTEDQRPQL	DPYQILGPTS SR	BAND04-20060217	163
PK		BAND05-20060206	164
PKTEDQRPQL	DPYQILGPTS SR	BAND05-20060209	165
PKTEDQRPQL	DPYQILGPTS SR	BAND05-20060217	166
PK		BAND06-20060209	167
<u>LSDSSNSSCI TWEGTNGEFK MTDPEVARR WGERKSKPNM</u>		360	168
	MTDPDEVAR	BAND01-20060206	169
	MTDPDEVAR	BAND02-20060206	170
	MTDPDEVAR	BAND03-20060206	171
	MTDPDEVAR	BAND03-20060209	172
	MTDPDEVAR	BAND04-20060206	173
	MTDPDEVAR	BAND04-20060209	174
	TDPDEVAR KSKPNM	BAND04-20060217	175
	MTDPDEVAR	BAND05-20060209	176
	KSKPNM	BAND05-20060217	177
<u>NYDKLSRALR YYYDKNIMTK VH GKRYAYKF DFHGIAQALQ</u>		400	178
	F DFHGIAQALQ	BAND02-20060206	179
	F DFHGIAQALQ	BAND02-20060209	180
	F DFHGIAQALQ	BAND03-20060206	181
	F DFHGIAQALQ	BAND03-20060209	182
	YYYDKNIMTK YAYKF DFHGIAQALQ	BAND04-20060209	183
NYDKLSR		BAND04-20060217	184
NYDKLSR	YYYDKNIMTK	BAND05-20060217	185
<u>PHPPSSLYK YPSDLPYMG YHAHPQKMNF VAPHPALPV</u>		440	186

10

20

30

40

PHPPESSLYK	BAND02-20060206	187
PHPPESSLYK YPSDLPYMGS YHAH	BAND02-20060209	188
PHPPESSLYK YPSDLPYMGS YHAHPQK	BAND03-20060206	189
PHPPESSLYK YPSDLPYMGS YHAHPQK	BAND03-20060209	190
YPSDLPYMGS YHAHPQK	BAND04-20060206	191
PHPPESSLYK YPSDLPYMGS YHAHPQK	BAND04-20060209	192
TSSSFFAAPN PYWNSPTGGI YPNTRLPTSH MPSHLGTTY	479	193
NSPTG	BAND02-20060217	194
SPTGGI YPNTR	BAND04-20060209	195

【0358】

表は、3つの異なる実験に渡って得られたERG2についての範囲マップを示す。下線が引かれたアミノ酸配列は、VCAP細胞からクローニングされたERG1のコンピューター内で翻訳された配列に対応する。アミノ酸配列GGAAFIFPNTSVYPEATQRITTRP(SEQ ID NO:196)は、ERG1に特異的であり、かつERG2に欠けているエキソンに対応する。残りのアミノ酸配列は、3つの実験のそれぞれにおいて同定されたERG2配列に対応する。ERG2はすべての実験においてバンド1～5で同定された。これらのバンドのそれぞれにおいて得られたERG2のペプチド配列は例証されている。非常に高い範囲のERG2タンパク質が3つの実験に渡って得られた。範囲マップは、最初の50個のアミノ酸残基に対応する、クローニングされたタンパク質のN末端領域におけるペプチドの範囲は、質量分析範囲マップでほとんど観察されなかった。しかしながら、アミノ酸バリンから始まるペプチドVPQQDWLSQP(SEQ ID NO:197)は、非常に豊富であることが見出され、従って、すべての実験において同定された。より厳密な評価は、47位におけるアミノ酸がインフレームでメチオニンであることを示唆した。複数の実験における47位メチオニンの上流(N末端)のいかなるペプチドもの欠損は、それがERG2のN末端アミノ酸であることを確認する。さらに、50位におけるアルギニン残基の存在は、それを可能性のあるトリプシン切断部位にする。この部位におけるトリプシンによる消化は、結果として、イオントラップ質量分析計による同定には小さすぎる、短い方のN末端ペプチドMSPR、およびすべての実験において同定された長い方のC末端ペプチドVPQQDWLSQP(SEQ ID NO:198)を生じるものと思われる。ペプチド配列MIQTVDPAA HI(SEQ ID NO:199)もまた、非常に低い確率スコアでたった1つの実験において同定された。これは、NCBIに報告されているようにERGのN末端をマッピングする。この配列は、VCAP細胞からクローニングされた異所的に発現した構築物の一部ではなかった。これは、PHINX細胞に発現するインビボERGから得られているはずであり、従って、良性細胞と関連したERGの部分を表しうる。

【0359】

従って、要約すれば、結果は、第三のメチオニンはTMPRSS2-ERG融合産物についての翻訳スタート部位であることを示す。

MASTIKEALS VVSEDQSLFE CAYGTPHLAK

TEMTA YGQTSKMSPR VPQQDWLSQP (SEQ ID NO:200)

【0360】

第一メチオニンは、内因性ERGについての翻訳スタート部位である。

MIQTVDPAA HI(SEQ ID NO:201)

【0361】

図20は内因性および融合ポリペプチドの概略図を示す。

【0362】

実施例18

尿試料におけるFISH分析

尿から前立腺細胞を単離および調製するために、～30mlの尿を注意深い直腸指診後、収集する。すぐに、15mlのPreservCytを加え、試料を、室温で10分間、50mlチューブにおいて4000rpmで遠心分離する。上清を捨て、ペレットを、室温で15分間、0.75M KClの15mlに再懸濁し、室温で10分間、50mlチューブにおいて4000rpmで遠心分離する。上清を捨て、ペレットを、メタノール：氷酢酸の3:1比の10mlに再懸濁する。これをその後、4000rpmで

8分間、遠心分離する。200 μ lを除いては上清を捨て、ペレットを再懸濁する。再懸濁されたペレットを、その後、スライドガラス上へ滴らし、空気乾燥させておく。ERG5'/3'およびTMPRSS5'/3'プローブ対に関するハイブリダイゼーションおよびプローブ調製は、上の実施例2においてのとおりである。

【0363】

上の明細書において挙げられたすべての刊行物、特許、特許出願、およびアクセッション番号は、全体として参照により本明細書に組み入れられている。本発明は特定の態様に関連して記載されているが、主張されているような本発明がそのような特定の態様に不当に限定されるべきではないことは理解されているはずである。実際、本発明の記載された組成物および方法の様々な改変ならびにバリエーションは、当業者にとって明らかであると思われ、特許請求の範囲の範囲内にあると意図される。

【図面の簡単な説明】

【0364】

【図1】マイクロアレイデータの癌アウトライアープロファイル分析(COPA)を示す。(A)ETV1(左パネル)およびERG(中央パネル)発現(標準化された発現単位)は、2つの大規模遺伝子発現研究におけるすべてのプロファイリングされた試料から示されている。(B)レーザーキャプチャーマイクロダイセクションされた試料からのデータが用いられたことを除いて、(A)においてのとおりである。(C)多発性骨髄腫における免疫グロブリン重鎖プロモーター(IgH)への既知の転座をもつ発癌遺伝子(FGFR3およびCCND1)が調べられたことを除いて、(A)においてのとおりである。

【図2】前立腺癌(PCA)におけるTMPRSS2:ETV1およびTMPRSS2:ERG遺伝子融合の同定ならびに特徴付けを示す。(A)前立腺癌細胞系(DuCaP、LnCaP、およびVCaP)およびホルモン抵抗性転移性(MET)前立腺癌組織が、定量的PCR(QPCR)によりERG(■)およびETV1(□) mRNA発現について分析された。(B)LnCaP細胞と比較したMET26におけるETV1エキソン2および3の過剰発現の喪失。(C)TMPRSS2との遺伝子融合を明らかにした、MET26-LNにおけるETV1およびMET28-LNにおけるERGについての、cDNA末端の5'RNAリガーゼ媒介性迅速増幅(RLM-RACE)結果の概略図。(D)MET26-LNおよびMET26-RPにおける転座特異的QPCRを用いるTMPRSS2:ETV1発現の確証。(E)細胞系およびPCA検体における転座特異的QPCRを用いるTMPRSS2:ERG発現の確証。

【図3】TMPRSS2:ETV1遺伝子融合およびERG遺伝子再配列を確認するホルマリン固定パラフィン包埋組織切片上での間期蛍光インサイチューハイブリダイゼーション(FISH)を示す。(AおよびB)は、TMPRSS2(緑色シグナル)およびETV1(赤色シグナル)の融合を検出するための2色融合シグナルアプローチを示す。(CおよびD)ERGの5'領域(緑色シグナル)および3'領域(赤色シグナル)にまたがる2つのプローブでの2色分裂シグナルアプローチを用いるERG遺伝子再配列の検出。(E)臨床的に局在した前立腺癌(PCA)の13個の症例および転移性前立腺癌(MET)の16個の症例由来のコアを含む独立した組織マイクロアレイ上の(A~D)と同じプローブを用いたFISH結果のマトリックス表示。

【図4】TMPRSS2:ERG転座を有する前立腺癌細胞におけるERGのアンドロゲン制御を示す。

【図5】癌アウトライアープロファイル分析(COPA)を示す。図5Aは、COPA分析の概略図を示す。図5Bは、RUNX1T1(ETO)が、Valkら急性骨髄性白血病データセット(n=293)において90thパーセンタイルで最も高いスコアリングアウトライアープロファイルを有したことを示す。

【図6】MET26-LNにおけるETV1、およびTMPRSS2との遺伝子融合(TMPRSS2:ERGb融合)を明らかにしたPCA4におけるERGについての、cDNA末端のRNAリガーゼ媒介性迅速増幅(RLM-RACE)結果の概略図を示す。

【図7】前立腺癌におけるETSファミリーメンバーの過剰発現を示す。肉眼的に解剖された組織(A)またはレーザーキャプチャーマイクロダイセクションにより単離された組織(B)由来のプロファイリングされた良性前立腺、前立腺上皮内腫瘍(PIN)、臨床的に局在した前立腺癌、および転移性前立腺癌におけるすべてのモニターされたETSファミリーメンバーの発現がOncomineを用いて可視化されたことを示す。

【図 8】ETV4を過剰発現する前立腺癌症例におけるTMPRSS2およびETV4座の過剰発現を示す。A. プールされた良性前立腺組織(CPP)、ETV4を過剰発現せず、かつTMPRSS2:ERG陽性(PCA1~2)または陰性(PCA3~4)のいずれかである前立腺癌、およびETV4過剰発現をもつ本発明者らのLCMコホート由来の前立腺癌症例(PCA5)におけるETV4の示されたエキソンまたは領域の発現。B. RLM-RACEにより、PCA5においてTMPRSS2の上流の配列のETV4との融合が明らかにされている。C. QPCRによるPCA5におけるTMPRSS2:ETV4aおよびTMPRSS2:ETV4bの発現。D. ホルマリン固定パラフィン包埋組織上での間期蛍光インサイチュアハイブリダイゼーションは、PCA5においてTMPRSS2およびETV4座の融合を確認する。

【図 9】例示的なETSファミリー遺伝子のmRNA配列を示す。

【図 10】TMPRSS2のmRNA配列を示す。

10

【図 11】FISHによるTMPRSS2:ERG遺伝子融合分析を示す。パネルA: TMPRSS2:ERG融合の間接的検出についての分裂アッセイを描く表意文字。パネルB: 間質細胞(左)および前立腺癌腺(右)の間期核。パネルC: テロメアプローブの喪失により示されているように、分裂および同時欠失を示す前立腺癌腺の間期核(100x油浸対物レンズ倍率)。パネルD: テロメアプローブの分裂および喪失をもつ、2つの核を示すCにおけるボックス領域の拡大図。(60x油浸対物レンズ倍率)。

【図 12】ERGとTMPRSS2の間の第21染色体上のゲノム欠失を示す。パネルA: 6個の細胞系、13個の異種移植片、および11個の転移性PCA試料を含む試料は、qPCRおよび/またはFISHによりTMPRSS2:ERGおよびTMPRSS2:ETV1状態(陰性状態について灰色バー、および陽性状態について青色バー)について特徴付けられた。パネルB: Aにおける緑色のフレームを付けられたボックスの拡大図。パネルC: Aにおける黒色のフレームを付けられたボックスの拡大図。

20

【図 13】臨床的に局在した前立腺癌におけるTMPRSS2:ERG再配列および病理学的パラメーターとの関連を示す。パネルA. TMPRSS2:ERG再配列は、原発PCA試料の49.2%およびホルモン未処置の転移性LN試料の41.2%で同定された。パネルB. 欠失を含むTMPRSS2:ERG再配列した腫瘍は、腫瘍の進行期のPCA症例のより高いパーセンテージにおいて観察される傾向にあった($p=0.03$)。

【図 14】21q22-23上のERG(セントロメア)およびTMPRSS2(テロメア)の間に位置した既知の遺伝子を示す。黒線より上の遺伝子は、5'-セントロメアから3'-テロメアへ配向され、黒線より下の遺伝子は5'-テロメアから3'-セントロメアへ配向されている。イメージの下半分において、ERG座の拡大図がFISHプローブと共に描かれている。

30

【図 15】主に欠失を含むTMPRSS2:ERG再配列(右側の核)を示す「不均一な」前立腺癌症例、および欠失を含まないTMPRSS2:ERG再配列(左側の核)を示すわずかに小領域のみを示す。

【図 16】8つの公開された発現アレイデータセットに渡るTMPRSS2とERGの間に位置した遺伝子のメタ分析を示す。

【図 17】FISHアッセイが、疾患進行と関連している、TMPRSS2:ERG遺伝子融合と付随した特徴的な欠失を検出することを示す。パネルAおよびB: 染色体21q22.2上のERG再配列を分析するために、それぞれ、ERG座の隣接するセントロメアおよびテロメア領域にまたがる、ビオチン-14-dCTP標識BACクローンRP11-24A11(最終的に、結合して赤色シグナルを生じる)およびジゴキシゲニン-dUTP標識BACクローンRP11-137J13(最終的に、結合して緑色シグナルを生じる)からなる分裂プローブ系が適用された。この分裂プローブ系を用いて、ERG再配列を含まない核は、並列した赤色および緑色シグナルの2ペアを示す。並列した赤色-緑色シグナルは、黄色の融合シグナルを形成する(パネルB、矢印)。パネルC: 累積発生率回帰モデルにおいて、TMPRSS2:ERGが、転移または前立腺癌特異的死亡の累積発生率についての決定因子として評価された。

40

【図 18】融合転写産物を含まないFLI1過剰発現を示す。

【図 19】TMPRSS2-ERG+細胞におけるアンドロゲンによるERGタンパク質発現の誘導を示す。

【図 20】内因性および融合ERGポリペプチドの概略図を示す。

50

【図 2 1】 ERG2についての核内相互作用物質を示す。

【図 2 2】 ERG1に対するペプチド抗体およびアクアプローブ作製のための配列を示す。

【図 2 3】 ETV1に対するペプチド抗体およびアクアプローブ作製のための配列を示す。

【図 2 4】 FLI1に対するペプチド抗体およびアクアプローブ作製のための配列を示す。

【図 2 5】 ETV4に対するペプチド抗体およびアクアプローブ作製のための配列を示す。

【図 2 6】 LNCaP前立腺癌細胞系におけるETV1の過剰発現およびアンドロゲン制御を示す。図26Aは、VCaPおよびLNCaP前立腺癌細胞系におけるアンドロゲン制御遺伝子の発現シグネチャーを示す。図26Bは、定量的PCR(QPCR)によるVCaPおよびLNCaP細胞の両方におけるアンドロゲンによるPSA誘導の確認を示す。図26Cは、LNCaP細胞におけるアンドロゲンによるETV1誘導を示す。図26Dは、ETV1がLNCaP細胞において著しく過剰発現することを示す。

10

【図 2 7】 LNCaP細胞におけるETV1の再配列を示す。図27Aは、蛍光インサイチュアハイブリダイゼーション(FISH)にプローブとして用いられるBACの概略図を示す。図27Bは、正常な末梢リンパ球(NPL)においてRP11-124L22およびRP11-1149J13が第7染色体へ共局在することを示す。図27Cは、中期スプレッド(上部パネル)および間期細胞(下部パネル)上でのBAC#1およびBAC#4の局在が、ニア4倍体LNCaP細胞系において測定されたことを示す。図27Dは、LNCaP細胞においてRP11-124L22からのシグナルが第14染色体へ局在することを示す。

【図 2 8】 LNCaP細胞においてETV1座全体が第14染色体へ挿入されていることを示す。図28Aは、この実験に用いられたBACの概略図を示す。図28Bは、中期スプレッド(上部パネル)上のRP11-124L22(BAC#1)およびRP11-313C20(BAC#2)の局在、ならびに間期細胞(下部パネル)がLNCaP細胞においてFISHにより測定されたことを示す。

20

【図 2 9】 LNCaPにおけるETV1のsiRNAノックダウンを示す。

【図 3 0】 VCaPにおけるERGのsiRNAノックダウンを示す。

【図 3 1】 ウイルス過剰発現系を示す。

【図 3 2】 トランスジェニックマウスの概略図を示す。

【図 3 3】 尿におけるERGおよびETV1転写産物の検出を示す。図33Aは、LNCaP(高ETV1発現)またはVCaP(高ERGおよびTMPRSS2:ERG発現)前立腺癌細胞におけるERGおよびETV1の検出を示す。図33Bは、前立腺癌を有するのではないかと疑われる患者の尿におけるERGおよびETV1の検出を示す。

【図 3 4】 前立腺癌においてTMPRSS2:ETS遺伝子融合を検出するために用いられるアッセイを示す。図34Aは、TMPRSS2およびERGについての分裂アッセイを示す。分裂5'および3'シグナルの1ペアにより示されているような、ERG再配列陽性症例(欠失無し)が左パネルに示されている。1つの3'シグナルの喪失により示されているような、TMPRSS2再配列陽性症例(欠失有り)が右パネルに示されている。図34Bは、TMPRSS2:ETV1遺伝子融合についての融合アッセイを示す。図34CはETV4についての分裂アッセイを示す。

30

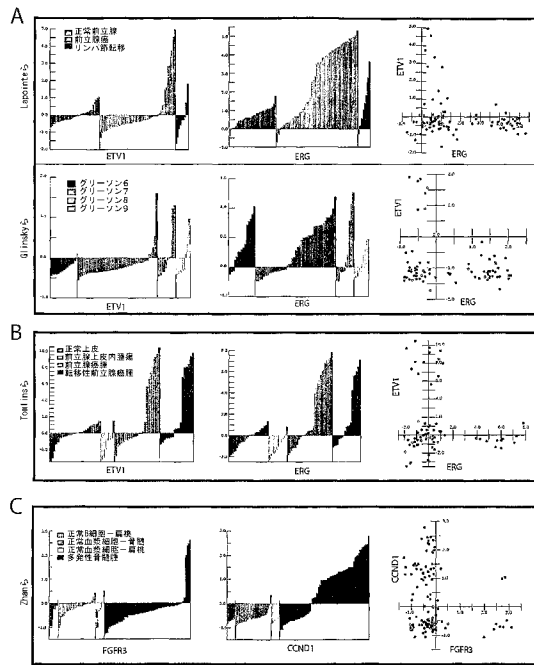
【図 3 5】 FISHにより検出されるようなTMPRSS2、ERG、ETV1、およびETV4再配列を示す。図35Aは、図34に示されたアッセイにより検出されるようなTMPRSS2、ERG、ETV1、およびETV4における再配列についての結果の表を示す。図34Bは、Aに記載されているようにすべての4つのアッセイが評価可能であった38症例からのTMPRSS2、ERG、ETV1、およびETV4状態のヒートマップ表示を示す。図34Cは、不一致なTMPRSS2およびETS再配列状態をもつ症例のヒートマップ表示を示す。

40

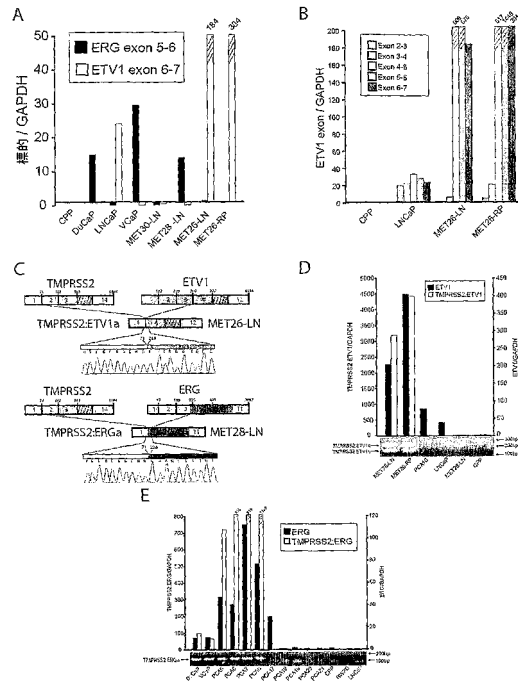
【図 3 6】 本発明の遺伝子融合の配列を示す。

【図 3 7】 FLI-1発現分析のためのプライマーおよびプローブを示す。

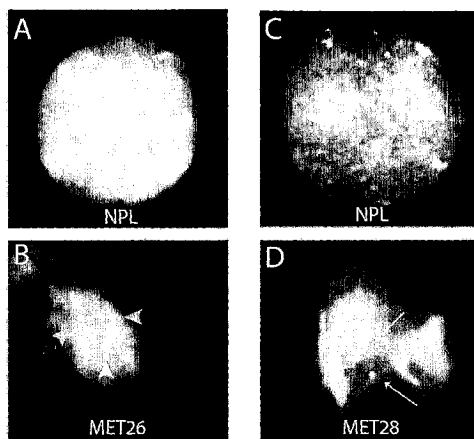
【図 1】



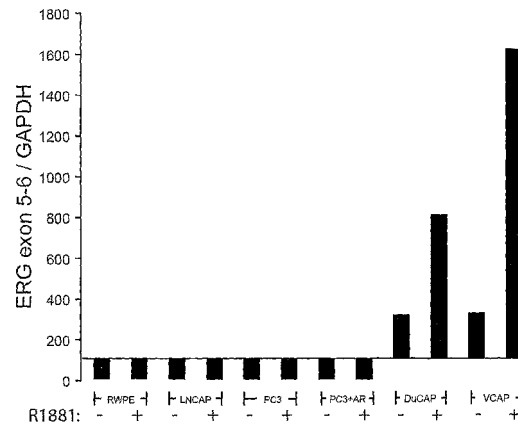
【図 2】



【図 3】



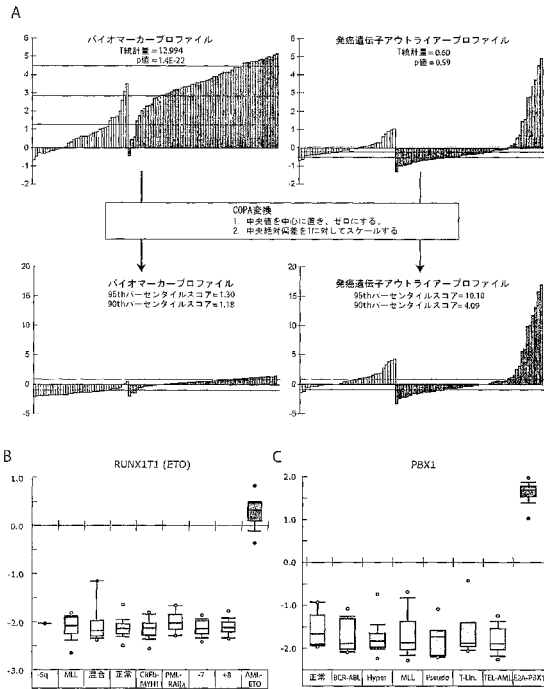
【図 4】



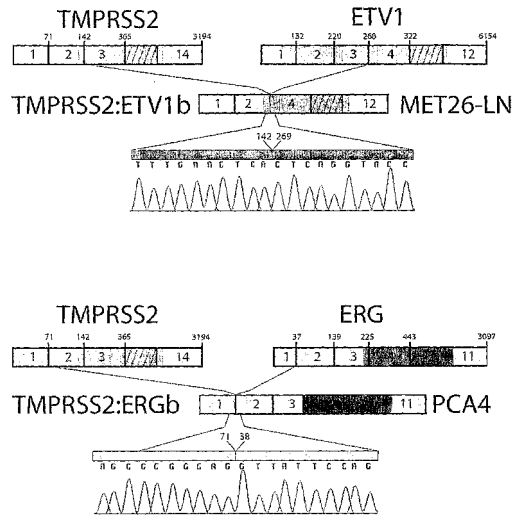
E

	PCA (n=13)	MET (n=16)
ETV1増幅	12/29	7/29
ETV1再配列	16/29	7/29

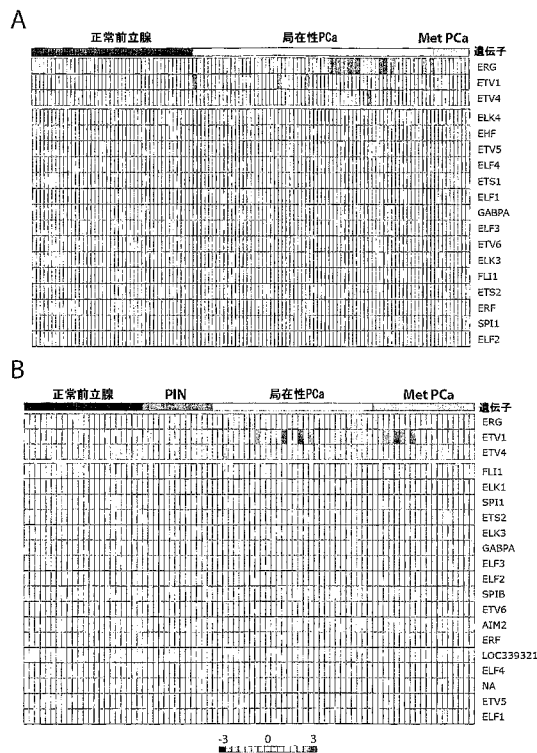
【図 5】



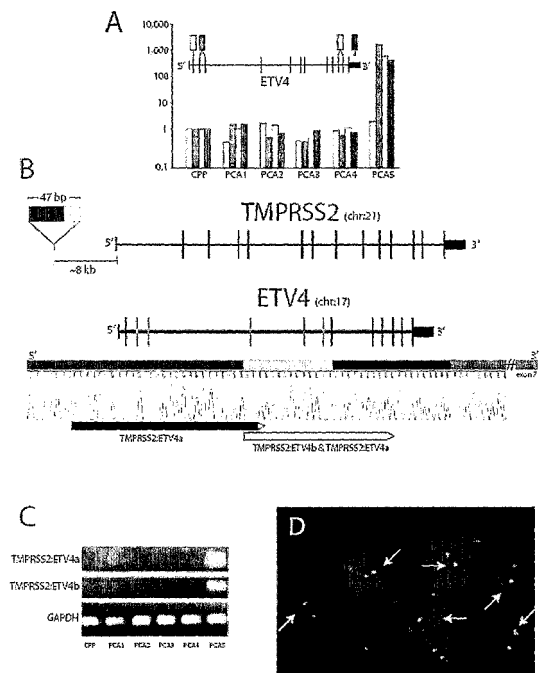
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【図 9 - 1】

