

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6051373号

(P6051373)

(45) 発行日 平成28年12月27日(2016.12.27)

(24) 登録日 平成28年12月9日(2016.12.9)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 Q 1/48 (2006.01)

C 1 2 Q 1/48 Z N A Z

G O 1 N 33/15 (2006.01)

G O 1 N 33/15 Z

G O 1 N 33/50 (2006.01)

G O 1 N 33/50 Z

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 4 (全 85 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-525227 (P2014-525227)
 (86) (22) 出願日 平成24年6月29日(2012.6.29)
 (65) 公表番号 特表2015-506665 (P2015-506665A)
 (43) 公表日 平成27年3月5日(2015.3.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2012/004232
 (87) 国際公開番号 W02013/080400
 (87) 国際公開日 平成25年6月6日(2013.6.6)
 審査請求日 平成27年6月16日(2015.6.16)
 (31) 優先権主張番号 61/566,193
 (32) 優先日 平成23年12月2日(2011.12.2)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 502240113
 オンコセラピー・サイエンス株式会社
 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一
 (74) 代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の治療および診断の標的遺伝子としてのSMYD2

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の段階を含む、癌の治療および予防のいずれかもしくは両方または癌細胞成長の阻害のための候補物質をスクリーニングする方法：

(a) SMYD2ポリペプチドを、HSP90AB1ポリペプチドまたはHSP90AB1ポリペプチドの断片であって配列番号65のリジン531および/もしくはリジン574を含む断片と、前記HSP90AB1ポリペプチドまたは断片のメチル化が可能な条件下において試験物質の存在下で接触させる段階；

(b) 前記HSP90AB1ポリペプチドまたは断片における配列番号65のリジン531および/もしくはリジン574のメチル化レベルを検出する段階；ならびに

(c) 前記HSP90AB1ポリペプチドまたは断片における配列番号65のリジン531および/もしくはリジン574のメチル化レベルを前記試験物質の非存在下で検出されたメチル化レベルと比較して低下させる試験物質を選択する段階。

【請求項2】

前記HSP90AB1ポリペプチドの断片が、配列番号65の500番目から724番目のアミノ酸からなる、請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記HSP90AB1ポリペプチドの断片が、配列番号65のリジン531を含む20アミノ酸からなる、請求項1記載の方法。

【請求項4】

10

20

前記 H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドの断片が、配列番号 6 5 のリジン 5 7 4 を含む 2 0 アミノ酸からなる、請求項 1 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物科学の分野、より具体的には癌研究、癌診断および癌治療の分野に関する。特に、本発明は、癌、特に膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌の存在および/またはこれらを発症する素因を検出および診断するための方法に関する。本発明はまた、癌、特に膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌を治療および予防するための方法に関する。本発明はさらに、癌、特に膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌の治療および/または予防に有効な候補物質をスクリーニングする方法に関する。

10

【0002】

優先権

本出願は、2011年12月2日に出願された米国仮出願第61/566,193号の恩典を主張し、その内容全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

20

【0003】

熱ショックタンパク質(heat shock protein)90(HSP90)は、進化的に保存されている分子シャペロンであり、HSP90「クライアント」と呼ばれる200種超のタンパク質の安定化および活性化に関与する；これらの多くは、構造的な細胞内シグナル伝達およびストレス適応反応に必須である[非特許文献1、2]。この任務を達成するために、HSP90、および「コシャペロン」と呼ばれるさらなるタンパク質は、HSP90シャペロンマシンとして公知の動的複合体を形成する[非特許文献3]。癌細胞は、多くの変異したおよび過剰発現している癌タンパク質をミスフォールディングおよび分解から保護するために、HSP90シャペロン機構を使用する。したがって、HSP90は、癌遺伝子依存および癌生存の重要な促進因子として認識されている[非特許文献4]。

30

【0004】

HSP90の機能は、アセチル化、リン酸化およびニトロシル化などの様々な翻訳後修飾によって調節されている。HSP90上の荷電リンカーのリン酸化は、アリル炭化水素受容体(aryl hydrocarbon receptor)(AHR)クライアントとの相互作用を調節する。HSP90中央ドメインにおけるリン酸化セリン225およびセリン254がアラニンに変異すると、HSP90のAHRへの結合が増加するが、これは、リン酸化が複合体を負に調節することを示唆している[非特許文献5]。他の事例では、HSP90のリン酸化は、クライアントの成熟を促進する。例えば、(チロシン300における)SRC依存性のHSP90AB1のリン酸化は、血管内皮成長シグナル伝達の活性化で、クライアントの内皮一酸化窒素合成酵素(endothelial nitric oxide synthase)(eNOS)とのシャペロン結合を増加させる[非特許文献6]。一方、未知のアセチラーゼによって中央ドメインにおけるリジン294がアセチル化されると、クライアントのタンパク質の成熟およびコシャペロン結合の両方が阻害され[非特許文献7、8]、ヒストン脱アセチル化酵素6は、この残基をインビボで脱アセチル化する。さらに、HSP90AB1CTDにおけるシステイン597がニトロシル化されると、eNOSの活性化がインビボで阻害され[非特許文献9、10]、インビトロにおけるS-ニトロシル化はHSP90のATPase活性を阻害し、シャペロンサイクルの立体配座平衡を変化させる。HSP90について、他の翻訳後修飾が報告されている。しかしながら、メチル化の生理学的意義は、いまだに解明されてい

40

50

い。

【0005】

網膜芽細胞腫抑制タンパク質 (retinoblastoma tumor suppressor protein) (RB) は、細胞周期調節において中心的な役割を有し、数種類の癌で変異している [非特許文献23~25]。RBはE2F転写因子と相互作用し、S期の開始に関連する遺伝子を調節することができる。RBは、その低リン酸化状態ではE2Fに結合し、E2F標的遺伝子の発現を抑制する。RBがサイクリン/CDK複合体によって過リン酸化されると、E2FはRBから離れ、細胞周期進行を促すその標的遺伝子を転写活性化する [非特許文献23、24、26、27]。RBは、ヒト小細胞肺癌 (SCLC) の90%超では不活性化されていると報告されているが [非特許文献23]、ヒト癌の大部分は、CDKの調節解除により主としてリン酸化状態にある野生型RBを発現する。それにより、ほとんどのヒト癌は、RB機能の調節解除によりG₁チェックポイント制御を喪失していると思われるので、RBのリン酸化は、癌細胞増殖を制御する経路における重要な調節工程である [非特許文献24]。リン酸化に加えて、RBタンパク質は、アセチル化されることが公知である [非特許文献28、29]。ケラチノサイトの分化において、RBはアセチルトランスフェラーゼP-CAFによってアセチル化され、核局在化シグナル内に位置する2個の主要なリジン残基 (リジン873および874) のアセチル化が、RBタンパク質の核内保持を介して、分化において重要な役割を果たしている可能性がある [非特許文献30]。しかしながら、RB機能の調節に関するリジンのメチル化を含めて、他の翻訳後修飾 (posttranslational modification) (PTM) の意義は、依然として不明である。

本発明者らは、特定のヒストンメチルトランスフェラーゼ (histone methyltransferase) (HMT) が、正常な細胞バイオロジーに加えて、ヒト癌の病因において重要な役割を果たすことを実証した [特許文献1~2、非特許文献11~13]。HMTはまた、ヒト細胞の悪性化に関与すると示唆されている [非特許文献14~16]。

【0006】

SMYD2は、SETドメインおよびMYNDドメインを含有するSMYDファミリーメンバーの1つとして最初に同定された [非特許文献17]。SMYD2は、H3K36をメチル化し、Sin3AおよびHDAC1ヒストン脱アセチル化酵素複合体と共同して、転写抑制因子として機能することが示されている [非特許文献17]。ヒストンのメチル化プロセスに加えて、SMYD2はまた、p53および網膜芽細胞腫 (RB) タンパク質をメチル化し、それによりそれらの機能を変化させる [非特許文献18、19]。アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) では、smyd2は筋組織で発現しているので、筋細胞の分化に関連する可能性がある [非特許文献20]。smyd2はまた、様々な種類の新生仔マウス組織、特に新生仔の心臓で発現していることが示されているが [非特許文献21]、心筋細胞の分化および心臓の形態形成に不可欠なSMYD1とは異なり、SMYD2は、マウス心臓の発達に重要ではない [非特許文献22]。

【0007】

したがって、一定の特性は明らかになっているが、正常な細胞バイオロジー、および癌のような疾患におけるSMYD2の意義は、依然として大部分が不明である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】WO2005/071102

【特許文献2】WO2003/027143

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Trepel, J., Mollapour, M., Giaccone, G. & Neckers, L. Nat Rev Cancer 10, 537-549 (2010).

10

20

30

40

50

【非特許文献2】Wandinger, S.K., Richter, K. & Buchner, J. J Biol Chem 283, 18473-18477 (2008).

【非特許文献3】Pratt, W.B. & Toft, D.O. Exp Biol Med (Maywood) 228, 111-133 (2003).

【非特許文献4】Whitesell, L. & Lindquist, S.L. Nat Rev Cancer 5, 761-772 (2005).

【非特許文献5】Ogiso, H. et al. Biochemistry 43, 15510-15519 (2004).

【非特許文献6】Duval, M., Le Boeuf, F., Huot, J. & Gratton, J.P. Mol Biol Cell 18, 4659-4668 (2007).

【非特許文献7】Scroggins, B.T. et al. Mol Cell 25, 151-159 (2007).

【非特許文献8】Kovacs, J.J. et al. Mol Cell 18, 601-607 (2005).

【非特許文献9】Retzlaff, M. et al. EMBO Rep 10, 1147-1153 (2009).

【非特許文献10】Martinez-Ruiz, A. et al. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 8525-8530 (2005).

【非特許文献11】Hamamoto R et al. Nat Cell Biol 6, 731-40 (2004).

【非特許文献12】Takawa, M. et al. Cancer Sci (2011).

【非特許文献13】Yoshimatsu, M. et al. Int J Cancer 128, 562-573 (2011).

【非特許文献14】Portela, A. & Esteller, M. I 28, 1057-1068 (2010).

【非特許文献15】Schneider, R., Bannister, A.J. & Kouzarides, T. Trends Biochem Sci 27, 396-402 (2002).

【非特許文献16】Sparmann, A. & van Lohuizen, M. Nat Rev Cancer 6, 846-856 (2006).

【非特許文献17】Brown, M.A., Sims, R.J., 3rd, Gottlieb, P.D. & Tucker, P.W. Mol Cancer 5, 26 (2006).

【非特許文献18】Huang, J. et al. Nature 444, 629-632 (2006).

【非特許文献19】Saddic, L.A. et al. J Biol Chem 285, 37733-37740 (2010).

【非特許文献20】Kawamura, S., Yoshigai, E., Kuhara, S. & Tashiro, K. Cytotechnology 57, 161-168 (2008).

【非特許文献21】Diehl, F. et al. PLoS One 5, e9748 (2010).

【非特許文献22】Gottlieb, P.D. et al. Nat Genet 31, 25-32 (2002).

【非特許文献23】Burkhardt, DL. et al. Nat Rev Cancer 8, 671-682 (2008).

【非特許文献24】Knudsen, ES. et al. Nat Rev Cancer 8, 714-724 (2008).

【非特許文献25】Weinberg, RA. et al. Cell 81, 323-330 (1995).

【非特許文献26】Sherr CJ. Science 274, 1672-1677 (1996).

【非特許文献27】Sherr, CJ. et al. Cancer Cell 2, 103-112 (2002).

【非特許文献28】Chan, HM. et al. Nat Cell Biol 3, 667-674 (2001).

【非特許文献29】Nguyen, DX. et al. EMBO J 23, 1609-1618 (2004).

【非特許文献30】Pickard, A. et al. J Cell Sci 123, 3718-3726 (2010).

【発明の概要】

【0010】

本発明者らは、SMYD2 (SET and MYND domain containing 2) 遺伝子、およびそれが癌細胞成長において果たす重要な役割に関する。このようなものとして、本発明は、癌を検出、診断、治療および/または予防するための新規な組成物および方法、ならびに癌の予防および治療のいずれかまたは両方に有用な候補物質をスクリーニングする過剰発現方法に関する。

【0011】

本発明の間に、本発明者らは、SMYD2 遺伝子が、例えば、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌を含む様々な癌で過剰発現していることを確認した。本発明者らはまた、HSP90AB1タンパク質およびRB1タンパク質に対するSMYD2タ

10

20

30

40

50

ンパク質のメチルトランスフェラーゼ活性を確認した。

【 0 0 1 2 】

これらの知見を考慮して、S M Y D 2 タンパク質の発癌活性は、癌細胞で重要な役割を果たすために、ヒストンタンパク質、H S P 9 0 A B 1 タンパク質またはR B 1 タンパク質との相互作用によってもたらされると仮定した。本発明の間に、S M Y D 2 タンパク質は、ヒストンタンパク質、H S P 9 0 A B 1 タンパク質および / またはR B 1 タンパク質のメチル化によって癌細胞増殖を促進することを発見した。

【 0 0 1 3 】

従来のインビトロのメチルトランスフェラーゼアッセイを使用して、本発明者らは、S M Y D 2 タンパク質が、H S P 9 0 A B 1 タンパク質を用量依存的にメチル化することを実証した。質量分光分析により、本発明者らは、H S P 9 0 A B 1 タンパク質のリジン 5 3 1 および / またはリジン 5 7 4 を、S M Y D 2 依存性のメチル化の主要標的として同定した。本発明者らは、H S P 9 0 A B 1 タンパク質のリジン 5 7 4 におけるモノメチル化が、二量体化およびシャペロニン複合体形成を促進したことをさらに確認した。加えて、メチル化H S P 9 0 A B 1 タンパク質は、癌細胞増殖を加速させた。

【 0 0 1 4 】

本発明者らはまた、S M Y D 2 タンパク質が、R B 1 タンパク質をメチル化することを実証した。質量分光分析により、R B 1 のリジン 8 1 0 が、S M Y D 2 タンパク質によってメチル化されたことが明らかになった。このメチル化は、インビトロおよびインビボの両方において、R B 1 タンパク質のセリン 8 0 7 および / またはセリン 8 1 1 のリン酸化を促進した。さらに、本発明者らは、メチル化R B 1 タンパク質がE 2 F 転写活性を加速させ、細胞周期進行を促進することを実証した。これらの結果は、S M Y D 2 タンパク質が様々な種類の癌において重要な癌タンパク質であり、リジン 8 1 0 におけるS M Y D 2 依存性のR B 1 メチル化が、癌細胞の細胞周期進行を促進することを示している。

総合すると、このデータは、S M Y D 2 分子を標的とすることが、癌の臨床管理における新たな診断治療戦略の開発に有望であり得ることを示唆している。

【 0 0 1 5 】

したがって、本発明の目的は、対象由来の生体試料におけるS M Y D 2 遺伝子の発現レベルを疾患指標として使用して、対象における癌、特に膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌の存在またはこれらを発症する素因を診断または決定する方法を提供することである。S M Y D 2 遺伝子の発現レベルが該遺伝子の正常対照レベルと比較して上昇していることは、対象が癌、特に膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌および / または膵臓癌に罹患しているかまたはこれらを発症するリスクを有することを示す。

【 0 0 1 6 】

本発明のさらなる目的は、癌、特に膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌の治療および / または予防に有効な候補物質をスクリーニングする方法を提供することである。このような物質はS M Y D 2 ポリペプチドに結合するか、またはS M Y D 2 ポリペプチドの生物学的活性またはS M Y D 2 遺伝子もしくはS M Y D 2 遺伝子に代わるレポーター遺伝子の発現を低下させるであろう。あるいは、このような物質は、S M Y D 2 ポリペプチドとH S P 9 0 A B 1 ポリペプチドまたはR B 1 ポリペプチドとの間の結合を阻害するか、またはS M Y D 2 ポリペプチドのメチルトランスフェラーゼ活性を阻害するであろう。

【 0 0 1 7 】

より具体的には、本発明は、以下の [1] ~ [3 3] を提供する :

[1] 対象由来の生体試料におけるS M Y D 2 遺伝子の発現レベルを決定する段階を含む、対象における癌を検出もしくは診断するかまたは癌を発症する素因を検出するための方法であって、前記遺伝子の正常対照レベルと比較した前記発現レベルの上昇が、前記対象

10

20

30

40

50

が癌に罹患しているかまたは癌を発症するリスクを有することを示し、前記発現レベルが、以下からなる群より選択される任意の方法によって決定される、方法：

- (a) S M Y D 2 遺伝子の m R N A を検出すること；
- (b) S M Y D 2 遺伝子によってコードされるタンパク質を検出すること；および
- (c) S M Y D 2 遺伝子によってコードされるタンパク質の生物学的活性を検出すること、

[2] 前記上昇が、前記正常対照レベルよりも少なくとも 1 0 % 大きい、[1] に記載の方法、

[3] 前記対象由来の生体試料が、生検標本、唾液、痰、血液、血清、血漿、胸水または尿試料を含む、[1] に記載の方法、

10

[4] 以下からなる群より選択される試薬を含む、対象における癌の存在または癌を発症する素因を検出または診断するためのキット：

- (a) S M Y D 2 遺伝子の m R N A を検出するための試薬；
- (b) S M Y D 2 遺伝子によってコードされるタンパク質を検出するための試薬、および
- (c) S M Y D 2 遺伝子によってコードされるタンパク質の生物学的活性を検出するための試薬、

[5] 前記試薬が、S M Y D 2 遺伝子の m R N A に結合するプローブまたはプライマーセットである、[4] に記載のキット、

[6] 前記試薬が、S M Y D 2 遺伝子によってコードされるタンパク質に対する抗体または該タンパク質の断片に対する抗体である、[4] に記載のキット、

20

[7] 前記生物学的活性が、細胞増殖促進活性またはメチルトランスフェラーゼ活性である、[1] ~ [3] のいずれかに記載の方法、または [4] ~ [6] のいずれかに記載のキット、

[8] 以下の段階を含む、癌の治療および予防または癌細胞成長の阻害のいずれかまたは両方のための候補物質をスクリーニングする方法：

(a) 試験物質を、S M Y D 2 ポリペプチドまたは S M Y D 2 ポリペプチドの機能的等価物と接触させる段階；

(b) 前記ポリペプチドまたは前記ポリペプチドの機能的等価物と前記試験物質との間の結合活性を検出する段階；および

(c) 前記ポリペプチドまたは前記ポリペプチドの機能的等価物に結合する試験物質を選択する段階、

30

[9] 以下の段階を含む、癌の治療および予防または癌細胞成長の阻害のいずれかまたは両方のための候補物質をスクリーニングする方法：

(a) 試験物質を、S M Y D 2 遺伝子を発現する細胞と接触させる段階；および

(b) S M Y D 2 遺伝子の発現レベルを前記試験物質の非存在下の発現レベルと比較して低下させる試験物質を選択する段階、

[1 0] 以下の段階を含む、癌の治療および予防または癌細胞成長の阻害のいずれかまたは両方のための候補物質をスクリーニングする方法：

(a) 試験物質を、S M Y D 2 ポリペプチドまたは S M Y D 2 ポリペプチドの機能的等価物と接触させる段階；

40

(b) 段階 (a) のポリペプチドまたは該ポリペプチドの機能的等価物の生物学的活性を検出する段階；および

(c) 前記ポリペプチドまたは前記ポリペプチドの機能的等価物の生物学的活性を前記試験物質の非存在下で検出された生物学的活性と比較して抑制する試験物質を選択する段階、

[1 1] 前記生物学的活性が、細胞増殖促進活性またはメチルトランスフェラーゼ活性である、[1 0] に記載の方法、

[1 2] 以下の段階を含む、癌の治療および予防または癌細胞成長の阻害のいずれかまたは両方のための候補物質をスクリーニングする方法：

(a) 試験物質を、S M Y D 2 遺伝子の転写調節領域と前記転写調節領域の制御下で発現

50

されるレポーター遺伝子とを含むベクターが導入された細胞と、接触させる段階、
(b) 前記レポーター遺伝子の発現または活性レベルを測定する段階；および
(c) 前記レポーター遺伝子の発現または活性レベルを前記試験物質の非存在下のレベルと比較して低下させる試験物質を選択する段階、
[1 3] 以下の段階を含む、癌の治療および予防または癌細胞成長の阻害のいずれかまたは両方のための候補物質をスクリーニングする方法：
(a) S M Y D 2 ポリペプチドまたは S M Y D 2 ポリペプチドの機能的等価物を、メチル化されるべき基質と、前記基質のメチル化が可能な条件下において試験物質の存在下で接触させる段階；
(b) 前記基質のメチル化レベルを検出する段階；および
(c) 前記基質のメチル化レベルを前記試験物質の非存在下で検出されたメチル化レベルと比較して低下させる試験物質を選択する段階、
[1 4] 前記基質が、ヒストンタンパク質、または少なくとも 1 つのメチル化部位を含むヒストンタンパク質の断片である、[1 3] に記載の方法、
[1 5] 前記ヒストンが、ヒストン H 4 またはヒストン H 3 である、[1 4] に記載の方法、
[1 6] 前記基質が、H S P 9 0 A B 1 ポリペプチド、または少なくとも 1 つのメチル化部位を含む H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドの断片である、[1 3] に記載の方法、
[1 7] 前記メチル化部位が、配列番号 6 5 のリジン 5 3 1 および / またはリジン 5 7 4 である、[1 6] に記載の方法、
[1 8] 前記基質が、R B 1 ポリペプチド、または少なくとも 1 つのメチル化部位を含む R B 1 ポリペプチドの断片である、[1 3] に記載の方法、
[1 9] 前記メチル化部位が、配列番号 6 8 のリジン 8 1 0 である、[1 8] に記載の方法、
[2 0] 以下の段階を含む、癌を治療もしくは予防するかまたは癌細胞成長を阻害するための候補物質をスクリーニングする方法：
(a) S M Y D 2 ポリペプチドの H S P 9 0 A B 1 結合ドメインを含むポリペプチドを、H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドの S M Y D 2 結合ドメインを含むポリペプチドと、試験物質の存在下で接触させる段階；
(b) 前記ポリペプチド間の結合を検出する段階；
(c) 段階 (b) で検出された結合レベルを、前記試験物質の非存在下で検出されたものと比較する段階；および
(d) 前記ポリペプチド間の結合を阻害する試験物質を、癌の治療および予防または癌細胞成長の阻害のいずれかまたは両方のための候補物質として選択する段階、
[2 1] 前記 H S P 9 0 A B 1 結合ドメインを含むポリペプチドが、配列番号 6 3 の 1 0 0 位 ~ 2 4 7 位のアミノ酸残基を含む、[2 0] に記載の方法、
[2 2] 前記 S M Y D 2 結合ドメインを含むポリペプチドが、配列番号 6 5 の 5 0 0 位 ~ 7 2 4 位のアミノ酸残基を含む、[2 0] に記載の方法、
[2 3] 以下の段階を含む、癌の治療および予防または癌細胞成長の阻害のいずれかまたは両方のための候補物質をスクリーニングする方法：
(a) S M Y D 2 ポリペプチドの R B 1 結合ドメインを含むポリペプチドを、R B 1 ポリペプチドの S M Y D 2 結合ドメインを含むポリペプチドと、試験物質の存在下で接触させる段階；
(b) 前記ポリペプチド間の結合を検出する段階；および
(c) 段階 (b) で検出された結合レベルを、前記試験物質の非存在下で検出されたものと比較する段階；および
(d) 前記ポリペプチド間の結合を阻害する試験物質を、癌の治療および予防または癌細胞成長の阻害のいずれかまたは両方のための候補物質として選択する段階、
[2 4] 前記 R B 1 結合ドメインを含むポリペプチドが、配列番号 6 3 の 3 3 0 位 ~ 4 3 3 位のアミノ酸残基を含む、[2 3] に記載の方法、