AP001732 (ZRG mRNA) SEQ ID NO:32

```

1  ccgtcggcgc cgaggagatt agtgcgaccc ggctcggcgc gcacggccaa ggcacgcgcg
61  ctggcaacag cgggcgcgga cagcgcgga caccacgctg cgggacacgc
cctccccgga
121  cggcggcgct aaacctcggg ttattccagg atctttggag acccgaggaa
agccgtgttg
181  accaaaagca agacaaatga ctccacagaa aaaaagatgg cagaaccaag
ggcaactaaa
241  gccctcaggt tctgaacagc tggtagatgg gctggcttac tgaaggacat
gattcagact
301  gtccccgacc cagcagctca tatcaag

```

NM_004956 (FTV1 mRNA) SEQ ID NO:33

```

1  gtcgatagaa gtccagatcc tgaggaaatc tccagctaaa tgcctcaaat ataaaaact
61  gagctgagat ttgogaagag cagcagcatg gatggatttt atgaccagca
agtgccttac
121  atggtcacca atagtccagc tggggagaat tgaacagaa aaccaacaaa
tgtcaggaaa
181  agaasattca ttaacagaga tctggctcat gattcagaag aactctitca
agatctaagt
241  caattacagg aaacatggct tgcagaagct caggtaacctg acaatgatga
gcagtttgtt
301  ccagactatc aggtcgaaag ttggcttttt catggcctgc cactgaaaat
caagaaagaa
361  cccacagctc catgttcaga aatcagctct gctgcgagtc aagaacagcc
ctlttaattc
421  agctatggag aaaagtgcct gtacaaatgc agtgcctatg atcagaagcc
acaagtggga
481  atgaggccct ccaacccccc cacaccatcc agcacgccag tgcctccact
gcactcatga
541  tctccaaact caactcatcc accgaacctc gaccggccct tcccagctca
cctccctcca
601  tgcagctcca taccagatag cagctacccc atggaccaca gatcttcgag
ccagctttct
661  gaacccctga actcctttcc tcctttggcg acgattgccaa gggaaggcag
tcttatgtac
721  caacgcgcaga tgtctgagcc aaacatcccc ttccaccacc aaggctttaa
gcaggagtag
781  cagcaccocg tgtatgaaca caacaccatg gtggccagtg cggccagcca
aagctttccc
841  cctcctctga tgattaaaca ggaaccagca gattttgcat atgactcaga
agtgcctcag
901  tgcacatcca tttatgatag gcaagaaggc ttccctggct atcccgacag
aacagaaggc
961  tgtatgtttg aaaaaggccc caggcagttt tatgatgaca cctgtgttgt
cccgaataaa
1021  ttgatggagc acatcaaaaa agagccagga atgtatcggg aaggaccocac
ataccaacgg

```

【図 9 - 3】

```

2761  cttacgccat gctatgctat aagcagcttt tatgcacatt gacaaatgaa
gagtaagctt
2821  cagcttgcta aaggaaactg tggaaacctt tgaactttt ggtgatattg
aaaattattt
2881  acsaacccgc aaagaatatg aggaagttgc tgtatgacct agtgcctgca
ctgatattat
2941  ccatcatctc tttttggaca cttctgtaaa tgtgatigga ttgittgaaa
gaagatttaa
3001  agtttcaagg ttttttgctc tgttttgcct ttgcatttgg agaaaatatt
gaaagcaggg
3061  tatgttgttt catctacott gaasaaacca tgaagtaaat gggatataga
atctctgaat
3121  agctcgtcaa aagattcaag caaggagcat gaattttgtt ccatctatca
ataatataca
3181  gaagaacaac ttttttaag agtctatagc aaaaagcaaa aaaaaaaaaa
aattctaaac
3241  acaagtcaca aataaaccta ttgtaaaagc atttcgtgat gagcatgaaa
aagatttgtt
3301  aaagatgata cccccagcta cccattttcc aaactacac agatcacagc
tcatttctct
3361  aagttgagca gttaacaaga accccaacac ccaaaattgc tactcttacc
atttaactct
3421  acaaaaagta ctccaatttc aaaaatgtga tgtaacctgc gatttcaatg
attgttgttc
3481  atatacatca tgtattattt tggcccattt tgggctcaaa aaagaaaact
atgccttaaa
3541  aatcagaacc ttttctcccc actatgctta tglggccact tacagcaact
agaataaaaa
3601  cagatgttaa aatattcagt gaaagtttta ttggaaaagc gaattgagat
atataattga
3661  gatttggtag aattgaagga gaaaatttaa gtgagtcttt aaaaatatatt
ctgaatgaaa
3721  actgtattga ggattcaatt ttgtctcttt tttttcttt tctcttttct
cctttttctt
3781  ctttttaata gtctaglttt agtcagtcag tgaggagaag ttgggcccatg
ctaactttat
3841  cacaagagaa caatggcaga aatgtgtata gttatataat atttaaggac
aaactatatg
3901  ttttgcgttt ttaacgtact gactcactga actaaataca taattgacca
acattagatg
3961  tatttccaat acagaagggt tgaataatatt acattataaa ctcttttgaa
aaatgtatct
4021  aaaatttttt aagttctggt ttgatccacc tttttggttg agtttttatg
tttttgtttt
4081  caggttagatt aataaatctg gcagctgatt tctgcaagat tctgtgtttt
tgaattttct
4141  attgaatttg ctactcaaac atagaaatca ttgtttaatg atgtaattgc
ttctctcagc
4201  ttttatcttc actgctgttt gctgtctctt gatgatgaca tgttaatacc
caatagatta
4261  attgcaacaa acactttatc tcaaaatact aagtaaaat aatttttctt
gttatgtcca
4321  tgaagaagtc ttacagataa aaatccacaa gactgacagt gcagaacatt
tttccaaat
4381  catggggcga tcttgagggt ctagtttccc gtagatgctg taaccaatta
ccacaacttc

```

【図 9 - 2】

```

1081  cgaggatacc ttacagctct gcagtttttg gtacgtcttc tggatgaccc
ttcaaatctc
1141  catttttatg cctggactgg tgcaggcatg gaattttaa c ttgattgagc
tgaagagggt
1201  gccgacgctt ggggcattca gaaaacaggc ccagctatga actatgataa
acttagccgt
1261  tcaactccgt attactatga gaaaggcaat atgcacaaag tggctggaga
gagatatgtc
1321  tacaagtttg tgtgtgatcc agaagccctt ttctccatgg cctttccaga
taatacagct
1381  ccaactgctga agacagacat ggaacgtcac atcaacgagg aggcacacgt
gctcttttct
1441  caactttgat agagcatggc ctacatggcg gaagggggct gctgcaaccc
caacccctac
1501  aacgaaggct acgtgtatta acacaagtga cagtcaagca gggcgttttt
gcgcttttcc
1561  tttttctgcg aagatacaga gaattgctga atcttcgctt tatttctgtt
gtttgtattt
1621  tatittttaa taataataca caaaaaggcg cttttctcgt tgcattatct
tatggctctg
1681  catggactgt gcactttatt tgaggggtgg tgggagtaat ctaaacattt
attctgtgta
1741  acaggaagct aatgggtgaa tgggcagagg gatttgggga ttacttttta
cttaggcttg
1801  ggaatggggt ctacaagttt tgagtatgat gaaactatat catgtctggt
tgatttcata
1861  acaacataag ataattgtta ttttatcggt gtatctatgg tacagttaat
ttcacgttgt
1921  gtaaatatcc acttggagac tattttgctt gggcattttc cctgtctatt
tatgagtctc
1981  tgcaggtgta caaaaaaacc ccaactctact gtaaatggca gtttaattgt
tagaaatgac
2041  tgtttttgca ccacttgtaa aaaggatttt agcgattgca ttgtctgtt
gttgttttat
2101  ttgtctttat atatgacttg cagaggataa ccaataaaat ggttaattctc
tctgaagttg
2161  aataatcacc atgactgtaa atgaggggca caattttgga cctctggcgc
aaactgaact
2221  ataggccagt agcattacgt gtatctggtg ccaacttgcgt gtttagatac
aaatcatacc
2281  gtctttttaa tattttgaag cccatttcag ttaaatatgt acatgtcatg
gtccttggga
2341  atcttcattt aaatgtttaa tctgggaatca aaa'gaagca aaaaatatct
gtctcctttt
2401  cactttcttc agtacataaa tacattattt aatcaataag aattaactgt
actaaatcat
2461  gtattatgct gtcttagtta cagcaaacac tctttaagaa aaatatccaa
tacactaaat
2521  aggtactata gtaattttta gacatgttac ccaattgatat gcaattaaac
ctttactgct
2581  tgtgttatgt tgataacata tataaatatt agataatgct aatgctctg
ctcgtctctt
2641  ttctgtaata ttctctttca tgcgtaatth actatgacca tttataagca
gtgcagttta
2701  ctacagatag catttcagga caaaatagat gactcaaac atttattgct
taaaaaatag

```

【図 9 - 4】

```

4441  agtaatttac acaattttat cttatagttc tggaggcaga agttcaaaa
aagccttaag
4501  agactaaaaa caagatgtcc tttagtctgg ttctctcgg aggcctccag
ggagattttt
4561  ccagctttca cttctagagt ctgctgacat tctctggctc ctggctacat
cacttcaato
4621  tctgcttcca tggctacata ctctctact atagtcacaa ttcttctcgt
cctcttataa
4681  ggatgcttgt gattacattt aggggagctc cagataatcc aggaacaact
ctccatctca
4741  agatccttaa cttaatgacg tgtgcacagt ccttttggtc agataattat
tcatagttcc
4801  cagggttagg gacatggatg taagggttga gggcagggct gttattcaga
acaccgcacg
4861  gagggaggag actgtgtago aaagactcta attgatttac tcaaggacag
tggagtcttg
4921  ctgagggtac taggatttga aagtactaga gtttgccttt atttaccact
gagattattt
4981  cccattatto tgcataaata attttgaaa cttcttatat taaatttcaa
ctattccact
5041  aaaaatgctg gtaactacat caagccttta gattattcaa atctctccc
agccccaggg
5101  aaaaacttaa gtcataaacc agaaaacag aaggtatgat aataatagta
ataacagtta
5161  aatcagtggt ctaatccaga tttttatttt taatacattt cttttggtgt
taatatgggt
5221  tactatgtga tcttatcatt tgcagtgtat tattacttat taggtgaaga
caatgtgtta
5281  aatatgtcta ttactcaaa gaacaattgc aaaatgagtc aaactatctt
tatataacca
5341  ggaagaatat atattgccc aggtcacaga attttgccc atgataggga
tttcaaaat
5401  gagccacttt gtctatcatg cagccttttc agagcttgta atgagaaaac
attacagagg
5461  agaaggctac ttggatgttt gttacttga atcctagaaa acaaaaacta
aaatttaaaa
5521  ataagaagtg agtaagctat ttctcatttg cgaatttgta tggagaagag
aggaataaga
5581  attattaaaa aaatacaaat tgggttaaaag tgatgggtga aaaaataaa
agaaggcaaa
5641  tgtacatatt aagcaattct actaagaatt ggaataaact agtttcaaaa
agatggtaat
5701  agttgggcat gatactagaa aatttccacc agtttattca gagctcaact
agtactttta
5761  ggaactcttt ttttatatac atgagactca ctttgacata ctttaaaaaa
aaacagttta
5821  tggaaagtag agtttaagag gagaatttga ttgactaag tggatatctt
tatagaataa
5881  ttaatgattt cagaattttc agttacaagt gtatataccg tggctattgt
ttatggattc
5941  atatgtaagg tagggctctt ttgcatata gactocagta ttatgtactt
tcatttcaaa
6001  attatattta tgcctctatg ggaagaaaaa tttttaattc acttggttgt
attaaaattt
6061  tacttaaggt ttgagaaaaa atgctatgaa aatcatgatt atagcaaat
aaatagctc
6121  aaaattttaa tctaaaaaa aagcccagaa actgaaza

```

【図 9 - 5】

NM_005238 (ETS1 mRNA) SEQ ID NO:34

1 cgggcgaggc cggggcagga ggagcgggCG cggcgcgggc gaggctggga cccgagcgcg
 61 ctcaacttcgc cgcgaagtgc caacttcccc tggagtgcgc ggcggcgacc
 gtccggcgccg
 121 ggggggaaaga aaggcagcgg gaatttgaga tttttgggaa gaaagtccga
 tttccccctgt
 181 ccccttcccc ctgttactaa tctcatttaa aaagaaaaac aacagtaact
 gcaaatctgc
 241 taccatcccg tacgtccccc actcctggca ccatgaaggc ggcgcgtcat
 ctcaagccga
 301 ctctcaccat catcaagacg gaaaagtgc atctggagct tttccccctc
 ccggatatgg
 361 aatgtgcaga tgtcccacta ttaactccaa gcagcaaaag aatgatgtct
 caagcattaa
 421 aagctacttt cagtgttttc actaaagaac agcaacgact ggggatccca
 aaagaccccc
 481 ggcagtgagc agaaacccat gttcgggact ggtgatgtg ggcgtggaat
 gaattcagcc
 541 tgaaggtgtg agacttcacg aagtctgtga tgaatggagc agccctctgc
 gccctgggta
 601 aagactgctt tctcgagctg gccccagact ttgttgggga catcttatgg
 gaacatctag
 661 agatcctgca gaaagaggat gtgaaacat atcaagttaa tggagtaaac
 ccagcctatc
 721 cagaatcccg ctatacctcg gattacttca ttgatctagg tattgagcat
 gcccgatgtg
 781 ttccaccatc ggagtcttca gagccagcgt tcatcacaga gtccatcatg
 acgtccatc
 841 ccatcagctc ggaagagctc ctctccctca agtatgagaa tgactacccc
 tcggtcatcc
 901 tccgagaccc tctccagaca gacacccctg agaatgacta ctttgcctac
 aaacaagaag
 961 tctgcacccc agacaacatg tgcactggga ggaaccagtc tggtaaaact
 gggggccagg
 1021 actcttttga aagcatagag agctacgata gttgtgatcg cctcacccag
 tctctggaga
 1081 gccagtcact tttcaacagc ctgcagcgtg ttccctctca tgaacagctc
 gactcagagg
 1141 actatccggc tgccctgcgc aaaccaagc ccaaggcgac ctccaaggac
 tatgtgcggg
 1201 accgtgtcga cctcaataag gacacagcgt tcatctctgc tgcctgccta
 tggcgctaca
 1261 caggcagtggt acaaatccag ctatggcagt ttctctctga attactccat
 gataaatcct
 1321 gtcagtcctt tatcagctcg acaggagatg gctgggaatt caaactttct
 gaccagatg
 1381 aggtggccag gagatgggga aagagaaaaa acaaacctaa gatgaattat
 gaaaaactga
 1441 gccgtggcct acgtacttat tacgacaaaa acatcatcca caagacagcg
 gggaaacgct
 1501 acgtgtacgc ctttgtgtgt gaactgcaga gctcgtcggg gtacacccct
 gaggagctgc

【図 9 - 7】

3241 catagtcaag caaggtagtc atctttctgc tggttgtgag ggggaatctg
 aaaaatggaat
 3301 tttagaggaa aagtnaacat ctactagtgt aggaaaagtg cotaatacaa
 ttgaactctc
 3361 cctcactcta tagttgccca gttgaagaa taaggaggag ggggtgcttt
 tatggaactc
 3421 catgagagaa ggaagaatat attcagcta agcttctcag ggcctggcct
 ttttgggatt
 3481 tggatgagaa attggaagta ctacactact tctagcatat ctttaagaaa
 atgattgttt
 3541 atttactccc agactcctct gcagaccagc aattatcagg aacatagctc
 tctgattcat
 3601 gagtgcctcc atactgatga attggagcat ccatatggaa agcaaaaggca
 gaattatccc
 3661 agctgtatta ttttgatctt ttggatgcag gtgccttaat gaagcttca
 aaatatttta
 3721 ggagctgcct agggagtgtt ggttggactt gtttggacta catgttttct
 tcttagatta
 3781 tttgatcttt gttggcaact ggcaaaaggt gttgtgtgta atgtgtgcat
 gtgtgtgaat
 3841 gttgtgtgtg tttgtgtgtg tttgtgtgtg tttgtgtgtg ttgcagaca
 tgcaaaactg
 3901 cagctgaaat aatcccttag atttctaggt aagtctttcc acatttcaat
 aatgggtaag
 3961 agtagaacca gggcggggta tcaattattg ctctgtgttt gcaaccaaggc
 ataaaatcac
 4021 tttctcaaat catccaccgt tctattataa tttatgcggg aaactctcct
 tctgtgagta
 4081 taactcctcg agttctcata gcagataaga tataagaagc tgctccttag
 tgctcctcgc
 4141 cccgcttgtt tgcataaatt ccccttctct ctatgtccac cattttcaag
 atttgtagat
 4201 agtgtartag ttaagacagc ttgtctgata cggccagatg tttttctccc
 ttgtccaaa
 4261 ggcagagac catccagaga agagtgggtg gtcgtttata cactggaaat
 gttgcgttta
 4321 tgctttttta aaacacacgt taacttcaga ggaaggatgg gcaaatctgg
 ictagctggg
 4381 tgaacccctt attttccag agatgcttta aactttgttg gttttggctt
 tgggtttcag
 4441 agtcactttt gttcccttct ccaattctga gagggaactt cctacacatg
 agccctgaat
 4501 tttgtgtgctg tggggatggg aggtagcatt caaagctcag atgtgtcttt
 cctcactttg
 4561 gagatgaaca ctctgggttt taacagcata acctgcctaa cctctatggt
 gagaataata
 4621 ccatctctct tctagtcag ctgtgcacgt cgttactctt gttgggtctt
 atataaattt
 4681 gttgaactct taactacatt ccaaaagagt ttcaaggaac cataaatata
 tgtatacata
 4741 tacatatata aaatatatat attaaaaaa aattatcagc aatctgctt
 cagttataga
 4801 actttttttt ttaagaatac ttttttttta agctgagaa tatagggtatg
 aaaaagatgt
 4861 tataattgtgt ttgactattt tccaacttgt attttcatat aatttatatt
 ttttaaaagc

【図 9 - 6】

1561 acgccatgct ggacgtcaag ccagatgcgc acgagtgtat gcaactgaagg
 ggcggggaaa
 1621 accctgtctga gaacttccaa ggacagccgt gtgtgttggg ctctgaattt
 tgaatttcta
 1681 ttctattttt tattttccag aactcatttt ttacttccag ggggtggagc
 taagtcaagt
 1741 gcagctgtaa tcaattgtgc gcagttggga aaggaaagcc aggaactgtg
 ggttgggttg
 1801 gaccagaaat tcttgagcaa attttcagga gaggagagag ggccttctca
 gaagcttgaa
 1861 ggcctctggt taacagagaa agagactaat gtgtccaatc atttttaaaa
 atcatccatg
 1921 aaaaagtgtc ttgagtgttg gaoccttag caagtgcact tgtcacatca
 gaactaatga
 1981 aactgatgta aggaacttaa ttgtctctgc tttttaggtc tgggagggca
 aaaaagaggt
 2041 ggggtggatg aaacatgttt tgggggggga tgcactgaaa atctgagaa
 tatttacctc
 2101 tcaacttagt tttagaagca agatggactt cagtggggag gggccaaaac
 cgttgtgttg
 2161 taaaaatta ttttattaaa tttttgcca gtattttttt tcttaaaaat
 cgtttaaagc
 2221 tctaaagttg tctcagatc gcaataatc gtaagtgtgt ttttatttgc
 cgggttggga
 2281 ttctgtcaca atgaagaaa actgtttata tagaccccat tggaaaagca
 aacgctctc
 2341 actgagatca gggatcccaa attcatggga cttatatagc aaggacattt
 aatgctgatt
 2401 tgggtacagc ggaattatgt gtgtgaatgt catctacaat taaaaaaat
 tagcacatcc
 2461 ctttacttac ttgttatcag tggattctcg ggggttggac ttaagtgtga
 gctaagaagc
 2521 attaatgtct tgaactgaat gtattttgca tccctgtttt tggacgacag
 taaacgtagg
 2581 agcacgtgtt aagtcttggg agggagatcg aaggaggagc attgacttgg
 ttctttctta
 2641 gtctatata ttagcatag atgacttga ataaaagctg tatgcatggg
 cattacccct
 2701 caggtctcaa gaaataagtc ctgaatgcat gtogttccaa actaaactc
 tgaatttttt
 2761 cttttatgtc ttattttcca agagtctccc attttttgc cccctccccc
 gcaactctg
 2821 ttattcagta gagagaagtg taocgcttct tgatttgtga gtgaaaaagt
 aacttgagac
 2881 acgacctaag ttgaagagtt tagacttctt gagttttaga agtgcagtaa
 atraagagag
 2941 catttcaata aaatgtgact tggctgtctt tggaaagaaa gtgcaggctt
 ttctttttaa
 3001 gaatttaaat tagtccgcta ggaatgcagg tgagactctg tatgcacaa
 gaatggcaaa
 3061 ggtgatgcca gggcctcttg ctgggtctgt atgtcttggc acagggttaag
 tgaaggttaa
 3121 ttccagaaga gaggaatgac ttgaaggcaa aggaactaaa ggaaggaggt
 tcaagttaga
 3181 aaataaggtt gtccatgaga ttgaaataga tttttatgtc ccccaaggtt
 taaatacaaa