10

20

30

40

50

[2 5] 前記 S M Y D 2 結合ドメインを含むポリペプチドが、配列番号 6 8 の 7 7 3 位 ~ 8 1 3 位のアミノ酸残基を含む、[2 3] に記載の方法、

[2 6] 以下の段階を含む、癌を治療もしくは予防するかまたは癌細胞成長を阻害するための候補物質をスクリーニングする方法：

(a) 試験物質を、S M Y D 2 遺伝子および R B 1 遺伝子を発現する細胞と接触させる段階；

(b) 段階 (a) の R B 1 ポリペプチドまたは該 R B 1 ポリペプチドの機能的等価物のリン酸化レベルを検出する段階；および

(c) 前記ポリペプチドまたは前記ポリペプチドの機能的等価物のリン酸化レベルを前記試験物質の非存在下で検出されたリン酸化レベルと比較して低下させる試験物質を選択する段階、

10

[2 7] R B 1 ポリペプチドのリン酸化レベルが、配列番号 6 8 のセリン 8 0 7 および / またはセリン 8 1 1 でリン酸化された R B 1 に対する抗体によって検出される、[2 6] に記載の方法、

[2 8] 以下の構成要素を含む、癌の治療および予防または癌細胞成長の阻害のいずれかまたは両方のための候補物質をスクリーニングするためのキット：

(a) S M Y D 2 ポリペプチドまたは S M Y D 2 ポリペプチドの機能的等価物；

(b) (i) ~ (i i i) からなる群より選択される構成要素

(i) ヒストンタンパク質、または少なくとも 1 つのメチル化部位を含むヒストンタンパク質の断片、

20

(i i) H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドまたは H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドの機能的等価物；

(i i i) R B 1 ポリペプチドまたは R B 1 ポリペプチドの機能的等価物；

(c) (i) ~ (i i i) からなる群より選択される試薬；

(i) ヒストンタンパク質またはヒストンタンパク質の機能的等価物のメチル化レベルを検出するための試薬；

(i i) H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドまたは H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドの機能的等価物のメチル化レベルを検出するための試薬；

(i i i) R B 1 ポリペプチドまたは R B 1 ポリペプチドの機能的等価物のメチル化レベルを検出するための試薬；および

30

(d) メチル供与体、

[2 9] ヒストンタンパク質が、ヒストン H 4 またはヒストン H 3 である、[2 8] に記載のキット、

[3 0] 段階 (c) (i) の試薬が、メチル化ヒストン H 4 タンパク質またはメチル化ヒストン H 3 タンパク質に対する抗体である、[2 8] に記載のキット、

[3 1] 段階 (c) (i i) の試薬が、配列番号 6 5 のリジン 5 3 1 および / またはリジン 5 7 4 でメチル化された H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドに対する抗体である、[2 8] に記載のキット、

[3 2] 段階 (c) (i i i) の試薬が、配列番号 6 8 のリジン 8 1 0 でメチル化された R B 1 ポリペプチドに対する抗体である、[2 8] に記載のキット、ならびに

40

[3 3] 前記メチル供与体が、S - アデノシルメチオニンである、[2 8] ~ [3 2] のいずれかに記載のキット。

【 0 0 1 8 】

当業者であれば、本発明の 1 つまたは複数の局面が特定の目的を満たすことができる一方、1 つまたは複数の他の局面が他の特定の目的を満たすことができることを理解するであろう。各目的は、すべての点が、等しく本発明のすべての局面に当てはまらない場合がある。したがって、前述の目的は、本発明の任意の一態様に関して択一的に考慮することができる。

【 0 0 1 9 】

本発明のこれらおよび他の目的および特徴は、添付の図面および実施例と併せて以下の

50

詳細な説明を読めば、さらに十分に明らかになるであろう。しかしながら、上述の本発明の概要および以下の詳細な説明はいずれも例示的な態様のものであり、本発明または本発明の他の代替的な態様を限定するものではないことが理解されるべきである。本発明の他の目的および特徴は、添付の図面および実施例と併せて以下の詳細な説明を読めば、さらに十分に明らかになるであろう。

【0020】

特に、本発明を多数の特定の態様を参照して本明細書において説明するが、その説明は本発明を例証するものであり、本発明を限定するものとして構成されていないことが認識されよう。当業者であれば、添付の特許請求の範囲によって記載される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変更および適用に想到することができる。同様に、本発明の他の目的、特徴、利益、および利点は、本概要および以下に記載される特定の態様から明らかになり、当業者には容易に明白になるであろう。このような目的、特徴、利益、および利点は、添付の実施例、データ、図面、およびそれらから引き出されるあらゆる妥当な推論と併せて上記から、単独で、または本明細書に組み入れられる参考文献を考慮して、明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0021】

本発明の様々な局面および適用は、以下の図面の簡単な説明ならびに本発明の詳細な説明およびその好ましい実施形態を考慮することで、当業者に明白になるであろう。

【図1A-C】図1は、SMYD2が癌組織および癌細胞で過剰発現していることを実証する。パートAは、膀胱癌症例125例および正常膀胱症例28例におけるmRNAレベルでのSMYD2についてのqRT-PCRによる発現分析を示す。結果は、箱髷図によって示す。ハウスキーピング遺伝子としてGAPDHおよびSDHを使用した。マンホイットニーU検定を統計分析に使用した($P < 0.0001$)。パートBは、膀胱癌試料と正常器官組織との間のSMYD2のmRNAレベルの比較を示す。正常器官組織には、脳、乳房、大腸、食道、眼、心臓、肝臓、肺、膵臓、胎盤、腎臓、直腸、脾臓、胃および精巣が含まれる。パートCは、膀胱癌組織および正常膀胱組織の免疫組織化学分析を示す。すべての組織試料は、BioChainから購入した。元の倍率： $\times 200$ 。

【0022】

【図1D-E】パートDは、1種の非癌性細胞株(WI-38)、12種の膀胱癌細胞株(SW780、J82、RT4、UMUC3、HT1197、HT1376、5637、EJ28、T24、253J、253JBVおよびSCABER)、5種の肺癌細胞株(REF-LC-AI、LC319、H2170、A549およびSBC5)、2種の大腸癌細胞株(LoVoおよびHCT116)および1種の肝臓癌細胞株(SNU475)におけるmRNAレベルでのSMYD2発現レベルを調べるためのqRT-PCR分析の結果を示す。パートEは、様々な種類の細胞株におけるタンパク質レベルでのSMYD2発現レベルを示す。抗SMTD2および抗ACTB(内部標準)抗体を用いて、大腸線維芽細胞株CCD-18Co、2種の膀胱癌細胞株(RT4およびSW780)、2種の肺癌細胞株(A549およびSBC5)、1種の大腸癌細胞株(HCT116)および1種の子宮頸癌細胞株(HeLa)のライセートをイムノブロットした。

【0023】

【図1F-1】パートFは、OncoPrintにおける遺伝子発現データの分析を示す。枠内の太いバーは平均発現レベルであり、枠は試料の95%を表す。エラーバーは枠の上下にあり、発現レベルの範囲は2個の点によって囲まれる。

【0024】

【図1F-2】図1F-2は、図1F-1の続きである。

【0025】

【図1F-3】図1F-3は、図1F-2の続きである。

【0026】

【図1F-4】図1F-4は、図1F-3の続きである。

【0027】

【図2A - C】図2は、SMYD2が癌細胞成長に関与することを実証する。パートAは、SMYD2ノックダウンのタンパク質レベルでの検証を示す。抗SMYD2および抗ACTB（内部標準）抗体を用いて、siRNA処理72時間後のSW780およびRT4細胞のライセートをイムノブロットした。パートBは、膀胱癌細胞株（SW780およびRT4）の増殖に対するSMYD2ノックダウンの効果を、Cell Counting Kit-8によって測定したもの示す。相対細胞数は、siNC処理細胞数に対して標準化する（siNC = 1）：結果は、3回の独立した実験の平均 + / - SD（エラーバー）である。P値は、スチューデントt - 検定を使用して計算した（*、 $P < 0.05$ ）。パートCは、SMYD2のメチル化活性が、その成長促進効果に重要であることを示す。FLAG-Mock、-SMYD2（WTまたはNHSC / GEEV）をCOS7細胞にトランスフェクトし、トランスフェクション10日後にギムザ染色を実施した。抗FLAG抗体を使用してウエスタンブロットによって、SMYD2（WTまたはNHSC / GEEV）の発現を確認した。ACTBの発現は、対照として役立った。

10

【0028】

【図2D - E】パートDは、SMYD2が細胞周期のG₁ / S移行を促進することを示す。細胞周期状態によって細胞を分類する、FACS結果の数値解析。S期のT-REX-SMYD2細胞の割合は、対照細胞（T-REX-MockおよびT-REX-CAT）よりもわずかに多い。3回の独立した実験の平均 + / - SD（エラーバー）。フィッシャーPLSD事後検定を使用して、P値を計算した（**、 $P < 0.01$ ；*、 $P < 0.05$ ）。パートEは、材料および方法に記載されているように、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）結合抗BrdUおよび7-アミノ-アクチノマイシンD（7-AAD）で複合染色した後にフローサイトメトリーによって分析した細胞周期分布を示す。

20

【0029】

【図2F - G】パートFは、肺癌細胞株の増殖に対するSMYD2ノックダウンの効果を示す。相対細胞数は、Cell Counting kit8によって測定し、siNC処理細胞数に対して標準化する（siNC = 1）：結果は、3回の独立した実験の平均 + / - SDである。P値は、スチューデントt - 検定を使用して計算した（*、 $P < 0.05$ ）。パートGは、HeLa細胞における細胞周期動態に対するsiSMYD2の効果を示す。細胞周期分布は、材料および方法に記載されているように、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）結合抗BrdUおよび7-アミノ-アクチノマイシンD（7-AAD）で複合染色した後にフローサイトメトリーによって分析した。

30

【0030】

【図3A - D】図3は、SMYD2が、細胞質においてHSP90AB1と複合体を形成することを実証する。パートAは、FLAG-MockまたはFLAG-SMYD2を発現する細胞の免疫沈降物の銀染色を示す。FLAG-MockまたはFLAG-SMYD2を293T細胞にトランスフェクトし、抗FLAG M2アガロースを使用して免疫沈降した。免疫沈降物をSDS-PAGEおよび銀染色、続いて質量分析に供した。パートBは、HA-HSP90AB1またはHA-MockおよびFLAG-SMYD2発現ベクターを293T細胞にコトランスフェクトし、抗FLAGおよび抗HA抗体でHA-免疫沈降物をイムノブロットしたことを示す。パートCは、FLAG-SMYD2と内因性HSP90との相互作用を示す。相互作用は、抗HSP90および抗FLAG抗体を使用して、FLAG-免疫沈降物のウエスタンブロットによって確認した。パートDは、SMYD2のSETドメインを含んでいた領域が、HSP90AB1との相互作用に必要であることを示す。HA-HSP90AB1発現ベクターおよび6種の異なる長さのFLAG-SMYD2発現ベクター（[1~433]、[1~100]、[1~250]、[100~433]、[250~433]および[330~433]）を293T細胞にコトランスフェクトした。抗HAアガロースビーズを使用して免疫沈降を実施し、抗FLAGおよび抗HA抗体で試料をイムノブロットした。

40

【0031】

50

【図3E-H】パートEは、HSP90AB1に対するSMYD2の結合領域の概略図を示す。パートFは、HSP90AB1のC末端領域がSMYD2への結合に必要であることを示す。FLAG-SMYD2発現ベクターおよび4種の異なる長さのHA-HSP90AB1ベクター（[1~724]、[1~500]、[250~724]および[500~724]）を293T細胞にコトランスフェクトした。抗FLAGおよび抗HA抗体でHA-免疫沈降物をイムノブロットした。パートGは、SMYD2に対するHSP90AB1の結合領域の概略図を示す。パートHは、SMYD2およびHSP90AB1がHeLa細胞で共局在していることを示す。抗SMYD2（Alexa Fluor（登録商標）488）および抗HSP90（Alexa Fluor（登録商標）594）抗体、ならびにDAPIでHeLa細胞を染色した。スケールバーは、10マイクロメートルを表す。

10

【0032】

【図4A-C】図4は、SMYD2が、K531およびK574でHSP90AB1をメチル化することを実証する。パートAは、SMYD2による用量依存的なHSP90AB1のメチル化を示す。精製His-HSP90AB1およびHis-SMYD2組換えタンパク質を使用してインビトロのメチルトランスフェラーゼ反応を実施し、フルオログラフィーでメチル化HSP90AB1を可視化した。ロードするタンパク質量は、ボンソーSで膜を染色することによって確認した。パートBは、インビボの標識実験による、ヒト細胞におけるHSP90のメチル化を示す。FLAG-Mock、FLAG-SMYD2（WT）またはFLAG-SMYD2（NHSC / GEEV）発現ベクターを293T細胞にトランスフェクトし、シクロヘキシミドおよびクロラムフェニコールを含む無メチオニン培地で処理した。次いで、それらをL-[メチル-³H]メチオニンで5時間標識した抗HSP90抗体で細胞ライセートを免疫沈降し、フルオログラフィーによってメチル化HSP90を可視化した。ボンソーSで膜を染色し、抗HSP90、抗FLAGおよび抗ACTB（内部標準）抗体で全細胞ライセートをイムノブロットした。パートCは、HSP90AB1のC末端領域（500~724）がSMYD2によってメチル化されたことを示す。5種の異なる長さのGST-HSP90AB1およびHis-SMYD2を使用して、インビトロのメチルトランスフェラーゼアッセイを実施した。フルオログラフィーによってメチル化活性を可視化し、CBB染色を行ってタンパク質量を確認した。

20

【0033】

【図4D】パートDは、モノメチル化HSP90AB1ペプチドに対応するMS/MSスペクトルを示す。リジン594残基の14Daの増加が観察されたが、これは、リジン594がモノメチル化されたことを実証している。スコアおよび予想は、それぞれマスコットイオンスコアおよびマスコットデータベース検索結果の予想値を示す。

30

【0034】

【図4E-G】パートEは、HSP90AB1のメチル化部位の概略図を示す。パートFは、His-SMYD2および完全長His-HSP90AB1（WT、K531A / K574AおよびK574A）を使用するインビトロのメチルトランスフェラーゼアッセイの結果を示す。S-アデノシル-L-[メチル-³H]メチオニンの存在下でHis-SMYD2および完全長His-HSP90AB1（WT、K531A / K574AおよびK574A）を反応させ、混合物をSDS-PAGEに供し、フルオログラムによって可視化した。ボンソーSで膜を染色した。パートGは、His-SMYD2および部分的なHis-HSP90AB1 [500~724]（WT、K531AおよびK574A）を使用するインビトロのメチルトランスフェラーゼアッセイの結果を示す。S-アデノシル-L-[メチル-³H]メチオニンの存在下でHis-SMYD2および部分的なHis-HSP90AB1 [500~724]（WT、K531AおよびK574A）を反応させ、混合物をSDS-PAGEに供し、フルオログラムによって可視化した。ボンソーSで膜を染色した。

40

【0035】

【図4H-I】パートHは、SMYD2によってメチル化されたHSP90AB1の概略

50

図を示す。HSP90AB1の500位～724位の部分が、SMYD2による推定メチル化領域である。パートIは、HSP90AB1のアミノ酸配列を示す。リジン531および574は、ヒト（ホモ・サピエンス（*Homo sapiens*））、ウサギ（カイウサギ（*Oryctolagus cuniculus*））、ラット（ドブネズミ（*Rattus norvegicus*））、マウス（ハツカネズミ（*Mus musculus*））、ツメガエル（アフリカツメガエル（*Xenopus laevis*））およびゼブラフィッシュ（ダニオ・レリオ（*Danio retio*））を含む様々な種にわたって保存されている。

【0036】

【図5A-E】図5は、K574のメチル化が、HSP90AB1シャペロン複合体の形成に重要であることを実証する。パートAはインビボの架橋アッセイを示し、HSP90AB1のメチル化依存的な架橋を示している。siSMYD2#2でHeLa細胞を処理し、siRNA処理24時間後に、FLAG-HSP90AB1（WT）およびHA-MockまたはHA-SMYD2発現ベクターを細胞にトランスフェクトし、続いて、L-フォト-ロイシンおよびL-フォト-メチオニンを含有するDMEM-LMの存在下でUV照射した。次いで、抗FLAG、抗SMYD2および抗ACTB（内部標準）抗体で細胞ライセートをイムノブロットした。パートBは、HA-SMYD2発現ベクターの存在下において、FLAG-MockまたはFLAG-HSP90AB1（WT）およびHA-HSP90AB1（WTまたはK531A/K574A）発現ベクターをコトランスフェクトした293T細胞を使用する免疫沈降分析の結果を示す。抗FLAG（登録商標）M2アガロースビーズを使用して免疫沈降を実施し、抗FLAGおよび抗HA抗体で試料をイムノブロットした。パートCは、HA-SMYD2発現ベクターの存在下において、FLAG-MockまたはFLAG-HSP90AB1（WT）およびHA-HSP90AB1（WT、K531AまたはK574A）発現ベクターをコトランスフェクトした293T細胞を使用する免疫沈降分析の結果を示す。抗FLAG（登録商標）M2アガロースビーズを使用して免疫沈降を実施し、抗FLAGおよび抗HA抗体で試料をイムノブロットした。パートDおよびEは、HSP90AB1のK574のメチル化が、いくつかのコシャペロンへの結合に重要であることを示す。HA-SMYD2発現ベクターの存在下において、FLAG-HSP90AB1（WT）またはFLAG-HSP90AB1（K531A/K574A）（D）、FLAG-Mock、FLAG-HSP90AB1（WT）、FLAG-HSP90AB1（K531A）またはFLAG-HSP90AB1（K574A）（E）発現ベクターを293T細胞にトランスフェクトした。抗FLAG（登録商標）M2アガロースビーズで免疫沈降を実施し、抗HOP、抗Cdc37、抗p23、抗HSP90meK574me1および抗FLAG抗体で試料をイムノブロットした。

【0037】

【図5F-G】パートFは、SMYD2依存性のメチル化によるHSP90AB1二量体化の促進を示す。SMYD2の存在下または非存在下におけるHSP90AB1のインビトロのメチルトランスフェラーゼ反応の後、BSによってHSP90AB1を架橋し、続いてSDS-PAGE、および抗HSP90抗体を使用するウェスタンブロッティングを行った。フルオログラムによってメチル化活性を検証し、ボンソーSで膜を染色して、ロードするタンパク質量を可視化した。パートGは、抗モノメチル化HSP90AB1K574me1抗体の力価および特異性の、ELISAによる分析を示す。

【0038】

【図5Ha-b】パートHは、HSP90AB1のメチル化が癌細胞成長を促進することを示す。パートHaは、FLAG-HSP90AB1（WTまたはK531A/K574A）を安定発現するHeLa細胞におけるHSP90AB1（WTまたはK531A/K574A）発現の検証を示す。FLAG-HSP90（WTまたはK531A/K574A）を安定発現するHeLa細胞を構築し、抗FLAGおよび抗ACTB（内部標準）抗体でライセートをイムノブロットした。パートHbは、Cell Counting k

i t 8を使用して24時間ごとに実施した細胞成長アッセイの結果を示す。相対細胞数は、HSP90AB1(WT)を発現する細胞の数に対して標準化する：結果は、3回の独立した実験の平均+/-SDである。P値は、スチューデントt-検定を使用して計算した(*、 $P < 0.05$)。

【0039】

【図6A-C】図6は、SMYD2がRB1をメチル化し、そのC末端ドメインを介して複合体を作ることを実証する。パートAは、RB1がSMYD2によってメチル化されることを実証する。精製N-RAS、H-RAS、K-RAS、RB1、p53、Aurora BおよびAKT1組換えタンパク質を使用して、インビトロのメチルトランスフェラーゼ反応を実施した。フルオログラフィーでメチル化タンパク質を可視化した。パートBおよびCは、SMYD2およびRB1タンパク質の免疫共沈降アッセイの結果を示す。SMYD2発現ベクターおよびRB1発現ベクターまたはmock対照ベクターを293T細胞にコトランスフェクトした。抗FLAG M2アガロースを使用して免疫沈降によって、FLAG-SMYD2とHA-RB1(B)との、またはFLAG-RB1とHA-SMYD2(C)との相互作用を調べ、抗FLAGおよび抗HA抗体でイムノブロットした。

10

【0040】

【図6D-E】パートDは、SMYD2のC末端領域がRB1との相互作用に必須であることを実証する。FLAG-RB1発現ベクターおよび3種の異なる領域のHA-SMYD2ベクター(SMYD2タンパク質の1位~250位、250位~330位および320位~433位のアミノ酸)を293T細胞にコトランスフェクトした。FLAG M2アガロースを使用して免疫沈降を実施し、抗FLAGおよび抗HA抗体で試料をイムノブロットした。パートEは、SMYD2およびRB1タンパク質がSBC5細胞で共局在していることを実証する。抗RB1(Alexa Fluor(登録商標)488)および抗SMYD2(Alexa Fluor(登録商標)594)抗体、ならびにDAPIでSBC5細胞を染色した。スケールバーは、30マイクロメートルを表す。

20

【0041】

【図7A】図7は、SMYD2がRB1をK810でメチル化することを実証する。パートAは、RB1のC末端領域がSMYD2によってメチル化されることを実証する。精製RB1組換えタンパク質[RB1(完全)、RB1(1~378)、RB1(379~928)およびRB1(773~928)]を使用して、インビトロのメチルトランスフェラーゼアッセイを実施し、フルオログラフィーでメチル化タンパク質を可視化した。

30

【0042】

【図7B】パートBは、モノメチルRB1ペプチドのMS/MSスペクトルを示す。RB1タンパク質(773~928)をSMYD2で処理し、次いで混合物をSDS-PAGEに供した。CBB染色の後、25kDaのタンパク質バンドをAPIで消化し、LC-MS/MSに供した。モノメチル化RB1のスペクトルを示す。*Kは、モノメチルリジンを示す。

【0043】

【図7C-D】パートCは、K810A-RB1がSMYD2によってメチル化されないことを実証する。RB1(773~928、773~813)、K810A-RB1(773~813)を使用して、インビトロのメチルトランスフェラーゼアッセイを実施した。パートDおよびEは、抗K810me RB1抗体の検証を示す。RB1(全長)およびRB1(773~928)(D)またはRB1(773~813)およびK810A-RB1(773~813)(E)を用いて、インビトロのメチルトランスフェラーゼアッセイを行った。抗RB1K810meおよび抗His(内部標準)抗体で試料をイムノブロットした。

40

【0044】

【図7E-F】パートEは、抗K810me RB1抗体の検証を示す。RB1(773~813)およびK810A-RB1(773~813)を用いて、インビトロのメチル

50

トランスフェラーゼアッセイを行った。パートFは、FLAG-WT-RB1ベクターまたはFLAG-K810A-RB1ベクターおよびHA-WT-SMYD2ベクターまたはHA-SMYD2(NHSC/GEEV)ベクターを293T細胞にコトランスフェクトしたことを示す。抗FLAG M2アガロースを使用して免疫沈降を実施し、抗RB1 K810me、抗FLAGおよび抗HA抗体で試料をイムノプロットした。