【図 9 - 8】

4921 tgaataatta gaagcaagat gaaaaaaag aaaaagcaggt gcttttttaa
 aatcagaact
 4981 gaggtagctt agagatgtag cgaatgaagt gtcgatgttt ttttaaaaa
 aatgcacaaa
 5041 aaattcttat ggcggagttt tttgtttgtt tatttttaga gtgatgtctg
 gcacactcat
 5101 ttgtggaga gttttttata tactgtagcc tgatttcaat ttgtatttta
 aactgtgtga
 5161 aattaaaaac aaagaatttc attcataaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
 aaaaaaaaaa
 5221 aaaaaaaa

NM_005239 (ETS2 mRNA) SEQ ID NO:35

1 gcccggttac ttctccaga gactgacgag tgcggtgtcg ctccagctca gagctccagg
 61 agccgcgcgg ccagcgtccg gctccctga tgcctctggt ccggcgccct
 cgcctctccc
 121 cggcgcgccc cgagcagccg cggcgcgcca gcagccacgg tcccgaccaa
 gcgcgcgcgc
 181 tgcgcgcgca gccaggtatg atgatttcgg aatcaagaat atggaccagg
 tagccctctg
 241 ggttaacagt tacagaggga cactcaagcg ccagccagcc ttfgacacct
 ttgatgggtc
 301 cctgttttgt gtttttccct ctctaatatg agagcaaaac ctgcaagaag
 tgcacacagg
 361 ctgtgattcc atttctcatg actccgccaa ctgtgaaltg cctttgttaa
 ccccgctcag
 421 caaggctgtg atgagtcagc ccttaaaagc taccttccat ggccttcaaaa
 aggaacacgc
 481 gcgcctgggc attcacaaga acccctggct gtggagttag caacaggtat
 gccagtggt
 541 tctctgggac accaatgagt tcaagtctgt gaacgtgaat ctgcagaggt
 tcggcatgaa
 601 tggccaagat ctgtgtaacc ttggcaagga acgctttctg gagctggcac
 ctgactttgt
 661 ggggtgacatt ctctgggaac atctggagca aatgatcaaa gaaaaccaag
 aaaaagacaga
 721 agatcaatat gaagaaaatt cacactcac ctccgttctt cattggatta
 acagcaatac
 781 atagggtttt ggcacagagc aggcgcctta tggagtgcag acacagaatt
 accccaaggy
 841 cggcctctcg gacagcatgt gtcggcctc cacaccagc gtaactagct
 ctgagcagga
 901 gtttcagatg ttcccaagc ctccgtctag ctccgtcagc gtaactact
 gctctgtcag
 961 tcaaggaact ccaggcagca acttgaaatt gtcacacaa aattctggga
 ctccaaaaga
 1021 ccacgaactc cctgagagag gtgcggacag ctctcagagc tcagactccc
 tctccagctc
 1081 ctgggaacag cagtcgtctt tgcctgagat gcaacggggt ccttctctcg
 agagcttcca
 1141 agatgactgc agccagctct tctgcctcaa taagccaacc atgtcttcca
 aggtattact
 1201 ccaagagagc agtgacccag tggagcaagg caaacagttt atactgcag
 ctgtgtctgc
 1261 cggcttcaca ggaagtggac ctattcagct gttgcaagtt ctccgtggagc
 tgcatacaga

【図 9 - 9】

```
1321 caaatcctgc cagtcattca tcagctggac tggagacgga tgggagttta
agctcgccga
1381 ccccgatgag gtggcccgcc ggtggggaan gaggaanaaa aagcccaaga
tgaactacga
1441 gaagctgagc cggggcttac gctactatta cgaacaagaac atcattccaca
agacgtcggg
1501 gaagcgtacg gtgtaccgct tcgtgtgcga cctccagaac ttgtgggggt
tcacgcccga
1561 ggaactgcac gccatctcgg cgttcacgac cgacacggag gactgaggtc
gccgggacca
1621 ccctgagcgg gcccccaggct cgtggactga gtgggaagcc catcctgacc
agctgctccg
1681 aggacccagg aaaggcagga ttgaaaatgt ccaggaaaagt ggccagaaga
cagtgccgctt
1741 attgcattcc aaaccacgcc tcctgaccag gctgcctccc ttgtggcagc
aaaggcaccg
1801 ctaattctac tcacagtgtc tttaagtga aatggtcgag aaagaggcac
cagggaagccg
1861 tcctggcgcc tggcagtcgg tgggacggga tggttctggc tgtttgagat
tcaccaagga
1921 gcagacatgt cgtggacaca cacagactat ttttagattt tcctttgcoo
tttgcaacca
1981 ggaacagcaa atgcataaac tcctttgagag ggtaggaggg tgggaaggaa
acaacaaagt
2041 catttcagaa gttagtittg atatatattt ataattttat aattgtttcc
agaatccctt
2101 aacagttgta tttaacagaa atgttatatt gtaatttaaa ataattatat
aactgtattt
2161 gaaataagaa ttcagacatc tgaggtttta ttctattttt caatagcaca
tatggaattt
2221 tgcaagattt taatctgcga agggccgact aagagaagtt gtaaagtatg
tatlatttac
2281 atttaataga cttacaggga taaggccctgt ggggggtaat cctgcttttt
tgtgtttttt
2341 tggttgtttg ttgtttttgt ttgtgggggt tttcttgcoo tggttgtctg
gcaaggactt
2401 tgtacatttg ggagttttta tgagaaactt aaatgttatt atctgggctt
atatctggcc
2461 tctgctttct cctttaattg taaagtaaaa gctataaagg agtatttttt
ttgcaaaagt
2521 gcataatggt tccacttctc tgcctgctgt taagtcagtt tatacacaaa
atggattttta
2581 ttttttagtt taactgtggt tcctgcacag ctcacctctc tcagaccacc
cagccatttc
2641 ctctctgtgc tcacgtgtct tcgtgtgtat taaaataaga atattatttt
tggaaatatg
2701 caactccttt tcagagatca ggaggagatt atgtagcagc tatttttact
gcaaaagtta
2761 ttcactggaa aaaaaatgta atttgtaaga aagctttatt ttatctcag
ctctatgtaa
2821 agttaaagtt actgtacaga gctgaaggac ggggggctgt agggctcttg
atgaaccctc
2881 ttgaacgaag cacagtttgt cccacttttg ttcaactcgt tgcctcaacc
atcttaatatg
2941 catgctgctc ctttttgctc agtgtccaca gcaagatgac gtgattctta
ttttcttgga
```

【図 9 - 1 1】

```
961 tgagatctcc cagccgcaga agggccggaa gcccccggag ctagagcttc
cactcagccc
1021 gagcctgcta ggtggccggg gaccgcgaag gaccccgagg tcgggaagtg
gctccggcct
1081 ccagggtccg gggccggcgc tgaccccatc cctgcttctc acgcatacat
tgaccccggt
1141 gctgtgaca cccagctcgc tgccctctag cattcacttc tggagacccc
tgagtcccat
1201 tggcccccgt agcccgccca agctctctct ccagtttcca tccagtgcca
ggcccccagt
1261 gcaatccctc tctatcagcg tggatggcct ctcgaccccc gtggtgctct
ccccggggcc
1321 ccagaagcca tgactactac caccaccacc accaccctct ctggggtcac
tccatccatg
1381 ctctctccag ccagccatct caaggagaaa catagticaa ctgaagactc
catgctctga
1441 ttgtggtggg gtggggatcc ttgggaagaa ttactcccaa gagttaactct
cattatctcc
1501 tccacagaaa acacacagct tccacaactc ctctgttttc tgtcagtcctc
ccagtggccg
1561 cccctacaag tctctacttt caatggtagg ggcggtttat ttattttatt
tttgaggccc
1621 actgggagga gctcgaacta accctttagg gtggttagga catctccccc
accctccccc
1681 ttttttcccc aagacaagac aatcgaggct tggcttgaga acgacctttc
ttcttttatt
1741 tctcagcctg cctctgggga gatgaggagg cctgtctgc gttttggat
gtgagtagaa
1801 gaggtagttt gttttgtttt attatccctg gccatactca ggggtccagg
aagaatttgt
1861 accatttaat ggggtgggag tcttgcccaa ggaagaatca caccottgga
atagaatttt
1921 ccaactccccc aacctttctc tcagacagct tatccttttc aaccaacttt
ttggccaggg
1981 aggaatgtcc cttttgtctc tccccctgag aagccattcc ttgtctgccc
aacctccctg
2041 ggggtccctg tgtttctccc caatgaggag tttttttggg ggggtgctcc
cgtctggggg
2101 gccctccagc ccagtactcc aggtctccct gctctccccc cgtgcccatt
tgtatagtat
2161 aatctatttt taattggggc ttttcaaatg gggagaggga gtcactctct
ctctattttg
2221 gtggggtggg tgggaaggaa gggatttggg ggggaattct cctgcgcctc
cccccactcc
2281 aagtgtttat ttttgatacc aaacatgaat ttccagtctc cctccctcca
gcccccaaat
2341 ttctgctggg cgggtacaaa ggacctcttc aatgtccctg gagtggggag
ggaggaattg
2401 gggacataaa gccctgctct tctctattct aggcagaaga gagtgggttc
aaaagactcc
2461 tgggctccac tgttagcgct gggccagccc aggccttggg acctgggggt
tgggtatttg
2521 ggggacagt ctacactcgt ctccactggt tgttttactt ccccaaaatg
gacctttttt
2581 ttttctaaag agtccagag aatgggggat tgttctgtta aatatatttt
tttcaagtgt
2641 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa
```

【図 9 - 1 0】

```
3001 cacagactat tctgaggcac agagcgggga cttaagatgg gaaagagaaa
gcatcgagagc
3061 cattcattcg gaaaaacgt tttagtcaaa atggagactt tttagtctgt
ttcaaaagag
3121 cactcgagtc atgtgtattc ccggccttta taaatgacco ggcgaagtgt
gtttcaaaat
3181 ccgacaggct tgtctgttta cttagctgct ggccttgacc ggggtgctga
catctgtaaa
3241 gaatctctct gtgatgaac tgaggaaatg ggtggccggg caagtgggga
agagcaaaagc
3301 cagagctgag ctgctcctaat accacaaaaa gacattcccc agtatacata
agcacaggat
3361 gtttttctca agagggatgt atttatcact tggacatctg ttataatat
aaacagacat
3421 gtgactggga acatcttctg gccaaaagaa tcttaggcag ttgctcattg
tatgtagggt
3481 tgaaccaagt gaaattgcca atattaggct ggcttttato tacaagaagag
gagtttcatg
3541 ggggttcagcc taacagttat ggaactaca gtccctataa accattggca
tggtataaaa
3601 cagactctaa gtataaaaaa tttgtaattg ggcctttact ctctcaataa
taaagtattt
3661 tgtttatata aa
//
BC056150 (ELK1 mRNA) SEQ ID NO:36
1 cgctacacac aggtacccct gggatggcgt gagcactccc ccagcgatgg acccatctgt
61 gacgctgtgg cagtttctgc tgcagctgct gagagagcaa gccaatggcc
acatcatctc
121 ctggacttca cgggatgggt gtgaattcaa gctgtggat gcagaggagg
tggcccggt
181 ttggggggcta cgcaagaaca agaccaacat gaaltacagc aagctcagcc
gggccttgct
241 gtactactat gacaagaaca tcatccgcga ggtgagcggc cagaagttcg
tctacaagtt
301 tgtgtctaac cctgaggtcg cagggtgctc cactgaggag tgcgcgcccc
agcccaaggt
361 gtctgttacc tccaccatgc caaatgtggc cctgtgctgt atacatgcgc
ccccagggga
421 cactgtctct ggaagccag gccaccccaa gggtcagaga atggcaggcc
caggcggttt
481 ggcacgcagc agccggaaag agtacctgct ctcgggcctc tatccacct
tcaccatcca
541 gtctctgacg ccgcagccac cccctcatcc tcggcctgct gtggtgctcc
ccagtgcagc
601 tcttgacagg gcagcagcgc cccctcgggg gagcaggagc accagtcocaa
gccctctgga
661 ggccgtgtcg gaggtgaag aggcgggctt gcctctgag gtoatctga
cccccccgga
721 ggcocccaaa ctgaaatcgg aagagcttaa tgtggagcgg ggtttgggcc
gggctttgoc
781 cccagaagtg aaagttagaa ggcoccaaga agagtgtgaa gttcgggggg
agagagcggt
841 tgtgcagaaa accaccaagg ccgagccaga agtccctcca caggaggcgc
tgccagcccg
901 gctgcgccgc gttgttatgg acacgcagg gcaggcgggc ggccatgcgg
cttccagccc
```

【図 9 - 1 2】

```
NM_001987 (TEL (ETV6) mRNA) SEQ ID NO:37
1 gcttcccggt tccccgcgc gcgcgcgcac ctgcagaccc gcgcgcgcgc ctcggccccc
61 tctccacagc ccccgccgccc ccggcgccccc aactccgcgc gccgcgcgcg
cccccccgcc
121 ggcctccaga cccccggggc ggcctccggg agagatgctg gaagaaaact
cttaaatgac
181 ccgctctggc tggccgtgga gccctttctg gttggggaga ggaagggaaa
tgggaaaaaa
241 cctgagaact tctgactctc tctcgtctgt agacatgctc agactcctc
ctcagtttag
301 catlaagcag gaacgaattt catatacccc tccagagagc ccagtgccga
gttagcttc
361 ctcgacgcca ctcatgttc cagtgcctcg agcgtcagg atggaggagag
actgactccg
421 cctgcctgcy cacttgcgtc tgcagccaat ttactggagc agggatgagc
tagcccgctg
481 gctcaagttg gctgaaaatg agttttcttt aaggccaatt gacagcaaca
cgtttgaatt
541 gaattggcaa gctctcctgc tgcctgacaa agagagacttt cgtctatgat
ctctcattc
601 aggtgatgtg ctctatgaac tctctcagca tattcttgag cagaggaaac
ctcggattct
661 tttttccaca ttcttccacc ctggaaactc tatacacaca cagccggagg
tcatactgca
721 tcagaacctc gaagaagata actgtgtcca gaggaacccc aggcctatccg
tggataagtt
781 gcaccataac cctccacca ttgaactgtt gccctgctc aggtacacta
tcacgacaaa
841 tcaccggcct tctcctgacc ccgagcagcg gccctccggc tccccctgg
accaatgat
901 ccgcgcgcct ccccgcgctg agagagctca gggacccagc ccgcaccag
agaacaacca
961 ccaggagttc taccctctgt cagtgtctcc catggagaat aatcactgcc
cagctctctc
1021 cagctccacc ccgaagccat ccagccccgc gcaggagagc acacgcgtga
tcacagctat
1081 gccacgcccc atcatgcacc ctctgactcc gaacccccgc cactcgttgg
atttcaaca
1141 ctgacggctc tccaggagc ggcctcatag ggaagggaag ccatcaacc
tctctatcg
1201 ggaagacctg gcttatatga accacatcat ggtctctgtc tccccgctg
aagagcagcg
1261 catgcccatt gggagaatag cagactgtag actgcttttg gattacgtct
atcagttgct
1321 ttctgacagc cgttacgaaa acttctatcc atgggagagc aaagaatcca
aaatatctcg
1381 gatagtgat ccaacgggac tggctgact gtgggggaac cataagaaca
gaacaaacat
1441 gacctatgag aaaatgtcca gagccctgcy ccaactactc aaactaaca
ttatcaggaa
1501 gggagccagg caaagccttt tgttcagggt tatgaaacc ccagatgaaa
tcaagaggtg
1561 ccgaacagag cgtctggagc acctagagtc ccaggagctg gatgaacaaa
tataccaaga
```

【図 9 - 1 3】

1621 agatgaatgc tgaaggaacc aacagtcacc ctccagcggc cagcagccca
 gggaaacccct
 1681 gccaccacagg attgctgtaa gtgtgacgga gcaagcgggc tgaggagagt
 ggaagaaggaa
 1741 gcgaccacaga aatggcaggg acactctctc tgcagaccaa gagggacccct
 ggagcacctt
 1801 agacaaacta cccagacagc gcggggctgg aattctggcg gagggcagtga
 gcctgggact
 1861 ccatgtccag ttctctctg atttggaaac tctccatctg taattctcca
 cctcacccct
 1921 tccacgggtg ttagtataat ggtgtttttg tttttgttt ttgtttaaga
 acctgcagtt
 1981 tgactcttca togttcctat aggggaagac atctgatgtt gttttccat
 ggaatatata
 2041 atctattata tatataattt ttgcataact cacaagtgcc ggcaagccca
 cgtggctcagg
 2101 aaagagaata ctggcagagg ggttcagggt cctctttttc ctgccacgtg
 gatcagggtc
 2161 gttctctgta ctgttgggtc ttggctgaaa aaaaaaaatg cttttaaaaa
 agataaaaat
 2221 aaaaggagag ctctcttttt ctctctcttg ctctgtttct ccttgggtcc
 cctctgtctc
 2281 cccgcccctg ctgcagttga gattcagatg cctctcgaca gagttcagcc
 tcttggagag
 2341 tcttggggat tgttggcacc taaacagaat cagtgcaccc ggtgctttgt
 ggccagcagc
 2401 acagaatcaa acccgcatcc cagcattggg ccaaccatct gagggagccc
 aaaaatcatca
 2461 cagatgctgc tgtgctgcag acagatacat gctagtcacg agagccgccc
 ctgagatggc
 2521 tgtgagaacc atgtgtctaa ggcgttaagt aaggatggaa ggcgtgtccaa
 gttattttga
 2581 aggcctcgcc agcttgggat tagcttggga gcgcagcgtc gcaaatggga
 aatatgaaa
 2641 agaccacaca gcccagcagc tccagaactt gggcaaaatg attctgcagt
 gggcatttat
 2701 ttttccaaag caggtaacag aggtcagtgga gaagaagaa ctctctctg
 ctccattcca
 2761 aaggccatct tgtgtcagt ttcctgcctc cactgtattt tttttttttt
 tttttttttt
 2821 caattcctaa ccttttttaa agtttctgtg tctccactgg acacagagct
 ttggagcagg
 2881 aggatccagc agggcagctc cagttgcaat cagtgtgtgc ccagcctggg
 cagacaggaa
 2941 attctcggga tacattattt tttcttttt tcatagctgt gtctcagaaa
 ggaccatttt
 3001 gtggctcttt ttccactcaa aataagatcg atggatctct gtaaatgag
 ggtagtgcga
 3061 ctctctagta tttttgaaag ctgttttaga tttttttttt ttttctttt
 ctagccatct
 3121 aaattgactc ttccaatata ggtctcagaa atccaatatt tggagtacaa
 ttctttttta
 3181 tccagattac acctgcctta caaagcaccc cctcctgttt cccctctgtt
 tctctactc
 3241 agttggggga gaaactcaca gctcctccgg gatcacatgt tgcccctcagc
 agcagctccc

【図 9 - 1 5】

4981 tatgttgaag gtaacatgaa ctctaaagtc ttgacccagg gcgacttggt
 ttgtcttaag
 5041 gtggcatcac caatgttcca aatccttttg ggagatgagg gtatccccc
 agaaaagagg
 5101 gaataataga ccaatggatt ttctcttttc accagtatgt ttggaacct
 ctgattccat
 5161 gtccctttag actgatctct tgtccaaagt agaattgcgc tttagtgaa
 attcaaatgg
 5221 ctgtgacaat ttaccgaaat gatgaagtga ccaaccatcc cactttcacc
 tgcctaggct
 5281 ccaagtctga atacattttt gaaataggaa ctcccttttg caaaaaagaa
 acctgggtgt
 5341 caggggaggtg aagtgcattg ccctaggagg agacagcatg ccaagaatgg
 aattaggctc
 5401 aggatccagc ctggggtcac cctgtgtggc tcatctccac ccaggaaact
 gaagataaaa
 5461 gatttgggaa aacacaccaa gaaaaagggg cagttttctt tgcccagca
 ttgtgtgc'a
 5521 gttagaggtc gttcactctc tctctgtctc ctctggagta gaaataaagg
 ctgtgacaca
 5581 aggaagccag tgggggtggg agagggccac ataactcctc cctaaaaacc
 acagaagact
 5641 aacctgatac tcttttgacc ccaactgcct aacactaaac agctgcagac
 cccatgaatc
 5701 ttccacacat gccaatgtaa cattcttgat gatttctctt tgtgacgca
 accacctgca
 5761 aaccagaagc actotagaat ttctctcccc gccccccttt ttgtttagtt
 tctaatctct
 5821 tgtttttagg gtgtgggggt tataaggagc tgaatcaaat gaattgaaca
 aanaagaaaa
 5881 aaaaaacaaa aaaaaatgcc ttttctcagg gccagtggat tgcnaataat
 ttttaagaaa
 5941 aagcctataa ttacatcatc tcaataaatt ttttataaaa aaaaaaaa aa

NM_016135 (TEL2 (ETV7) mRNA) SEQ ID NO:38

1 gatcttctcc cagcgacact tccagttctc ggagccagggt taggggtttg
 gcggaggagg
 61 actgcggggc gcgggactag ggcccagaca gccacggcca ggggagcgt
 caagacagaa
 121 agcgggtggc ttctcactcc ccaactgtta tgcaggaggg agaattggct
 atttctccta
 181 taagccctgt ggcagccatg cctccctatg gcacccacgt gcaagccaga
 tgtgaagctc
 241 aaattaaact gctgggtgaa ggggggagat gcaagctgac aggaagactc
 cgcctccagc
 301 ccgcactgtg gagcaggagg gacgtgctgc actggctgag ctgggcagag
 caggagtact
 361 ctctgcccatg caccggggag caagggttgc agatgaacgg acgcgccctc
 tgcactctca
 421 ccaaggacga ctcccgccac cgtgcgccca gctcaggtga cgtcctgtat
 gagctgctcc
 481 agtatatcaa gaccacaggc cgagccctgg tgtgtggacc ctttttttga
 gggatcttca
 541 ggctgaagac gccacccagc caactctcag tcccctcgga agaggtgact
 ggccctctct

【図 9 - 1 4】

3301 aggtgaagt accagacccc tgggcttctc cccagctttt tctgagttga
 gtcagacagt
 3361 tagagtttgg gtcacacagg caagaggaaat ttccctcggc ccttactgac
 aaggacacca
 3421 acctagggtg caaacagatg gactatgggt caaggcacat ggaattgagg
 agctgatcaa
 3481 ggctctcttc agccttgctc tgcctctgcc tcttatcaga gcaacagtga
 acacacgggc
 3541 atagccagcc cactcctact gtcacaggcg cccaccactt caacctctcg
 ggaggtcagg
 3601 gaccttctat atgaggcgag tgggtctcag tctgcttgaa tgggtgatga
 attctgctgg
 3661 atctcagcac gctgcagggt tcttttgaga gcaatcagta ggaactgggt
 atccctattt
 3721 cagcctctaa gatgactggt attctatctg aaatgcagag attaagocaa
 atacctgatg
 3781 tattgtgaaa gccactgatt ttaagaatgg agagaagggg attttttact
 gcatccctct
 3841 gtatgaatat gaaatcagag accaggcgat gatgttgcta ggtatagaac
 ctctcagctc
 3901 ggctcttcca cccaagtcca agaactcagt ctcttactgt tcaaaagaa
 ttaacagttg
 3961 aattatggag ggaattcccc ttttgcacca agcatttcta tatttaagc
 aatatccag
 4021 gagaatagt tagacttagg atgatacctt cagccacttg aagaagaaat
 agaaggcgtc
 4081 catctcaata tagcttttat tcccatcca gatacaggtt gagcatccct
 aatctgaaca
 4141 gttaaaaccc ccaaatgccc caaaatccaa accttctcga acgctatgac
 acctgagtg
 4201 gaaattccca cacttaacca acacatttgc tttcttatgg ttcaatgtac
 acaaacctgt
 4261 ttatatagaa aatgatttca aatatcataa aattaccttc aggtatgtg
 tataaagtat
 4321 atatgagcca taaatgaatt ttgtgttagt accttggctc catccccaag
 atctctcatt
 4381 ttatatatat atatatatat atatatatat atatatatat atatatatat
 acacacacac
 4441 acatacacaa atattccagg atacaaaaaa aaacatttaa aaatccgaga
 cccagaacac
 4501 ttctggctcc aagcatttca gataagggat atcaatctgt actaccaata
 aggatttcgt
 4561 aattccctca actgcaaatg tctctctcat ttgttcttta tgaagaaacc
 cgggtagtc
 4621 cagcacctgg atacagtatt tacacctcgc agacctcaa gatctcagat
 tcaatagga
 4681 aaccttgatg aagcacctgc tggacactga gggaccocaa gctcaatcag
 ccaaatccc
 4741 tgccttcaga gtttatattg taactgccta atccaccggc cgtgactcat
 ttcaacacta
 4801 agtactaggg gtgtgttcag gagacaatcc tgaagtcagg agaggaagaa
 gcaaaaggagc
 4861 cctgcctgtg gatggatgtg cattctcact tgggtcttga agttctcatt
 cctacatctc
 4921 aagctagcca ggcagctccc tctctatcag aagaaagcac tggtaattgg
 ctgactggc

【図 9 - 1 6】

601 agatggacac ccgaaggggc cacttgcctg agccaccaga cccagggtct
 accagcaact
 661 tgggccacct ggaatgacct ggctggccaa ggtggacccc tggcaaggag
 gactccctca
 721 acttatgtca ctgtgcagag ctggctgcga ggaaccaggg ggtctgttcc
 ttcccgcga
 781 tggccaggcg cccattgac ggcaggatcg ctgactgcgc cctgctgtgg
 gattactgtg
 841 atcagctgct ccttgatacc cgaatgagc cctacatcaa gtgggaaagc
 aaggcagcca
 901 agatcttccc agttgtggat ccaaatggcg tgcagagact ctggggaaat
 cacaagaacc
 961 ggggtgaacat gacctacgag aagatgtctc gtgcccctgc ccactattat
 aagcttaata
 1021 tcatatagaa ggaaccgggg cagaaaactc tgttcagatt tctaaagact
 ccgggaagaa
 1081 tgggtcagga caagcacagc cacttggagc cgttggagag ccaggagcag
 gacagaatag
 1141 agttcaagga caagagccca gaaatctctc cgtgaggggc aggtggaactc
 caggccaccg
 1201 gtaccagatg ggcaggaccg gactctccga tgaaggcaga ctctctctcc
 cagcagagca
 1261 gcaggatccc cagccagact ctgtaccacc aggtattcac ccattgottg
 ggaaggctgg
 1321 gaggcctccc atccaggaca ctgggggcag gactgtctcc ttttgggcag
 ggcaatctct
 1381 aggttaaatg aggtacaggg gaatggactc tccctactgc caccctgggg
 agaggagacc
 1441 aggcaccgat agagcaccca gcccccacc tgtaaatgga atttaccaga
 tgaagggaat
 1501 gaagtccctc actgagcttc agatttctcc acctgtgaaa tgggctgagg
 caggaaatgg
 1561 gaaaaagtgt tagtgcttcc agggcgcaat gacagctcca gtaacaataa
 aacaaatggt
 1621 agctgaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa

NM_004454 ERM (ETV5) mRNA SEQ ID NO:39

1 gactccagcc gctgtgtgca ggaagggttc acctctctgc gagcggttgc gccacgctt
 61 tggccaggcg gccacggccc gctgcggcgc tgggtgagcg cgcctgcgccc
 gccaggcccg
 121 ctgcaggggg aggaagggcg ccgctccagg aggtactcct ttcccacaga
 aattactcaa
 181 tgcgtgaacc tctcaaatg gtattagaga cgtgaaagc acctgggagc
 ggttttatga
 241 tcaagcaagtc ccttttargg tcccaggaaa atctcagatc gaggaatgca
 gagggcgccc
 301 tgtgattgac agaagaggga agttttttag cacagatctg gctcacgatt
 ctgaagagct
 361 atttcaggat ctacgtcaac ttcaaggagc ttgtttagct gaagcacaag
 ttccctgaga
 421 tgaacagttt gtcccagatt ttacgtctga taaactgggt cttcatgccc
 caccctcaac
 481 caagatcaaa cgggagctgc acagccctcc ctctgagctg tctgttttga
 gccatgagca

【図 9 - 1 7】

541 ggcctcttggt gctaactatg gagaaaagtg cctctacaac tattgtgcct
atgataggaa
601 gcctccctctt ggcctcaagc cattaacccc tctacaac ccctctctac
cccccctaca
661 gaatccccta ttcccccaac ctacggcaac tctgccccc toagggcgatg
ccctgcagc
721 tggcccaggtt caaggtgtgg gcccccgc ccgcccccac tgcgtccag
agcctggacc
781 acagcagcaa acatttgcgg tccccgcacc accacatcag cccctgcaga
tgccaaagat
841 gatgcctgaa aaccagtatc catcagaaca gagatttcag agacaactgt
ctgaaccctg
901 ccaccccttc cctctcagc caggagttcc tggagataat cgcgccagtt
aocctggca
961 aatgtcagaa cctattgtcc ctgcagctcc ccgcgccct cagggattoa
aacaagaata
1021 ccatgaccaa ctotatgaac atgggggtccc ggcatgcga ggccccccag
cacacgggtt
1081 ccagtcacca atgggaatca agcaggagcc tcgggattac tgcgtgcatt
cagaagtgc
1141 taactgcagc tcatctaca tgagaggggg ttattttccc agcagccatg
aaggtttttc
1201 atatgaaaaa gatcccogac tatactttga cgcacattgt gttgtgcctg
agagactgga
1261 aggcacaagc aaacaggagc ctaccatgta tcgagagggg ccccttacc
agaggcgagg
1321 ttcccttcag ctgtggcagt tccgtgtcac cctctttgat gacccagcca
atgcaccact
1381 cattgcctgg acaggtcgag gcatggagtt caagctgata gaaccggag
aggttgctcg
1441 gcgctggggg atccagaaga accggccagc catgaactat gacaagctga
gcgcctctct
1501 ccgctattac tatgaaaagg gcatcatgca gaaggtggct ggagagcgat
acgtctacaa
1561 atttgtctgt gaccagatg cctctctccc catggcttcc cgggataacc
agcgtccgtt
1621 cctgaaggca gagtccaggt gccactcag cgagagggag accctgcgc
tgaccactat
1681 tgaagacagc cccgcttacc tccctggacat ggcacgctgc agcagcctcc
cctatgcga
1741 aggcctttgt tactaaagtt ctgagtgccg gattggccaa accctagagc
tagcagttcc
1801 cattcaggca aacaaggcca gtggttttgt ttgtgttttt ggtgttctc
aaagcttgc
1861 ctttgagtat tatctggaga acccaagctg tctctggatt ggcaccccta
aagacagata
1921 cattggctgg ggaagtggaa cagggggggg cagaaaacca ccaaaaggcc
agtgcctcaa
1981 cctctgatcc tgatgaggtt tctgggaaga gatcaaaatg gagtctcct
accatggaca
2041 atacatgcaa agcaaatatc tgttcagggt agtaccgcga aaacgggaca
tgatgtgaca
2101 atctcgatcg atcatggact actaaatggc ctttaccatg aagggtctctg
attgcacaa
2161 ttgtgtgaaa aatcacaaac ccataagaaa gtgagtggc taagtgggg
aggctcaaac

【図 9 - 1 9】

3901 tgggggttgt ttgtttgctt cttttccaga gtgtggaaag tctacagtgc
agaaaggctt
3961 gaacctgcca gctgatttga aatactttca cctgcgcagc ggccgtatgc
atcctgcca
4021 gctgcgttat attctgtact gtgtacata aagaagtttg cttttcggtt a

BC030507 (ELF1) SEQ ID NO:40

1 gccaaagaagc ttgagagaag aaaaatttca gaaaaattgt ctcaatttga ctagaatatc
61 aatgaaccag gaaactgaa gcaactctcc taagaataac ttgggtatgc
aattactcca
121 cagacagagc tgaggggttt ttacccaatc cagtcaactg attttgcctg
ctgatacgtg
181 aatcttcttg gaatttttct catgtggatc taaggggaat gctttattat
ggctgctgtt
241 gtccaacaga acgacctagt atttgaatt gctagttaac tcatggagga
tgaacgacag
301 cttgtgtgac cagctatttt tctgtccgta attgtgaaac atgttctgtg
tgtgtgattt
361 ctcaatagtt atgcgggtct agcctgtgtg gaagagccca atgacatgat
tactgagagt
421 tcaactgagt ttgtctgaaga agaaatcata gacgatgatg atgatgacat
cacccttaca
481 gttgaagctt ctgtctatga cggggatgaa acaattgaaa ctattgagc
tgtgagggca
541 cctctcaata tggattcccc tggcctatg ctggatgaaa aacgaataaa
taataatata
601 tttagttcac ctgaagatga catgttgttt gccccagtc cccatgtgtc
cgctcacata
661 gatgggattc ctgaagtgtat ggaacacacg caggtgcagc aaaaatatgc
agactcacgc
721 ggagcctcat caccagaaca gcctaaaggc aaaaaaggaa gaataactaa
accaccaga
781 ccagattccc cagccactac gccaaatata tctgtgaaga agaaaaacaa
agatggaaag
841 ggaaacacaa ttatcttttg ggagttttta ctggcactgc tccaggacaa
ggctacttgt
901 cctaaatata tcaagtgagc ccagcgagag aaaggcattt ttaaattggg
ggattctaaa
961 gcagtgloca ggttgtgggg gaagcaca aaacaaacct atatgaatta
tgagaccatg
1021 ggaagagcac tcaagttacta ttaccaaaagg ggtattctgc caaaagtgga
aggtcagcgc
1081 ttgtgtgata agtttaaaga aatgcacaaa gatctttat atataaatg
tgaggtacca
1141 agttccagca tagagtcttc agatccatca ctatcttcat cagccacttc
aaatagaat
1201 caaacacagc ggtcgagagt atcttcaagt ccaggggttaa aaggaggagc
cactacagtt
1261 ctaaaacagc ggaattctaa agctgcacaa cccaaagatc ctgttggaag
tgcaacacaa
1321 tcagaagatt ttgaggacagt gcagccacag cagcttccat atcctacca
gctctccgg
1381 actgttcatg tagtacagcc agtacaggct gtcccagagc gagaagcagc
tagaaccagt

【図 9 - 1 8】

2221 ctttaagggt taaaaataca tcttaaacat tggaaagctc tcttagctga
atctgaata
2281 ttaacccctg tctagaaaaa ggggggcagt cagaacagct gtccccact
ccgtgttctc
2341 aaaatcataa accatggcta ctcttgggaa ccacccggcc atgtgtgtgc
caagtagagc
2401 aagcccccct tctcttccca atcacctggc tgagtgtgga tgacttttat
tttaggagaa
2461 gggcgattaa cacttttgac agtattttgt tttgccctga tttgggggat
tgtttttgtt
2521 tgggtgtgtg ttggaaaaa cagtttala aactgttttt gtatgttttg
tatttaagg
2581 aaaaaaacga aaaaaaaa acaaaaacaa aacttttggc aatgtgcact
gtgtctttag
2641 ccagggccgt gcaacttatg aagacactgc agcttgagag gggctttgt
gaggtctccc
2701 cttggcactg tgaagcccg ccttgttgcc tgcctttgtc tttctgcacc
agacaacctg
2761 atggaacatt tgcacctgag ttgtacattt ttgaagtgtg cagggcagcc
tggaacacag
2821 cttagattct ctatgtatag ttcccctgt toactaacat gccctctctg
gaaagcata
2881 gtatataaca tgtgtcatgt cctttggaaa cctggtcacc tggtagaaac
ccttgggatt
2941 ctccctggg catgactgat gacaatttcc atttaccatg tttgtttgt
ttctctttt
3001 cttaaatct tggactttaa accctacctg tgtgattcag taggttttga
gacttagctg
3061 tgactatgac agttaagcaa cagtgtcagc attctagatt cctgcctttt
ttlaaaaaa
3121 aattattctc attgtctgat tatattggaa aagttttaa caaccaagut
aaagctatgt
3181 gaaagttgag ctcaagtag aggaaaagtt actggttgga ccttgcctgc
tgtctcgtg
3241 gtagaattct gtgctcccg tgacacttag tacattaaga atgactaac
tgttctcgtg
3301 atgtgaaga ggcagtgctg actccgtgag tgtgagacac gtgctttgaa
ctgctttttc
3361 attctggag cactccatag tctcaaacctg tccoccttat gaccaacagc
acattttgta
3421 agaggttgcg agggataagg ggtgcacttt atagctatgg aaacatgaga
ttctctcta
3481 ttggaagcta attagccac aaaggttgga aacctgtaga ttggccctta
attagcattg
3541 tactctaato aaaggactct ttctaaacca tatttatagc tttcttaac
tacacatagt
3601 ctatacatag atgcataatt taacccacag tggctagaga ttattttgt
gtaagctg
3661 tatagattg gttttcctt cttaacttcc cctggttttg atttttttt
ttttttttt
3721 tgaagtgatt tatgctgtct tagcaattatg acaataatcc tctgtagatt
tagctacccc
3781 tccctcgtg taacttactg gaactgtgct gtcactgggc ataggacagc
ggcctacagg
3841 ttgcattccc attggactca tgcacctccc ggaatgtttt tgttttttc
gggggttctt

【図 9 - 2 0】

1441 accatgcagg atgaacatt aaattcttcc gttcagagta ttagagcat
acaggctcca
1501 acccaagttc cagtgggtgt gtctccagtg aatcagcagt tgcatacagt
aacactccaa
1561 acagtgccac tcacaacagt tatagccagc acagatccat cagcaggtac
tggtctcag
1621 aagtttattt tacaagccat tccatcatca cagcccatga cagtactgaa
agaaaatgtc
1681 atgctgcagt ccaaaaaggc gggctctccc ccttcaattg tcttggggcc
tgccaggtt
1741 cagcaggtcc ttactagcaa tgtctcagcc atttgcaatg gaaccgtcag
tgtggcttcc
1801 tctccatccc tcaagtctac tgcacctgtg gtgacctttt ctctccgcag
ttcacagctg
1861 gttgctcacc caccctggac tgaatacact tcagttatca aaactcaaga
aacaaaaact
1921 ctacacagc aagtagagaa aaaggaatct gaagatcatt tgaagagaa
cactgagaaa
1981 accgagcagc agccacagcc ttatgtgatg gtatgttcca gtccaatgg
attacttct
2041 caggtagcta tgaacacaaa cgaactgctg gaaccaactc cttttagtt
aatataccaa
2101 agcttatgaa taattgtttg ttaattgaa attttcaatt atatgcagac
tgactgttc
2161 taagataaaa tctaaggagg ttctcaattt tgaattgttt aaaaatagag
ttaattttga
2221 ctttgttaga tgaggaggga aaactcaact gtttctcttt gttatctaaa
tgtttcagaa
2281 ttcaatcgtg aagggaacag cattttacac tatgaagaca ttcttttag
atttttattt
2341 cagttgtcat atcataagca tttttaaagt ttcttttcta attttacatt
gtattagatt
2401 tctgtattct ttgttaata cagaacttaa atagaaggca acaggaaatt
tatataggaa
2461 ctattttcat tccacttgtg taagtttaag cttagactott tcaaatgcac
aaaaactatt
2521 ttatgctttg ttaaaattat ggtgtcactt agattgactt tagttgactg
cactatataa
2581 tatagaacta tgaatatgta gaataacatg aaaaattgga ggtcgtggtg
gtatgctga
2641 ccctgtttca gaagcaggat agtataaag catcagccta agaatggcac
tccactaac
2701 tagctatgta atctgacct ctttgggctt tagtttctct cataaaagg
agagatgtat
2761 tggattagac tagattatca ccactttctc tcttagttct aattttttta
attotaatc
2821 ctatattttc aagttatgtc aattaaatca ttatcaggtt atttctaatt
gtaagaatag
2881 ctaaaatgtt gcagagaaat aagtgacca acaaaattta ttcatctgtt
atgggttaag
2941 tctgcatata atttctcta aataatttgt ttactaacct tttaggccc
tgtgtctg
3001 ggtccattag taactttgtg tctgtaagt ctaaacagaa tactgtctat
ttgagagagt
3061 caagactott tcttaagggc caagaagaca acttgagcct tgggtataac
tggtgagta

【図 9 - 2 1】

```

3121 gtcagttata aaagcataat tgccttatat ttggatcat tttttactgg
ggcgggactt
3181 ggggggggtt gcatacaaa ataatatata tatccaaactt tctgaaatga
aatgttttta
3241 gattactttt tcaactgtaa ataactgtaca tttaagtca caagaaaaaa
atgtctcttg
3301 caaattttct agtataacag aaattttttg agatgaaaa aatcattatg
tttagaggtc
3361 taatgctatg ttttcatatt acagatgtaa ttgtattta aacaaaaaatt
taaattttgg
3421 aatcctctaa acattttttg atcttttaatt ggtttattat taataaaatc
atataaaat
3481 tctcaaaaaa aaaaaaaa

```

NM_001986 (ETV4 (E1AF)) SEQ ID NO:41

```

1 gcccggtccc tgggagcagg tctcgccccc cgttggggc cccggccgtg cggccggagg
61 gaggcgccgg atggagcggg ggaatgaaag cggatacttg gaccagcaag
tgccctacac
121 cticagcagc aaatgcgccg gaaatgggag ctgctcgcaa gcctgatgc
gcccgctggg
181 gaagctcatg gaccggggtt ccttgccggc cctcgactct gaagatctct
tccaggatct
241 aagtcacttc caggagacgt ggcctogtag agctcagga ccagacagtg
atgagcagtt
301 tgttctgat ttccattcag aaaacttagc ttccacagc cccaccacca
ggatcaagaa
361 ggagccccag agtccccgca cagacccggc cctgtccgc agcaggaaagc
cgccactccc
421 ctaccacatc ggcgagcagt gccttttact cagtgcctat gaccccccca
gacaaatcgc
481 catcaagtcg cctgcccttg gtgcctttg acagtcggcc ctacagccct
ttccccgggc
541 agagcaacgg aatttctcga gatcctctgg cacttcccag cccccacctg
gcatgtggtt
601 cctgggggaa catagctcgg tcttcacaga gcccttgagc atttgcaact
ccttcacatc
661 taagcgaggg ggcgggggaa cctctccagc cccctaccaa caccagctgt
cggagccctg
721 cccactctat cccagcaga gctttaagca agaataccat gatccctgt
atgaacaggg
781 gggccagcca gccctggacc aggggtgggt caatggggac aggtaccagc
ggcggggggt
841 ggtgatcaaa caggaaacag cggacttcgc ctacagctca gatgtcacg
ggtgcgcata
901 aatgtacctc cacacagagg gcttctctgg gccctctcaa ggtgacgggg
ccatgggcta
961 tggctatgag aaacctctgc gaaccttccc agatgatgtc tgcgtttgtc
ctgagaaatt
1021 tgaagagagc atcaagcagg aagggtgggt tgcatttoga gaggggcccgc
cotaccagcg
1081 ccggggttgc ctgacagctg ggcatttctt ggtggccttg ctgagtgacc
caacaaatgc
1141 ccaatttcatt gcttgagcgg gccgggggaa ggaattcaag ctcataggc
ctgaggagggt

```

【図 9 - 2 3】

```

601 gctcacccc agcctgtct tcatcttcat ctccctctt ctgctgttg
gtggcccgcc
661 gcctggggcc aggtctagtc agtgactgta gtgagtgcac gtcagagctg
gaggaaacgg
721 tgggagagga tccccggccc cgcacacccc gccctccgga tctgggtgcc
ttccagaggg
781 ccccgctggc ccgcttgccc catgaacctg gtgtcttcgg agtctatccc
cggcctcggg
841 gtggccttga accctctcag cctcttcctg tgcgcctct ggcgggtcct
ggatcctctc
901 tgccccctca gctctcccgg gctctgccca tgacggccac ccaactggcc
tacaactcct
961 cgccccagct gagcccgatg taccocagtg gtggcggggg gccacggggc
tcagggggag
1021 gctccccact ctccctcagc cctgaggaca tgaacaggta cctgcaggcc
cacacccaaa
1081 gcgtctacaa ctacacacct agcccccgcc ccttcttgca ctacccctgg
ctggtgggtg
1141 ccaagcccca ggcctctgac aagtgcctgc tggcccccac ggcacccag
accacccggc
1201 tccccctctt ggcctcgtca tccctttctt ctcttctctt cccattcaag
tttaagctcc
1261 agcgggccccc actcgagcgc cggcagcggg cagctggggg gaaggccgta
gccgtgctg
1321 acaagagcgg tggcagtgca ggcggcgctg ctgagggggc agggcgctca
gccccacggc
1381 ccccgccacc acagatcaag gtggagccca tctcggaagg cagatcgagg
gaggttaggg
1441 tgactgacat cagtgtatg gatgaggaag acggggagggt gttcaagagc
ccccgtgcct
1501 caactgcaac ccttaagcct gagcccgccg aggcaccccg ggcactccag
tgcatgcccc
1561 tcaagctaac ctttaagcgg cgtctggagt aagactgtcg cctcgaaagg
ggtggggggc
1621 ccgctggggg ctttgaggat gaggtgtagg acaagaagggt cgttggggag
gggcctgggg
1681 aggctggggg gccctccacc ccaaggcggg tgagctctga cctocagcat
gccacggccc
1741 agctctccct ggagcaccca gactcctgag ggcctggggc aggggaactg
tgtccccgg
1801 accccccatg ctctctttgc tgacttaagc cccctatgcc ctggagggtg
ggcgacgtct
1861 ctgtctctct cctcgctccc tcccttttcc ccccccacat ttgtataaaa
actttaattt
1921 ctctttttta aaaaagtgg ggggtgggtg gtgcccaggc ctaggggcta
ttccctgtct
1981 ctgttggggt ctaagctctg ggcaaatgg ttgtaggggg agggaggggg
aagttaaggg
2041 ggtcacctcc attctgggga atttatattt gaattagggc tttagcccta
acacccagga
2101 acttttttat tacaatgct taggaagtaa agccttgtct cctccctgt
tctctgctc
2161 ttgtaccccc ctgacccacc cgtctgtccc cactccagc cctcctagc
cccagccctg
2221 cctgcccctg ccttccaggg ggccatgagt gctagggttt ctcatcccc
acaaggtaac