【0045】

【図8A-C】図8は、SMYD2によるRB1のリン酸化の促進を実証する。パートAは、SMYD2の発現レベルがRB1のリン酸化レベル(セリン807/811)と相関することを示す。正常細胞株(CCD18CoおよびHFL1)および癌細胞株(HeLa、ACC-LC-319、A549、SW480、SW780、HCT116およびSBC5)のライセートを、抗p-RB1(セリン807/811)、抗SMYD2および抗ACTB(内部標準)抗体でイムノプロットした。パートBは、FLAG-SMYD2ベクターおよびmockベクター(陰性対照)を293T細胞にトランスフェクトしたことを示す。コンプリートプロテアーゼ阻害剤カクテルを含有するRIPA様緩衝液で細胞を溶解させ、抗FLAG、抗ホスホ(phospho)-RB1(セリン807/811)および抗RB1(内部標準)抗体で試料をイムノプロットした。パートCは、HA-SMYD2ベクターをトランスフェクトしたHeLa細胞における免疫細胞化学的分析の結果を示す。HA-SMYD2ベクターをHeLa細胞にトランスフェクトした後、4%パラホルムアルデヒド(PFA)で細胞を固定し、0.5%Triton X-100で透過処理した。固定した細胞を、抗ホスホ-RB1(セリン807/811)(Alexa Fluor(登録商標)488)および抗HA(Alexa Fluor(登録商標)594)抗体、ならびにDAPIで染色した。

【0046】

【図8D-E】パートDは、SMYD2のノックダウンがRB1(セリン807/811)のリン酸化レベルを低下させることを示す。SMYD2特異的siRNAを使用してSMYD2をノックダウンした後、コンプリートプロテアーゼ阻害剤カクテルを含有するRIPA様緩衝液で細胞を溶解させた。抗SMYD2、抗ホスホ-RB1(セリン807/811)および抗RB1(内部標準)抗体を用いて、イムノプロットを実施した。パートEは、FLAG-RB1(773~813)ベクターおよびHA-WT-SMYD2ベクターおよびHA-SMYD2(NHSC/GEEV)ベクターをトランスフェクトした293T細胞を使用する免疫沈降分析の結果を示す。抗FLAG M2アガロースを用いて免疫沈降を行った。抗FLAG、抗ホスホ-RB1(セリン807/811)および抗ホスホ-RB1(セリン780)抗体をイムノプロット分析に使用した。

【0047】

【図9A-C】図9は、リジン810におけるSMYD2依存性のRB1のモノメチル化が、セリン807/811におけるRB1のリン酸化をインビトロで増加させることを実証する。パートAは、連続的なインビトロのメチル化およびキナーゼアッセイの研究戦略を示す。パートBは、BSA(陰性対照)と反応させる基質として組換えRB1(773~813)タンパク質を使用するか、または酵素としてSMYD2を使用して実施したインビトロのメチルトランスフェラーゼアッセイの結果を示す。抗RB1 K810me抗体を用いてウエスタンブロットによってRB1のメチル化を確認した後、CDK4/サイクリンD1複合体を酵素として使用してインビトロのキナーゼアッセイを行った。抗ホスホ-RB1(セリン807/811)抗体で試料をイムノプロットした。ロードするタンパク質およびペプチドの量は、MemCode(商標)Reversible Protein Stain(Thermo Scientific)によって可視化した。パートCは、リジン810におけるRB1のメチル化が、RB1(セリン807/811)のリン酸化レベルを促進することを示す。いくつかの異なる用量のSMYD2で処理したRB1のインビトロのメチルトランスフェラーゼアッセイの後、CDK4/サイクリンD1複合体を酵素として用いてインビトロのキナーゼアッセイを実施した。抗ホスホ-RB1(セリン807/811)および抗RB1 K810me抗体で試料をイムノプロットした

。ロードするタンパク質およびペプチドの量は、MemCode (商標) Reversible Protein Stain (Thermo Scientific) によって可視化した。

【0048】

【図9D-F】パートDは、WT-RB1 (773~813) およびK810A-RB1 (773~813) を用いるインビトロのメチルトランスフェラーゼおよびキナーゼアッセイの結果を示す。抗RB1 K810me、抗ホスホ-RB1 (セリン807/811) および抗His (内部標準) 抗体をイムノブロット分析に使用した。パートEは、RB1のメチル化および非メチル化ペプチドの配列を示す。パートFは、CDK4/サイクリンD1を酵素源として用いて実施した、K810メチル化または非メチル化RB1ペプチドのインビトロのキナーゼアッセイの結果を示す。抗RB1 K810meおよび抗ホスホ-RB1 (セリン807/811) 抗体をイムノブロット分析に使用した。ロードするペプチド量は、MemCode (商標) Reversible Protein Stain (Thermo Scientific) によって可視化した。2回の独立した実験の平均+/-SD (エラーバー) である。P値は、スチューデントt-検定を使用して計算した (**、 $P < 0.01$)。

10

【0049】

【図9G】パートGは、2種の異なる用量のCDK4/サイクリンD1で処理したRB1ペプチドのインビトロのキナーゼアッセイの結果を示す。ロードするペプチド量は、MemCode (商標) Reversible Protein Stain (Thermo Scientific) によって可視化した。

20

【0050】

【図10A-B】図10は、RB1のリジン810のメチル化が、RB1のリン酸化およびE2Fルシフェラーゼ活性をインビボで促進することを実証する。パートAは、HA-WT-SMYD2ベクターおよびFLAG-WT-RB1ベクターまたはFLAG-K810A-RB1ベクターをトランスフェクトした293T細胞を使用する免疫沈降分析の結果を示す。抗FLAG M2アガロースを用いて、免疫沈降を行った。抗FLAG、抗RB1 K810meおよび抗ホスホ-RB1 (セリン807/811) 抗体をイムノブロット分析に使用した。パートBは、FLAG-WT-RB1 (773~813) ベクターまたはFLAG-K810A-RB1 (773~813) ベクターおよびHA-WT-SMYD2ベクターをトランスフェクトした293T細胞を使用する免疫沈降分析の結果を示す。抗FLAG M2アガロースを用いて、免疫沈降を行った。抗FLAG、抗RB1 K810meおよび抗ホスホ-RB1 (セリン807/811) 抗体をイムノブロット分析に使用した。

30

【0051】

【図10C-D】パートCは、WT-RB1およびK810A-RB1を293T細胞で過剰発現させた後のE2F受容体アッセイの結果を示す。3回の独立した実験の平均+/-SD (エラーバー)。P値は、スチューデントt-検定を使用して計算した (**、 $P < 0.001$)。パートDは、SMYD2によるRB1のメチル化を介したRB1のリン酸化の動的調節の概略モデルを示す。

40

【0052】

【図11】図11は、SMYD2処理後またはSMYD2非処理後にRB1の酸加水分解によって得られたアミノ酸のクロマトグラムを示す。挿入図は、アルギニンの周辺領域の拡大図を示す。モノメチル化リジン (MK) およびノルバリン (n-V) を除いて、アミノ酸残基は、それらの1文字略語を使用して注釈を付ける。NH₃ : アンモニア、AMQ : アミノ酸誘導体化試薬による加水分解から生じた6-アミノキノリン。

【0053】

【図12】図12は、Flp-In T-REx 293細胞株の細胞成長分析の結果を示す。本発明者らは、Flp-In (商標) T-REx (商標) system (Life technologies) を使用して、野生型RB1 (RB1-WT) およびK81

50

0 置換 R B 1 (R B 1 - K 8 1 0 A) を過剰発現することができる安定細胞株を樹立した。野生型および K 8 1 0 置換 R B 1 タンパク質の両方を、1 マイクログラム / m l のドキシサイクリンによって誘導した。細胞数は C e l l C o u n t i n g K i t - 8 (D o j i n d o) によって計算し、y 値は 1 日目に対する相対細胞数を示す (d 1 = 1) 。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 5 4 】

態様の説明

本明細書に記載されるものと類似または等価な任意の方法および材料を、本発明の態様の実施または試験に使用することができるが、好ましい方法、装置および材料をこれから説明する。しかしながら、本材料および本方法を説明する前に、本発明が、本明細書に記載される特定のサイズ、形、寸法、材料、方法論、プロトコルなどに限定されず、これらがルーチンな実験法および最適化にしたがって変動し得ることが理解されるべきである。また、本明細書で使用される用語は、特定の形式または態様を記載するためのものに過ぎず、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を限定することを意図していないことも理解されるべきである。

【 0 0 5 5 】

本明細書で言及される各刊行物、特許、または特許出願の開示は、参照によりその全体が具体的に本明細書に組み入れられる。しかしながら、本明細書のいかなる記載も、本発明が、先行発明によるこのような開示に先行している資格を有しないことの承認として解釈されるべきではない。

特に定義がない限り、本明細書で使用されるすべての専門用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者により一般に理解されるものと同じ意味を有する。矛盾が生じた場合には、定義を含む本明細書が優先される。加えて、材料、方法、および実施例は例証に過ぎず、限定を意図するものではない。

【 0 0 5 6 】

定義

「1つの (a)」、「1つの (a n)」、および「その (t h e)」という単語は、本明細書で使用される場合、特に指定のない限り、「少なくとも1つの」を意味する。

「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸」、および「核酸分子」という用語は、核酸残基のポリマーを指すのに本明細書において互換的に使用され、かつ特記しない限り、その一般に認められている1文字コードで呼ばれる。これらの用語は、1つまたは複数の核酸がエステル結合によって結合している核酸 (ヌクレオチド) ポリマーに適用される。核酸ポリマーは、DNA、RNA、またはそれらの組み合わせから構成されてもよく、天然に存在する核酸ポリマーおよび天然に存在しない核酸ポリマーの両方を包含する。ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、核酸、または核酸分子は、DNA、RNA またはそれらの組み合わせから構成され得る。

【 0 0 5 7 】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すのに本明細書において互換的に使用される。これらの用語は、天然に存在するアミノ酸および合成アミノ酸のみならず、アミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体のアミノ酸ポリマーであって、1つまたは複数のアミノ酸残基が修飾された残基であるか、または対応する天然に存在するアミノ酸の人工化学的模倣体などの天然に存在しない残基である、アミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体のアミノ酸ポリマーを指す。

【 0 0 5 8 】

「アミノ酸」という用語は、天然に存在するアミノ酸および合成アミノ酸のみならず、天然に存在するアミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を指す。天然に存在するアミノ酸は、遺伝暗号によってコードされたもの、ならびに細胞内で翻訳後に修飾されたもの (例えば、ヒドロキシプロリン、 - カルボキシグルタミン酸、および O - ホスホセリン) である。「アミノ酸類似体」という語句は、天然に存在するアミノ酸と同一の基本化学構造 (水素に結合した炭素、カルボキシ基、アミノ基、および R 基

）を有するが、修飾されたR基または修飾された骨格を有する化合物（例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニン、スルホキシド、メチオニンメチルスルホニウム）を指す。「アミノ酸模倣体」という語句は、一般的なアミノ酸と異なる構造を有するが、類似した機能を有する化合物を指す。

アミノ酸は、本明細書において、IUPAC - IUB 生化学命名委員会 (Biochemical Nomenclature Commission) によって推奨された、それらの一般的に公知の3文字記号または1文字記号により言及される場合もある。

【0059】

本発明との関連において、「SMYD2遺伝子」、「HSP90AB1遺伝子」、または「RB1遺伝子」という語句は、ヒトのSMYD2遺伝子、HSP90AB1遺伝子もしくはRB1遺伝子、またはヒトのSMYD2遺伝子、HSP90AB1遺伝子もしくはRB1遺伝子の機能的等価物のいずれかをコードするポリヌクレオチドを包含する。SMYD2遺伝子、HSP90AB1遺伝子、またはRB1遺伝子は、従来のクローニング方法によって、または選択されたヌクレオチド配列に基づく化学合成によって、天然に存在するポリヌクレオチドとして天然から得ることができる。cDNAライブラリなどを使用して遺伝子をクローニングするための方法は、当技術分野において周知である。

【0060】

特に定義がない限り、「癌 (cancer)」という用語は、SMYD2遺伝子を過剰発現する癌を指す。SMYD2遺伝子を過剰発現する癌の例には、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌が含まれるが、これらに限定されない。

【0061】

物質（例えば、ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチドなど）に関連して使用される「単離された」および「精製された」という用語は、物質が、その元の環境（例えば、天然に存在する場合は、天然の環境）から取り出され、そのようにしてその天然の状態と入れ替わることを示す。単離された核酸の例には、組換え技術によって作製された場合には、他の細胞物質もしくは培養培地を実質的に含まないか、または化学合成された場合には、前駆化学物質もしくは他の化学物質を実質的に含まないDNA（例えば、cDNA）、RNA（例えば、mRNA）、およびそれらの誘導体が含まれる。好ましい実施形態において、本発明のペプチドをコードする核酸分子は、単離または精製されている。

【0062】

本発明との関連において、「単離された」または「精製された」ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは抗体は、天然起源に別に含まれ得る1つまたは複数の混入物質を実質的に含まない。したがって、単離されたまたは精製された抗体は、タンパク質（抗体）が由来する細胞もしくは組織起源に由来する、炭水化物、脂質、もしくは他の混入タンパク質などの細胞物質を実質的に含まないか、または化学合成された場合には、前駆化学物質もしくは他の化学物質を実質的に含まない抗体を指す。「細胞物質を実質的に含まない」という用語には、ポリペプチドの単離元であるか、または組換えにより作製されたポリペプチドの元となる細胞の細胞成分からポリペプチドが分離されている、ポリペプチドの調製物が含まれる。

【0063】

したがって、細胞物質を実質的に含まないポリペプチドには、（乾燥重量で）約30%、20%、10%、または5%未満の異種タンパク質（本明細書において、「混入タンパク質」とも呼ばれる）を有するポリペプチドの調製物が含まれる。ポリペプチドが組換えにより作製される場合には、それは、好ましくは、培養培地も実質的に含まず、このようなポリペプチドには、タンパク質調製物の容積の約20%、10%、または5%未満の培養培地を含むポリペプチド調製物が含まれる。ポリペプチドが化学合成によって作製される場合には、それは、好ましくは、前駆化学物質または他の化学物質を実質的に含まず、このようなポリペプチドには、タンパク質調製物の容積の（乾燥重量で）約30%、20%、10%、5%未満の、タンパク質の合成に関与する前駆化学物質または他の化学物質

を含むポリペプチド調製物が含まれる。特定のタンパク質調製物が、単離または精製されたポリペプチドを含有することは、例えば、タンパク質調製物のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) - ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびゲルのクーマシー・ブリリアント・ブルー染色などの後の単一バンドの出現によって示され得る。好ましい実施形態において、本発明の抗体およびポリペプチドは、単離または精製されている。cDNA分子などの「単離された」または「精製された」核酸分子は、組換え技術によって作製された場合には、他の細胞物質もしくは培養培地を実質的に含まない可能性があり、または、化学合成された場合には、前駆化学物質もしくは他の化学物質を実質的に含まない可能性がある。好ましい実施形態において、本発明の抗体をコードする核酸分子は、単離または精製されている。

10

【0064】

本明細書で使用される場合、「生体試料 (biological sample)」という用語は、生物全体、またはその組織、細胞、もしくは構成部分 (例えば、血液、粘液、リンパ液、滑液、脳脊髄液、唾液、羊水、羊膜臍帯血、尿、腔液、および精液を含むがこれらに限定されない体液) のサブセットを指す。「生体試料」はさらに、生物全体またはその細胞、組織、もしくは構成部分のサブセットから調製されたホモジネート、ライセート、抽出物、細胞培養物、もしくは組織培養物、またはその画分もしくは一部を指す。最後に、「生体試料」は、タンパク質またはポリヌクレオチドなどの細胞成分を含有する、その中で生物が増殖した栄養ブロスまたはゲルなどの培地を指す。

【0065】

20

本発明の方法および組成物に「予防」および「予防法」との関連において有用性が見出される限り、このような用語は、疾患による死亡率および罹患率の負荷を軽減する任意の働きを意味するために本明細書において互換的に使用される。予防および予防法は「一次、二次、および三次の予防レベルで」行うことができる。一次予防および予防法は疾患の発症を回避するのに対し、二次および三次レベルの予防および予防法は、疾患の進行および症候の出現の予防および予防法、ならびに機能の回復および疾患に関連する合併症の軽減による既存の疾患の悪影響の軽減を目的とした働きを包含する。あるいは、予防および予防法は、特定の障害の重症度の緩和、例えば、腫瘍の増殖および転移の低減を目的とした広範囲の予防的治療を含むことができる。

【0066】

30

本発明のある態様が、癌の治療および/もしくは予防法、ならびに/または術後再発の予防を包含する程度において、このような方法は、以下の段階のいずれかを含み得る：癌細胞の外科的切除、癌腫細胞成長の阻害、腫瘍の退行または退縮、寛解の誘導および癌発症の抑制、腫瘍の退縮、ならびに転移の軽減または阻害。癌の有効な治療および/または予防法は死亡率を減少させ、癌を有する個体の予後を改善し、血液中の腫瘍マーカーのレベルを低下させ、癌に伴う検出可能な症候を緩和する。治療は、対象において、SMYD2 遺伝子の発現低下、または癌のサイズ、有病率もしくは転移能の減少などの臨床的利益につながる場合にも「有効」であると考えられ得る。治療が予防的に適用される場合、「有効」は、それが、癌の形成を遅延もしくは予防するか、または癌の臨床症状を予防もしくは緩和することを意味する。有効性は、特定の腫瘍型を診断または治療するための任意の公知の方法に関連して決定される。

40

【0067】

遺伝子またはタンパク質：

本発明は、SMYD2 (SET and MYND domain containing 2)、HSP90AB1 (熱ショックタンパク質90kDa (細胞質性)、クラスBメンバー1)、およびRB1 (網膜芽細胞腫1) の遺伝子、ならびにこれらの遺伝子によってコードされるタンパク質に関する。

本発明の関心対象である遺伝子の典型的な核酸およびアミノ酸配列を以下の番号で示す。しかしながら、本発明は、これらの特定の配列に限定されない：

SMYD2：配列番号62および63；

50

HSP90AB1：配列番号64および65；

RB1：配列番号67および68。

上記配列データは、以下のGenBankアクセッション番号でも利用可能である：

SMYD2：NM_020197およびNP_064582；

HSP90AB1：NM_007355およびNP_031381；

RB1：NM_000321およびNP_000312。

【0068】

本明細書において、関心対象である遺伝子、例えばSMYD2、HSP90AB1、またはRB1遺伝子によってコードされるポリペプチドは、「SMYD2（またはHSP90AB1もしくはRB1）ポリペプチド」、または「SMYD2（またはHSP90AB1もしくはRB1）タンパク質」、または単に「SMYD2」（または「HSP90AB1」もしくは「RB1」）と呼ばれる。本発明との関連において、「SMYD2（またはHSP90AB1もしくはRB1）遺伝子」という語句は、特定のヒトポリペプチドをコードするポリヌクレオチドだけではなく、ヒト遺伝子の機能的等価物をコードするポリヌクレオチドも包含する。関心対象である特定の遺伝子は、従来のクローニング方法によって、または選択されたヌクレオチド配列に基づく化学合成によって、天然に存在するポリヌクレオチドとして天然から得ることができる。上記のように、および以下により詳細に議論するように、cDNAライブラリなどを使用して遺伝子をクローニングするための方法は、当技術分野において周知である。

【0069】

本発明の一態様によれば、機能的等価物も上記「ポリペプチド」と考えられる。本明細書において、ポリペプチドの「機能的等価物」は、そのポリペプチドと等価な生物学的活性を有するポリペプチドである。すなわち、元の参照ポリペプチドの生物学的能力を保持する任意のポリペプチドを、本発明におけるこのような機能的等価物として使用することができる。

【0070】

機能的等価物の例には、SMYD2（またはHSP90ABもしくはRB1）タンパク質の天然に存在するアミノ酸配列と比べて、1つまたは複数、例えば1～5個のアミノ酸または元のアミノ酸の最大5%が置換、欠失、付加、および/または挿入されているものが含まれる。あるいは、このポリペプチドは、それぞれのタンパク質の配列に対して少なくとも約80%の相同性（配列同一性とも呼ばれる）、より好ましくは少なくとも約90%～95%の相同性、多くの場合には約96%、97%、98%、または99%の相同性を有するアミノ酸配列から構成されてもよい。特定のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの相同性は、「Wilbur and Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 80: 726-30 (1983)」のアルゴリズムにしたがって決定することができる。他の実施形態において、機能的等価物は、ストリンジェントな条件下で該遺伝子の天然に存在するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドでもよい。

本発明との関連において、ポリペプチドは、それを作製するために使用される細胞もしくは宿主、または利用される精製法に応じて、アミノ酸配列、分子量、等電点、糖鎖の有無、または形態における変動を有することができる。それでもなお、それが、関心対象であるヒトタンパク質のものと等価な機能を有する限り、それは、SMYD2（またはHSP90ABもしくはRB1）ポリペプチドの機能的等価物の範囲内である。

【0071】

天然に存在する配列に対して1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、または挿入されている変異型または修飾型の関心対象であるポリペプチドから構成される機能的等価物に関して、一般に、タンパク質中の1個、2個、またはそれ以上のアミノ酸の修飾は、そのタンパク質の機能に重大な影響を与えないか、または重大な影響を及ぼさないことが公知である。一部の場において、それは、元のタンパク質の所望の機能を促進することさえできる。実際に、変異タンパク質または修飾タンパク質（すなわち、置換、欠失、

挿入、および/または付加によって1個、2個、または数個のアミノ酸残基が修飾されたアミノ酸配列から構成されるペプチド)は、元の生物学的活性を保持することが公知である(Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 81:5662-6 (1984); Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 10:6487-500 (1982); Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 79:6409-13 (1982))。したがって、当業者であれば、単一のアミノ酸または低比率のアミノ酸(すなわち、5%未満、より好ましくは3%未満、さらにより好ましくは1%未満)を変化させる、アミノ酸配列に対する個々の付加、欠失、挿入、もしくは置換が、またはタンパク質の変化によって同様の機能を有するタンパク質が生じる「保存的修飾」とみなされるものが、本発明において許容されることを認識するであろう。したがって、一実施形態において、本発明のペプチドは、最初に開示された参照配列において1個、2個、またはさらにそれ以上のアミノ酸が付加、挿入、欠失、および/または置換されているアミノ酸配列を有してもよい。

10

【0072】

生物学的活性が維持されている限り、アミノ酸変異の部位および数は、特に限定されない。しかしながら、一般に、アミノ酸配列の5%以下、より好ましくは3%未満、さらにより好ましくは1%未満を変化させることが好ましい。したがって、好ましい実施形態において、このような変異体において変異させるべきアミノ酸の数は、一般に30アミノ酸以下、好ましくは20アミノ酸以下、より好ましくは10アミノ酸以下、より好ましくは5もしくは6アミノ酸以下、およびさらにより好ましくは3もしくは4アミノ酸以下である。

20

【0073】

変異させるべきアミノ酸残基は、好ましくは、アミノ酸側鎖の特性が保存される異なるアミノ酸に変異させられる(保存的アミノ酸置換として公知のプロセス)。アミノ酸側鎖の特性の例は、疎水性アミノ酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、および以下の官能基または特徴を共通に有する側鎖である:脂肪族側鎖(G、A、V、L、I、P);ヒドロキシル基を含有する側鎖(S、T、Y);硫黄原子を含有する側鎖(C、M);カルボン酸およびアミドを含有する側鎖(D、N、E、Q);塩基を含有する側鎖(R、K、H);ならびに芳香族を含有する側鎖(H、F、Y、W)。機能的に類似したアミノ酸を提供する保存的置換の表は、当技術分野において周知である。例えば、以下の8つの群は、各々、互いに保存的置換であるアミノ酸を含有する:

30

- 1) アラニン(A)、グリシン(G);
- 2) アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E);
- 3) アスパラギン(N)、グルタミン(Q);
- 4) アルギニン(R)、リジン(K);
- 5) イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V);
- 6) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W);
- 7) セリン(S)、スレオニン(T);および
- 8) システイン(C)、メチオニン(M)(例えば、Creighton, Proteins 1984を参照されたい)。

40

【0074】

このような保存的に修飾されたポリペプチドは、本発明のタンパク質の機能的等価物に含まれる。しかしながら、本発明はこれらに限定されず、得られる修飾ポリペプチドがポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を保持している限り、関心対象であるペプチドの機能的等価物は、非保存的修飾を含むことができる。さらに、修飾タンパク質は、多型バリエーション、種間相同体、およびこれらのポリペプチドの対立遺伝子によってコードされるものを排除しない。

【0075】

1個、2個、またはそれ以上のアミノ酸残基の付加によって修飾されたポリペプチドの例は、SMYD2ポリペプチド、HSP90AB1ポリペプチド、またはRB1ポリペ

50

チドの融合タンパク質である。融合タンパク質は、当業者に周知の技術によって、例えば、S M Y D 2 遺伝子、H S P 9 0 A B 1 遺伝子、または R B 1 遺伝子をコードする D N A を、別のペプチドまたはタンパク質をコードする D N A とフレームが一致するように連結し、この融合 D N A を発現ベクターに挿入し、これを宿主内で発現させることによって、作製することができる。融合タンパク質の「他の」成分は、典型的には、数個～12個のアミノ酸から構成される小さなエピトープである。得られる融合タンパク質が S M Y D 2 ポリペプチド、H S P 9 0 A B 1 ポリペプチド、または R B 1 ポリペプチドの目的の生物学的活性のいずれか1つを保持している限り、S M Y D 2 ポリペプチド、H S P 9 0 A B 1 ポリペプチド、または R B 1 ポリペプチドに融合させるペプチドまたはタンパク質に制限はない。

10

【0076】

本発明によって意図される例示的な融合タンパク質には、S M Y D 2 ポリペプチド、H S P 9 0 A B 1 ポリペプチド、または R B 1 ポリペプチドと、他の小さなペプチドまたはタンパク質との、例えば F L A G (Hopp TP, et al., Biotechnology 6: 1204-10 (1988))、6個の H i s (ヒスチジン) 残基を含有する 6 x H i s または 10個の H i s 残基を含有する 10 x H i s などのポリヒスチジン (H i s タグ)、インフルエンザ凝集体または凝集素 (H A)、ヒト c - m y c 断片、水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質 (V S V - G P)、p 1 8 H I V 断片、T 7 遺伝子 10 タンパク質 (T 7 タグ)、ヒト単純ヘルペスウイルス糖タンパク質 (H S V タグ)、E タグ (モノクローナルファージ上のエピトープ)、S V 4 0 T 抗原断片、I c k タグ、チューブリン断片、B タグ、プロテイン C 断片

20

【0077】

本発明によって意図される修飾タンパク質の他の例には、多型バリエーション、種間相同体、およびこれらのタンパク質の対立遺伝子によってコードされるものが含まれる。

天然に存在する関心対象である遺伝子またはタンパク質と同一の特定配列から構成される機能的等価物は、当技術分野における従来の技術、例えばハイブリダイゼーション技術 (Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Sp

30

【0078】

本明細書において使用される場合、「ストリンジェントな (ハイブリダイゼーション) 条件」という語句は、核酸分子が、その標的配列、典型的には複合的な核酸混合物中にある標的配列にハイブリダイズするが、他の配列とは検出可能にハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェントな条件は、配列依存性であり、異なる状況下で異なる。より長い配列は、より高い温度で特異的にハイブリダイズする。核酸のハイブリダイゼーションに関する広範囲のガイドは、Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biol

40

ogy--Hybridization with Nucleic Probes, 「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays」(1993)に見られる。一般に、ストリンジェントな条件は、規定のイオン強度および p H における特定の配列の熱融解点 (T m) よりも約 5 ~ 10 低く選択される。T m は、平衡状態で、標的に相補的なプローブの 50 % が、標的配列にハイブリダイズする (規定のイオン強度、p H、核濃度での) 温度である (標的配列が過剰に存在するので、T m では、平衡時に、プローブの 50 % が占有される)。ホルムアミドなどの脱安定化剤の添加によっても、ストリンジェントな条件を達成することができる。選択的または特異的なハイブリダイゼーションのため、陽性シグナルは、バックグラウンドの少なくとも 2 倍、好ましくは、バックグラウンドハイブリダイゼーションの 10 倍である。例示的なストリンジェントなハイブリダイゼーション条件には、

50

以下のものが含まれる：50%ホルムアミド、5×SSC、および1%SDS、42でのインキュベーション、または5×SSC、1%SDS、65でのインキュベーションと、50での0.2×SSCおよび0.1%SDSによる洗浄。

【0079】

本発明との関連において、当業者であれば、機能的に等価なポリペプチドをコードするDNAを単離するための最適なハイブリダイゼーションの条件をルーチン的に選択することができる。例えば、「Rapid-hyb buffer」(Amersham LIFE SCIENCE)を使用して、68で30分以上プレハイブリダイゼーションを行い、標識されたプローブを添加し、68で1時間以上加熱することにより、ハイブリダイゼーションを実施することができる。例えば、低ストリンジェントな条件においては、以下の洗浄工程を行うことができる。例示的な低ストリンジェントな条件には、42、2×SSC、0.1%SDS、好ましくは、50、2×SSC、0.1%SDSが含まれ得る。多くの場合、高ストリンジェンシー条件が好んで使用される。例示的な高ストリンジェンシー条件には、2×SSC、0.01%SDSで20分間、室温での3回の洗浄、次いで1×SSC、0.1%SDSで20分間、37での3回の洗浄、および1×SSC、0.1%SDSで20分間、50での2回の洗浄が含まれ得る。しかしながら、温度および塩濃度などのいくつかの因子が、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を及ぼす場合があり、当業者であれば、これらのおよび他の因子をルーチン的に調整して所望のストリンジェンシーに達することができる。

【0080】

したがって、本発明との関連において、機能的等価物には、関心対象であるヒトポリペプチドをコードするDNA配列の全部または一部と、ストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAによってコードされるポリペプチドが含まれる。これらの機能的等価物には、ヒトタンパク質の哺乳動物相同体、例えば、サル、マウス、ラット、ウサギまたはウシSMYD2遺伝子(またはHSP90AB遺伝子もしくはRB1遺伝子)によってコードされるポリペプチドが含まれる。

関連DNAの配列情報に基づいて合成されたプライマーを使用して、関心対象であるヒトポリペプチドの機能的等価物をコードするDNAを単離するために、ハイブリダイゼーションに代えて、遺伝子増幅法、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を利用することができる。例示的なプライマー配列の例は、実施例のセクションの半定量的RT-PCRにおいて示す。

【0081】

上記ハイブリダイゼーション技術または遺伝子増幅技術により単離されたDNAによってコードされるポリペプチドの機能的等価物は、通常、元の参照ポリペプチドのアミノ酸配列に対して高い相同性(配列同一性とも呼ばれる)を有するであろう。「高い相同性」(「高い配列同一性」とも呼ばれる)は、典型的には、最適にアライメントされた2つの配列(ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列のいずれか)間の同一性の程度を指す。典型的には、高い相同性または配列同一性は、40%以上、例えば60%以上、例えば80%以上、例えば85%、90%、95%、98%、99%以上の相同性を指す。2つのポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列間の相同性または同一性の程度は、アルゴリズム [Wilbur WJ & Lipman DJ. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983 Feb; 80 (3):726-30] にしたがって決定することができる。

【0082】

配列同一性および配列類似性のパーセントは、従来の技術、例えば、[Altschul SF, et al., J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215 (3):403-10; Nucleic Acids Res. 1997 Sep 1; 25 (17):3389-402]に記載されているBLASTおよびBLAST2.0アルゴリズムを使用して、容易に決定することができる。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationを通じて公に入手可能である(ncbi.nlm.nih.gov/のワールドワイドウェブ上)。このアルゴリズムは、データベース配列中の同じ長さのワードと整列された場合、

一致するかまたはいくつかの正の値の閾値スコア T を満たすかいずれかのクエリー配列中の長さ W の短いワードを同定することによって、高スコアリング配列対 (high scoring sequence pair) (HSP) を最初に同定することを伴う。 T は近隣ワードスコア閾値と呼ばれる (Altschul ら、前記)。これらの最初の近隣ワードヒットは、それらを含むより長い HSP を見出すための検索を開始するためのシードとして働く。

【0083】

その後、このワードヒットは累積アラインメントスコアが増加し得る限り、各々の配列に沿って両方向に伸長される。ヌクレオチド配列については、パラメータ M (1 対の一致残基に対する報酬スコア; 常に > 0) および N (不一致残基に対するペナルティスコア; 常に < 0) を用いて累積スコアを計算する。アミノ酸配列については、スコアリングマトリックスを用いて累積スコアを計算する。累積アラインメントスコアがその最大達成値から量 X だけ低下した場合; 1 つもしくは複数の負のスコアリング残基アラインメントの蓄積によって、累積スコアがゼロ未満に進んだ場合、またはいずれかの配列の末端に達した場合、各々の方向におけるワードヒットの伸長は停止する。

【0084】

BLAST アルゴリズムパラメータ W 、 T 、および X は、アラインメントの感度および速度を決定する。(ヌクレオチド配列についての) BLASTN プログラムは、28 のワードサイズ (W)、10 の期待値 (E)、 $M = 1$ 、 $N = -2$ 、および両方の鎖の比較をデフォルトとして使用する。アミノ酸配列について、BLASTP プログラムは、3 のワードサイズ (W)、10 の期待値 (E)、および BLOSUM62 スコアリングマトリックスをデフォルトとして使用する [Henikoff S & Henikoff JG. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Nov 15; 89(22):10915-9]。

【0085】

癌を検出または診断する方法:

本発明は、SMYD2 が癌の診断マーカーとして役立ち得るという発見に関し、したがって、それに関連する癌の検出において有用性を見出すものである。本明細書において実証されたように、SMYD2 遺伝子の発現は、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌で特異的かつ有意に上昇している (図1)。したがって、本明細書において同定された遺伝子、ならびにそれらの転写産物および翻訳産物は、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌のマーカーとしての診断有用性が見出され、細胞試料における SMYD2 遺伝子の発現を測定することによって、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病または前立腺癌を診断することができる。具体的には、本発明は、対象由来の生体試料における SMYD2 遺伝子の発現レベルを決定することによって、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病または前立腺癌の存在またはこれらを発症する素因を検出、診断および/または決定するための方法を提供する。

【0086】

本発明との関連において、「診断する」という用語は、検出のみならず予測および尤度解析を包含することができる。したがって、本発明は、対象由来の生体試料における SMYD2 遺伝子の発現レベルを決定する段階を含む、対象における癌細胞の存在または癌を発症する素因を検出または同定するための方法であって、該遺伝子の正常対照レベルと比較した該発現レベルの上昇が、該組織における癌細胞の存在または疑いを示す方法を提示する。

【0087】

本発明によれば、対象の状態を検査するための中間結果が提供され得る。このような中間結果をさらなる情報と組み合わせて、医師、看護師、または他の実務者が、対象が疾患

10

20

30

40

50

に罹患しているかを決定するのを援助することができる。すなわち、本発明は、癌を検査するための診断マーカー S M Y D 2 を提供する。

【 0 0 8 8 】

あるいは、本発明は、対象由来の試料における S M Y D 2 遺伝子の発現レベルを決定する段階を含む、対象由来の膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病または前立腺癌組織試料における癌細胞を検出または同定するための方法であって、該遺伝子の正常対照レベルと比較した該発現レベルの上昇が、該組織における癌細胞の存在または疑いを示す方法を提供する。

【 0 0 8 9 】

本発明の診断方法は、癌について、治療的介入、病期などの診断基準、ならびに疾患モニタリングおよび監視を含む治療様式に関する決定を行う際に、臨床的に使用してもよい。診断の正確性を改善するために、他の癌関連遺伝子、例えば、癌において差次的に発現されることが公知の遺伝子の発現レベルも決定することができる。さらに、複数の癌関連遺伝子の発現レベルが比較される場合、試料と癌性である参照との間の遺伝子発現パターンの類似性は、対象が、肺癌に罹患しているかまたは肺癌を発症するリスクを有することを示す。

【 0 0 9 0 】

したがって、関心対象である特定遺伝子の発現結果を、組織病変、血液中の公知の腫瘍マーカーのレベル、および対象の臨床経過を含むさらなる情報または別の指標と組み合わせ、医師、看護師、または他の医療実務者が、対象が疾患に罹患していると診断するのを援助することができる。換言すれば、本発明は、対象が疾患に罹患していると診断するために有用な情報を医師に提供し得る。例えば、本発明によれば、対象から得られた組織における癌細胞の存在に関して疑いがある場合、S M Y D 2 遺伝子の発現レベルに加えて、組織病変、血液中の公知の腫瘍マーカーのレベル、および対象の臨床経過などを含む疾患の異なる側面を考察することによって、臨床的判断に至ることができる。例えば、血液中のいくつかの周知の診断用肺癌マーカーには、A C T、B F P、C A 1 9 - 9、C A 5 0、C A 7 2 - 4、C A 1 3 0、C A 6 0 2、C E A、I A P、K M O - 1、S C C、S L X、S P 1、S p a n - 1、S T N、T P A およびサイトケラチン - 1 9 断片が含まれる。血液中のいくつかの周知の膀胱癌マーカーには、N M P 2 2、B F P および T P A が含まれる。あるいは、血液中の診断用乳癌マーカー、例えば C A 1 5 - 3、B C A 2 2 5、C S L E X、N C C - S T - 4 3 9、C E A、T P A および H E R 2 も周知である。血液中のいくつかの周知の診断用大腸癌マーカーには、C A 7 2 - 4、S T N、C A 1 9 - 9、C E A および N C C - S T - 4 3 9 が含まれ、血液中の腎臓癌マーカーには、B F P および I A P が含まれ、血液中の肝臓癌マーカーには、A F P および P I V K A - 2 が含まれ、血液中の頭頸部癌マーカーには、S C C が含まれ、血液中の精上皮腫マーカーには、A F P、- h C G、L D H が含まれ、血液中の皮膚癌マーカーには、S C C が含まれ、血液中の膵臓癌マーカーには、C A 1 9 - 9、S p a n - 1、S L X および C E A が含まれる。すなわち、本発明のこの特定の態様において、遺伝子発現分析の結果は、対象の疾患病期をさらに診断するための中間結果として役立つ。

【 0 0 9 1 】

本発明の特に好ましい実施形態は、[1] ~ [1 1] の項目として示される：

[1] 以下の段階を含む、対象における癌の存在または癌を発症する素因を検出または診断する方法：

(A) 対象由来の生体試料における S M Y D 2 遺伝子の発現レベルを決定する段階であって、前記遺伝子の正常対照レベルと比較した前記レベルの上昇が、前記対象が癌に罹患しているかまたは癌を発症するリスクを有することを示し、該発現レベルが、以下からなる群より選択される方法のいずれか 1 つによって決定される、段階：

(a) S M Y D 2 遺伝子の m R N A を検出すること；

(b) S M Y D 2 遺伝子によってコードされるタンパク質を検出すること；および

10

20

30

40

50

(c) S M Y D 2 遺伝子によってコードされるタンパク質の生物学的活性を検出すること、

または

(B)

(i) 対象由来の生体試料を単離または採取する段階、

(i i) S M Y D 2 遺伝子の発現レベルを測定または決定するために、該対象由来の生体試料を、S M Y D 2 遺伝子の m R N A にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドと、または S M Y D 2 遺伝子によってコードされるタンパク質に結合する抗体と接触させる段階、および

(i i i) 前記接触に基づいて S M Y D 2 遺伝子の発現レベルを測定または決定する段階であって、S M Y D 2 遺伝子の正常対照レベルと比較した該レベルの上昇が、該対象が癌に罹患しているかまたは癌を発症するリスクを有することを示す、段階；

[2] 測定された試料の発現レベルが、該正常対照レベルよりも少なくとも 1 0 % 大きい、[1] に記載の方法；

[3] 該生物学的活性が、細胞増殖促進活性またはメチルトランスフェラーゼ活性である、[1] に記載の方法；

[4] 該癌が、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌からなる群より選択される、[1] ~ [3] のいずれかに記載の方法；

[5] 該発現レベルが、該遺伝子の m R N A に対するプローブのハイブリダイゼーションを検出することによって決定される、[1] ~ [4] のいずれかに記載の方法；

[6] 該発現レベルが、該遺伝子によってコードされるタンパク質に対する抗体の結合を検出することによって決定される、[1] ~ [4] のいずれかに記載の方法；

[7] 該対象由来の生体試料が、生検標本、痰、血液、胸水および尿を含む、[1] ~ [6] のいずれかに記載の方法；

[8] 該対象由来の生体試料が、上皮細胞を含む、[1] ~ [6] のいずれかに記載の方法；

[9] 該対象由来の生体試料が、癌細胞を含む、[8] に記載の方法；および

[1 0] 該対象由来の生体試料が、癌性上皮細胞を含む、[1] に記載の方法。

[1 1] 該癌が膀胱癌である場合、該対象由来の生体試料が該対象由来の膀胱組織であり；該癌が肺癌である場合、該対象由来の生体試料が肺組織であり；該癌が乳癌である場合、該対象由来の生体試料が乳房組織であり；該癌が子宮頸癌である場合、該対象由来の生体試料が子宮頸部組織であり；該癌が大腸癌である場合、該対象由来の生体試料が大腸組織であり；該癌が腎臓癌である場合、該対象由来の生体試料が腎臓組織であり；該癌が肝臓癌である場合、該対象由来の生体試料が肝臓組織であり；該癌が頭頸部癌である場合、該対象由来の生体試料が頭頸部組織であり；該癌が精上皮腫である場合、該対象由来の生体試料が精巣組織であり；該癌が皮膚癌である場合、該対象由来の生体試料が皮膚組織であり；該癌が膵臓癌である場合、該対象由来の生体試料が膵臓組織であり；該癌がリンパ腫である場合、該対象由来の生体試料が血液試料またはリンパ節組織であり；該癌が卵巣癌である場合、該対象由来の生体試料が卵巣組織であり；該癌が白血病である場合、該対象由来の生体試料が血液試料または骨髓組織であり；該癌が前立腺癌である場合、該対象由来の生体試料が前立腺組織である、[4] に記載の方法。

【 0 0 9 2 】

膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌を含む癌を診断する方法を以下により詳細に説明する。

本方法によって診断されるべき対象は、好ましくは、哺乳動物である。例示的な哺乳動物には、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、およびウシが含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 9 3 】

本発明の方法は、診断を実施するために、好ましくは、診断されるべき対象から得られたかまたは採取された生体試料を利用する。任意の生物学的材料は、それがS M Y D 2の目的の転写産物または翻訳産物を含み得る限り、決定のための生体試料として使用することができる。対象由来の適切な生体試料の例には、癌を診断することが望まれるかまたは癌に罹患していることが疑われる体組織、ならびに生検標本、血液、痰、胸水および尿などの体液が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、生体試料は、上皮細胞、より好ましくは、癌性上皮細胞、または癌性であることが疑われる組織に由来する上皮細胞を含む細胞集団を含有する。さらに、必要であれば、得られた体組織および体液から細胞を精製し、次いで、それを生体試料として使用してもよい。

【0094】

例えば、本発明との関連において、診断または検出に適切な癌には、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、脾臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌が含まれる。これらの癌を診断または検出するために、対象由来の生体試料を以下の器官から採取してもよい：

膀胱：膀胱癌用、

肺：肺癌用、

乳房：乳癌用、

子宮頸部：子宮頸癌用、

大腸：大腸癌用、

腎臓：腎臓癌用、

肝臓：肝臓癌用、

頭頸部：頭頸部癌用、

精巣：精上皮腫用、

皮膚：皮膚癌用、

脾臓：脾臓癌用、

血液またはリンパ節：リンパ腫用、

卵巣：卵巣癌用、

血液または骨髄：白血病用、

前立腺：前立腺癌用。

【0095】

本発明によれば、対象由来の生体試料におけるS M Y D 2 遺伝子の発現レベルを決定し、次いで対照試料と比較することによって、特定の健康または疾患状態と関連させる。当技術分野において公知の方法を使用して、転写（核酸）産物レベルで、発現レベルを決定することができる。例えば、ハイブリダイゼーション法（例えば、ノーザンハイブリダイゼーション）によってプローブを使用して、S M Y D 2 遺伝子を定量することができる。検出は、チップ上またはアレイ上で行ってもよい。アレイは、S M Y D 2 遺伝子を含む複数の遺伝子（例えば、様々な癌に特異的な遺伝子）の発現レベルを検出するために好ましい。当業者であれば、S M Y D 2 遺伝子の配列情報（配列番号62）を利用して、このようなプローブを調製することができる。例えば、S M Y D 2 遺伝子のcDNAをプローブとして使用することができる。必要であれば、色素、蛍光、および同位体などの適切な標識によりプローブを標識し、ハイブリダイズした標識の強度として、遺伝子の発現レベルを検出してもよい。

【0096】

あるいは、増幅に基づく検出法（例えば、R T - P C R）によってプライマーを使用して、S M Y D 2 遺伝子の転写産物を定量することもできる。このようなプライマーは、利用可能な遺伝子の配列情報に基づいて調製することもできる。例えば、実施例で使用したプライマー対（配列番号5および6）を、R T - P C Rまたはノーザンプロットによる検出に利用してもよいが、本発明はこれらに限定されない。

本方法に関連して使用するために適切なプローブまたはプライマーは、ストリンジェントな条件、中程度のストリンジェントな条件、または低ストリンジェントな条件下で、S

10

20

30

40

50

MYD2 遺伝子の mRNA にハイブリダイズするであろう。「ストリンジェントな条件」の詳細は、「遺伝子およびタンパク質」という表題のセクションに記載されている。

【0097】

あるいは、診断は、当技術分野において公知の方法を使用して、翻訳産物（すなわち、ポリペプチドまたはタンパク質）を定量的に検出することを含んでもよい。例えば、関心対象であるタンパク質に対する抗体を使用して S M Y D 2 タンパク質の量を決定し、疾患または正常な状態と相関させてもよい。翻訳産物 / タンパク質の量は、例えば、該タンパク質を特異的に認識する抗体を使用するイムノアッセイ法を含む任意の従来の技術によって決定してもよい。本発明の方法に関連して使用するために適切な抗体はモノクローナルでもよいまたはポリクローナルでもよい。さらに、断片が S M Y D 2 タンパク質に対する結合能を保持している限り、抗体の任意の免疫原性断片または修飾物（例えば、キメラ抗体、s c F v、F a b、F (a b ') 2、F v など）を、検出に使用することができる。タンパク質の検出のためのこれらの種類の抗体を調製する方法は、当技術分野において周知であり、本発明においては、このような抗体およびそれらの等価物を調製するために、任意の方法を利用することができる。

10

【0098】

あるいは、S M Y D 2 遺伝子の発現レベルをその翻訳産物に基づいて決定してもよく、例えば、染色強度の研究は、S M Y D 2 タンパク質に対する抗体を使用した免疫組織化学分析を介して観察してもよい。より具体的には、強い染色の観察は、タンパク質の存在の増加を示し、同時に、S M Y D 2 遺伝子の高い発現レベルを示す。

20

【0099】

さらに、翻訳産物は、その生物学的活性に基づいて検出することもできる。本明細書において発見されたように、S M Y D 2 タンパク質は癌細胞の成長に関与していることが実証された。したがって、S M Y D 2 タンパク質の癌細胞成長促進能力およびメチルトランスフェラーゼ活性は、生体試料中に存在する S M Y D 2 タンパク質の指標として使用され得る。本明細書において、細胞成長促進能力は、「細胞増殖活性」、「細胞増殖促進活性」または「細胞増殖促進活性」とも呼ばれる。本明細書において、基質に対するメチルトランスフェラーゼ活性は、S M Y D 2 タンパク質をその生物学的活性に基づいて定量するために有用である。基質（特に、ヒストン H 4 タンパク質またはその断片、ヒストン H 3 タンパク質またはその断片、H S P 9 0 A B 1 タンパク質またはその断片、R B 1 タンパク質またはその断片）のメチル化レベルは、当技術分野において周知の方法によって決定することができる。