```

【図 9 - 2 2】

```

1201 cgccaggctc tggggcatcc agaagaaccg gccagccatg aatracgaca
agctgagccg
1261 ctgcctcoga tactattatg agaagagcat catgcagaa gtgctgtgtg
agcgttacct
1321 gtacaaagtt gtgtgtgagc ccgagggccc ctctctcttg gccctcccg
acaatcagcg
1381 tccagctctc aaggctgagt ttgacggccc tgtcagttag gaggacacag
tccctttgtc
1441 coacttggat gagagccccg cctacctccc agagctgggt ggcocccccc
agccatttgg
1501 ccccaagggt ggctactctt actagccccg agcggtggtt cccctcgccg
caggtgggtg
1561 ctgcccctgt tacatataaa tgaactgtgt gttggggaaa ccttcatctg
aaacccacag
1621 atgtctctgg ggcagatccc cactgtctca ccagttgccc tagcccgagc
ctgagctgct
1681 tccacggagt cattgggag aaaaagtga gaaatggcaa gtctagagtc
tcagaaactc
1741 cctgggggtt tccacctggg ccttgaggga attcagctca gcttctctc
aggtcccaagc
1801 ccccccaccc ttttcccaa ccacagagaa caagagtgtt ttctgtctg
gggacagag
1861 aaggcgcttc ccaacttoat actcgaggga ggtgaggag gttcactgag
ctccccagat
1921 ctcccactgc ggggagacag aagcctggac tctgcccacc gctgtggccc
tgaggggtac
1981 cggtttgtca gttcttgggt ctctgtgttc ccagaggcag gcggagggtg
aagaaggaaa
2041 cctgggatga ggggtgctgg gtataagcag agagggatgg gttcctgctc
caagggaccc
2101 ttgtccttcc ttctgcccct tctagtgccc aggcctgggt ttgtacttcc
acctccacca
2161 catctgcag accttaataa agggcccccac ttctccaaa aaaaaaaaaa aa

```

NM_006494 (BRF) SEQ ID NO:42

```

1 tctgagaggg gaggccggtt gaggcgcca gggcgcccg acggccggc gacggagccg
61 ggaagcagg ggcgcgggag ccgcccggag gaatcgggg cttctgcccc
gggcccccca
121 gcatgaagac ccggcgagc acagggtttt ccttccgga ttgggctcac
aagccagagt
181 cgtcccctgg ctcaaggcag atccagctgt ggcactttat cctggagctg
ctgcggaagg
241 aggagtagca ggcgctcatt gcctggcagg gggactacgg ggaattcgtc
atcaaaagac
301 ctgatgaggt ggcocggctg tggggogtgc gcaagtgcga gccccagatg
aattacagct
361 agctgagccg ggccttgccc tattactata acaagcgcat tctgcacaa
accaagggga
421 aacgggttcc ctacaagttc aatttcaaca aactgggtct ggtcaattac
cattcatttg
481 atgtgggggt ggcgtgggggt gcagtgcccc agagtgcgcc gccagtgcgc
tcgggttgta
541 gccacttccc ctccctcccc tcaacgccc ccagagtggt gtccccccac
gaggaccccc

```

【図 9 - 2 4】

```

2281 agcaggggag ggagggacaa ttttataatg aacaaaaaat tccatgtgtt
gggggggtgg
2341 gggcgaggga gggtagggg tgcccctcat gggccacaaa tctctacaag
tgctgtctat
2401 cctctcccca ctccccacc cagcaccggt ccaacccctt catccccagc
tgctcctatg
2461 actggcccat gggcaggcgg gtggggggat gggaaagggg tgccctgaaa
ccaaactgga
2521 agccccctct gcttccacag tggggcctct ggggtgggggt ggggggctgt
ggtcagcctc
2581 tattctgtat tggggactga gggtaggggg agtagagggg ccgctggaga
atgtattcaa
2641 aacaataaac tttggacctt tggaaaaa

```

NM_003120 (PU.1) SEQ ID NO:43

```

1 aaaatcagga acttgtctg gcccctgcat gtcaaggag ggggctcacc cagggtcctt
61 gtatgtcagg gggcaggcct gagcctgca cccgcccacc gaccgtccag
cccctgacgg
121 gcaaccccat ctgaggggct ctgcatttgc ccccacagga gcaggggatc
tgaccgactc
181 ggagcccgcc tggatgttac aggcgtgcaa aatggaagg ttctccctcg
tccccctccc
241 atcagaagac ctggtgcctt atgacacgga tctataccaa cgccaaacgc
acgagtatta
301 cccctatctc agcagtgtat gggagagcca tagcgacctt tactgggact
tccaccccca
361 ccacgtgcac agcgagttcg agagcttccc cgaagaacac ttacaggagc
tccagagcgt
421 gcagcccccg cagctgcagc agctctaccg ccacatggag ctggagcaga
tgacgtctct
481 cgataccccc atggtgcccac cccactccag tcttggccac caggtctcct
acctgccccg
541 gatgtgctcc cagtaacccat cctgttccc agccacagcc agctcagatg
aggaggaggg
601 cgagcggcag agccccccac tggagggtgc tgacggcag gcggatggcc
tggaacccgg
661 gcctgggctc ctgcctgggg agacaggcag caagaagaa atccgctgt
accagttcct
721 gttggaactg ctccgcagcg gcagatgaa ggacagatc ttgtgggtg
acaaggacaa
781 gggcaccctc cagttctctg ccaagcaca ggaggcgctg gcgcacgcct
ggggcatcca
841 gaagggcaac cgaagaaga tgacctacca gaagatcgct cgcgcgctgc
gcaactacgg
901 caagacgggc gagggtcaaga aggtgaagaa gaagctcacc taccagtcca
ggcgccaagt
961 gctggggccc gggggcctgg ccagagggcg ccacccgccc cactgagccc
gcaagccccc
1021 ccggcccccg caggcctccc cgtgtgccat agcattaagc cctgcocggc
ccgggacaca
1081 gggaggagcg tccggggccc cagaggcagg actgttggcg gccgggctcc
gtcacccggc
1141 cctcccccca ctccaggccc cctccacatc cagttcgcc tccctcagg
actccacccc

```

【図 9 - 2 5】

1201 ggcctccgac gccagctggg cgtcagaccc accggcaacc ttgcagagga
cgaccgggg
1262 taactgccttg ggaagtctcaa gtccgtatgt aaatcagatc tcccctctca
cccctccacc
1321 ccattaacct cctcccaaaa aacaagttaa gttattctca atcc

NM_001973 (ELK4, 転写産物/バリエーション a, mRNA) SEQ ID NO:44

1 tttcttggtta aacaacaccc taatttatct cttggagggt ttgttcagct gtccctaatt
61 atgaactttac attcctctcty gtgctaaact gctcaagtag cctcttgat
caagtgtgac
121 ctgattcctt aagaatttta cttaatgaga acctctaagc tagaactct
tgctagtggt
181 ttcattgcac ttaattttct taatcattac aacaactota agattgggtt
ctctccacct
241 tataaatgat gactgtttta gagaggttaa ggttgcttaa aattgctgag
ttagtggagg
301 gttagagccac gaattggatt ctgtctcgct cctccatcgt cagggaagac
ttttccacag
361 actccagcgc ttccatttgt cagtcccccag gctagaagac cacagtctca
atttagtatt
421 tatcaagcgt ttgtagtgtc ctgggactgt gcaacttcgt gagaagctg
tgacggcccc
481 aacttctaac agcgagtggt aaggaggacg agggacacag gagggaggag
actctcccca
541 aagcttagca ccaacagaag tggctccccc cagggttgctc tgcgagcgcc
acctcttccc
601 tccaaccgag gagaagatgg cgcgcctttg aggagtcocga ggtcccgccc
caggcgccag
661 ctggctctct ggccgggttcc ggacggggcg ctcaggggacc tggaaacac
cgacccgaac
721 gcgacggaga gcggcgagac gactccagga ggcccccag ctacatcccc
cgcccaaccc
781 aaacccgggt ttgtctggcag acggcgctca cgacaccccc tagggtgcga
gccccctccc
841 cggaagtgc gtgtagcgac taaggcgctc ggaagggaacc caggagcagt
cggggggttt
901 gagagtgccg gcggcgccgg agggcctggc agggccccgc gctgcaagga
acgccccgaa
961 cgcgcgcgcgc cggcggtgtag cggcccccaag accgcgcgcgc cgcgtgcgcg
gtgcgggggc
1021 ggggaaggggc gggcgccagg agccgcggcg gcgggagatg cggcgcgctg
cgggcaaccg
1081 gcgggctcgg cttggccgccc gcgccttctt accgctccgc cgcgggggtc
gcagcgctg
1141 ccgcgcgcgc ctcagagttc cagcgtgagg agggagctga gggcgagag
gcgcactctg
1201 ttcgaggcgg agaaccgagg ggaacccccc gcgcggcgct gctcattgct
atggacagt
1261 ctatcacacct gtggcagttc cttcttcacg tcttgacaga gcctcagaac
aagcacatga
1321 tctgttggac cctcaatgat gggcagttta agcttttgca ggcagaagag
gtggctcgtc
1381 tctgggggat tgcgaagac aagcctaaca tgaattatga caaactcagc
cgagccctca

【図 9 - 2 7】

NM_021795 (ELK4, transcript variant b, mRNA) SEQ ID NO:45

1 tttcttggtta aacaacaccc taatttatct cttggagggt ttgttcagct gtccctaatt
61 atgaactttac attcctctcty gtgctaaact gctcaagtag cctcttgat
caagtgtgac
121 ctgattcctt aagaatttta cttaatgaga acctctaagc tagaactct
tgctagtggt
181 ttcattgcac ttaattttct taatcattac aacaactota agattgggtt
ctctccacct
241 tataaatgat gactgtttta gagaggttaa ggttgcttaa aattgctgag
ttagtggagg
301 gttagagccac gaattggatt ctgtctcgct cctccatcgt cagggaagac
ttttccacag
361 actccagcgc ttccatttgt cagtcccccag gctagaagac cacagtctca
atttagtatt
421 tatcaagcgt ttgtagtgtc ctgggactgt gcaacttcgt gagaagctg
tgacggcccc
481 aacttctaac agcgagtggt aaggaggacg agggacacag gagggaggag
actctcccca
541 aagcttagca ccaacagaag tggctccccc cagggttgctc tgcgagcgcc
acctcttccc
601 tccaaccgag gagaagatgg cgcgcctttg aggagtcocga ggtcccgccc
caggcgccag
661 ctggctctct ggccgggttcc ggacggggcg ctcaggggacc tggaaacac
cgacccgaac
721 gcgacggaga gcggcgagac gactccagga ggcccccag ctacatcccc
cgcccaaccc
781 aaacccgggt ttgtctggcag acggcgctca cgacaccccc tagggtgcga
gccccctccc
841 cggaagtgc gtgtagcgac taaggcgctc ggaagggaacc caggagcagt
cggggggttt
901 gagagtgccg gcggcgccgg agggcctggc agggccccgc gctgcaagga
acgccccgaa
961 cgcgcgcgcgc cggcggtgtag cggcccccaag accgcgcgcgc cgcgtgcgcg
gtgcgggggc
1021 ggggaaggggc gggcgccagg agccgcggcg gcgggagatg cggcgcgctg
cgggcaaccg
1081 gcgggctcgg cttggccgccc gcgccttctt accgctccgc cgcgggggtc
gcagcgctg
1141 ccgcgcgcgc ctcagagttc cagcgtgagg agggagctga gggcgagag
gcgcactctg
1201 ttcgaggcgg agaccgaggg ggaacccccc gcgcggcgct gctcattgct
atggacagt
1261 ctatcacacct gtggcagttc cttcttcacg tcttgacaga gcctcagaac
aagcacatga
1321 tctgttggac cctcaatgat gggcagttta agcttttgca ggcagaagag
gtggctcgtc
1381 tctgggggat tgcgaagac aagcctaaca tgaattatga caaactcagc
cgagccctca

【図 9 - 2 6】

1441 gatactatta tgtaagaat atcatcaaaa aagtgaatgg tcagaagttt
gtgtacaagt
1501 ttgtctctta tccagagatt ttgaacatgg atccaatgac agtgggcagg
attgaggggt
1561 actgtgaaag tttaaacttc agtgaagtca gcagcagtc caaagatgtg
gagaatggag
1621 ggaaagataa accacctcag cctgggtgcca agacctctag ccgcaatgac
tacatacaact
1681 ctggcttata ttcttcattt actctcaact ctttgaactc ctccaatgta
aagcttttca
1741 aattgataaa gactgagaat ccagccgaga aactggcaga gaaaaaatct
cctcaggagc
1801 ccacacccatc tgctatcaaa ttgttcacga cactttccaa aaagccaccg
gttgaacctg
1861 ttgtgcccac catttcaatt ggcccaga tttctccatc ttcagaagaa
actatccaag
1921 ctttggagac attggtttcc ccaaaaactgc cttccctgga agccccaacc
ctgcctcta
1981 acgtaatgac tgcctttgccc accacaccac ccaatttcgc cataccacct
ttgcagggaac
2041 ctcccagaac accttcacca ccaactgagtt ctcaccocga catcgacaca
gacattgatt
2101 cagtggcttc tcagccaatg gaacttccag agaatttgc actggagcct
aaagaccagg
2161 attcagctct gctagaaaag gacaaagtaa ataattcacc aagatccaag
aaacccaag
2221 ggtagaact ggcacccacc cttgtgatca cgagcagtg tccaagccca
ctgggaatac
2281 tgaacccatc tctcctaca gcttctctta caccagcatt tttttcacg
acacccatca
2341 tactgactcc aagccctctg cctctccagta tccactcttg gagtactctc
agtctctgtg
2401 ctcccctaag tccagccaga ctgcaagggt ctaacacact tttccagttt
cctctctgac
2461 tgaacagtcg tgggccattc actctgtctg ggctggatgg accttccacc
ctgcgccat
2521 tttccocaga cctacagaag acataacct tgcacttgtg gaatgagaga
accgaggaac
2581 gaagaacacg acattcaaca tgaattgcat tgaattgagc aattgtagt
totacaatgc
2641 tgataataga ctattgtgat ttttgcaatt cccacttgaa aacatctttt
taggattctc
2701 ttggaatagg actcaagttg gactatagt ataaaaatgc ctttaattgga
gtctaaactc
2761 caactccctc tgtcttttcc ttttctttt tttctcttcc ttccttttct
tttctctttt
2821 aaaaaatatt tgagctttgt gctgaagaag tttttgggtg gctttagtga
ctgtctctgt
2881 caaaagcaat taagaacaaa gttactctct ctggctattg ggaacctttg
gccaggcaaa
2941 attatgotta gaactatatta tttcaagaaa tatttgtgaa atgaaaaaaa
aaaaaaaaaa
3001 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa

【図 9 - 2 8】

1621 ggaaagataa accacctcag cctgggtgcca agacctctag ccgcaatgac
tacatacaact
1681 ctggcttata ttcttcattt actctcaact ctttgaactc ctccaatgta
aagcttttca
1741 aattgataaa gactgagaat ccagccgaga aactggcaga gaaaaaatct
cctcaggagc
1801 ccacacccatc tgctatcaaa ttgttcacga cactttccaa aaagccaccg
gttgaacctg
1861 ttgtgcccac catttcaatt ggcccaga tttctccatc ttcagaagaa
actatccaag
1921 ctttggagac attggtttcc ccaaaaactgc cttccctgga agccccaacc
ctgcctcta
1981 acgtaatgac tgcctttgccc accacaccac ccaatttcgc cataccacct
ttgcagggaac
2041 ctcccagaac accttcacca ccaactgagtt ctcaccocga catcgacaca
gacattgatt
2101 cagtggcttc tcagccaatg gaacttccag agaatttgc actggagcct
aaagaccagg
2161 attcagctct gctagaaaag gacaaagtaa ataattcacc aagatccaag
aaacccaag
2221 ggtagaact ggcacccacc cttgtgatca cgagcagtg tccaagccca
ctgggaatac
2281 tgaacccatc tctcctaca gcttctctta caccagcatt tttttcacg
gtagcttctg
2341 cgccttttat ggtgtcacca ttgctttcat ttatttgcgc ttttaagcaa
atccagaatt
2401 tataacatca agtttgcctt ctgttactta ggtttgtctt agaaagggtta
tgltgtactg
2461 tcatgtgaaa gttaccccat ttctcatctt aattaggatt gctaaaaatg
aaagtttgga
2521 gtattttctt aaaaaatcca ttgttctaca agtaataaaa tatittgatt
tttctatttc
2581 ctcttaaaga aagtacacac actctctcgc tctctctcgc tcttataaaa
ctcgtttggt
2641 tcttataaaa caaacagtga taactcagg ttagaaaaa gtaggctctg
agaaccataa
2701 gaaaaatgac tgggtgtgat ttgagtaaca agttgtgaca gttactttag
ctatttatta
2761 acctgtctat ctcatagaac atttttagtag atttttcaac caactcatta
ttaaaaaa
2821 acaaacatgc tgggtgtctg gttacccatt attcctctgt acctgaattc
aggttgggtt
2881 ttctatttgg aaaaagcttt ataaatgttg gcttataaag aggttgagca
ccagaacttc
2941 agaatttaac accaaaagac tcatccatgt aacccaaaaa caactgtacc
cccaaaaact
3001 attgaataaa aaatttaaaa aattttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa
aaaaaaaaaa
3061 aaaaaaaaaa aaaaaaaa

NM_005240 (METS(BTV3)) SEQ ID NO:46

1 ggggggggtg gatgaggagg agcccgagac gcccgaggag gaagacggag
61 cgtgcccggga agagcaggcg ggtgaatgt aaagccggct gtgactcgt
ggaaaagcca

【図 9 - 2 9】

121 gaaggaggtg gaggtatca gtttctgac tgggcctaca aaacagagtc
atccccaggg
181 tccoggcaga tccagctgtg gcacttcata ctggagctgc tgcagaagga
agagttccgc
241 catgtcatcg cctggcagca gggagagtag ggggaatttg tcatcaagga
tccagatgag
301 gtggcccgcc tctggggcgg cagggaatgc aaaccacaga tgaattatga
caagctgagc
361 cgggcctcca gatactatta caacaagagg atccttcata aaacaaaagg
gaaaagattt
421 accataaat taaacttcaa caagctgggt atgccaaact acccaattcat
caacattcgg
481 tcaagtggta agatacaaac tcttttggta ggggaattat ttggaattga
aaagaatttt
541 taaaaatcca aatctaagac atggcatgtt taggaagatt ttagaacac
taaaataatg
601 tgatcctttg gattgcctca atgtttctac tcaagtcac tcaattataa
ggagagttat
661 aggcatttca gtacaaagat agattttctt ggtttatttg gtgtgttcc
tttttgcac
721 attgtttgta atctctaga tactattacg ctatctgttt tgggaatgat
gtttcatagg
781 ttttgtatga tctttacgtt caggactcag ttttaacacc cagcccatgt
gttctttcat
841 agatgggaac ctgtttctac aaacacttcc gctttttgtt gaaactacca
agctctccct
901 tatcaagta atactatcaa aaccacagca tctttgatca gagaaggggg
aggttccatc
961 gtttgcagtg aaaaagcagtg tctttgatct gcaacagcaa atcctcagag
aaaaagattc
1021 tggggttact tgaactttct tctgttaag tgcagtaggg ctccccctct
tgactttctc
1081 gggtatagct ttccatcaca gctccacca tctctctgt atgttgaag
cagttctcca
1141 aaagactttg ttgttgtgtg gttttttgtt tgtgattttt ttctttatgc
aaatcatact
1201 cctgcccaga aaaaatacagt agttccctct atctgagcag tatatgtttc
aagaccctta
1261 gtatgttgc aaaccacaga tagtaccaaa ctccattcat atatatgatg
ttttttcttc
1321 ccttaacccc actcatatgt atctgtgata acgtttaatt tataaattag
gcacagtaag
1381 agattaatga caataataaa atgaaaaaat tataaaaaaa aaaaaaaa
aaaaaaa
1441 aaa

S72620 (EWS/Flil) SEQ ID NO:47

1 ccactagttt acccacccca aactggatcc tacagccaaag ctocaagta atatatgcaa
61 cagagcagca gctacgggca gcagaatccg taccagatcc tgggcccagc
cagcagctgc
121 ctagccaaac ctggaagcgg gcagatccag ctgtggcaat tctctctgga
gctgctctcc
181 gacagcgcca acgcacagctg tatcacctgg gaggggacca acggggag-

【図 9 - 3 1】

1681 ttaaccacat tattaattgt tgcgtagttt attccctctt ctaactgatg
gctggcatct
1741 gatatgcaga gttatgtcac agacactggc atcaattaca aaactactgc
tgtttctgtg
1801 attcaagctg tcaacacaaat aaaactgaaa ttcaattgatt cctctctctg
tccagatggt
1861 aaacgtttat aaaaccggaa atgtcctaac aaactctgtaa ttgcaaatga
aattgtgtgt
1921 ctttttttgt ttgtctttct accctgatgt tattcaagtg ctataaacg
tatttctctg
1981 acaaaaatga tgacagtgaa ttcaacataa taatgttcca taggttaaa
tgtgcaactga
2041 catttttctca tcaatacactg gtatgttaagt tatcagtgac tgacagctag
gtggactgac
2101 cctaggactt ctgtttccac agagcaggaa tcaagtgggt aggcactgaa
tgtctgtaca
2161 ggctgaagac ctctttatta gagttgaact tcaagttaac ttgttttaaa
aaatgtgaat
2221 tactgtaaaa taactatatt tggattctgt tgttttccag gtggatatag
ttgttaaaa
2281 atgtgaataa agtatttaac atgtaaaaaa aaaaaaaa

NM_01253 (ESE3) SEQ ID NO:49

1 acccgtgggt ccccatccct ataggagctg gtgagattgc agcctgtctc ctcccccca
61 tccagccacg ctattggatt tcccaccag aatcttttag taaatgagat
catgattctg
121 gaaggaggtg gtgtaattgaa ttctaccccc ggcacacccc tcttccacca
gcgcaccaac
181 tggacagaca gctactccac gtgcatagtt tccagtgggt tttttggagg
ccagtggcat
241 gaatttcatc ctacgtactg gaccaagtag cagggtgtgg agtggctcca
gcacctcctg
301 gacaccaaac agctggatgc caattgtatc ctttccaag agttcgacat
caacggcgag
361 cactctgca gcatgagttt gcaggagttc acccgggcgg cagggacggc
ggggcagctc
421 ctctacagca acttgacgca tctgaagtgt aacggccagt gcagtatga
cctgttccag
481 tccacacaca atgtcattgt caagactgaa caaactgagc ctctccatcat
gaacactcgg
541 aaagacgaga actatttata tgacacacac tatggtatga cagttagatt
gttgacacag
601 aaaaatttct gcggygctca gatctccagt acaaccacca gtcaacttcc
tgttgcaag
661 taccctgata tgaaaaagga gcaagacccc ctgtccaagt gcaacaccaa
aaagcacaac
721 ccgagagggg ctcaattatg ggaattcttc cgggacatcc tottgaaacc
agacaagaac
781 ccagatttaa taaaatggga agacagcatc gaggcgctct tcaggttctt
gaaatcagag
841 gcagtggctc agctatgggg taaaaaagg aaacacagca gcatgaccta
tgaaaagctc
901 agccagacta tgagatatta ctacaaaaa gaaattctgg agcgtgtgga
tggacgaaga

【図 9 - 3 0】

BC029743 (ESE2 (ELF5)) SEQ ID NO:48

1 cacaaagcta caggtgtctt tatttccact gcaagctggt gctgggagcg cctgctctct
61 cttgcttga aagctctctc ttggagccta gcacacgctg cctccacggg
aatgttggac
121 tctgtgacac acagcacctt cctgctcaat gcatcctctt gcatccctct
gatgtctgtg
181 actgatctgt tcaagcaatga agagtactac cctgctcttg agcatcagac
agcctgtgac
241 tcatactgga catcagtcga cctgaatac tggactaagc gccatgtgtg
ggagtggctc
301 cagttctgtct ggcaccagta caagtggagc accaattgca tctcctctg
caacttcaac
361 atcagttggc tgcagctgtg cagcatgaca caggaggagt tctctgagcg
agctggcctc
421 tgcggcgagt acctgtactt catctctcag aacatccgca cacaaggtta
ctctttttt
481 aatgaagctg aagaagcaa ggccacatcc aaagactatg ctgattccaa
ctgcttgaaa
541 acaagtggca tcaaaagta agactgtcac agtcatatga gaacaagcct
cacaagtctc
601 catctatggg aatttgtacg agacctgctt ctatctcctg aagaaaaactg
tggactctg
661 gaatgggaag atagggaaca aggaattttt cgggtgggta aatcggaagc
cctggcaag
721 atgtggggac aaaggaaaga aatgcagaca atgacatag aagagttgag
cagagccctg
781 agatactact ataaaacagg aattttggag cgggttgacg gaagtttagt
gtacaaattt
841 gaaaaaaatg cacacgggtg gcagggaagc aagctatgat ctgctccagg
catcaagctc
901 attttatgga tttctgtctt ttaaaaaat cagattgcaa tagacattcg
aaaggctcca
961 ttttctctc tttttttt aaactgcaga catgctgata aaatttctcc
acatctcagc
1021 ttacatttgg attcagattt gtgtctacg gagggtgaga gcagaaactc
ttaagaattc
1081 ctttctctc cctaagggga tgaggggagt atcttttctg gtgtctgtat
caaaccttat
1141 tttctagag ttgtggaatg acaacagccc atgcatttga tctgtatcag
agaaaaacta
1201 ttcaattctg ccattagaga cacatccaat gctccatccc caaaggttca
aaagttttca
1261 aataactgtg gcagctcacc aaaggtgggg gaaagcatga ttgatttgca
ggttatggta
1321 ggagaggggt agatataaga catatactat ttgattttta aattattaaa
gtcaaaaaac
1381 catagaaaaa tatccctttt tttttttt gagacgggtt ctcaactatg
tgccagggg
1441 tggctttgaa ctctatgct caagtgtac tcccacotg gctcccaaa
gtac-gtagt
1501 tacaagctg agccacggca cctggggaga aaagtattct aataatgaa
agagctaac
1561 catcaagctg ggacttaatt ggatttaaca taggttcaac gaaagtttcc
taaccagagc
1621 atctttttga ccaactcagca aaacttccac agacatcctt ctggaactta
aaccttaaca

【図 9 - 3 2】

961 ctggtatata aatttgggaa gaatgcoga ggaaggagag aaaaatgaaa
ctgaagctgc
1021 caataacttt gacacaaacc aaaaacaca ccaataatc agaaacaaag
aaactctgga
1081 cgtaaatatt tcaaaagacta cttttctctg atatttatgt accatgaggg
gaacaagaaa
1141 ctacttctaa cgggaagaag aaacactaca gtctgattaa aaaattattt
tgttacttgc
1201 aagtatgtcc tatatgggga aaaaacgtac acagttttct gtgaaatag
atgctgtatg
1261 tggttgtgat tttttttcac ctctattgtg aatctttttt caactgcaaga
gtaacaggat
1321 ttgtagcctt gtgcttcttg ctaagagaaa gaaaaacaa atcagagggc
attaaattgt
1381 ttgtatgtga catgatttag aaaaaggta tgcatctccc tccataagc
atccatctgg
1441 cttctgcaag ggaggtagac atgtgtctgt agttaattc cagggtctca
gatgggttag
1501 acaaaagtga tggatgcogg gaagttaac ctgagcotta ggaatcaatg
agtggaagat
1561 ggggacttcc aaaaaccaa gtgtgtctata atctcgcat aacacatgga
cttggaatgc
1621 taaaatcagc aagaagaata atgtgtgggt ctttatact attcaggaa
ggtttatctg
1681 atgccagggc tgtcttctt tctccctttt ggaagggttg tgaataactt
taattgacct
1741 gtctgtctac ttctagctat ttaagagaga acccagctgt gttcttttt
gtcccaagt
1801 cttaaaaata agttgaaaa aggagacggt ggtgtgaaa tggctgaaga
gtttgctctt
1861 gtatccctat agtccaaggt tcttcaactc gcacaattga catatttggc
cggagtgttc
1921 ttgtgtgtga gggcttctct gtgcattgta agatgttcag cagtatccac
tcatggtctc
1981 taaccacttg acaccagaaa cccccagct gtgataacgc aaaaatgtct
tagacatcac
2041 caaatgttcc ctgggggttg caaatitgcc cttgattgag aaccaccagt
ttagctagtc
2101 aatatgagga tgggtgttta ttctcagaag aaaaagatat gtaaggtctt
ttagctctct
2161 agagtgaagc aaagcaaga ctccaacctc aaactatctt tatgttttaa
atgttaggga
2221 caataagttg aaatagctag aggagcttct ttccaagac ccagatgaga
gccaatgtca
2281 gataaagtaa gcatagtaat gtacagaggaa ctacaataga agacatttct
actggaatta
2341 caaagcagaa ttaaaattat attgtagaag gaacaccaa gaaaagaatt
tccaggga
2401 atcctctttt cagggtattaa tctttataat tttttgtctt ttggattatc
tgtttactgt
2461 ctcatctgaa ctgatccag gtgaacgggt tattgctag atttgtactc
agaggattt
2521 tttttgtttt gttttgtctt ttaagaagag aaagaagga tgaaaaaaat
aaacagaaaa
2581 ctacagctag gcacaattgt cccaaggag ttaaaagctt ctcttccaat
agagggaattg

【図 9 - 3 3】

```

2641 ttctgggggt cctggagact taccattgag ccatgcaate tgggaagcac
aggaataagt
2701 agacactttg aaaatggatt tgaattgtct catccctttt gcagcttttc
tttttggctc
2761 tctcatgtcc ttggcttgct cctctattct acctctcttt ctccagcaat
aatatgcaaa
2821 tgaagacatg tatccataag aaggagtgct ctctcatcac taatagagca
cctaccacag
2881 tgtcatacct ggtagaggtg agcaattcat attcaaaagt tgcaaaagtgt
ttgtaataata
2941 ttcatgagggc tggaaagtaag aagaattaaa aattttgctt aattacaatg
agaacacattc
3001 taggtagtga tcttgagaca cacatgaata acctttctga ggtgcaacca
aatccatttt
3061 tattttctgc tggcttgctc acctctgtaa aggttttaac tagtgtttgc
aagtaacagt
3121 tactgaaaag gctgagaaaa agacaatga acagcaacga tcttgactgt
gcaactcaga
3181 cattctgcga gaaaagacat atgttgcttt acaagaaggg caaagaacta
tggggccttc
3241 ccagcatttg actgttcatt gcatagaagt aattaaatc ccagttactt
gaatgggtat
3301 aacgcgatga tattttgtgt tctgtgtgtg tgtctgagtt gtgtgatttt
attaggggca
3361 tcttgcaatt ctctcaactg ggttctctct ctgaccttgc ctgtttcatca
tctaaggaggt
3421 ctagatcctt cgtcgaactc accattctct aaacctgtaa gtttctact
tcttccaaat
3481 tggctttggc tctttctgca acccttccat tcaagagcaa tctttgctaa
ggaagtaagt
3541 aatgtgaaga gtaccaacta caacaattct acagataatt agtggattgt
gttgtttgtt
3601 gagagtgaag gtttctt

```

AF071538 (PDEF) SEQ ID NO:50

```

1 gtctgacttc ctccagcac attctgcac tctgcccgtt ccacactgcc
ccacagaccc
61 agtctctcca gctctgtgcc agctctcttc aagccctcca ggttgggctt
tgccacgctg
121 ccagcaggca gctctgggct ggggttaggg gactccctac aggcacgcag
ccctgagacc
181 tcagaggggc accccttgag ggtggccagg cccccagtggt ccaacttgag
tgctgctctt
241 gccaccagcc ctgctggccc ctggttccgc tggcccccca gatgcttggc
tgagacacgc
301 cagtgggctc agctgcccac accctctccc ggcctctgaa gttggcactg
cagcagacag
361 ctccctgggc accggcagc taacagacac agccgcagc ccaaacagca
ggcgactggg
421 cagcgccagc ccgggtctga gcagcgtatc cccacgccc acctctgctc
ccccgcacac
481 ggtgtccggg acagggttgg agaaggcggc agcggggggc gtgggtctcg
agagacggga
541 ctggagtcgc agtccaccgc ccacggccga gcaggggcgt tccgctctct
acctctcta

```

【図 9 - 3 5】

```

301 tggcagttcc ttgtgcagtt gctgtggatt cagaacaatg agcatttgat
ctgctggacc
361 tcgaacgatg gtgaattcaa gctctccaaa ccagaagaag ttggccaagt
gtgggggactc
421 cgaaaaaaca aaacaaatat gaactatgat aagctgagca gagccctgcg
atactattat
481 gacaagaaca tcatcaagaa ggtgactcgg cagaagtttg tgtacaagtt
tgtctcttcc
541 ccggagatcc tgaagatgga tctctacggc gtggagatca gccgggagag
cctctgtctg
601 caggacagcg actgcaaggg gtctccggag ggcgcgaggg cccacaaaca
cgccctggcc
661 gccctcagaa gcacgagcgg caacgaatac atccactcag gctgtactc
gtccttcacc
721 attaatctcc tgcagaaccc accagagccc ttcaaggcca tcaagacgga
gaagctggag
781 gagccggccc aagacagccc cccctgggaa gaagtccagg ctgtgatcag
gtttgtgacc
841 aataaaacng acagacagct caccaggccc gtgtgtgccc tgccttccac
gtcagaggct
901 gcggcgcgct cgcctctctc agcctgtctc gctctggcca agatctctcc
tttaattgtt
961 ccaaacgctg ccagtatctc atccgctcca cctctctcat ctggtctccc
gtccctgtcc
1021 cccaaactca cctctccttc tgaacacaga agcctctccc tggaggccgc
ctgccaatgac
1081 tccgattccc tggagccctt gaacctgtca tggggtccca agaccaagtc
tccattctct
1141 cccccaaagg ccaaaaaacc caaagccttg gaaactcag ccgcccgct
ggtgctctcc
1201 ggcacgcaga tgggtctcat cgcctctcac agcccgccc tccctcggg
atccctcacc
1261 ccagccttct tcaccgcaca gacacaaat ggatgtctc tgaactccag
tccactgtcc
1321 tccagcatac atttctggag cagccttagt ccagltgctc cgtgagttcc
tgcagggtcg
1381 caaggggcca gcacgtgtt ccagttcccc acactgtcta atggccaact
gccagtgcga
1441 atccccagtc tggacagagc tgccttccca gtactgtctt cttaaaactc
tcagaactcc
1501 tgatgaogtc tggccaacta taaggactca ttaactgatg aaacaaattt
gtcccccagg
1561 gctagtctac ctgtgtcgtg agaaggacat tgtgaaactc ttgttaattt
ggtttgcaact
1621 ttcaataaca tggatagctt agatttatgt tagcatitita aaaactgttt
ttgatattat
1681 caagtataca tgaaaactcg ttgtgcatta agtgaatttt aatgtttttg
tttttatatc
1741 ctittagctc ttaagtgttg aacactgttg acagtgaaga acttttctta
atggttttca
1801 gtataactaa taaggatgtg aagctttttt ctctttagtt ctgagtatgc
taaaactgtg
1861 gcttatatag actataacca gtgtgctctt ctttgcatt taatgtaaat
gaatgattta
1921 tatatttttt agtatttaaga ggaattgttt gaaagatgaa aattagttatc
aaacagctct

```

【図 9 - 3 4】

```

601 cttagacatg ctgtaccctg aggcacagag ctgggcagcc aaggcccttg
gggcacagag
661 tccggaggag ccacctgagg agcctgagca gtgcccgttc attgacagcc
aagcccccagc
721 gggcagcctg gacttggtgc ccggcgagct gaccttgagg gagcactcgc
tggcagaggt
781 gcagtcctatg gtggtggggc aagtgc'caa ggacatcgag acgscctgca
agctgtctcaa
841 catcacccga gatcccatgg actggagccc cagcaatgtg cagaagtggc
tctgtgggac
901 agagcaccaa taccggctgc ccccactggg caaggccttc caggagctgg
cgggcaggga
961 gctgtgcgcc atgtcggagg agcagttccg ccagcgtctg cccctgggtg
gggatgtgct
1021 gcacgcccac ctggacatct ggaagtcagc ggcttgagat aaagacgcga
cttcacctgg
1081 ggcgattcac tactgtcctc cgaccagtga ggagagctgg accgacacgc
aggtggactc
1141 atcatgtctc gggcagccca tccacctgtg gcagttcttc aaggagtgc
tactcaagcc
1201 ccacagctat ggccgcttca ttaggttggc caacaaggag aagggcactc
tcaaaattga
1261 ggaactcagc cagggtggcc ggctgtgggg catccgcaag aacogtccc
ccatgactca
1321 cgacaagctg agccgctcca tccgccagta ttacaagaag ggcctatcc
ggaagccaga
1381 catctccag cgcctctgtc accagttcgt gcaacccatc tgagtgcctg
gccacaggcc
1441 tgaacccgcg cctcaggggc ctctctctgt cctgcccctg ctacgcccag
ccctgagatg
1501 ggggaaaacg ggcagttctg tctgtctctc tgaccttcca gagcccaagg
tcagggaagg
1561 gcaaccaact gccccagggg gatattgggt ctctggggcc ttccgggacca
tggggcaggg
1621 gtgcttctc ctacggccca gctgtcccc tggaggagag agggagacag
gggtctctcc
1681 caacacctgc ctctgacccc agcatttcca gagcagagcc tacaagaagg
cagtgactcg
1741 acaaaaggca caggcagtc aggcctctct ctgctccatc cccctgcttc
ccattctgca
1801 ccacacctgg catgtgtgca ggagacatct gcaacccctg gttggggcagc
caggagtgc
1861 cccgggaatg gataataaag atactagaga actg

```

NM_005230 (NET (ELK3; SAP2) SEQ ID NO:51)

```

1 gggcggaaaa gctgttttac acagactgca caccgctgg ggaataatgc agtaaaagaa
61 gtgagccggc tggcctgac tgcctcaact tctgtctct acacacacca
gagggggaaaa
121 aaaaagagga ccagagagaaa gaaaaaagg ggggaaaatc aggatctcat
tacaagagcc
181 acagaccctc tgcagacgcc tgcagcagtg gaaagtccgg ggcttttccc
cgggtctccc
241 tagaaattcc ccccgaaaga gactccccc catctgggta tggagagtgc
aatcacgtg

```

【図 9 - 3 6】

```

1981 ctagtagaat ttcattattt ttcaccagt ggcaataaga aagcatatat
cagctttttt
2041 ttactttcca attgtataag aattgcttta gaacctcttt tgaactgaaa
tcaagtaaat
2101 gtccaagtaa tgttttata ataaactaag ccatatttag acaataaaca
tcgaaaaaaa
2161 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

NM_006874 (NBRF; ELP2) 転写産物/バリエント2 SEQ ID NO:52

```

1 gttgccagct gcggcgccgc ccacagccc agccgccccc gccgcgccg ccgcccttcg
61 cctgcgcgcc cctgcccctg ccgttaggtg gtggggttcc tcaagccgcg
ggcggggaggg
121 gggccgggct ccgcttccgt tccggagcag ccgaaggatc cggcgctcgg
agtgtgtgct
181 agtgcgtgag tgtgtgtcgg tccgcggggc tgtgtctcc gccgcggggt
ccgctctctc
241 cctgcgcgcc gctgctcag gtgttaagta atgtgaagca gcagctccag
cccggggata
301 aacatggcga cgtctctgca tgaaggaccc acgaacccgc ggaatctgct
catccgggoc
361 gtggaaagcat cagttcacag cagtaatgca caactgtacag ataaagcaat
tgaagctgct
421 gaagccctgc ttcatatgga atctctacc tgcctgaggg attcaagaag
tccgtgggaa
481 gtgtttgttc ctcttgtgt atcaactcca gaattctacc atgctgtcat
gaggccagat
541 gtcattacag aaactgtagt ggaagtgtca actgaagagt ctgaacccat
ggataacctc
601 cctattccaa catcacaga tagccatgaa ccaatgaaaa agaaaaaagt
tggccgttaa
661 ccaaaagacc agcaatcacc aatttccaat gggctctcct agttaggtat
aaagaagaaa
721 ccaagagaag gaaaaggaaa cacaacctat ttgtgggagt ttctttttaga
tctacttcaa
781 gataaaaaata ctgtccag gtataataa tggactcaga gaaaaaagg
catattcaag
841 ctggtggatc caaaggctgt ctctaagctt tggggaaagc ataaagaaca
accagactgc
901 aactatgaaa ccatgggagc agctttttaga tactactacc aaaggggaat
tcttgcaag
961 gttgaaggac agaggctgtg atactagttc aaggtatgac ggaaaaaatc
agtggtcata
1021 gatgatgaca aaagtgaac ctgtaatgaa gatttagagc gaactactga
tgaaaaatca
1081 ttagaacagc tgtcactgtc tgcagaaagt ctctgaaag cagcatcttc
tgttcagct
1141 ggaaaaaaatt catccctat aaactgtccc agagcagaga aggggtgagc
tagagttgtg
1201 aatatcactt cccctgggca cgaacttcca tccaggtctc ctactaccac
tgcatctgtg
1261 tcagcaacag cagctccaag gacagttcgt gtggcaatgc aggtactcgt
tgtaatgaca
1321 tcatggggtc agaaaaattc aactgtggca gttcagtcag ttaatgcagg
tgcacactta

```

【図 9 - 3 7】

```

1381 ataaccagca ctagtccaac aacagcgacc tctccaaagg tagtcattca
gacaatccct
1441 actgtgatgc cagcttctac tgaaatgga gacaaatca ccatgcagcc
tgccaaaatt
1501 attaccatcc cagctacaca gcttgccagc tgtcaactgc agacaaagtc
aaatctgact
1561 ggatcaggaa gcattaacat tctgtggaac ccatgtgctg tgagagcact
taccctgttt
1621 tcaatagccc atgtgtacacc tgtaattgga ctatcaatgc ctactcagca
ggcatctggc
1681 cagactctcc ctgcagttat cagtgccagtc ataaaggggc cagaggttaa
atcgggaagca
1741 gtggcaaaaa agcaagaaca tgatgtgaaa accttgccgc tagtagaaga
aaaaccagca
1801 gatggaaata agacagtgac ccaagtagtg gtgtccagtg cgccttcagc
tattgccttt
1861 cctgtaecta tgaaaacaga aggaactagt acatgtgaga aataaaatag
cagctccacc
1921 atggacttca ggcctgttagt ggcagtagtc acataaacat ttgcaaggga
agtcatcaag
1981 aaaagtcaaa gaagacttta aaacattttt aatgcataa caaaaaccaat
cagacttact
2041 ggaataaat tacctatccc atgttttcag gggaaatgaa ctacatatg
agatgctgac
2101 agaaaaactgc ctcttaccgt aggaaaacac tgaaccctac aataagaana
aggatcgaaa
2161 gggacccaagc agctcactac gatataagtg taccataaga ctgggaacac
taacattctg
2221 taagaggtta tatagttttc agtggaggag gttgggagtg gtaatctcat
tgttaccata
2281 agcaattttt gatgcatttt atatgcatac cagcaattat tactgtgttc
gcacagttct
2341 cacttaactg gtgctatgtg aagcactctgc taatataggt attttagaat
gtgaattgaa
2401 gaatggatcc caaaaacttc agaaaggaga tagcaaaaa agatctagtg
cgattttata
2461 tatatatata tatatatata catacatata tatatatcat atagcttaag
ctgattttaa
2521 acaaaaggcct tagactaatt ttcgattttc ttctttgaaa taagctaatg
gcttgttttg
2581 tgaagccttt ttatataaaa gaaaaatttt aaaaattctg tacctagcac
agtattgtta
2641 tagaataata atgtaacatt ttatatggta gtttaagctg gtcagtttct
taattgtgga
2701 caaattaaca gttggctctg gcccttttgt gtaacatgcc tgtgtcactc
acttagcctt
2761 ggcatttgtg cagacatacc attttccagt ctgcgtgcac ttggaagttc
aggcttcaga
2821 tgaatttttg gcaggtagct ctaatacctg gagttttctt tgtttttttt
tccttttttt
2881 agtltgaagt tatgagggaa ataccagtggt tcagttttga actataatag
ttgttatatt
2941 caacatttga agtatattct attttgtgtg actctgtttt caaagtgat
tcaagtaggt
3001 ttctctgaat atagaaatga aatttatctt ctgttttgtt ctctggtgat
attttaaca

```

【図 9 - 3 9】

```

1501 cttctactga aaatggagac aaaatcacca tgcagcctgc caaaattatt
acctcccag
1561 ctacacagct tgcacagctg caactgcaga caaagtcaaa tctgactgga
tcaggaagca
1621 ttaacattgt tggaaaccca ttggctgtga gacacattac cctgttttca
atagcccatg
1681 gtacacctgt aatgagacta tcaatgctca ctacgcagcg atctggccag
actcctctcc
1741 gagttatcag tgcagtcata aaggggccag aggtttaaot ggaagcagtg
gcaaaaaagc
1801 aagaacatga tgtgaaactt ttgcagctag tagaagaaaa accagcagat
ggaataaaga
1861 cagtgaccca cgtagtggtt gtcagtgctgc ctccagctat tgcccttctc
gtaactatga
1921 aaacagaagg actagtgaca tgtgagaaat aaaatgcagc ctccaccatg
gacttoagcc
1981 tgttagtgcc agtactgaca taacactttg caagggaagt catcaagaaa
agtcaagaaa
2041 gacttttaaa catttttaat gcatatacaa aaacaatcag acttactgga
aataaattac
2101 ctatcccatg ttccagtggt aaatgaacta catattgaga tgcgtacaga
aaactgcctc
2161 ttacagtagt aaacaactga acccatccat aagaaaaagg atcgaaaggg
accaagcagc
2221 tcaactagat atcaagttac actgaagact ggaacactaa cattctgtaa
gaggttatat
2281 agttttcagt gggagggggt gggatgggta atctcattgt tacatatagc
aatttttgat
2341 gcattttata tgcataccag caattattac tgtgttcgca cagttctcac
llaactgggt
2401 ctatgtgaag actctgctaa tataggtatt ttgaaatgtg aattgaagaa
tggatcccaa
2461 aaacttcaga aagaggatag caaaaaaga tctagtgcga ttttatatat
atatatatat
2521 atatatatat acatatatat atatatata gottaaagctg atttaaaaca
aaggccttag
2581 actaattttc gattttcttt ctggaataaa gctaatggot tgtttgtgta
aagctttttt
2641 attaaaagaa aaatttttaa aatcttgtac ctatgcagat attgttatag
aatatacatg
2701 taacatttta tatggtagtt taagtctctc agtttcttaa ttgtggacaa
attaacagtt
2761 ggctctggcc ttttgtgtga acatgctgtg gtcaactcac tagccttggc
atttgtcag
2821 acataccatt ttccagttctg ctgctacctg gaagttcagg ctacagcatg
atttttgaca
2881 ggtagctcta atactggag ttttcttgtt ttttttttct tttttttagt
tgaagtattat
2941 gagggaaata ccagtggtca gttttgaact aatatagttt gtatatcaa
catttgaagt
3001 atattctatt ttgttgtact cttgtttcaa agtgtattca agtagtttt
ctgaataata
3061 gaaatgaaat ttatcttctg ttttgtctc ttgtgatatt ttaaacata
tttaaaagtc
3121 agtatagaag tgttttagtt aggaagtgat aaacactctc tctctcctt
cccaactact
3181 gcatgaagaa attctacttc cattataata atattttg

```

【図 9 - 3 8】