30

【0100】

さらに、診断の正確性を改善するために、S M Y D 2 遺伝子の発現レベルに加えて、他の癌関連遺伝子、例えば、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌において差次的に発現されることが公知の遺伝子の発現レベルも決定することができる。

【0101】

本発明との関連において、対象における癌、または対象由来の試料における癌細胞を検出または同定するための方法は、S M Y D 2 遺伝子の発現レベルの決定から始める。決定したら、前記技術のいずれかを使用して、この値を対照レベルと比較する。本発明との関連において、遺伝子発現が、対照レベルから例えば 1 0 %、2 5 %、もしくは 5 0 % 変化もしくは上昇しているか、または、対照レベルと比較して少なくとも 0 . 1 倍、少なくとも 0 . 2 倍、少なくとも 0 . 5 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 5 倍、もしくは少なくとも 1 0 倍、もしくはそれ以上変化または上昇している場合に、遺伝子発現レベルが「変化した」または「上昇した」と考えられる。したがって、生体試料における S M Y D 2 遺伝子を含む癌マーカー遺伝子の発現レベルは、対応する癌マーカー遺伝子の対照レベルから、例えば、1 0 %、2 5 %、もしくは 5 0 % 上昇している場合；または 1 . 1 倍超、1 . 5 倍超、2 . 0 倍超、5 . 0 倍超、1 0 . 0 倍超、もしくはそれ以上上昇している場合、上昇しているとみなされ得る。

40

50

【 0 1 0 2 】

本発明との関連において、「対照レベル」という語句は、対照試料において検出された S M Y D 2 遺伝子の発現レベルを指し、正常対照レベルおよび癌対照レベルの両方を包含する。「正常対照レベル」という語句は、正常な健常個体において、または癌に罹患していないことが判明している個体集団において検出された S M Y D 2 遺伝子の発現レベルを指す。正常な個体は、癌の臨床症状がない個体である。正常対照レベルは、非癌性組織から得られた正常細胞を使用して決定することができる。「正常対照レベル」はまた、癌に罹患していないことが判明している個体または集団の正常な健常組織または細胞において検出された S M Y D 2 遺伝子の発現レベルでもよい。一方、「癌対照レベル」または「癌性対照レベル」という語句は、癌に罹患している個体または集団の癌性組織または細胞において検出された S M Y D 2 遺伝子の発現レベルを指す。

10

【 0 1 0 3 】

対象由来の試料において検出された S M Y D 2 の発現レベルの正常対照レベルと比較した上昇は、対象（該試料が得られた）が、癌に罹患しているかまたは癌を発症するリスクを有することを示す。本発明との関連において、対象由来の試料は、試験対象、例えば癌を有すると疑われる患者から得られた任意の組織でもよい。例えば、組織には、上皮細胞が含まれ得る。より具体的には、組織は、癌性であると疑われる上皮細胞でもよい。試料の発現レベルと癌対照レベルとの間の類似性は、該対象（該試料が得られた）が、癌に罹患しているかまたは癌を発症するリスクを有することを示す。他の癌関連遺伝子の発現レベルも測定および比較される場合、試料と癌性である参照との間の遺伝子発現パターンの類似性は、対象が、癌に罹患しているかまたは癌を発症するリスクを有することを示す。

20

【 0 1 0 4 】

疾患状態（癌性であるか非癌性であるか）が既知である対象から以前に採取され保管されていた試料を使用することによって、試験生体試料と同時に対照レベルを決定することができる。あるいは、疾患状態が既知である対象由来の試料において、以前に決定された S M Y D 2 遺伝子の発現レベルを分析することによって得られた結果に基づいて、統計的方法によって対照レベルを決定してもよい。さらに、対照レベルは、以前に試験された細胞からの発現パターンのデータベースでもよい。さらに、本発明の一態様によれば、複数の参照試料から決定された複数の対照レベルと、生体試料における S M Y D 2 遺伝子の発現レベルを比較してもよい。患者由来の生体試料のものと類似した組織型に由来する参照試料から決定された対照レベルを使用することが好ましい。さらに、疾患状態が既知である集団における S M Y D 2 遺伝子の発現レベルの標準値を使用することが好ましい。標準値は、当技術分野において公知の任意の方法によって得てもよい。例えば、 $\text{平均値} \pm 2 S.D.$ または $\text{平均値} \pm 3 S.D.$ の範囲を、標準値として使用してもよい。

30

【 0 1 0 5 】

対象由来の生体試料における S M Y D 2 遺伝子の発現レベルが正常対照レベルと比較して上昇しているか、または癌性対照レベルと類似している場合、対象は、癌に罹患しているかまたは癌を発症するリスクを有すると診断され得る。さらに、複数の癌関連遺伝子の発現レベルが比較される場合、試料と癌性である参照との間の遺伝子発現パターンの類似性は、対象が、癌に罹患しているかまたは癌を発症するリスクを有することを示す。

40

【 0 1 0 6 】

試験生体試料の発現レベルと対照レベルとの間の差は、細胞の癌性状態または非癌性状態によって発現レベルが相違しないことが公知の対照核酸、例えば、ハウスキーピング遺伝子の発現レベルによって標準化することができる。例示的な対照遺伝子には、 α -アクチン、グリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ、およびリボソームタンパク質 P 1 が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 1 0 7 】

癌を診断するため、および／または癌治療の有効性をモニタリングするためのキット：

本発明は、癌を検出もしくは診断するため、および／または癌治療の有効性をモニタリングするためのキットを提供する。好ましくは、癌は、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、

50

大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病または前立腺癌である。具体的には、キットは、対象由来の生体試料における S M Y D 2 の発現を検出するための少なくとも 1 つの試薬であって、以下からなる群より選択され得る試薬を含む：

- (a) S M Y D 2 遺伝子の m R N A を検出するための試薬；
- (b) S M Y D 2 タンパク質を検出するための試薬；および
- (c) S M Y D 2 タンパク質の生物学的活性を検出するための試薬。

【 0 1 0 8 】

S M Y D 2 遺伝子の m R N A を検出するために適切な試薬には、S M Y D 2 m R N A に特異的に結合するか、または S M Y D 2 m R N A を特定する核酸、例えば、S M Y D 2 m R N A の一部分に対する相補的配列を有するオリゴヌクレオチドが含まれる。これらの種類のオリゴヌクレオチドの例は、S M Y D 2 m R N A に特異的なプライマーおよびプローブである。これらの種類のオリゴヌクレオチドは、当技術分野において周知の方法に基づいて調製することができる。必要であれば、S M Y D 2 m R N A を検出するための試薬を固体マトリックス上に固定化することができる。さらに、S M Y D 2 m R N A を検出するための複数の試薬をキットに含めることもできる。

【 0 1 0 9 】

本発明のプローブまたはプライマーは、典型的には、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含む。典型的には、オリゴヌクレオチドは、少なくとも約 2 0 0 0 個、1 0 0 0 個、5 0 0 個、4 0 0 個、3 5 0 個、3 0 0 個、2 5 0 個、2 0 0 個、1 5 0 個、1 0 0 個、5 0 個、または 2 5 個の、S M Y D 2 配列を含む核酸の連続したセンス鎖ヌクレオチド配列、または S M Y D 2 配列を含む核酸のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列、またはこれらの配列の天然に存在する変異体にストリンジентな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。特に、例えば、好ましい実施形態において、長さが 5 ~ 5 0 個のオリゴヌクレオチドが、検出されるべき遺伝子を増幅するためのプライマーとして使用することができる。あるいは、ハイブリダイゼーションに基づいた検出手順において、長さが数百個（例えば、約 1 0 0 ~ 2 0 0 個）の塩基 ~ 数千個（例えば、約 1 0 0 0 ~ 2 0 0 0 個）の塩基を有するポリヌクレオチドもまた、プローブに使用することができる（例えば、ノーザンブロットアッセイまたは D N A マイクロアレイ解析）。

【 0 1 1 0 】

一方、S M Y D 2 タンパク質を検出するために適切な試薬には、S M Y D 2 タンパク質に対する抗体が含まれる。抗体はモノクローナルでもよいしまたはポリクローナルでもよい。さらに、断片が S M Y D 2 タンパク質に対する結合能を保持している限り、抗体の任意の断片または修飾物（例えば、キメラ抗体、s c F v、F a b、F (a b ') 2、F v など）を、試薬として使用することができる。タンパク質の検出のためのこれらの種類の抗体を調製する方法は、当技術分野において周知であり、本発明においては、このような抗体およびそれらの等価物を調製するために、任意の方法を利用することができる。さらに、直接結合または間接標識技術を介して、シグナル生成分子によって抗体を標識してもよい。標識、および抗体を標識して抗体とその標的との結合を検出するための方法は、当技術分野において周知であり、任意の標識および方法を本発明に利用することができる。さらに、S M Y D 2 タンパク質を検出するための複数の試薬が、キットに含まれてもよい。

【 0 1 1 1 】

直接結合または間接標識技術を介して、シグナル生成分子によって抗体を標識してもよい。標識、および抗体を標識して抗体とその標的との結合を検出するための方法は、当技術分野において周知であり、任意の標識および方法を本発明に利用することができる。さらに、S M Y D 2 タンパク質を検出するための複数の試薬が、キットに含まれてもよい。

【 0 1 1 2 】

あるいは、生体試料における S M Y D 2 タンパク質の発現は、その生物学的活性を指標として使用して検出および測定してもよい。生体試料において、例えば、発現された S M

10

20

30

40

50

Y D 2 タンパク質による細胞増殖活性またはメチルトランスフェラーゼ活性を測定することによって、生物学的活性を決定することができる。例えば、細胞を、対象由来の生体試料の存在下で培養し、次いで、増殖速度を検出することによって、または細胞周期もしくはコロニー形成能を測定することによって、生体試料の細胞増殖活性を決定することができる。必要であれば、S M Y D 2 m R N Aを検出するための試薬を固体マトリックス上に固定化することができる。さらに、S M Y D 2 タンパク質の生物学的活性を検出するための複数の試薬が、キットに含まれてもよい。

【 0 1 1 3 】

一方、生体試料を、ヒストンタンパク質（例えば、ヒストンH 4 タンパク質またはヒストンH 3 タンパク質）もしくはその断片、H S P 9 0 A B 1 タンパク質もしくはその断片、またはR B 1 タンパク質もしくはその断片などの基質と共にインキュベートし、メチル化基質に対する抗体を使用して基質のメチル化レベルを検出することによって、生体試料におけるメチルトランスフェラーゼ活性を決定することができる。したがって、本キットは、基質（特に、ヒストンH 4 タンパク質もしくはその断片、ヒストンH 3 タンパク質もしくはその断片、H S P 9 0 A B 1 タンパク質もしくはその断片、またはR B 1 タンパク質もしくはその断片）および抗メチル化基質抗体を含んでもよい。このような抗体の例には、ヒストンH 3 タンパク質のメチル化リジン3 6、H S P 9 0 A B 1 タンパク質のメチル化リジン5 3 1 およびノもしくはリジン5 7 4、またはR B 1 タンパク質のメチル化リジン8 1 0 に結合する抗体が含まれる。そうでなければ、本キットは、ヒストンのメチル化によって放出されるホルムアルデヒドを検出するための適切な標識メチル供与体を含んでもよい。標識メチル供与体は、S - アデノシル[メチル - ³ H]メチオニン(S A M)またはL - [メチル - ³ H]メチオニンであり得る。

【 0 1 1 4 】

キットは、前記試薬を複数含有してもよい。さらに、キットは、S M Y D 2 遺伝子に対するプローブまたはS M Y D 2 タンパク質に対する抗体を結合させるための固体マトリックスおよび試薬、細胞を培養するための培地および容器、陽性および陰性対照試薬、ならびにS M Y D 2 タンパク質に対する抗体を検出するための二次抗体を含んでもよい。本発明のキットは、緩衝液、希釈剤、フィルタ、針、注射器、および使用のための説明を含む添付文書（例えば、文書、テープ、C D - R O M など）を含む、商業的見地および使用者の見地から望ましい他の材料をさらに含んでもよい。これらの試薬などは、ラベルを有する容器に入っているもよい。適切な容器には、ボトル、バイアル、および試験管が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの多様な材料から形成されてもよい。

【 0 1 1 5 】

本発明の一態様によれば、癌を診断するための本発明のキットは、陽性もしくは陰性対照試料のいずれか、またはその両方をさらに含んでもよい。本発明との関連において、陽性対照試料は、樹立された膀胱癌細胞株、肺癌細胞株、乳癌細胞株、子宮頸癌細胞株、大腸癌細胞株、腎臓癌細胞株、肝臓癌細胞株、頭頸部癌細胞株、精上皮腫細胞株、皮膚癌細胞株、膵臓癌細胞株、リンパ腫細胞株、卵巣癌細胞株、白血病細胞株または前立腺癌細胞株、でもよい。あるいは、S M Y D 2 陽性試料はまた、癌患者から得られた膀胱癌組織、肺癌組織、乳癌組織、子宮頸癌組織、大腸癌組織、腎臓癌組織、肝臓癌組織、頭頸部癌組織、精上皮腫組織、皮膚癌組織、膵臓癌組織、リンパ腫細胞、卵巣癌組織、白血病細胞または前立腺癌組織、でもよい。あるいは、陽性対照試料は、カットオフ値を決定し、そのカットオフ値よりも多い量のS M Y D 2 m R N AまたはS M Y D 2 タンパク質を含有する試料を調製することによって調製してもよい。本明細書において、「カットオフ値」という語句は、正常範囲と癌性範囲を区分する値を指す。例えば、当業者であれば、受信者動作特性(receiver operating characteristic)(R O C) 曲線を使用してカットオフ値を決定することができる。本キットは、S M Y D 2 m R N AまたはS M Y D 2 ポリペプチドのカットオフ値量を提供する、S M Y D 2 標準試料を含んでもよい。一方、陰性対照試料は、非癌性細胞株または、正常な膀胱組織、肺組織、乳房組織、子宮頸部組織、大腸組織、腎臓組織、肝臓組織、頭頸部組織、精巣組織

、皮膚組織、膵臓組織、リンパ節組織、卵巣組織、骨髓組織または前立腺組織などの非癌性組織から調製してもよいし、カットオフ値未満の S M Y D 2 m R N A または S M Y D 2 タンパク質を含有する試料を調製することによって調製してもよい。

【 0 1 1 6 】

本発明の一実施形態として、試薬が S M Y D 2 タンパク質に対するプローブである場合、該試薬を多孔質ストリップなどの固体マトリックス上に固定化して、少なくとも 1 つの検出部位を形成することができる。多孔質ストリップの測定領域または検出領域は、核酸（プローブ）を各々が含有する複数の部位を含んでもよい。試験片はまた、陰性対照および／または陽性対照のための部位を含有してもよい。あるいは、対照部位は、試験片から分離されたストリップ上に位置してもよい。任意で、異なる検出部位は、異なる量の固定化された核酸を含有してもよい。すなわち、第 1 の検出部位の量がより多く、その後の部位の量がより少ない。試験試料の添加時、検出可能なシグナルを示す部位の数が、試料中に存在する S M Y D 2 m R N A の量の定量的な指標を提供する。検出部位は、任意の適切に検出可能な形で配置してもよく、典型的には、試験片幅にわたるバーまたはドットの形である。

【 0 1 1 7 】

抗癌物質のスクリーニング：

S M Y D 2 遺伝子、S M Y D 2 ポリペプチドもしくはそれらの機能的等価物、または該遺伝子の転写調節領域を使用して、S M Y D 2 遺伝子の発現または S M Y D 2 ポリペプチドの生物学的活性を変化させる物質をスクリーニングすることが可能である。このような物質は、癌を治療または予防するための薬剤候補として使用してもよい。したがって、本発明は、S M Y D 2 遺伝子、S M Y D 2 ポリペプチドもしくはそれらの機能的等価物、または S M Y D 2 遺伝子の転写調節領域を使用して、癌の治療および予防のいずれかまたは両方のための候補物質をスクリーニングする方法を提供する。

【 0 1 1 8 】

本発明のスクリーニング方法によって適切な候補として単離および同定される物質は、S M Y D 2 遺伝子の発現または S M Y D 2 遺伝子の翻訳産物の活性を低下させ、抑制し、および／または阻害すると予想され、したがって、癌（特に、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌）の治療および予防のいずれかまたは両方のための候補である。

すなわち、本方法によってスクリーニングされる物質は、臨床的利益を有すると考えられ、動物モデルまたは試験対象において癌細胞成長を制限または予防する能力についてさらに試験することができる。

【 0 1 1 9 】

本発明との関連において、本スクリーニング方法によって同定されるべき物質には、任意の物質、またはいくつかの物質を含む組成物が含まれる。さらに、本発明のスクリーニング方法によって細胞またはタンパク質に曝露される試験物質は、単一の物質でもよいし、または物質の組み合わせでもよい。物質の組み合わせを前記方法において使用する場合には、物質を逐次的に接触させてもよいし、または同時に接触させてもよい。

あるいは、本発明は、癌の治療もしくは予防または癌細胞成長の阻害に対する試験物質の治療効果を評価する方法を提供する。

【 0 1 2 0 】

任意の試験物質、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産物、海洋生物抽出物、植物抽出物、精製されたタンパク質または粗タンパク質、ペプチド、非ペプチド物質、合成微小分子物質（アンチセンス R N A、s i R N A、リボザイム、およびアプタマーなどの核酸コンストラクトを含む）、および天然物質を、本発明のスクリーニング方法において使用することができる。本発明の試験物質はまた、（ 1 ）生物学的ライブラリ、（ 2 ）空間的にアドレス可能なパラレルな固相または液相のライブラリ、（ 3 ）デコンボリューションを必要とする合成ライブラリ法、（ 4 ）「一ビーズー物質」ライブラリ法、お

よび(5)アフィニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリ法を含む、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法の多数のアプローチのいずれかを使用して得ることができる。アフィニティークロマトグラフィー選択を使用する生物学的ライブラリ法はペプチドライブラリに限定されるが、他の4つのアプローチは物質のペプチドライブラリ、非ペプチドオリゴマーライブラリ、または低分子ライブラリに適用可能である(Lam, *Anticancer Drug Des* 1997, 12: 145-67)。分子ライブラリの合成法の例は、当技術分野において見られ得る(DeWitt et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90: 6909-13; Erb et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 11422-6; Zuckermann et al., *J Med Chem* 37: 2678-85, 1994; Cho et al., *Science* 1993, 261: 1303-5; Carell et al., *Angew Chem Int Ed Engl* 1994, 33: 2059; Carell et al., *Angew Chem Int Ed Engl* 1994, 33: 2061; Gallop et al., *J Med Chem* 1994, 37: 1233-51)。物質のライブラリは、溶液中(Houghten, *Bio/Techniques* 1992, 13: 412-21を参照されたい)、またはビーズ上(Lam, *Nature* 1991, 354: 82-4)、チップ上(Fodor, *Nature* 1993, 364: 555-6)、細菌上(米国特許第5,223,409号)、胞子上(米国特許第5,571,698号;第5,403,484号、および第5,223,409号)、プラスミド上(Cull et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89: 1865-9)、もしくはファージ上(Scott and Smith, *Science* 1990, 249: 386-90; Devlin, *Science* 1990, 249: 404-6; Cwirla et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 6378-82; Felici, *J Mol Biol* 1991, 222: 301-10; 米国特許出願第2002103360号)に提示され得る。

本スクリーニング方法のいずれか1つによってスクリーニングされる物質の構造の一部が、付加、欠失、および/または置換によって変換された化合物は、本発明のスクリーニング方法によって得られる物質に含まれる。

【0121】

さらに、スクリーニングされた試験物質がタンパク質である場合、タンパク質をコードするDNAを得るためには、タンパク質の全アミノ酸配列を決定して、タンパク質をコードする核酸配列を推定してもよいし、または得られたタンパク質の部分アミノ酸配列を分析して、その配列に基づいてオリゴDNAをプローブとして調製し、そのプローブを用いてcDNAライブラリをスクリーニングして、タンパク質をコードするDNAを得てもよい。得られたDNAは、癌を治療または予防するための候補である試験物質の調製における有用性に関して確認される。

【0122】

本明細書に記載されるスクリーニングにおいて有用な試験物質には、SMYD2タンパク質、またはインビボで元のタンパク質の生物学的活性を欠くその部分ペプチドに特異的に結合する抗体が含まれ得る。

試験物質ライブラリの構築は当技術分野において周知であるが、試験物質の同定および本スクリーニング方法のためのこのような物質のライブラリ構築についてのさらなる指針を本明細書において以下に提供する。

【0123】

本発明の一態様において、SMYD2タンパク質の発現レベルおよび/または生物学的活性の抑制は、癌細胞成長の抑制につながる。したがって、ある物質がSMYD2タンパク質の発現および/または活性を抑制する場合、このような抑制は、対象における潜在的な治療効果を示している。本発明との関連において、潜在的な治療効果は、合理的な見込みのある臨床的な利点を指す。このような臨床的な利点の例には、以下のものが含まれるがこれらに限定されない;

- (a) SMYD2遺伝子の発現低下、
- (b) 対象における癌のサイズ、有病率、成長もしくは転移能の低減、
- (c) 癌形成の予防、または
- (d) 癌の臨床症状の予防もしくは緩和。

【0124】

- (i) 分子モデリング:

10

20

30

40

50

試験物質ライブラリの構築は、求められる特性を有することが公知の物質の分子構造、および/またはS M Y D 2タンパク質の分子構造の知識によって容易になる。さらなる評価のために適切な試験物質を予備スクリーニングするための1つのアプローチは、試験物質とS M Y D 2タンパク質との間の相互作用のコンピュータモデリングを利用する。

コンピュータモデリング技術により、選択された分子の三次元原子構造の可視化、およびその分子と相互作用する新たな物質の合理的設計が可能になる。三次元コンストラクトは、典型的には、選択された分子のX線結晶学的分析またはNMRイメージングからのデータに依存する。分子動力学は力場データを必要とする。コンピュータグラフィックスシステムは、新たな物質が標的分子にどのように結合するかを予測可能にし、結合特異性を完全にするための物質および標的分子の構造の実験的操作を可能にする。一方または両方に軽微な変化が加えられた場合に、分子-物質相互作用がどのようになるかを予測するには、分子力学ソフトウェアおよび計算集約型コンピュータが必要とされ、それらは、通常、分子設計プログラムと使用者との間のユーザーフレンドリなメニュー方式のインターフェースと連結される。

【0125】

上記に概説された分子モデリングシステムの例には、CHARMMプログラムおよびQUANTAプログラム、Polygen Corporation, Waltham, Massが含まれる。CHARMMは、エネルギー最小化および分子動力学の機能を実行する。QUANTAは、分子構造の構築、グラフィックモデリング、および分析を実行する。QUANTAは、相互作用の構築、修飾、可視化、および分子の互いの挙動の分析を可能にする。

【0126】

特定のタンパク質と相互作用する薬物のコンピュータモデリングの主題について多数の論文が発表されており、その例には、Rotivinen et al. Acta Pharmaceutica Fennica 1988, 97: 159-66; Ripka, New Scientist 1988, 54-8; McKinlay & Rossmann, Annu Rev Pharmacol Toxicol 1989, 29: 111-22; Perry & Davies, Prog Clin Biol Res 1989, 291: 189-93; Lewis & Dean, Proc R Soc Lond 1989, 236: 125-40, 141-62; および核酸成分のモデル受容体に関するAskew et al., J Am Chem Soc 1989, 111: 1082-90が含まれる。