```

3061 atatttataa gtcagtatag aagtgtttta gtaggaagt gataaaacat
ctctctctct
3121 cttcccaact actgcatgaa gaaattctac ttccattata ttaattattg g

```

NM_201999 (NERF; SLF2) 転写産物バリエント1 SEQ ID NO:53

```

1 aaaatagtag aggatgtcta gactacttaa catacaaaat gctttctggt taatcatctt
61 tagaagactg gatttctgga tatctactcc actccatctc tattgacttt
taaaacatga
121 taatgcaaac ctataaactt ggcaacatcc agtgaacctt taatttcatt
gattaatagc
181 gtttgaagct tcttcaggga atacaatga catcagcagt ggttgacagt
ggaggtacta
241 ttttggagct ttccagcaat ggagttagaaa atcaagaggaa aagtgaasaag
gtttctgaat
301 atccagcagt gattgtggag ccagttccaa gtgcagagtt agagcagggc
tatgcagccc
361 aggttctggt ttatgatgat gagacttata tgatgcaaga tgtggcagaa
gaacaagaag
421 ttgagaccga gaattgtgaa acagtggagg catcagttca cagcagtaat
gcacactgtt
481 cagataagac aattgaagct gctgaagccc gtcttcatat ggaatctctt
aactgtctga
541 gggattcaag aagtcctgaa ttcatccatg ctgctatgag gccagatgto
attacagaaa
601 ctgtagtgga ggtgtcaact gaagagctct aacctatgga tacctctctt
attccacat
661 caccagatag ccatgaacca atgaaaaaga aaaagtttgg ccgtaaacca
aagaccacag
721 aatcaccaat ttccaatggg tctctgagt taggtataaa gaagaacca
agagaaggaa
781 aaggaaaacac aacctatttg tgggagtttc ttttagatct acttcaagat
aaaactactt
841 gtcccaggta tattaaatgg actcagagag aaaaaggcat attcaagctg
tgggattcaa
901 aggtgtctct taagcttttg gaaaagcata agaacaacac agacatgaac
tatgaaccca
961 tgggacgagc tttagatgac tactaccaaa ggggaattct tgcgaagggt
gaagagacaga
1021 ggttgttata ttagttcaag gatagccga aaaacatagt ggtcatagat
gatgacaaaa
1081 gtgaaccttg taatgaagat tttagcaggaa ctactgatga aaaatcatta
gaacgagttg
1141 cactgtctgc agaaagcttc ctgaaagcag catctctgtt tgcagtgga
aaaaattcac
1201 cccctataaa ctgtccaga gcagagaagg gtgtagctag agttgtgaat
atcacttccc
1261 ctgggcaaga tgccttccac aggtctctca ctaccatgc atctgtgtca
gcaacagcag
1321 ctccaaggag agttcgtgtg gcaatgcagg tacctgtgtt aatgacatca
ttgggtcaga
1381 aaattttcac tgtggcagtt cagtcagtta atgcaggtgc accattataa
accagcacta
1441 gtccacaacac agcgacctct ccaaggtagt taattcagac aatccctact
gtgatgccag

```

【図 9 - 4 0】

NM_017521 (F5V) SEQ ID NO:54

```

1 gggcgagagt gagcgaggc cgaactggaag aagggtctcta gggagggggc tgtgctgct
61 ggggtccagag gtggggccgg gtaccacagc cccatcactg tttgcagaga
gtcaggagag
121 cggaaaaagc acgcgtctta ggtcccatc agggcaacat gccccggccc
atcccccccg
181 cgtctccccc gctgcggggc gcgggggggt gccgggtgag ctggtgtgtg
gcgcggcgcg
241 ttggagactt tattgcgat ggacgataag agggcggggg gcggggctct
ggggggcgag
301 gcggcagcgc tttaattaaa accgaaattg cggcccccgg ccgcgcgggg
gcggggaggt
361 tcaagcgcgc ccttagctg gaagcgttcc tccaggaccc ccccgcaacc
cccgccacgc
421 ccgggctgcc ccttcccgc aggcctcgcc ggaccggcg ccgtcttctc
ctccttgcca
481 ccgcgggttg cttagggggg gtagctgtgc caccgagcgc aaagcctgcc
tcgccccctt
541 tccccctccc cccatctccc caccgccagc tcccggcg cgatgagaca
gagcggcgcc
601 tccagccccc tgcgtatcaa catgtacctg ccagatcccg tcggagacgg
tctcttaag
661 gacgggaaga acccgagctg gggggccgtg agcccccg gggtcaaaag
cagcggacag
721 atccagctgt ggcagtttct gctgagctg ctggctgacc gcgcgaagc
cggctgcttc
781 gcgtgggagg gcgttcacgg cgagttcaag ctacaggacc cggacagagt
ggcgcgagg
841 tggggcgagc gcaagagcaa gcccaacatg aactacgaca agctgagcgg
cgccctgcgc
901 tactactacg acaagaacat catgagcaag gtgcatggca agcgtacgc
ctaccgttcc
961 gacttccagg gcctggcgca ggcccgccag ccgcgcggcg tctacaaagt
tgcgcgcgcc
1021 gcaagctgctg ccgcgcggcg ggcccgcagc gagcgcgcg totacaaagt
gccgcgcggc
1081 ctgcgcggcg tgcccttccc cggccttccc aaactcaacc tcatggcgcc
ctgcgcgg
1141 gtgcgcggcg ccggcttctc ctactggcgg ggccggggcc ccgcgcgccc
cgctgcgcgc
1201 gccacggcgg cgtctctacc cagtccagcc ttgcagcccc cgcccgggcc
cttcggggcc
1261 gtggcgcgag cctcgcactt gggggggcat taccaataga cggggcggtc
gggtgcctgc
1321 ggccctggcc gcaagcctag agtctgcgcc gatcccatcg gcatcccggg
gagggccggg
1381 gagcctccgt caacgcctct ctaattccaga gtttactcca cctgcgcgac
ttagcagggg
1441 gaggggagcg aagctccctc aatccttgtc tggtagtaga ttgtctctg
tccaccccg
1501 cagtcccttg agggaggaga tgtgcgcctt ctctcaattt ttttctctc
ggtctccag
1561 tccggagggg gatttgtgga cctctctgt ctcccaacca ctccagtgca
tttcgcctg

```

【図 9 - 4 1】

```

1621 gctctagaa gcccatcca atactactac tcttlaacga gtgccaatc
ttttccact
1681 tttgctcttc cccaaggaa tgctccacc tcagcactg gaggcctctc
acggctctcc
1741 ttctctggac ctgagcaggt ttggtgaaag ccacogtctc ccgtgacaca
cggcccccctt
1801 cctctgtctc ccacactccc agggagaaact cccggtgtgt ttctgacctt
ttcagcccca
1861 ttaaagctcc tgagctctca aaaaaaaaa aaaaaaaaa a

```

【図 10 - 1】

NM_005656 mRNA (SEQ ID NO: 54)

```

1 cgcagagctaa gcwgaaggcg gagcggaagg cggaggggcga gggcgggga gcgcgcctg
61 gagcgcgga ggtcatattg aacattccag atacctatca ttactcgatg
ctgttgataa
121 cagcaagatg gcttgaact cagggtccac accagctatt ggaccttaact
atgaaaacca
181 tggataccaa ccgaaaacc cctatcccg acagcccact gtggtcccca
ctgtctacga
241 ggtgcacccg gctcagtaact acccgctccc cgtgcccag taagcccccga
gggtccctgac
301 gcaggccttc aaccccgctg tctgcaacga gcccaaatcc ccattccggga
cagtgctgac
361 ccaagactc aagaagcac tctgcaacac cttgaccctg gggacccttc
tcgtgggagc
421 tgcgtggcc cctggcctac tctggaagt catgggcagc aagtgcctcca
actctgggat
481 agagtgagac tctcaggtg cctgcaatca cccctcaac tgggtgtgatg
gcgtgtcaca
541 cgcggccggc gggaggagcg agaactcggtg tgttcgctc tacggaccaa
acttcacctt
601 tcagatgtac tcattcaga ggaagtctgt gcaccctgtg tgccaagacg
actggaacga
661 gaactacggg cggcgccgct gcaggagacat ggggtataag aataattttt
ctctagacca
721 aggaatagtg gatgacagcg gatccaccag ctttstgaaa ctgaacacaa
gtgcggcgaa
781 tctgatata tataaaaaac tgaaccacag tgatgctgtg tcttcaaaag
cagtggtttc
841 ttacgctgt atagcctcg ggtcaactt gaactcaagc cgcagagaca
ggatcgtggg
901 cggtagagcg gcctcccg gggcctggcc ctggcaggtc agcctgcagc
tccagacgt
961 ccacgtgtgc gaggctcca tcattccccc cagtggtgac gtgacagccg
cccactcggt
1021 ggaaaaacct cttaacaac catggcattg gacggcattt cgggggattt
tgagacaact
1081 tttcatgttc tatggagcgg gatcccaagt agaaaaagtg atttctaac
caaattatga
1141 cccaagacc aagaacaatg acattgogct gatgaagctg cagaagcctc
tgactttcaa
1201 cagcctagtg aaacacgtgt gctgcccaca cccagcagtg atgtgcagc
cagaacagct
1261 ctgctggatt tccgggtggg gggccaccga ggagaaaggg aagacctcag
aagtgtgaa
1321 cgtgccaag gtgcttcca ttgagacaca gagatgcac agcagatag
tctatgaca
1381 cctgacaca ccagccatga tctg-gccg cttcctgag ggaacgtcg
attcttgcca
1441 ggg-gacagt ggaggccctc tctgcaactc gaagaacaat atctggtggc
tgataggaga
1501 tacaagctgg ggtctggct gtcaccaag ttacagaca ggaatgtacg
ggaatgtgat

```

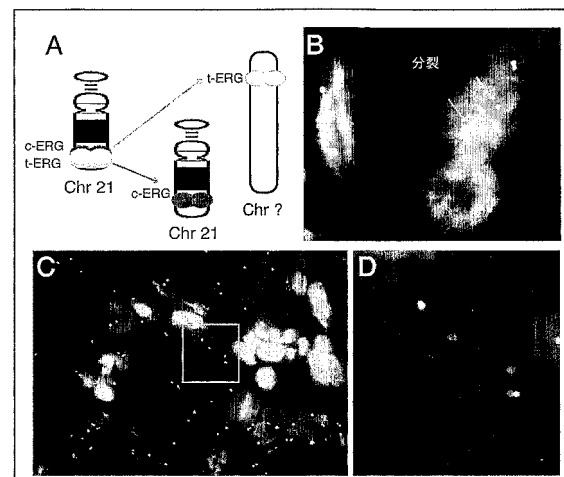
【図 10 - 2】

```

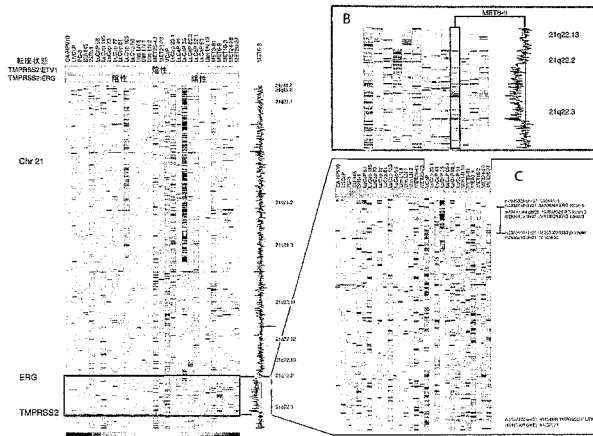
1561 ggtattcacg gactggattt atcgacaaat gagggcgagc ggctaatacca
catggtcttc
1621 gtccttgacg tctgtttaca agaaaaaat gggcggtggt ttgctccccc
gtgcacgatt
1681 tactcttaga gatgattcag aggtcacttc atttttatta aacagtgaac
ttgtctggct
1741 ttggcactct ctgccattct gtccagctcg cagtggtccc cctgcccagc
ctgctctccc
1801 taaacccctg tccgcaaggc gtgatggccc gctggttttg ggcactggcg
gtcaagtgtg
1861 gagggagagg gtggaggctg cccattgag atcttctcgc tgagtccctt
ccaaggcgca
1921 attttggatg agcatggagc tgcacacctc cagctgctgg atgacttgag
atgaaaaagg
1981 agagacatgg aaaggagac agccaggctg cactgcagc ggcctgccctc
tggggcactc
2041 tggtagtgtc cccagctcac ctctccacaa ggggattttg ctgatgggtt
cttagagcct
2101 tagcagccct gtaggtggc cagaataaaa gggaccagcc ctctatgggt
ggtgactggg
2161 tagtcaactg taaggcgac agaaacattt ttgttcttat ggggtgagaa
tatagacagt
2221 gcccttggtg caggggaagc aattgaaaag gaactgtccc tgagcactcc
tggtgcaagg
2281 ctccacctgc acattgggtg gggctcctgg gagggagact cagccttctc
ctcatctcc
2341 cctgacccctg ctccctagac cctggagagt gcacatgccc cttggtctcg
gcaggcgccc
2401 aagtcctggc ccattgtgac ctcttcagcg ctgctagcca ctggaattg
aggtccatgg
2461 gggaaatcaa gtagctcag ttaaggtgac actgtttcca tgtatgttt
ctacacattg
2521 ctacotcagt gctcctggaa acttagcttt tgatgtctcc aagtagtcca
ccttcattta
2581 actctttgaa actgtatcac ctttgccaag taagagtgtg ggcctatttc
agctgctttg
2641 acaaaatgac tggctctga cttaacgttc tataaatgaa tctgctgaag
caaagtgcgc
2701 atgggtggcg cgaagaagag aaagatgtgt tttgttttg actcctctg
gtcccttcca
2761 atgctgtggg ttccaacca ggggaagggt cctttttgca ttgcaaatg
ccataacat
2821 gagcaactac ctaccatggt tctgctcctc ggccaagcag gctggtttgc
aagaatgaaa
2881 tgaatgatto tacagctagg acttaacott gaaatggaaa gtcttgcaat
ccatttgca
2941 ggatcgtct gtgcacatgc ctctgttagag agcagcattc ccagggaacc
tggaacacgt
3001 tggcactgta aggtgcttc tcccacagc acatcctaaa aggtgttgta
atggtgaaaa
3061 cgtctctctt ctttattgac cctctctatt tatgtgaaca actgtttgtc
tttttttgta
3121 tcttttttaa actgtaaagt tcaattgtga aatgaatat catgcaaat
aatatgca
3181 ttttttttcc aaagcaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaa aaaaaa

```

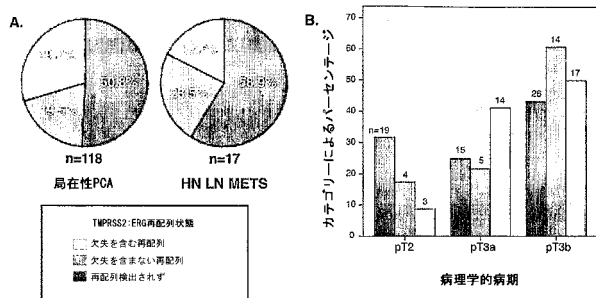
【図 11】



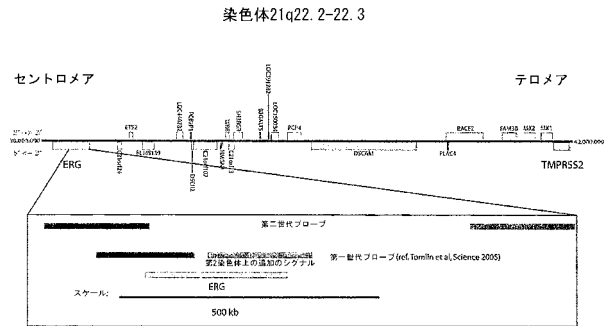
【図 12】



【図 13】

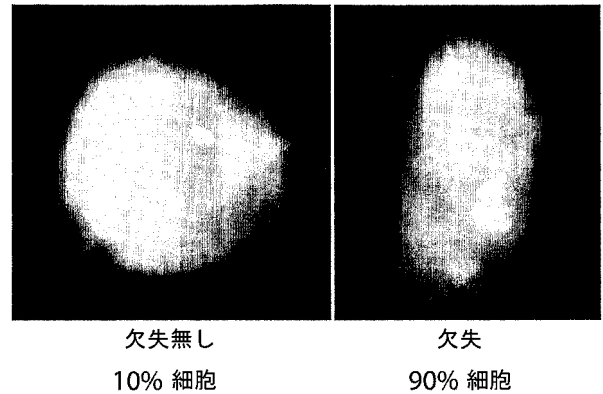


【図 14】

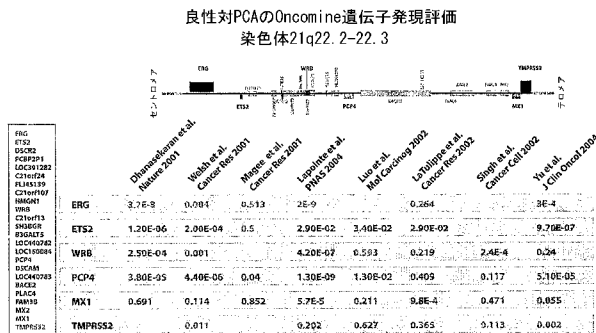


【図 15】

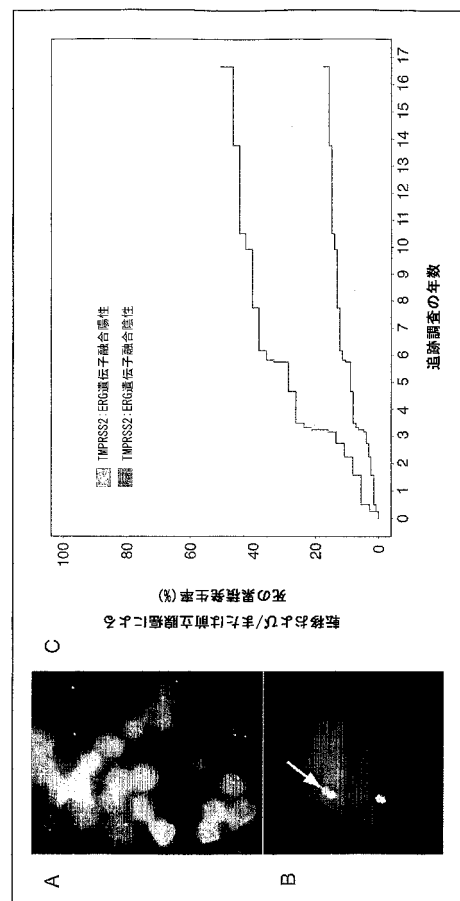
ERG分裂アッセイ : ERG再配列LN13



【図 16】



【図 17】



内因性 ERG1

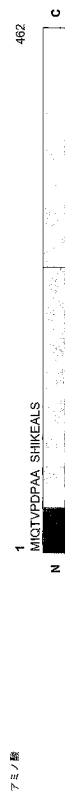


【図 20】

融合転写産物を含まないFLI1過剰発現

【図 18】

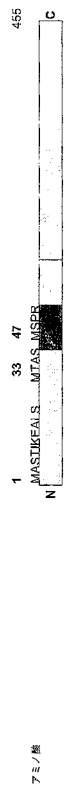
内因性 ERG2



ERG1 融合産物



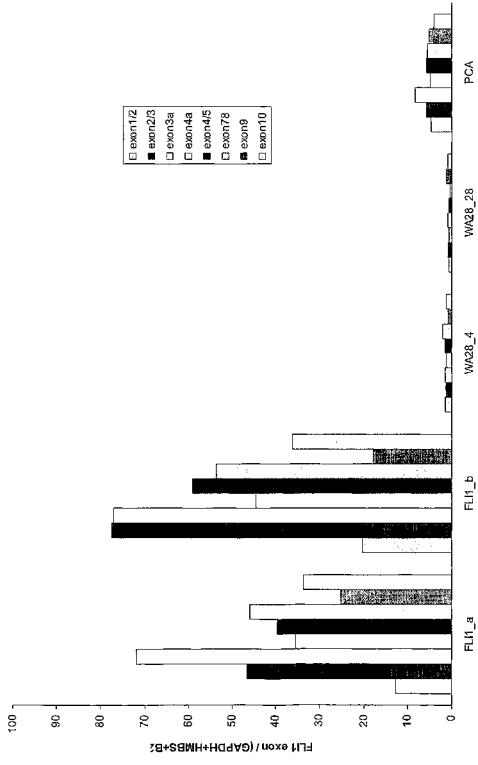
ERG2 融合産物



ERG2についての核内相互作用物質(質量分析およびタンパク質アレイ)

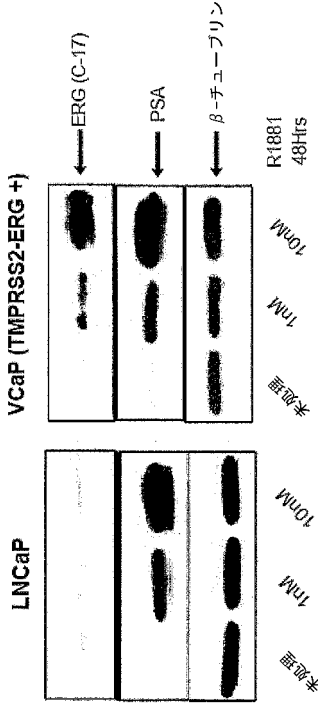
【図 21】

PRPF8	PRPF8プロセッシング因子8相同体(前体)
TBR1	1-ボックス、膜、1
EBNA1BP2	EBNA1結合タンパク質2
ERG	Y-to-pyrimidine ウイルスE2E6融合遺伝子様(トリ)
FBL	フィブリリン
EXOSC7	エキソソーム成分7
FLI1	フレンド白血病ウイルス組み込み1
NUMA1	核分裂装置タンパク質1
PCBP1	ポリ(rC)結合タンパク質1
SNRP70	核内成分70核タンパク質70kDaポリペプチド(組換え体)
LGALS3	レクチン、ガラクチン結合性、可溶性、3(ガラクチン3)
RBM23	RNA結合モチーフタンパク質23
TAF6	TAF6 RNAポリメラーゼII、TATAボックス結合タンパク質(TBP)関連因子、60kDa
ZNF306	ジンクフィンガータンパク質306
RASSF5	Ras関連蛋白(RAP-6)ドメインファミリー5
CAMK1	カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼI



TMPRSS2-ERG+細胞におけるアンドロゲンによるERGタンパク質の誘導

【図 19】



【図 2 2】

ERG 1

```

MASTIKKALS VVSDQSLFE CAYGTPHLAK TEMTASSSSD 40
YQGTSSKSRFR VEQDQLSQF FARVITIMEC NPSQVNGSRN 80
SPDECSVAKG GQGVGPPPTV QARYGSMIE KMDPPNMTT 120
NERRVIVPAD PTLWSTHVRW QWLEWAVKEY GLDGVNILLF 160
QNIQKELCKL MIKDDPQLRL PSYNADILLI HLHLYRETFE 200
PHLTSDDDVK ALQNSPRLMH ARNTGGAAFI FPNISVYFEA 240
          GAFT FPNISVYV
TORITTRPDL PYEPPIRSRW TQHGHTPOS KAAQSPSSTV 280
PKTEDQRPQL DPYQILGPTS SRLANPGSGQ IQLWQFLLEL 320
LSDSSNSSCI TWESTNCEFK MTDPEVARR WGERKSKPNM 360
NYDKLSRALR YYIDKNIMTK VHGRYAYFK DFHGIAQALQ 400
PHEPSSLYK YPSDLPYMG S YHAHQKQNF VAPHPALPV 440
TSSSFFAAPN PYWNSPTGGI YPNTRLEPVS MPSHLGTYY 479

```

【図 2 5】

ETV-4 (NCBI)

```

1 MERRMKAQYL DQGVPTTFSS KSPGNGSIRE ALTGPLKIM DPGSLPPLDS EDLPQDLSHF
          GYL DQGVPTTFSS LRE ALTGPLK LQDLSH
61 QETWLABAQV DSDEQEVFD FHSNLAFFS PTHRIKGPQ SPRTDPALSC SRKPPLEPYHH
          SENLAFFS TDPALSC SRKPPLEPYHH
121 GEQCLYSSAY DPPRQIAIKS PAPGALQSP LQFFPRAEQR NPLRSSGTSQ PHPGHYLGE
          GEQCLYSSAY DPPRQIAIKS PAPGALQSP LQFFPRAEQR NPLRSSGTSQ PHPGHYLGE
181 HSSVFPQFLD ICHSFTSQGG GREPLPAPYQ HQLSEPCPPY PQQSFQKQYH DPLYEQAGQP
          HSSVFPQFLD ICHSFTSQGG GREPLPAPYQ HQLSEPCPPY PQQSFQKQYH DPLYEQAGQP
241 AVEQGGVNGH RYPGAGVVIK QEQDFAIDS DVTGCASMYL HTEGFGSPSP GDGAMGYGYE
          AVEQGGVNGH RYPGAGVVIK QEQDFAIDS DVTGCASMYL HTEGFGSPSP GDGAMGYGYE
301 KPLRPPPDV CVVPEKFGD IKQEGVGAFR EGPPYQKGA LQLWQFLVAL LDDPTNAHFI
          KPLRPPPDV CVVPEKFGD IKQEGVGAFR EGPPYQKGA LQLWQFLVAL LDDPTNAHFI
361 AWTGRMEFK LIEPEEVARL WGIQKNRPM NYDKLSRLR YYEKGIMQK VAGERVVVKF
          AWTGRMEFK LIEPEEVARL WGIQKNRPM NYDKLSRLR YYEKGIMQK VAGERVVVKF
421 VCEPFALES L AFQDNQRPAL KAEFDRPVSE EDIVPLSHLD ESPAYLPFLA GPAQPGPKG
          VCEPFALES L AFQDNQRPAL KAEFDRPVSE EDIVPLSHLD ESPAYLPFLA GPAQPGPKG
481 GYST

```

【図 2 3】

ETV1 (NCBI)

```

MDGFDQQVF YMVNSQRGR NCNEKPTNVR KKKFINRDLA HDSEELFQDL SQLQETWLAE
61 AQVDENDEQF VPDYQASLA FHGLPLKIKK EPHSPCEIS SACSQEQPFK FSYGKCLYN
          PHSPCEIS SACSQEQPFK FSYGKCLYN
121 VSAIDQKQV GMRRSPNPTT SSTPVSLPHN ASPNSTHTPK PDRAFFAHLF PQQSIEDSSY
          TP SSTPVSLPHN A RAFFAHLF PQQSIEDSSY
181 PMDHFRRLQ SEPNSFPPL PTMPREGRPM YQRMSEPNI PFPQGFQKQ YHDFVYEHNT
241 MVGSAASQSF PPFMIKQEP RQFAYDSEVP SCHSIYMRQ GFLLAHSRTE GCMFEKGRQ
301 FYDDTCVPE KFDGDIQEP GMYREGPTY RRGSLQLWQF LVALDDPSN SHFIANTGRG
361 MEKFLIEFE VARWGIQEN RPAMNYDKL RSLRYTYEKG IMQKVAGEKY VYKFCVDFEA
421 LFSMAFFDQ RPLKTDMER HINEEDTVFL SHFDESMAYM FEGGCCNPHP YNEGYTY

```

【図 2 4】

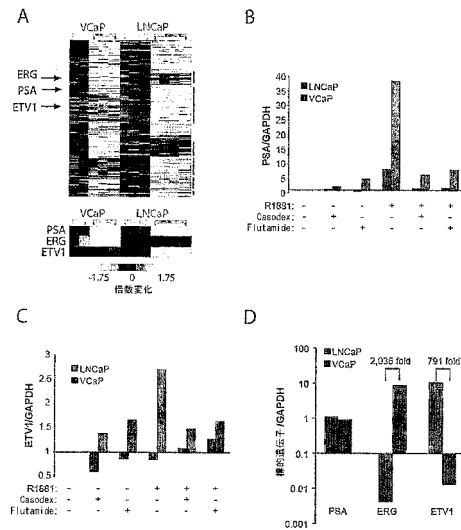
FLI-1 (NCBI)

```

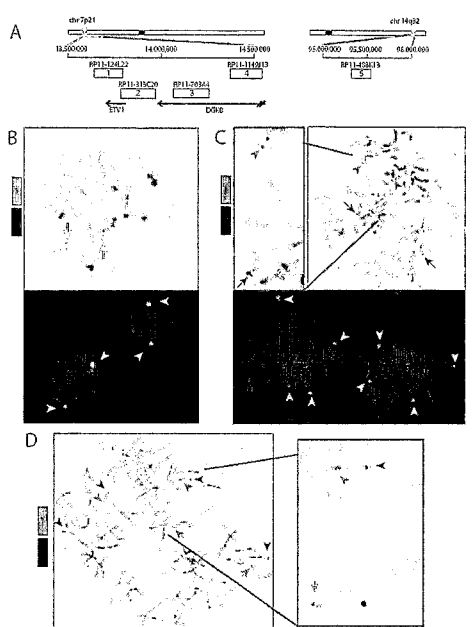
1 MDGTIKKALS VVSDQSLFD SAYGAAHLP KADMTASGSP DYQOPHKINP LPPQEWIQQ
          SLEF SAYGAAHLP HKINP LPPQ IQQ
61 FVRVNVKREY DHMNGRESF VDCSVKCKK IAGGGESNPM NYNSIMDEKN GPPPPMATTN
          FVRVNV RESF VDCSVKCKK LVG
121 ERRVIVPADP TLWTOHVRQ WLEWAKESY LMEIDTSFFQ NMDGKELCKM NKEDFLRATT
          TOHVRQ
181 LYNTFVLLSH LSYLRSSLL AYNTTSHDQ SSRLSVKBDP SYDSVRGAW GNNMNSGLNK
          SSRLSVK
241 SPPLGGAQTT SKNTEQRQP DPYQILGPTS SRLANPGSGQ IQLWQFLLEL LSDSANASCI
301 TWGNTNGEKF MTDPEVARR WGERKSKPNM NYDKLSRALR YYIDKNIMTK VHGRYAYKF
361 DFHGIAQALQ PHPTSSMYK YPSDISYMP S YHAHQKQNF VPHHPSMVF TSSSFFGAAS
421 QWTSPTGGI YPNNVVRHP NTHVPSHLG YY
          P NTHVPSHL

```

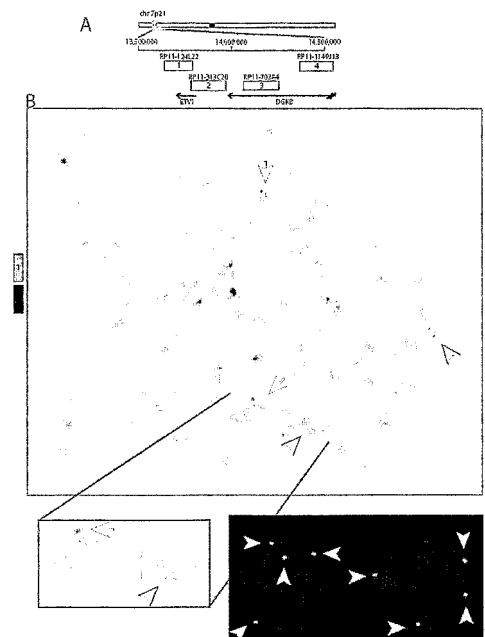
【図 2 6】



【図 2 7】

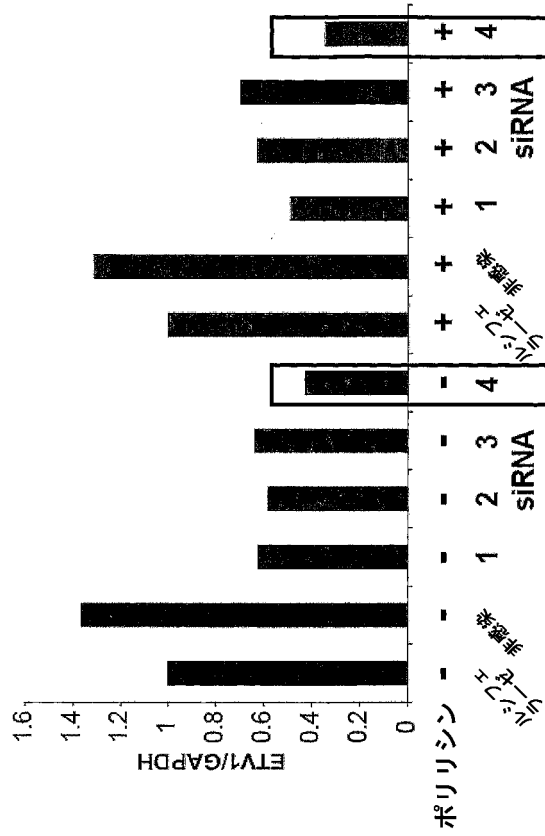


【図 2 8】



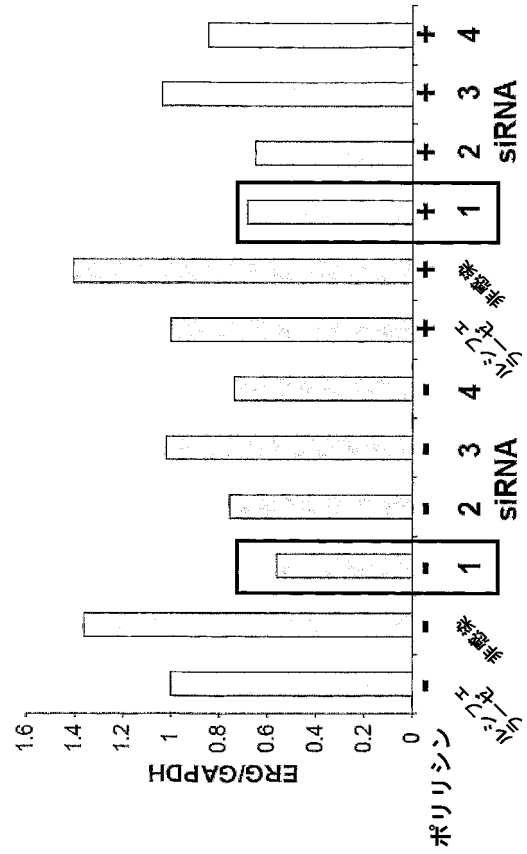
【図 29】

LnCaPIにおけるETV1のsiRNAノックダウン



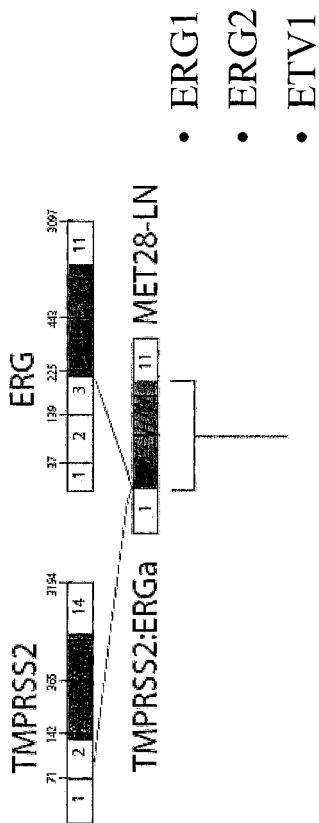
【図 30】

VCaPIにおけるERGのsiRNAノックダウン



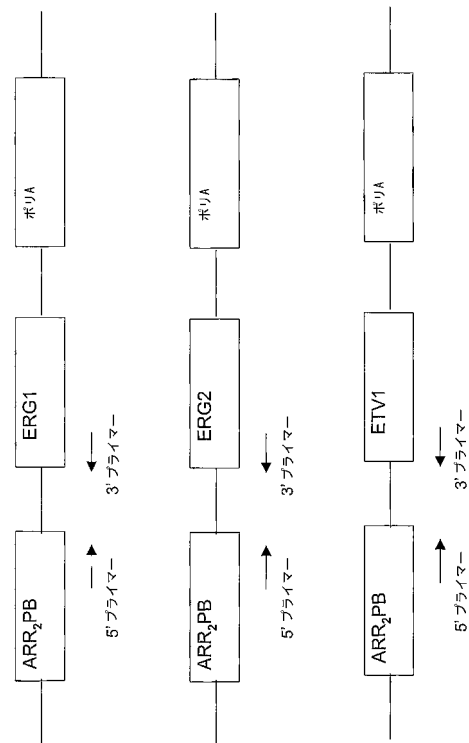
【図 31】

ウイルス過剰発現系

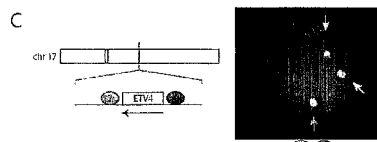
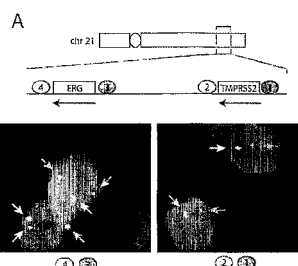


【図 32】

トランスジェニックマウス



【图 3 4】



【図 3 6 - 1】



【図 3 6 - 2】

		ggccgcagagatgctggccgcag
		atctacgatgagtagacacacacgctggccgcg/gpctgag/gpccgg/gaaagast/gcc
		ttccagatgcacacatctgtttatccacacatcg/gcggaagaa/gctgaagtgaaacag
ERG	6	cgcttcacagggctcccccaccccttcacacgcgcacacacacacacacacacacacag
		ctccttccttcacattggaattgagtagtgtagaaagccttcacaaatctccatcggttaagctgt
ERG	7	agagacacag
ERG	7a	ggagctgagcttttttcccaaatctcagatatactgagtagtgcacgaagaattacacacgagcag
		aattccatgatggccccacagcagtgacgctggccgcgctcgaagcgaacccacacacacacac
ERG	8	gaag
ERG	9	ctgtcaacacctcttcacagctgcacaaagctgaagacagcagctcttcagtag
ERG	10	ctctatcagctcttgcgcacacagagctggcccttgcacaaatcc
		gcagctggcagatagcttgtagtgagcttgagctgctgttgagacagcttcacactacgtgtg
		atcctccggaaggaacacacacacccgggagctgaagtagcagctacccagacggctgcacggctgt
		ggggagacggagagacacacacacacacagtaactgaactgacagcagcagcggccctcttacta
		ctatgcacagaacacatgacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
		gacagccacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
		gacagctgctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct
		ctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct
ERG	11	ctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct
		ctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct
ETV1	4	ctcagctactgacatgctgacagctgtgacagacatctacagctcgaatgt
		ctgtctttatctgcttgcacatgaantcagcgaagacccacacgctcctgtctaggaatcag
ETV1	5	ctctcctgcagtcacgaacacgcccttaattacagatctggagaagagtgctctacaaatgca
		g
		tgtctatgttcagagacacagctgggaatgggcgcctccacacccccacacacacacacacac
ETV1	6	cgcacgtctccacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
		cttccacgctcaacctccctccatgcgtccacacacacacacacacacacacacacacacacac
		atttcgcgcagcttttgacacctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct
		gagctctatgatacaccacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
ETV1	7	cgagagtagacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
		agctttcccccctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct
		aagctcctgctgcacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
ETV1	8	acacagag
		gctgtgtgttggaagaagggcccccacagcagattttatgtagacacctggtgtccacgaataatc
ETV1	9	gatg
		gagacataaacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
		caattcagctctcgcaattgttagtctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct
		ctctgcagacatgaatttaactgttgatggcgcagag
		gtggccacacgtggggcattcagaacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
ETV1	11	ctctcctctactactatgaagaagaaattatgcaag
		gtggcgcagagagatgtctacaagtttgggtgtgtctcagacagacccctttctccatggccttt
		cgagatatacagctccactgctgaacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
		cagtgccctctctcactgttagagacagctccctacatcgggaagagctctctctcagccacc
ETV1	12	ccacccctacacacagagctcgtcttttta

【図 3 6 - 3】

ETV4	3	aaatgcgcggaaataggaggttcgcgcgaagcgtgatgcggccgtctgggaagcatcgaac accgggctccctgcgcgccttcgactctgaag	
ETV4	4	ntctcttcagatcagtaacttcacttcaggaagtgctgcctgaag	
ETV4	5	ctcaggtaccagacagatgatacgaattgtctctgattccattcagaagaacc tagcttccacagcccccacacagagatcaagaagagaccacagtcgccccacagagcc ggccctgtctgcagcaggaagaccgcacatccctccacatcgaatcgtggagagatgccattact ccag	
ETV4	6	tgcctatgaccccccagacaattgcacatgaactccctgccctgtgtccttggagctgc gccctacagcccttcccccgcgcagacaaaggaattcttgatctctcctcagaccctccca gccccacactggccatggtactcctcgggacatag	
ETV4	7	ctctcgttccagagccctgaacttgcacactccctccacatccaggaagggggccggga acccctccagcccccacacacacagctgtcggagacccctgccaccctatccccaagaga gcttttagcaaatcaatcagatccocclgatgaacagcggccgcagccgtgtggacag gtggggctcaattggccacagatgccacggcgggcggtgtgtatcaacaggaacagacg gacttcctactgactacg	
ETV4	8	gtgtaacgggtgcgcacatctgactccacacagaggcttccttggccgccttcagatgtg accggggacatg	
ETV4	9	gcatagtctatgaagaacctctgcacactccagatgatgtgtcgtgtctctgagaattt gaag	
ETV4	10	gagatcacaagcagagagggctgggtgcattgagagagggccgccctacacagccggg gtgcctcgtgacgtctgtgcgaattgtgtgcctcttgatgacacaacaatgccattcatt gcctcgcagggccggaggaatggtctcaagctcattgctcgttagag	
ETV4	11	gtccagagctctggggacatcagaagagccagccatgaattacagaacgtgagcc gctcgtccgatcatctatgaagaagcactcagagag	
ETV4	12	gtggctggagagctgtatgtaacattgtgtgtgagcccgagagccctctcttctgtccctc ccggacaaacagcgttcagctcgaagcttgattgttcagccgtgtcagtgaggagagacaa gtcccttgaccatctgaatgagagccgcctacctcagctcgtgtgcgcgccgccagc cattggcccccaaggtgcgtactctactag	
ETV4	13		
名前	参照	IMPRSS2	ETV1
	IMPRSS2:ETV1a	1	4-12
	IMPRSS2:ETV1b	1,2	4-12
		IMPRSS2 エキソン	ERG エキソン
IMPRSS2:ERG(1,2)	IMPRSS2:ERGb	1	2-11
IMPRSS2:ERG(1,3)	3	1	3-11
IMPRSS2:ERG(1,4)	IMPRSS2:ERGa	1	4-11
IMPRSS2:ERG(1,5)	2	1	5-11
IMPRSS2:ERG(2,2)	3	1,2	2-11
IMPRSS2:ERG(2,3)		1,2	3-11
IMPRSS2:ERG(2,4)	1	1,2	4-11
IMPRSS2:ERG(2,5)	2	1,2	5-11
IMPRSS2:ERG(3,4)	3	1-3	4-11
IMPRSS2:ERG(4,4)	1	1-4	4-11
IMPRSS2:ERG(5,4)	1	1-4	5-11
IMPRSS2:ERG(5,4)	1	1-5	4-11

【図 3 6 - 4】

[illegible]

【图 3 7】

	プライマー	SEQ ID NO
FL11_exon1-f	GCTCGAGACTTGGCCAAATGGAC	202
FL11_exon2-r	TCCACCACGACAGAGCTCCCTTA	203
FL11_exon23-f	ACCATCATGAATGGATCCAGGAGTCT	204
FL11_exon3-r	ACCAGCTTGTGCAATTGCTAACG	205
FL11_exon4-f	CTCCGCGCCACCACCCCTCTA	206
FL11_exon415-r	GGCCAGGAGTGAACCTTCCCTGAG	207
FL11_exon3a-f	CTCCTCCCAACATGACCAACAC	208
FL11_exon3a-r	GTCTCGGGGACGATGATCTCTC	209
FL11_exon4a-f	CATGTGAGGCAATGGCTGGAGTG	210
FL11_exon4a-r	CCATGTTCTTGGAAAAAGGTTGTGCG	211
FL11_exon7-f	CCTTGGAGGGGCGACAACGAT	212
FL11_exon8-r	GGTCGGGCCCAAGGATCTATAC	213
FL11_exon8-f	CGCCACCGCGAGCTGTATCATC	214
FL11_exon9-r	AGCGCCTGGCCACCTCATC	215
FL11_exon10-f	ATGTTTTTATGACCAAGCAGTTTCTTGTC	216
FL11_exon10-r	ATGACCGATTAGTGCCTCATGTTCTGTG	217

ERG		
フォワード-	CGAAAGCTGCTCAACCATCTC	218
リバーズ-	TAACTAGAGCAGCTGTGCTTCA	219
FAM標識MGB プローブ	CCACAGTGCCCAAAA	220
FLI1		221
フォワード-	CGGCAAAAAGATATGCTTACAAATT	222
リバーズ-	GACGACTCGGTCCGAGATGTG	223
FAM標識MGB プローブ	CACGGCATTGCCCA	224
TMPPRSS2:ERGα 特異的		
フォワード-	CGCGGCAGGAAGCCCTTA	225
リバーズ-	TCCGTAGGCACACTCAAACAAC	226
FAM標識MGB プローブ	CAGT1GTGAGTGAGGACC	227
ETV4		
フォワード-	GCTCGCTCCGATCATATTATGAGAA	228
リバーズ-	CACACACAACCTTGATACACGTAACG	229
FAM標識MGB プローブ	ACCAGCCACCTTCTGC	230
ETV1		
フォワード-	GGTCGAGGCATGGAATTTAAACTGA	231
リバーズ-	CGTGGCTGT1TTCTGGAATGC	232
FAM標識MGB プローブ	TCGGGCCACCTCTTC	233

【配列表】

0005512125000001.app

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 60/779,041
(32)優先日 平成18年3月3日(2006.3.3)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/795,590
(32)優先日 平成18年4月28日(2006.4.28)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (74)代理人 100102978
弁理士 清水 初志
(74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一
(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (72)発明者 チナイヤン アルール
アメリカ合衆国 ミシガン州 プリマス プリマス バリー 51300
(72)発明者 トムリンズ スコット
アメリカ合衆国 ミシガン州 アナーバー バロン ドライブ 1077 #112
(72)発明者 ローデス ダニエル
アメリカ合衆国 ミシガン州 アナーバー ウィンウッド ドライブ 2710 アpartment
#122
(72)発明者 メーラ ロヒット
アメリカ合衆国 ミシガン州 アナーバー アイランド ドライブ コート 1044 アpartment
#122
(72)発明者 ルービン マーク エー.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ヴァッセル レーン 41 アpartment
2
(72)発明者 サン シャオ-ウェイ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ニュートン ハイランド アベニュー 33
(72)発明者 デミチェリス フランチェスカ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ コンコルド アベニュー 29
(72)発明者 ペルネル スベン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ベルモント ウォールナット ストリート 54
(72)発明者 リー チャールズ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 モールバラ コンコルド ロード 1025

審査官 木原 啓一郎

- (56)参考文献 Cancer Genet Cytogenet., 2004 Oct 15, Vol.154, No.2, p.110-118
Oncogene, 2005 May 26, Vol.24, No.23, p.3847-3852
Prostate, 2004 Jul 1, Vol.60, No.2, p.98-108

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00

C12Q 1/68

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)