【0127】

化学物質をスクリーニングし図示する他のコンピュータプログラムは、BioDesign, Inc., Pasadena, Calif., Allelix, Inc, Mississauga, Ontario, Canada、およびHypercube, Inc., Cambridge, Ontarioなどの会社から入手可能である。例えば、Desjarlais et al., J Med Chem 1988, 31: 722-9; Meng et al., J Computer Chem 1992, 13: 505-24; Meng et al., Proteins 1993, 17: 266-78; Shoichet et al., Science 1993, 259: 1445-50を参照されたい。

【0128】

推定上の阻害剤が同定されたならば、以下に詳述されるように、同定された推定上の阻害剤の化学構造に基づいて、任意の数のバリエーションを構築するため、コンビナトリアルケミストリー技術を利用することができる。得られた推定上の阻害剤または「試験物質」のライブラリを、本発明の方法を用いてスクリーニングし、癌の治療および/もしくは予防法ならびに/または癌、特に膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌の術後再発の予防に適した試験物質を同定してもよい。

【0129】

(ii) コンビナトリアル化学合成:

試験物質のコンビナトリアルライブラリは、公知の阻害剤に存在しているコア構造の知識を使用する合理的薬物設計プログラムの一部として作製され得る。このアプローチにより、ハイ・スループット・スクリーニングを容易にする適度のサイズにライブラリを維持することが可能になる。あるいは、ライブラリを構成する分子ファミリーの全順列を簡便

に合成することによって、単純な、特に短い、重合体分子ライブラリを構築することもできる。この後者のアプローチの一例は、6アミノ酸長の全ペプチドのライブラリである。このようなペプチドライブラリは、6アミノ酸配列のあらゆる順列を含み得る。この種類のライブラリは、線形コンビナトリアル・ケミカル・ライブラリと呼ばれる。

【0130】

コンビナトリアル・ケミカル・ライブラリの調製は、当業者に周知であり、化学合成または生物学的合成のいずれかによって作製され得る。コンビナトリアル・ケミカル・ライブラリには、ペプチドライブラリ（例えば、米国特許第5,010,175号；Furka, *Int J Pept Prot Res* 1991, 37: 487-93; Houghten et al., *Nature* 1991, 354: 84-6を参照されたい）が含まれるが、これらに限定されない。化学的多様性ライブラリを作製するための他の化学を使用することもできる。このような化学には、ペプチド（例えば、PCT公報WO91/19735）、コードされたペプチド（例えば、WO93/20242）、ランダムバイオオリゴマー（例えば、WO92/00091）、ベンゾジアゼピン（例えば、米国特許第5,288,514号）、ヒダントイン、ベンゾジアゼピン、およびジペプチドなどのダイバーソマー（*diversomers*）（DeWitt et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90: 6909-13）、ビニロガス（*vinyllogous*）ポリペプチド（Hagihara et al., *J Amer Chem Soc* 1992, 114: 6568）、グルコース足場を有する非ペプチド性ペプチド模倣体（Hirschmann et al., *J Amer Chem Soc* 1992, 114: 9217-8）、低分子物質ライブラリの類似有機合成（Chen et al., *J. Amer Chem Soc* 1994, 116: 2661）、オリゴカルバメート（Cho et al., *Science* 1993, 261: 1303）、および/またはペプチジルホスホネート（Campbell et al., *J Org Chem* 1994, 59: 658）、核酸ライブラリ（Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology* 1995 supplement; Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USAを参照されたい）、ペプチド核酸ライブラリ（例えば、米国特許第5,539,083号を参照されたい）、抗体ライブラリ（例えば、Vaughan et al., *Nature Biotechnology* 1996, 14(3): 309-14およびPCT/US96/10287を参照されたい）、炭水化物ライブラリ（例えば、Liang et al., *Science* 1996, 274: 1520-22；米国特許第5,593,853号を参照されたい）、ならびに有機低分子ライブラリ（例えば、ベンゾジアゼピン、Gordon EM. *Curr Opin Biotechnol.* 1995 Dec 1; 6(6): 624-31.; イソプレノイド、米国特許第5,569,588号；チアゾリジノンおよびメタチアザノン、米国特許第5,549,974号；ピロリジン、米国特許第5,525,735号および第5,519,134号；モルホリノ物質、米国特許第5,506,337号；ベンゾジアゼピン、米国特許第5,288,514号などを参照されたい）が含まれるが、これらに限定されない。

【0131】

コンビナトリアルライブラリの調製のための材料および方法は市販されている（例えば、357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MAを参照されたい）。加えて、コンビナトリアルライブラリ自体も多数市販されている（例えば、ComGenex, Princeton, N.J., Tripos, Inc., St. Louis, MO, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MDなどを参照されたい）。

【0132】

(iii) 他の候補：

別のアプローチは、ライブラリを作製するために組換えバクテリオファージを使用する。「ファージ法」（Scott & Smith, *Science* 1990, 249: 386-90; Cwirla et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 6378-82; Devlin et al., *Science* 1990, 249: 404-6）を使用して、極めて大きいライブラリを構築することができる（例えば、 $10^6 \sim 10^8$ 個の

化学物質)。第2のアプローチは、主として化学的な方法を使用し、Geysenの方法 (Geysen et al., Molecular Immunology 1986, 23: 709-15; Geysen et al., J Immunologic Method 1987, 102: 259-74); および Fodorらの方法 (Science 1991, 251: 767-73) がその例である。Furkara (14th International Congress of Biochemistry 1988, Volume #5, Abstract FR: 013; Furka, Int J Peptide Protein Res 1991, 37: 487-93)、Houghten (米国特許第4,631,211号)、およびRutterら (米国特許第5,010,175号) は、アゴニストまたはアンタゴニストとして試験され得るペプチドの混合物を作製する方法を記載している。

【0133】

アプタマーは、特定の分子標的に強固に結合する核酸から構成された高分子である。TuerkおよびGold (Science, 249:505-510 (1990)) は、アプタマーの選択のためのSELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) 法を開示している。SELEX法においては、核酸分子の大きなライブラリ (例えば、 10^{15} 個の異なる分子) をスクリーニングに使用することができる。

【0134】

SMYD2ポリペプチドの全長に加えて、利用されるその断片が、天然に存在するSMYD2ポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を保持している限り、そのポリペプチドの断片を本スクリーニングに使用してもよい。本発明によって意図されるこのような生物学的活性の例には、天然のSMYD2ポリペプチドの細胞増殖促進活性および/またはメチルトランスフェラーゼ活性が含まれる。

【0135】

SMYD2ポリペプチドまたはその機能的等価物は、該ポリペプチドおよび断片がそれらの生物学的活性の少なくとも1つを保持している限り、他の物質にさらに連結させてもよい。有用な物質には、ペプチド、脂質、糖および糖鎖、アセチル基、天然および合成のポリマーなどが含まれる。これらの種類の修飾を行って、さらなる機能を付与すること、または該ポリペプチドおよび断片を安定化することができる。

【0136】

SMYD2ポリペプチド結合物質のスクリーニング:

本発明との関連において、正常な器官では発現されていないにもかかわらず、SMYD2遺伝子の過剰発現が、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌で検出された (図1A~F)。さらに、siRNAによるSMYD2のノックダウンおよびSMYD2の不活性化は、癌細胞成長の阻害をもたらした (図2)。膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌におけるSMYD2遺伝子の発現レベルの上昇、およびsiRNAによるSMYD2のノックダウン効果により、SMYD2ポリペプチドに結合する物質は、癌細胞増殖を抑制するので、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌におけるSMYD2遺伝子の発現レベルの上昇、およびsiRNAによるSMYD2のノックダウン効果により、SMYD2ポリペプチドに結合する物質は、癌細胞増殖を抑制するので、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌を
含む癌の治療または予防に有用であると予想される。したがって、本発明はまた、SMYD2ポリペプチドに対する結合活性を指標として使用して、癌細胞増殖を抑制する候補物質をスクリーニングする方法、ならびに癌、特に膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌を治療または予防するための候補物質をスクリーニングする方法を提供する。このスクリーニング方法の特定の一実施形態は、以下の段階を含む:

- (a) 試験物質を、SMYD2ポリペプチドまたはその機能的等価物と接触させる段階;
- (b) SMYD2ポリペプチドまたはその機能的等価物と試験物質との間の結合活性を検出する段階; および
- (c) SMYD2ポリペプチドまたはその機能的等価物に結合する試験物質を、癌を治療または予防するための候補物質として選択する段階。

【 0 1 3 7 】

あるいは、本発明によれば、癌の治療または予防に対する試験物質の潜在的な治療効果も評価または推定することができる。いくつかの実施形態において、本発明は、以下の段階を含む、癌の治療もしくは予防、または S M Y D 2 の過剰発現に関連する癌の阻害に対する試験物質の治療効果を評価または推定するための方法を提供する：

(a) 試験物質を、 S M Y D 2 ポリペプチドまたはその機能的等価物と接触させる段階；
(b) S M Y D 2 ポリペプチドまたはその機能的等価物と該試験物質との間の結合活性を検出する段階；および

(c) 該試験物質の潜在的な治療効果を、段階 (b) で検出された結合活性と関連させる段階であって、該試験物質が、癌を治療または予防するための候補物質として該ポリペプチドまたはその機能的等価物に結合する場合に、潜在的な治療効果が示される段階。

10

【 0 1 3 8 】

本発明との関連において、治療効果は、試験物質および S M Y D 2 ポリペプチドの結合レベルと関連させてもよい。例えば、試験物質が S M Y D 2 ポリペプチドに結合する場合、試験物質を、必要な治療効果を有する候補物質として同定または選択してもよい。あるいは、試験物質が S M Y D 2 ポリペプチドに結合しない場合、試験物質を、有意な治療効果を有しない物質として同定してもよい。

【 0 1 3 9 】

本発明のスクリーニング方法を以下により詳細に説明する。

スクリーニングに使用されるべき S M Y D 2 ポリペプチドは、組換えポリペプチドもしくは天然由来のタンパク質、またはそれらの部分ペプチドであり得る。試験物質と接触させるべきポリペプチドは、例えば、精製されたポリペプチド、可溶性タンパク質、担体と結合した形態、または他のポリペプチドと融合した融合タンパク質であり得る。好ましい実施形態において、ポリペプチドを、 S M Y D 2 を発現する細胞から単離するか、または化学合成して、試験物質とインビトロで接触させる。

20

【 0 1 4 0 】

S M Y D 2 ポリペプチドに結合するタンパク質をスクリーニングする方法として、当業者に周知の多くの方法を使用することができる。このようなスクリーニングは、例えば、免疫沈降法によって、具体的には以下のように行うことができる。 S M Y D 2 ポリペプチドをコードする遺伝子を、 p S V 2 n e o、 p c D N A I、 p c D N A 3 . 1、 p C A G G S、および p C D 8 などの外来遺伝子の発現ベクターに挿入することによって、宿主（例えば、動物）細胞などにおいて発現させる。

30

【 0 1 4 1 】

発現に使用されるべきプロモーターは、一般に使用され得る任意のプロモーターでもよく、例えば、 S V 4 0 初期プロモーター (Rigby in Williamson (ed.), Genetic Engineering, vol. 3. Academic Press, London, 83-141 (1982))、 E F - プロモーター (Kim et al., Gene 91:217-23 (1990))、 C A G プロモーター (Niwa et al., Gene 108:193 (1991))、 R S V L T R プロモーター (Cullen, Methods in Enzymology 152:684-704 (1987))、 S R プロモーター (Takebe et al., Mol Cell Biol 8:466 (1988))、 C M V 前初期プロモーター (Seed and Aruffo, Proc Natl Acad Sci USA 84:3365-9 (1987))、 S V 4 0 後期プロモーター (Gheysen and Fiers, J Mol Appl Genet 1:385-94 (1982))、 アデノウイルス後期プロモーター (Kaufman et al., Mol Cell Biol 9:946 (1989))、 H S V T K プロモーターなどが含まれ得る。

40

【 0 1 4 2 】

外来遺伝子を発現させるための宿主細胞への遺伝子の導入は、任意の方法、例えば、エレクトロポレーション法 (Chu et al., Nucleic Acids Res 15:1311-26 (1987))、リン酸カルシウム法 (Chen and Okayama, Mol Cell Biol 7:2745-52 (1987))、 D E A E デキストラン法 (Lopata et al., Nucleic Acids Res 12:5707-17 (1984); Sussman and Milman, Mol Cell Biol 4:1641-3 (1984))、リポフェクチン法 (Derijard B., Cell 76:1025-37 (1994); Lamb et al., Nature Genetics 5:22-30 (1993); Rabindran et al., Science

50

259:230-4 (1993)) などにしたがって実施することができる。

【 0 1 4 3 】

ポリペプチドのN末端またはC末端に、特異性が明らかなモノクローナル抗体のエピトープを導入することによって、モノクローナル抗体の認識部位(エピトープ)を含む融合タンパク質として、S M Y D 2 遺伝子によってコードされるポリペプチドを発現させることができる。任意の市販のエピトープ-抗体システムを使用することができる(Experimental Medicine 13:85-90 (1995))。マルチクローニング部位の使用によって、例えば、

ガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)などとの融合タンパク質を発現し得るベクターが、市販されている。また、融合によりS M Y D 2 ポリペプチドの特性が変化しないように、数個~12個のアミノ酸から構成される小さなエピトープのみを導入することによって調製された融合タンパク質が本明細書において提供される。ポリヒスチジン(His-タグ)、インフルエンザ凝集HA、ヒトc-myc、FLAG、水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質(VSV-GP)、T7遺伝子10タンパク質(T7-タグ)、ヒト単純ヘルペスウイルス糖タンパク質(HSV-タグ)、E-タグ(モノクローナルファージ上のエピトープ)などのエピトープと、これらを認識するモノクローナル抗体とを、S M Y D 2 ポリペプチドに結合するタンパク質をスクリーニングするためのエピトープ-抗体システムとして使用することができる(Experimental Medicine 13:85-90 (1995))。

【 0 1 4 4 】

免疫沈降との関連において、適切な界面活性剤を使用して調製された細胞ライセートに、これらの抗体を添加することによって、免疫複合体が形成される。免疫複合体は、S M Y D 2 ポリペプチド、該ポリペプチドとの結合能を有するポリペプチド、および抗体から構成される。免疫沈降は、上記エピトープに対する抗体を使用する以外に、S M Y D 2 ポリペプチドに対する、上記のように調製され得る抗体を使用して行ってもよい。抗体がマウスIgG抗体である場合、例えば、プロテインAセファロースまたはプロテインGセファロースによって、免疫複合体を沈降させることができる。S M Y D 2 遺伝子によってコードされるポリペプチドが、GSTなどのエピトープとの融合タンパク質として調製される場合には、グルタチオン-セファロース4Bなどのこれらのエピトープと特異的に結合する物質を使用して、S M Y D 2 ポリペプチドに対する抗体を使用する場合と同様に免疫複合体を形成させることができる。

【 0 1 4 5 】

免疫沈降は、例えば、文献中の方法にしたがってまたは準じて実施することができる(Harlow and Lane, Antibodies, 511-52, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York (1988))。

免疫沈降したタンパク質の分析には、SDS-PAGEが一般に使用され、結合したタンパク質は、適切な濃度を有するゲルを使用して、タンパク質の分子量によって分析され得る。S M Y D 2 ポリペプチドに結合したタンパク質は、クーマシー染色または銀染色などの一般の染色法によって検出することが困難であるため、細胞を、放射性同位体³⁵S-メチオニンまたは³⁵S-システインを含有する培養培地中で培養し、細胞内のタンパク質を標識し、タンパク質を検出することによって、タンパク質の検出感度を改善することができる。タンパク質の分子量が明らかである場合には、標的タンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲルから直接精製し、その配列を決定することができる。

【 0 1 4 6 】

あるいは、ウエストウエスタンブロッティング分析(Skolnik et al., Cell 65:83-90 (1991))を使用して、S M Y D 2 ポリペプチドに結合するタンパク質をスクリーニングすることができる。特に、S M Y D 2 ポリペプチドに結合するタンパク質を発現すると予想される培養細胞から、cDNAライブラリを、ファージベクター(例えば、ZAP)を使用して調製し、LB-アガロース上でタンパク質を発現させ、発現されたタンパク質をフィルタ上に固定し、精製され標識されたS M Y D 2 ポリペプチドを上記フィルタと反応させ、S M Y D 2 ポリペプチドに結合したタンパク質を発現しているブランクを標識によ

て検出することによって、S M Y D 2 ポリペプチドに結合するタンパク質を得ることができる。ビオチンとアビジンとの間の結合を利用することによって、またはS M Y D 2 ポリペプチドと特異的に結合する抗体、もしくはS M Y D 2 ポリペプチドと融合されるペプチドもしくはポリペプチド（例えば、G S T）を利用することによって、S M Y D 2 ポリペプチドを標識してもよい。放射性同位体または蛍光などを使用する方法も、使用してもよい。

【0147】

本明細書において使用される場合、「標識」および「検出可能な標識」という用語は、分光的手段、光化学的手段、生物学的手段、免疫化学的手段、電気的手段、光学的手段または化学的手段によって検出可能な任意の成分を指すのに使用される。このような標識には、標識されたストレプトアビジン複合体による染色のためのビオチン、磁気ビーズ（例えば、D Y N A B E A D S（商標））、蛍光染料（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質など）、放射標識（例えば、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C または ^{32}P ）、酵素（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、およびE L I S Aに一般に使用される他のもの）、および熱量測定標識、例えばコロイド金または着色ガラスもしくはプラスチック（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）ビーズが含まれる。このような標識の使用を教示する特許には、米国特許第3,817,837号、米国特許第3,850,752号、米国特許第3,939,350号、米国特許第3,996,345号、米国特許第4,275,149号、および米国特許第4,366,241号が含まれる。このような標識を検出する手段は当業者に周知である。したがって、例えば、放射線標識は写真フィルムまたはシンチレーションカウンタを使用して検出することができ、蛍光マーカは発光を検出するために光検出器を使用して検出することができる。酵素標識は、典型的には、酵素に基質を与え、基質に対する酵素作用によって生成された反応生成物を検出することによって検出され、熱量測定標識は着色標識を単純に視覚化することによって検出される。

【0148】

あるいは、別の実施形態において、本発明のスクリーニング法は、ツーハイブリッド細胞システムを利用してよい（「M A T C H M A K E R Two - H y b r i d s y s t e m」、「M a m m a l i a n M A T C H M A K E R Two - H y b r i d A s s a y K i t」、「M A T C H M A K E R o n e - H y b r i d s y s t e m」（C l o n t e c h）；「H y b r i Z A P Two - H y b r i d V e c t o r S y s t e m」（S t r a t a g e n e）；参考文献「Dalton and Treisman, Cell 68:597-612 (1992)」、「Fields and Sternglanz, Trends Genet 10:286-92 (1994)」）。

【0149】

ツーハイブリッドシステムにおいては、S M Y D 2 ポリペプチドをS R F 結合領域またはG A L 4 結合領域に融合させ、酵母細胞において発現させる。S M Y D 2 ポリペプチドに結合するタンパク質を発現すると予想される細胞からのc D N Aライブラリを、ライブラリが、発現された場合にV P 1 6またはG A L 4の転写活性化領域に融合するように、調製する。次いで、c D N Aライブラリを上記酵母細胞に導入し、ライブラリに由来するc D N Aを、検出された陽性クローンから単離する（S M Y D 2 ポリペプチドに結合するタンパク質が酵母細胞において発現される場合、その2つの結合がレポーター遺伝子を活性化し、陽性クローンを検出可能にする）。上記の単離されたc D N Aを大腸菌に導入し、タンパク質を発現させることによって、c D N Aによってコードされるタンパク質を調製することができる。適切なレポーター遺伝子の例には、A d e 2 遺伝子、l a c Z 遺伝子、C A T 遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子が含まれるが、これらに限定されず、H I S 3 遺伝子に加えてこのようなものを使用することができる。

【0150】

アフィニティクロマトグラフィーを使用して、S M Y D 2 ポリペプチドに結合する物質をスクリーニングすることもできる。例えば、S M Y D 2 ポリペプチドをアフィニティカラムの担体上に固定化し、本発明のポリペプチドに結合可能なタンパク質を含有する試験

物質をカラムに適用することができる。本明細書における試験物質は、例えば、細胞抽出物、細胞ライセートなどであり得る。試験物質をロードした後、カラムを洗浄し、SMYD2ポリペプチドに結合した物質を調製することができる。試験物質がタンパク質である場合には、得られたタンパク質のアミノ酸配列を分析し、配列に基づいてオリゴDNAを合成し、オリゴDNAをプローブとして使用してcDNAライブラリをスクリーニングして、タンパク質をコードするDNAを得る。

【0151】

本発明においては、結合した物質を検出または定量する手段として、表面プラズモン共鳴現象を使用するバイオセンサーを使用してもよい。このようなバイオセンサーを使用した場合、極微量のSMYD2ポリペプチドのみを使用して、標識することなく、SMYD2ポリペプチドと試験物質との間の相互作用を、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムで観察することができる（例えば、BIAcore、Pharmacia）。したがって、BIAcoreなどのバイオセンサーを使用して、SMYD2ポリペプチドと試験物質との間の結合を評価することが可能である。

【0152】

タンパク質だけではなくSMYD2タンパク質に結合する化学物質（アゴニストおよびアンタゴニストを含む）を単離するための、固定化されたSMYD2ポリペプチドを合成化学物質または天然物質バンクもしくはランダム・ファージ・ペプチド・ディスプレイ・ライブラリに曝露した場合に結合する分子をスクリーニングする方法、およびコンビナトリアルケミストリー技術に基づくハイスループットを使用したスクリーニング法（Wright et al., Science 273:458-64 (1996); Verdine, Nature 384:11-13 (1996); Hogan, Nature 384:17-9 (1996)）が当業者に周知である。

【0153】

SMYD2ポリペプチドの全長に加えて、SMYD2ポリペプチドの断片は、該断片が、天然に存在するSMYD2ポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を保持している限り、本スクリーニング方法に使用してもよい。このような生物学的活性には、細胞増殖促進活性およびメチルトランスフェラーゼ活性などが含まれる。

SMYD2ポリペプチドまたはその断片は、該ポリペプチドまたは機能的等価物が少なくとも1つの生物学的活性を保持している限り、他の物質にさらに連結させてもよい。使用可能な物質には、ペプチド、脂質、糖および糖鎖、アセチル基、天然および合成のポリマーなどが含まれる。これらの種類の修飾を行って、さらなる機能を付与すること、または該ポリペプチドまたは機能的等価物を安定化することができる。

【0154】

本発明の方法に使用されるSMYD2ポリペプチドまたは機能的等価物は、従来の精製方法によって天然に存在するタンパク質として天然から、または選択されたアミノ酸配列に基づく化学合成を通じて、得ることができる。例えば、合成のために採用することができる従来のペプチド合成方法には、以下のものが含まれる：

- 1) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;
- 2) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976;
- 3) ペプチド合成（日本語）、丸善、1975;
- 4) ペプチド合成の基礎と実験（日本語）、丸善、1985;
- 5) 医薬品の開発 続第14巻（ペプチド合成）（日本語）、広川書店、1991
- 6) WO 99 / 67288; および
- 7) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, 「Solid Phase Peptide Synthesis」, Academic Press, New York, 1980, 100-118.

【0155】

あるいは、SMYD2ポリペプチドは、ポリペプチドを作製するための任意の公知の遺伝子工学的的方法によって、得ることもできる（例えば、Morrison J., J Bacteriology 1977, 132:349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.) 1983, 101:347-62）。例えば、最初に、目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを発

現可能な形態で（例えば、プロモーターを含む調節配列の下流に）含む適切なベクターを調製し、適切な宿主細胞中に形質転換し、次いでその宿主細胞を培養して、そのタンパク質を産生させる。より具体的には、S M Y D 2 ポリペプチドをコードする遺伝子を、p S V 2 n e o、p c D N A I、p c D N A 3 . 1、p C A G G S、またはp C D 8 など外来遺伝子を発現させるためのベクター中にその遺伝子を挿入することによって、宿主（例えば、動物）細胞などにおいて発現させる。発現のために、プロモーターを使用することができる。一般に使用される任意のプロモーターを利用することができ、例えば、S V 4 0 初期プロモーター（Rigby, Williamson(ed.), Genetic Engineering, vol. 3. Academic Press, London, 1982, 83-141）、E F - プロモーター（Kim et al., Gene 1990, 91:217-23）、C A G プロモーター（Niwa et al., Gene 1991, 108:193）、R S V L T R プロモーター（Cullen, Methods in Enzymology 1987, 152:684-704）、S R プロモーター（Takebe et al., Mol Cell Biol 1988, 8:466）、C M V 前初期プロモーター（Seed et al., Proc Natl Acad Sci USA 1987, 84:3365-9）、S V 4 0 後期プロモーター（Gheysen et al., J Mol Appl Genet 1982, 1:385-94）、アデノウイルス後期プロモーター（Kaufman et al., Mol Cell Biol 1989, 9:946）、およびH S V T K プロモーターなどが含まれる。S M Y D 2 遺伝子を発現させるための、宿主細胞へのベクターの導入は、任意の方法、例えば、エレクトロポレーション法（Chu et al., Nucleic Acids Res 1987, 15:1311-26）、リン酸カルシウム法（Chen et al., Mol Cell Biol 1987, 7:2745-52）、D E A E デキストラン法（Lopata et al., Nucleic Acids Res 1984, 12:5707-17; Susman et al., Mol Cell Biol 1985, 4:1641-3）、およびリポフェクション法（Derijard B, Cell 1994, 7:1025-37; Lamb et al., Nature Genetics 1993, 5:22-30; Rabindran et al., Science 1993, 259:230-4）などにしたがって実施することができる。

【 0 1 5 6 】

S M Y D 2 ポリペプチドはまた、インビトロの翻訳系を採用してインビトロで作製してもよい。

試験物質と接触させるべきS M Y D 2 ポリペプチドは、例えば、精製されたポリペプチド、可溶性タンパク質、または他のポリペプチドと融合した融合タンパク質であり得る。

本方法によって、S M Y D 2 ポリペプチドに結合する物質としてスクリーニングされる試験物質は、癌を治療または予防する潜在能力を有する候補物質であり得る。これらの候補物質が癌を治療または予防する潜在能力を、第2のおよび/またはさらなるスクリーニングによって評価して、癌に対する該物質の治療効果をさらに同定または確認してもよい。例えば、物質を、S M Y D 2 遺伝子を過剰発現する癌細胞と接触させることによって、これらの候補物質を、癌細胞増殖の抑制についてさらに検査してもよい。

【 0 1 5 7 】

S M Y D 2 の生物学的活性を抑制する物質のスクリーニング：

本発明の間に、S M Y D 2 遺伝子は、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌で特異的かつ有意に過剰発現していることが明らかになった（図1D、F）。さらに、低分子干渉RNA（siRNA）によるS M Y D 2 遺伝子の抑制は、癌細胞の成長阻害および/または細胞死をもたらした（図2A、B、D、E、F）。さらに、S M Y D 2 タンパク質の不活性化は、コロニー形成活性を低下させた（図2C）。

【 0 1 5 8 】

さらに、本発明の間に、新規なS M Y D 2 基質として同定されたH S P 9 0 A B 1 およびR B 1 のS M Y D 2 メチル化部位をアラニンに置換することにより、H S P 9 0 A B 1（図5H）およびR B 1（図12）の成長促進効果が減少した。

これらの結果は、S M Y D 2 ポリペプチドが癌細胞の生存に関与することを明確に実証しているので、S M Y D 2 ポリペプチドの生物学的活性を阻害する物質は、癌治療に適切な候補物質として役立つ。

したがって、本発明はまた、S M Y D 2 ポリペプチドの生物学的活性を指標として使用して、癌の治療および予防のいずれかまたは両方のための候補物質をスクリーニングする

ための方法を提供する。

例示的な癌には、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌が含まれる。

【0159】

具体的には、本発明は、以下の方法を提供する：

以下の段階を含む、癌の治療および予防のいずれかまたは両方のための候補物質をスクリーニングする方法：

(a) 試験物質を、SMYD2ポリヌクレオチドまたはその機能的等価物と接触させる段階；

(b) 段階(a)のSMYD2ポリペプチドまたはその機能的等価物の生物学的活性を検出する段階；

(c) 段階(b)で検出された生物学的活性を、該試験物質の非存在下で検出されたものと比較する段階；

(d) SMYD2ポリペプチドまたはその機能的等価物の生物学的活性を低下させるかまたは阻害する試験物質を選択する段階。

【0160】

本発明との関連において、SMYD2ポリペプチドの生物学的活性（例えば、細胞増殖促進活性またはメチルトランスフェラーゼ活性）の抑制に対する試験物質の治療効果、または癌の治療および予防のいずれかまたは両方のための候補物質を評価することができる。したがって、本発明はまた、以下の段階を含む、SMYD2ポリペプチドまたはその機能的等価物を使用して、SMYD2ポリペプチドの生物学的活性を抑制するための候補物質、または癌の治療および予防のいずれかまたは両方のための候補物質をスクリーニングする方法を提供する：

(a) 試験物質を、SMYD2ポリペプチドまたはその機能的等価物と接触させる段階；および

(b) 段階(a)のポリペプチドまたはその機能的等価物の生物学的活性を検出する段階、および

(c) (b)の生物学的活性を試験物質の治療効果と関連させる段階。

【0161】

本発明との関連において、治療効果は、SMYD2ポリペプチドまたはその機能的等価物の生物学的活性と関連させてもよい。例えば、試験物質が、SMYD2ポリペプチドまたはその機能的等価物の生物学的活性を、該試験物質の非存在下で検出されたレベルと比較して抑制または阻害する場合、該試験物質を、治療効果を有する候補物質として同定または選択してもよい。あるいは、試験物質が、SMYD2ポリペプチドまたはその機能的等価物の生物学的活性を、該試験物質の非存在下で検出されたレベルと比較して抑制または阻害しない場合、該試験物質を、有意な治療効果を有しない物質として同定してもよい。

【0162】

あるいは、いくつかの実施形態において、本発明は、以下の段階を含む、癌の治療および予防のいずれかもしくは両方、またはSMYD2遺伝子の過剰発現に関連する癌の阻害に対する試験物質の治療効果を評価または推定するための方法を提供する：

(a) 試験物質を、SMYD2ポリペプチドまたはその機能的等価物と接触させる段階；

(b) 段階(a)のポリペプチドまたはその機能的等価物の生物学的活性を検出する段階；および

(c) 潜在的な治療効果と該試験物質とを関連させる段階であって、物質が、SMYD2ポリペプチドまたはその機能的等価物の生物学的活性を、該試験物質の非存在下で検出された該ポリペプチドの生物学的活性と比較して抑制する場合に、潜在的な治療効果が示される、段階。

【0163】

発現、結合および生物学的活性との関連において、「抑制する」という用語は、部分的

なもののから完全なものにまで及ぶ効果を包含するために、「低下させる」および「阻害する」という用語と互換的に使用される。したがって、本明細書において定義される場合、「生物学的活性を抑制する」という語句は、S M Y D 2 の生物学的活性の、物質の非存在下と比較した少なくとも 10 % の抑制、より好ましくは少なくとも 25 %、50 %、または 75 % の抑制、および最も好ましくは 90 % の抑制を指す。

【0164】

上記のように、本発明によって意図される癌の例には、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌が含まれるが、これらに限定されない。

【0165】

本発明との関連において、治療効果は、S M Y D 2 ポリペプチドまたはその機能的等価物の生物学的活性と相関させてもよい。例えば、試験物質が、S M Y D 2 ポリペプチドまたはその機能的等価物の生物学的活性を、該試験物質の非存在下で検出されたレベルと比較して抑制または阻害する場合、該試験物質を、治療効果を有する候補物質として同定または選択してもよい。あるいは、試験物質が、S M Y D 2 ポリペプチドまたはその機能的等価物の生物学的活性を、該試験物質の非存在下で検出されたレベルと比較して抑制または阻害しない場合、該試験物質を、有意な治療効果を有しない物質として同定してもよい。

【0166】

本発明のスクリーニング方法を以下により詳細に説明する。

任意のポリペプチドは、それらが S M Y D 2 ポリペプチドの少なくとも 1 つの生物学的活性を保持している限り、本発明のスクリーニング方法に使用することができる。このような生物学的活性の例には、S M Y D 2 ポリペプチドの細胞増殖促進活性およびメチルトランスフェラーゼ活性が含まれる。例えば、S M Y D 2 ポリペプチドを使用することもできるし、S M Y D 2 ポリペプチドと機能的に等価なポリペプチドを使用することもできる。このようなポリペプチドは、細胞によって内因的または外因的に発現されてもよい。S M Y D 2 ポリペプチドの機能的等価物の詳細については、「遺伝子およびタンパク質」の項目を参照されたい。例えば、S E T ドメインを保持する S M Y D 2 ポリペプチドの断片、例えば、配列番号 63 の 17 番目から 247 番目のアミノ酸のアミノ酸配列を含有する断片は、S M Y D 2 ポリペプチドの機能的等価物であり得る。

【0167】

本発明のスクリーニング方法によって単離される物質は、S M Y D 2 ポリペプチドのアンタゴニスト（阻害剤）候補であると考えられる。「アンタゴニスト」という用語は、ポリペプチドに結合することによって、その機能を阻害する分子を指す。この用語は、S M Y D 2 ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を低下させるかまたは阻害する分子も指す。さらに、このスクリーニングによって単離される物質は、S M Y D 2 ポリペプチドと分子（DNA およびタンパク質を含む）とのインビボの相互作用を阻害する物質の候補である。

【0168】

本方法において検出されるべき生物学的活性が細胞増殖促進活性である場合、例えば、S M Y D 2 ポリペプチドを発現している細胞を調製し、試験物質の存在下で該細胞を培養し、細胞周期などを測定して細胞増殖速度を決定することによって、および例えば M T T アッセイ、コロニー形成アッセイまたは F A C S によって生存細胞またはコロニー形成活性を測定することによって、細胞増殖促進活性を検出することができる。

【0169】

S M Y D 2 を発現する細胞の増殖速度を減少させる物質は、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌などの癌を治療または予防するための候補物質として選択される。いくつかの実施形態において、S M Y D 2 遺伝子を発現する細胞は、S M Y D 2 遺伝子をインビトロで外因的または内因的に発現する単離された培養細胞である。

【 0 1 7 0 】

より具体的には、方法は、以下の段階を含む：

- (a) 試験物質を、 S M Y D 2 遺伝子を過剰発現する細胞と接触させる段階；
- (b) 細胞増殖促進活性を測定する段階；および
- (c) 細胞増殖促進活性を該試験物質の非存在下の細胞増殖促進活性と比較して低下させる試験物質を選択する段階。

好ましい実施形態において、本発明の方法は、以下の段階をさらに含んでもよい：

- (d) S M Y D 2 遺伝子を全く発現しないかまたはほとんど発現しない細胞に対して効果を有しない試験物質を選択する段階。

【 0 1 7 1 】

本方法において検出されるべき生物学的活性がメチルトランスフェラーゼ活性である場合、 S M Y D 2 ポリペプチドを、基質（例えば、ヒストン H 4 タンパク質またはその断片（例えば、配列番号 6 6 ）、ヒストン H 3 タンパク質またはその断片、 H S P 9 0 A B 1 タンパク質、または配列番号 6 5 のリジン 5 3 1 および / もしくはリジン 5 7 4 を含有するその断片、 R B 1 タンパク質、または配列番号 6 8 のリジン 8 1 0 を含有するその断片（例えば、配列番号 6 9 ））および補因子（例えば、 S - アデノシル - L - メチオニン、 S - アデノシル - L - [メチル - ³ H] メチオニン、または L - [メチル - ³ H] メチオニン）と、該基質のメチル化に適切な条件下で接触させ、該基質のメチル化レベルを検出することによって、メチルトランスフェラーゼ活性を決定することができる。

【 0 1 7 2 】

より具体的には、本発明は、以下の [1] ~ [1 0] の方法を提供する：

[1] 以下の段階を含む、癌の治療および予防のいずれかまたは両方のための候補物質をスクリーニングする方法：

- (a) 試験物質を、 S M Y D 2 ポリペプチドまたはその機能的等価物、基質および補因子と、該基質のメチル化に適切な条件下で接触させる段階；
- (b) 該基質のメチル化レベルを検出する段階；および
- (c) 該基質のメチル化レベルを該試験物質の非存在下のメチル化レベルと比較して低下させる試験物質を選択する段階；

[2] 該基質が、ヒストンタンパク質、または少なくとも 1 つのメチル化部位を含むその断片である、[1] に記載の方法；

[3] 該ヒストンが、ヒストン H 4 またはヒストン H 3 である、[2] に記載の方法；

[4] 該基質が、 H S P 9 0 A B 1 ポリペプチド、または少なくとも 1 つのメチル化部位を含むその断片である、[1] に記載の方法；

[5] 該メチル化部位が、 H S P 9 0 A B 1 ポリペプチド（配列番号 6 5 ）のリジン 5 3 1 および / またはリジン 5 7 4 である、[4] に記載の方法；

[6] 該基質が、 R B 1 ポリペプチド、または少なくとも 1 つのメチル化部位を含むその断片である、[1] に記載の方法；

[7] 該メチル化部位が、 R B 1 ポリペプチド（配列番号 6 8 ）のリジン 8 1 0 である、[6] に記載の方法、

[8] 該補因子が、 S - アデノシルメチオニンである、[1] ~ [7] のいずれかに記載の方法；

[9] 該ポリペプチドを該基質および補因子とメチル化促進剤の存在下で接触させる、[1] ~ [8] のいずれかに記載の方法；および

[1 0] 該メチル化促進剤が、 S - アデノシルホモシステインヒドロラーゼ（ S A H H ）である、[9] に記載の方法。

【 0 1 7 3 】

本発明との関連において、 S M Y D 2 ポリペプチドのメチルトランスフェラーゼ活性は、当技術分野において公知の方法によって決定することができる（例えば、Brown et al, Mol Cancer 2006;5:26, Huang et al, Nature 2006;444:629-632, Saddic et al, J Bio I Chem 2010;285:37733-37740を参照されたい）。

【 0 1 7 4 】

例えば、S M Y D 2 ポリペプチドおよび基質を、適切なアッセイ条件下で、標識メチル供与体と共にインキュベートすることができる。ヒストン H 4 ペプチド（すなわち、ヒストン H 4 タンパク質またはその断片（例えば、配列番号 6 6 ））、ヒストン H 3 ペプチド（すなわち、ヒストン H 3 タンパク質またはその断片）、H S P 9 0 A B 1 ペプチド（すなわち、H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドまたはその断片）、または R B 1 ペプチド（すなわち、R B 1 ポリペプチドまたはその断片（例えば、配列番号 6 9 ））を基質として、および標識 S - アデノシル - L - メチオニン（例えば、S - アデノシル - [メチル - ¹⁴C] - L - メチオニン、S - アデノシル - [メチル - ³H] - L - メチオニンおよび L - [メチル - ³H] メチオニン）をメチル供与体としてそれぞれ使用することができる。例えば、S D S - P A G E 電気泳動およびフルオログラフィーによって、基質（例えば、ヒストン H 4 ペプチド、ヒストン H 3 ペプチド、H S P 9 0 A B 1 ペプチド、または R B 1 ペプチド）への放射標識の転移を検出することができる。あるいは、反応の後、基質をろ過によってメチル供与体から分離し、フィルタ上に保持された放射標識の量をシンチレーション計数によって定量することができる。発色標識および蛍光標識などの、メチル供与体に付着させることができる他の適切な標識、ならびに基質へのこれらの標識の転移を検出する方法は、当技術分野において公知である。メチルトランスフェラーゼアッセイの例は、「実施例 6 : S M Y D 2 のメチルトランスフェラーゼ活性の阻害剤のスクリーニング」で説明する。

【 0 1 7 5 】

あるいは、未標識メチル供与体（例えば、S - アデノシル - L - メチオニン）、およびメチル化基質（例えば、ヒストン H 4 ペプチド、ヒストン H 3 ペプチド、H S P 9 0 A B 1 ペプチド、R B 1 ペプチドなど）を選択的に認識する試薬を使用して、S M Y D 2 ポリペプチドのメチルトランスフェラーゼ活性を決定することもできる。例えば、基質のメチル化が可能な条件下で、S M Y D 2 ポリペプチド、メチル化されるべき基質およびメチル供与体をインキュベートした後、メチル化基質を免疫学的方法によって検出することができる。メチル化基質を認識する抗体を使用した任意の免疫学的技術を、検出に使用することができる。例えば、メチル化ヒストンに対する抗体が市販されている（a b c a m l t d . ）。メチル化基質を認識する抗体を用いた E L I S A またはイムノブロットイングを、本発明に使用することができる。

【 0 1 7 6 】

本発明との関連において、ヒストン H 4 もしくはその断片（例えば、配列番号 6 6 ）、ヒストン H 3 タンパク質もしくはその断片、または H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドもしくはその断片、または R B 1 ポリペプチドもしくはその断片（例えば、配列番号 6 9 ）は、好ましくは、S M Y D 2 ポリペプチドによってメチル化されるべき基質として使用することができる。基質として使用されるべきヒストン H 3 断片は、好ましくは、リジン 3 6 を保持する。基質として使用されるべきヒストン H 4 断片は、好ましくは、リジン 2 0 を保持する。基質として使用されるべき H S P 9 0 A B 1 断片は、好ましくは、リジン 5 3 1 および / またはリジン 5 7 4 を保持する。基質として使用されるべき R B 1 断片は、好ましくは、リジン 8 1 0 を保持する。このようなヒストン H 4 断片、ヒストン H 3 断片、H S P 9 0 A B 1 断片または R B 1 断片は、好ましくは少なくとも 1 0 個のアミノ酸残基、より好ましくは少なくとも 1 5 個のアミノ酸残基、およびさらにより好ましくは少なくとも 2 0 個のアミノ酸残基から構成される。このようなヒストン H 4 断片の例には、配列番号 6 6 のアミノ酸配列を有するペプチドが含まれる。このような H S P 9 0 A B 1 断片の例には、配列番号 6 5 の 5 0 0 番目から 7 2 4 番目のアミノ酸のアミノ酸配列を含有するペプチドが含まれる。このような R B 1 断片の例には、配列番号 6 9 のアミノ酸配列を含有するペプチド、好ましくは配列番号 6 8 の 7 7 3 番目から 8 1 3 番目のアミノ酸のアミノ酸配列を含有するペプチドが含まれる。あるいは、メチルトランスフェラーゼが増加した親和性 / 活性を有するヒストン H 3 もしくはその断片の修飾ペプチド、ヒストン H 4 もしくはその断片の修飾ペプチド、H S P 9 0 A B 1 もしくはその断片の修飾ペプチド、ま

たは R B 1 もしくはその断片の修飾ペプチドを使用してもよい。このようなペプチドは、アミノ酸を交換および/または付加および/または欠失し、S M Y D 2 ポリペプチドを使用してメチルトランスフェラーゼアッセイの連続実験において該基質を試験することによって設計されることができる。

【 0 1 7 7 】

本発明において、S M Y D 2 ポリペプチドの任意の機能的等価物は、それが元の（天然、野生型の）S M Y D 2 ポリペプチドのメチルトランスフェラーゼ活性を保持している限り、使用することができる。この目的を達成するために、S M Y D 2 ポリペプチドの機能的等価物は、好ましくは、S M Y D 2 ポリペプチドの S E T ドメイン（例えば、配列番号 6 3 の 1 7 位 ~ 2 4 7 位）を保持する。このような機能的等価物の例には、ヒストン H 3、H 4 および H S P 9 0 A B 1 の場合には配列番号 6 3 の 1 番目から 2 5 0 番目のアミノ酸のアミノ酸配列を有するポリペプチド、ならびに配列番号 6 3 の 1 番目から 2 5 0 番目のアミノ酸のアミノ酸配列および配列番号 6 3 の 3 3 0 番目から 4 3 3 番目のアミノ酸のアミノ酸配列を保持するポリペプチドが含まれる。

【 0 1 7 8 】

ポリペプチドの N 末端または C 末端に、特異性が明らかなモノクローナル抗体のエピトープを導入することによって、モノクローナル抗体の認識部位（エピトープ）を含む融合タンパク質として、S M Y D 2 ポリペプチドまたはその機能的等価物を発現させてもよい。市販のエピトープ - 抗体システムを使用することができる（Experimental Medicine 13 : 85-90 (1995)）。マルチクローニング部位の使用によって、例えば、 - ガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク質、グルタチオン S - トランスフェラーゼ（G S T）、緑色蛍光タンパク質（G F P）などとの融合タンパク質を発現し得るベクターが、市販されている。また、融合により S M Y D 2 ポリペプチドの特性が変化しないように、数個 ~ 1 2 個のアミノ酸からなる小さなエピトープのみを導入することによって調製された融合タンパク質も報告されている。ポリヒスチジン（H i s - タグ）、インフルエンザ凝集 H A、ヒト c - m y c、F L A G、水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質（V S V - G P）、T 7 遺伝子 1 0 タンパク質（T 7 - タグ）、ヒト単純ヘルペスウイルス糖タンパク質（H S V - タグ）、E - タグ（モノクローナルファージ上のエピトープ）などのエピトープ。

【 0 1 7 9 】

本発明は、物質のメチル化を促進する剤の使用を意図する。好ましいメチル化促進剤は、S A H H またはその機能的等価物である。このような剤は物質のメチル化を促進し、それにより、メチルトランスフェラーゼ活性をより高感度で決定することを可能にする。したがって、S M Y D 2 を基質および補因子と該促進剤の存在下で接触させてもよい。一実施形態において、S M Y D 2 ポリペプチドおよび基質を、S M Y D 2 および基質を発現する細胞から単離するか、または化学合成して、試験物質とインビトロで接触させる。

【 0 1 8 0 】

S M Y D 2 ポリペプチドを発現する細胞を調製し、該細胞を試験物質の存在下で培養し、ヒストン、H S P 9 0 A B 1 または R B 1 のメチル化レベルを、例えば、それらのメチル化部位に特異的に結合する抗体を使用して決定することによって、メチルトランスフェラーゼ活性を検出することもできる。

より具体的には、方法は、以下の段階を含む：

[1] 試験物質を、S M Y D 2 遺伝子を発現する細胞と接触させる段階；

[2] ヒストン H 4 タンパク質のリジン 2 0、ヒストン H 3 タンパク質のリジン 3 6（H 3 K 9）、H S P 9 0 A B 1 タンパク質のリジン 5 3 1 および/もしくはリジン 5 7 4、または R B 1 タンパク質のリジン 8 1 0 のメチル化を検出する段階；および

[3] メチル化レベルを該試験物質の非存在下のメチル化レベルと比較して低下させる試験物質を選択する段階。

【 0 1 8 1 】

上記のように、「生物学的活性を抑制する」という語句は、本明細書において、S M Y D 2 ポリペプチドの生物学的活性の、物質の非存在下と比較した好ましくは少なくとも 1

10

20

30

40

50

0%の抑制、より好ましくは少なくとも25%、50%、または75%の抑制、および最も好ましくは90%の抑制と定義される。したがって、試験物質は、それが、約10%の低下、より好ましくは少なくとも25%、50%、または75%の低下、および最も好ましくは90%の低下を提供する場合、「メチル化レベルを低下させる」と特性決定してもよい。

【0182】

好ましい実施形態において、SMYD2遺伝子を発現しない対照細胞が使用される。したがって、本発明はまた、以下の段階を含む、SMYD2ポリペプチドまたはその機能的等価物を使用して、細胞成長を阻害するための候補物質、またはSMYD2遺伝子関連疾患の治療および予防のいずれかまたは両方のための候補物質をスクリーニングする方法を提供する：

(a) 試験物質の存在下または非存在下でSMYD2ポリペプチドまたはその機能的等価物を発現する細胞、および該試験物質の存在下でSMYD2ポリペプチドまたはその機能的等価物を発現しない対照細胞を培養する段階；

(b) SMYD2ポリペプチドまたはその機能的等価物を発現する細胞、および対照細胞の生物学的活性（例えば、細胞成長）を検出する段階；および

(c) SMYD2ポリペプチドまたはその機能的等価物を発現する細胞の生物学的活性を前記試験物質の非存在下で検出された生物学的活性と比較して阻害し、該対照細胞の生物学的活性を阻害しない試験物質を、選択する段階。

【0183】

本明細書において明らかになったように、SMYD2ポリペプチドの生物学的活性の抑制は、細胞成長を減少させる。したがって、SMYD2ポリペプチドの生物学的活性を阻害する物質をスクリーニングすることによって、癌を治療または予防する潜在能力を有する候補物質を同定することができる。これらの候補物質が癌を治療または予防する潜在能力を、第2のおよび/またはさらなるスクリーニングによって評価して、癌の治療物質、治療化合物または治療剤を同定してもよい。例えば、SMYD2ポリペプチドの生物学的活性を阻害する物質が、癌の活性も阻害する場合、このような物質は、SMYD2特異的な治療効果を有すると結論付けてもよい。

【0184】

SMYD2の発現を変化させる物質のスクリーニング：

本明細書において実証されたように、siRNAによるSMYD2遺伝子発現の低下は、癌細胞増殖の阻害をもたらす（図2）。したがって、SMYD2遺伝子発現の抑制（低下、阻害）は、細胞成長を抑制する（低下させる、阻害する）ことが本明細書において明らかにされている。したがって、レポーター遺伝子の発現または活性を低下させる候補物質をスクリーニングすることによって、癌を治療または予防する潜在能力を有する候補物質を同定することができる。これらの候補物質が癌を治療または予防する潜在能力を、第2のおよび/またはさらなるスクリーニングによって評価して、癌の治療物質を同定してもよい。

【0185】

したがって、本発明は、SMYD2遺伝子の発現を阻害する物質をスクリーニングする方法を提供する。SMYD2遺伝子の発現を阻害する物質は、癌細胞増殖を抑制すると予想されるので、SMYD2遺伝子に関連する癌であって、特に膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、脾臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌である癌の治療または予防に有用である。

【0186】

したがって、本発明はまた、癌細胞増殖を抑制する候補物質をスクリーニングする方法、ならびにSMYD2遺伝子に関連する癌であって、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、脾臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌である癌を治療または予防するための候補物質をスクリーニングするための方法を提供する

【0187】

本発明との関連において、このようなスクリーニング方法は、例えば、以下の段階を含んでもよい：

- (a) 試験物質を、S M Y D 2 遺伝子を発現する細胞と接触させる段階；
- (b) 該細胞におけるS M Y D 2 遺伝子の発現レベルを検出する段階；および
- (c) S M Y D 2 遺伝子の発現レベルを該試験物質の非存在下で検出された発現レベルと比較して低下させる試験物質を選択する段階。

【0188】

あるいは、いくつかの実施形態において、本発明はまた、以下の段階を含む、癌の治療もしくは予防、またはS M Y D 2 遺伝子の過剰発現に関連する癌の阻害に対する試験物質の治療効果を評価または推定するための方法を提供する：

- (a) 試験物質を、S M Y D 2 遺伝子を発現する細胞と接触させる段階；
- (b) 該細胞におけるS M Y D 2 遺伝子の発現レベルを検出する段階；および
- (c) 潜在的な治療効果と該試験物質とを相関させる段階であって、試験物質が、S M Y D 2 遺伝子の発現レベルを、該試験物質の非存在下で検出された発現レベルと比較して低下させる場合に、潜在的な治療効果が示される、段階。

【0189】

本発明のスクリーニング方法を以下により詳細に説明する。

S M Y D 2 遺伝子を発現する細胞には、例えば、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病もしくは前立腺癌から樹立された細胞株、またはS M Y D 2 遺伝子発現ベクターをトランスフェクトされた細胞株が含まれる；このような細胞のいずれかは、本発明の上記スクリーニング方法に使用されることができる。S M Y D 2 遺伝子の発現レベルは、当業者に周知の方法、例えば、R T - P C R、ノーザンブロットアッセイ、ウエスタンブロットアッセイ、免疫染色、およびフローサイトメトリー分析によって推定することができる。本発明との関連において、「発現レベルを低下させる」という語句は、S M Y D 2 遺伝子の発現レベルの、物質の非存在下の発現レベルと比較した好ましくは少なくとも10%の低下、より好ましくは少なくとも25%、50%、または75%のレベル低下、および最も好ましくは95%のレベル低下と定義される。本明細書における物質には、化学物質、二本鎖ヌクレオチドなどが含まれる。二本鎖ヌクレオチドの調製は、上記説明の中にある。スクリーニング方法の過程において、S M Y D 2 遺伝子の発現レベルを低下させる物質を、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌などの癌の治療または予防に使用されるべき候補物質として選択することができる。いくつかの実施形態において、S M Y D 2 遺伝子を発現する細胞は、S M Y D 2 遺伝子をインビトロで外因的または内因的に発現する単離された培養細胞である。

【0190】

あるいは、本発明のスクリーニング方法は、以下の段階を含んでもよい：

- (a) 試験物質を、S M Y D 2 遺伝子の転写調節領域と該転写調節領域の制御下で発現されるレポーター遺伝子とを含むベクターが導入された細胞と、接触させる段階；
- (b) 該レポーター遺伝子の発現または活性レベルを測定する段階；および
- (c) 該レポーター遺伝子の発現または活性レベルを低下させる候補物質を選択する段階。

【0191】

本発明との関連において、細胞成長の阻害に対する試験物質の治療効果、またはS M Y D 2 遺伝子関連疾患を治療もしくは予防するための候補物質を評価してもよい。したがって、本発明はまた、癌細胞増殖を抑制する候補物質をスクリーニングする方法、およびS M Y D 2 遺伝子関連疾患を治療または予防するための候補物質をスクリーニングする方法を提供する。

【0192】

あるいは、いくつかの実施形態において、本発明はまた、以下の段階を含む、癌の治療もしくは予防、またはS M Y D 2の過剰発現に関連する癌の阻害に対する試験物質の治療効果を評価または推定するための方法を提供する：

- (a) 試験物質を、S M Y D 2 遺伝子の転写調節領域と該転写調節領域の制御下で発現されるレポーター遺伝子とを含むベクターが導入された細胞と、接触させる段階；
- (b) 該レポーター遺伝子の発現または活性レベルを測定する段階；および
- (c) 潜在的な治療効果と該試験物質とを相関させる段階であって、試験物質が、該レポーター遺伝子の発現または活性レベルを低下させる場合に、潜在的な治療効果が示される、段階。

【0193】

本発明との関連において、このようなスクリーニング方法は、例えば、以下の段階を含んでもよい：

- (a) 試験物質を、S M Y D 2 遺伝子の転写調節領域と、該転写調節領域の制御下で発現されるレポーター遺伝子とから構成されるベクターが導入された細胞と接触させる段階；
- (b) 該レポーター遺伝子の発現または活性レベルを検出する段階；および
- (c) (b) の発現または活性レベルを該試験物質の治療効果と相関させる段階。

【0194】

本発明との関連において、治療効果は、レポーター遺伝子の発現または活性レベルと相関させてもよい。例えば、試験物質が、レポーター遺伝子の発現または活性レベルを、該試験物質の非存在下で検出されたレベルと比較して低下させる場合、該試験物質を、治療効果を有する候補物質として同定または選択してもよい。あるいは、試験物質が、該レポーター遺伝子の発現または活性レベルを、該試験物質の非存在下で検出されたレベルと比較して低下させない場合、該試験物質を、有意な治療効果を有しない物質として同定してもよい。

【0195】

適切なレポーター遺伝子および宿主細胞は、当技術分野において周知である。例示的なレポーター遺伝子には、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質(G F P)、イソギンチャクモドキ属の一種(D i s c o s o m a s p.)の赤色蛍光タンパク質(D s R e d)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(C A T)、l a c Z、および グルクロニダーゼ(G U S)が含まれるが、これらに限定されず、宿主細胞はC O S 7、H E K 2 9 3、H e L aなどである。スクリーニングに必要なレポーターコンストラクトは、レポーター遺伝子配列をS M Y D 2の転写調節領域と接続することによって調製することができる。本明細書におけるS M Y D 2の転写調節領域には、転写開始部位から少なくとも5 0 0 b p上流、好ましくは1 0 0 0 b p、より好ましくは5 0 0 0 b pまたは1 0 0 0 0 b p上流までの領域が含まれる。転写調節領域を含有するヌクレオチドセグメントは、ゲノムライブラリから単離することもできるし、またはP C Rによって増幅することもできる。スクリーニングに必要なレポーターコンストラクトは、レポーター遺伝子配列をこれらの遺伝子のいずれか1つの転写調節領域と接続することによって調製することができる。転写調節領域を同定するための方法、およびアッセイプロトコルも周知である(Molecular Cloning third edition chapter 17, 2001, Cold Springs Harbor Laboratory Press)。

【0196】

レポーターコンストラクトを含有するベクターを、宿主細胞に感染させ、レポーター遺伝子の発現または活性を、当技術分野において周知の方法によって(例えば、ルミノメーター、吸光度計、フローサイトメーターなどを使用して)検出する。本明細書で定義される場合、「発現または活性を低下させる」は、レポーター遺伝子の発現または活性の、物質の非存在下と比較した好ましくは少なくとも1 0 %の低下、より好ましくは少なくとも2 5 %、5 0 %、または7 5 %の低下、および最も好ましくは9 5 %の低下である。いくつかの実施形態において、細胞は、S M Y D 2 遺伝子の転写調節領域と、該転写調節領域の制御下で発現されるレポーター遺伝子とから構成されるベクターがインビトロで導入さ

10

20

30

40

50

れた単離された培養細胞である。

【 0 1 9 7 】

S M Y D 2 と、H S P 9 0 A B 1 または R B 1 のいずれかとの結合を指標として使用するスクリーニング：

本明細書において実証されたように、S M Y D 2 と H S P 9 0 A B 1 タンパク質との直接的な相互作用が、プルダウンアッセイによって示された（図 3 B、C）。抗 F l a g 抗体を使用して S M Y D 2 タンパク質のプルダウンを行い、H A タグ付 H S P 9 0 A B 1 および F l a g タグ付 S M Y D 2 タンパク質の混合物をインキュベートした。続いて、H S P 9 0 A B 1 タンパク質に対する抗体を使用してウエスタンブロッティングによって、S M Y D 2 結合 H S P 9 0 A B 1 タンパク質を検出した。したがって、本発明は、S M Y D 2 タンパク質と H S P 9 0 A B 1 タンパク質との間の結合を阻害する物質をスクリーニングする方法を提供する。

10

【 0 1 9 8 】

さらに、本発明の間に、S M Y D 2 と R B 1 タンパク質との直接的な相互作用が、プルダウンアッセイによって示された（図 6 B、C）。抗 F l a g 抗体を使用して S M Y D 2 タンパク質のプルダウンを行い、H A タグ付 R B 1 および F l a g タグ付 S M Y D 2 タンパク質の混合物をインキュベートした。続いて、抗 H A 抗体を使用してウエスタンブロッティングによって、S M Y D 2 結合 R B 1 タンパク質を検出した。したがって、本発明は、S M Y D 2 タンパク質と R B 1 タンパク質との間の結合を阻害する物質をスクリーニングする方法を提供する。

20

【 0 1 9 9 】

S M Y D 2 タンパク質と H S P 9 0 A B 1 タンパク質または R B 1 タンパク質との間の結合を阻害する物質は、S M Y D 2 タンパク質と H S P 9 0 A B 1 タンパク質または R B 1 タンパク質との間の結合レベルを指標として検出することによってスクリーニングすることができる。したがって、本発明は、S M Y D 2 タンパク質と H S P 9 0 A B 1 タンパク質または R B 1 タンパク質との間の結合レベルを指標として使用して、S M Y D 2 タンパク質と H S P 9 0 A B 1 タンパク質または R B 1 タンパク質との間の結合を阻害するための物質をスクリーニングする方法を提供する。

【 0 2 0 0 】

さらに、本発明の間に、S M Y D 2 タンパク質による H S P 9 0 A B 1 タンパク質および R B 1 タンパク質のメチル化は、癌細胞成長に関与することが明らかにされている（図 5 H、図 1 2）。したがって、S M Y D 2 タンパク質と H S P 9 0 A B 1 タンパク質または R B 1 タンパク質との間の相互作用を阻害する物質は、S M Y D 2 タンパク質による H S P 9 0 A B 1 タンパク質または R B 1 タンパク質のメチル化を抑制することによって、癌細胞増殖を抑制するものであると予想される。したがって、本発明はまた、S M Y D 2 遺伝子を発現する癌細胞、例えば、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病または前立腺癌の成長を阻害するかまたは減少させるための候補物質、したがって、癌、例えば、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病または前立腺癌を治療または予防するための候補物質をスクリーニングする方法を提供する。

30

40

【 0 2 0 1 】

さらに、本スクリーニング方法によって得られる物質はまた、細胞増殖を阻害するために有用であり得る。

本発明にとって特に興味深いのは、以下の [1] ~ [7] の方法である：

[1] 以下の段階を含む、S M Y D 2 ポリペプチドと H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドまたは R B 1 ポリペプチドとの間の結合を妨げる物質をスクリーニングする方法：

(a) S M Y D 2 ポリペプチドまたはその機能的等価物を、H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドもしくはその機能的等価物または R B 1 ポリペプチドもしくはその機能的等価物と、試験物質の存在下で接触させる段階；

50

(b) 該ポリペプチド間の結合レベルを検出する段階；
(c) 段階(b)で検出された結合レベルを、該試験物質の非存在下で検出されたものと比較する段階；および

(d) 該結合レベルを低下させる試験物質を選択する段階。

[2] 以下の段階を含む、癌の治療および/もしくは予防、または癌細胞成長の阻害に有効な候補物質をスクリーニングする方法：

(a) S M Y D 2 ポリペプチドまたはその機能的等価物を、H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドもしくはその機能的等価物またはR B 1 ポリペプチドもしくはその機能的等価物と、試験物質の存在下で接触させる段階；

(b) 該ポリペプチド間の結合レベルを検出する段階；

10

(c) 段階(b)で検出された結合レベルを、該試験物質の非存在下で検出されたものと比較する段階；および

(d) 該結合レベルを低下させる試験物質を選択する段階。

[3] S M Y D 2 ポリペプチドの機能的等価物が、S M Y D 2 ポリペプチドのH S P 9 0 A B 1 結合ドメインを含む、[1]または[2]に記載の方法。

[4] H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドの機能的等価物が、H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドのS M Y D 2 結合ドメインを含む、[1]または[2]に記載の方法。

[5] S M Y D 2 ポリペプチドの機能的等価物が、S M Y D 2 ポリペプチドのR B 1 結合ドメインを含む、[1]または[2]に記載の方法。

[6] R B 1 ポリペプチドの機能的等価物が、R B 1 ポリペプチドのS M Y D 2 結合ドメインを含む、[1]または[2]に記載の方法。

20

[7] 該癌が、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌からなる群より選択される、[1]～[6]のいずれかに記載の方法。

【0202】

あるいは、いくつかの実施形態において、本発明はまた、以下の段階を含む、癌の治療もしくは予防、または癌の阻害に対する試験物質の治療効果を評価または推定するための方法を提供する：

(a) S M Y D 2 ポリペプチドまたはその機能的等価物を、H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドもしくはその機能的等価物またはR B 1 ポリペプチドもしくはその機能的等価物と、試験物質の存在下で接触させる段階；

30

(b) 該ポリペプチド間の結合レベルを検出する段階；

(c) 段階(b)で検出された結合レベルを、該試験物質の非存在下で検出されたものと比較する段階；および

(d) 潜在的な治療効果と該試験物質とを相関させる段階であって、試験物質が該結合レベルを低下させる場合に、潜在的な治療効果が示される、段階。

【0203】

さらに、別の実施形態において、本発明はまた、以下の段階を含む、癌の治療もしくは予防、または癌の阻害に対する試験物質の治療効果を評価または推定するための方法を提供する：

40

(a) S M Y D 2 ポリペプチドのH S P 9 0 A B 1 結合ドメインを含むポリペプチドを、H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドのS M Y D 2 結合ドメインを含むポリペプチドと、試験物質の存在下で接触させる段階；

(b) 該ポリペプチド間の結合を検出する段階；および

(c) 潜在的な治療効果と該試験物質とを相関させる段階であって、試験物質が該ポリペプチド間の結合を阻害する場合に、潜在的な治療効果が示される、段階。

【0204】

本発明との関連において、S M Y D 2 ポリペプチドおよびH S P 9 0 A B 1 ポリペプチドの機能的等価物は、それぞれS M Y D 2 ポリペプチド(配列番号63)、H S P 9 0 A B 1 ポリペプチド(配列番号65)と等価な生物学的活性を有するポリペプチドである。

50

特に、S M Y D 2 ポリペプチドの機能的等価物は、H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドに対する結合ドメインを含有するS M Y D 2 ポリペプチドの断片である。好ましい実施形態において、S M Y D 2 ポリペプチドの機能的等価物は、配列番号63のアミノ酸位置100位～247位のアミノ酸配列を含有するS M Y D 2 ポリペプチドの断片である。同様に、H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドの機能的等価物は、S M Y D 2 結合ドメインを含有するH S P 9 0 A B 1 ポリペプチドの断片である。好ましい実施形態において、H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドの機能的等価物は、配列番号65のアミノ酸位置500位～724位のアミノ酸配列を含有するH S P 9 0 A B 1 ポリペプチドの断片である。

【0205】

さらに、別の実施形態において、本発明はまた、以下の段階を含む、癌の治療もしくは予防、または癌の阻害に対する試験物質の治療効果を評価または推定するための方法を提供する：

(a) S M Y D 2 ポリペプチドのR B 1 結合ドメインを含むポリペプチドを、R B 1 ポリペプチドのS M Y D 2 結合ドメインを含むポリペプチドと、試験物質の存在下で接触させる段階；

(b) 該ポリペプチド間の結合を検出する段階；および

(c) 潜在的な治療効果と該試験物質とを相関させる段階であって、試験物質が該ポリペプチド間の結合を阻害する場合に、潜在的な治療効果が示される、段階。

【0206】

本発明との関連において、S M Y D 2 ポリペプチドおよびR B 1 ポリペプチドの機能的等価物は、それぞれS M Y D 2 ポリペプチド（配列番号63）またはR B 1 ポリペプチド（配列番号68）と等価な生物学的活性を有するポリペプチドである。特に、S M Y D 2 の機能的等価物は、R B 1 ポリペプチドに対する結合ドメインを含有するS M Y D 2 ポリペプチドの断片である。好ましい実施形態において、S M Y D 2 ポリペプチドの機能的等価物は、配列番号63のアミノ酸位置330位～443位のアミノ酸配列を含有するS M Y D 2 の断片である。同様に、R B 1 ポリペプチドの機能的等価物は、S M Y D 2 結合ドメインを含有するR B 1 ポリペプチドの断片である。好ましい実施形態において、R B 1 ポリペプチドの機能的等価物は、配列番号68のアミノ酸位置773位～813位のアミノ酸配列を含有するR B 1 ポリペプチドの断片である。

【0207】

H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドまたはR B 1 ポリペプチドへのS M Y D 2 ポリペプチドの結合を阻害する物質をスクリーニングする方法として、当業者に周知の多くの方法を使用することができる。

スクリーニングに使用されるべきポリペプチドは、組換えポリペプチドもしくは天然起源由来のタンパク質、またはそれらの部分ペプチドであり得る。好ましい実施形態において、ポリペプチドを、S M Y D 2、H S P 9 0 A B 1 もしくはR B 1 を発現する細胞から単離するか、または化学合成して、試験物質とインビトロで接触させる。任意の上記試験物質をスクリーニングに使用することができる。

【0208】

S M Y D 2 タンパク質とH S P 9 0 A B 1 タンパク質またはR B 1 タンパク質との間の結合を検出する方法として、当業者に周知の任意の方法を使用することができる。このような検出は、例えば、免疫沈降、ウエストウエスタンブロットティング分析（Skolnik et al., Cell 65: 83-90 (1991)）、細胞を利用するツーハイブリッドシステム（「M A T C H M A K E R Two - H y b r i d s y s t e m」、*「Mammalian M A T C H M A K E R Two - H y b r i d A s s a y K i t」*、*「M A T C H M A K E R one - H y b r i d s y s t e m」*（Clontech）；*「HybridZAP Two - H y b r i d V e c t o r S y s t e m」*（Stratagene）；参考文献「Dalton and Treisman, Cell 68: 597-612 (1992)」、*「Fields and Sternglanz, Trends Genet 10: 286-92 (1994)」*）、アフィニティクロマトグラフィー、および表面プラズモン共鳴現象を使用するバイオセンサーを使用して行うことができる。

【 0 2 0 9 】

いくつかの実施形態において、本スクリーニング方法は、S M Y D 2 タンパク質および H S P 9 0 A B 1 タンパク質または R B 1 タンパク質の両方を発現する細胞を使用して、細胞ベースのアッセイで行ってもよい。S M Y D 2 タンパク質および H S P 9 0 A B 1 タンパク質または R B 1 タンパク質を発現する細胞には、例えば、癌、例えば、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病または前立腺癌から樹立された細胞株が含まれる。あるいは、該細胞は、S M Y D 2 遺伝子および H S P 9 0 A B 1 遺伝子または R B 1 遺伝子をコードするポリヌクレオチドで細胞を形質転換することによって調製してもよい。このような形質転換は、S M Y D 2 遺伝子および H S P 9 0 A B 1 遺伝子もしくは R B 1 遺伝子の両方をコードする発現ベクター、または S M Y D 2 遺伝子もしくは H S P 9 0 A B 1 遺伝子もしくは R B 1 遺伝子のいずれかをコードする発現ベクターを使用して行ってもよい。本スクリーニング方法は、このような細胞を試験物質の存在下でインキュベートすることによって行うことができる。H S P 9 0 A B 1 タンパク質または R B 1 タンパク質への S M Y D 2 タンパク質の結合は、抗 S M Y D 2 抗体、抗 H S P 9 0 A B 1 抗体または抗 R B 1 抗体を使用して免疫沈降アッセイによって検出することができる。

10

【 0 2 1 0 】

本発明との関連において、細胞成長の阻害に対する候補物質の治療効果、または S M Y D 2 遺伝子に関連する癌（例えば、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌）を治療もしくは予防するための候補物質を評価してもよい。したがって、本発明はまた、以下の段階を含む、S M Y D 2 ポリペプチドまたはその機能的等価物を使用して、細胞増殖を抑制することができる候補物質、または癌（例えば、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病または前立腺癌）を治療および／予防するための候補物質をスクリーニングする方法を提供する：

20

（ a ） S M Y D 2 ポリペプチドまたはその機能的等価物を、H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドもしくはその機能的等価物または R B 1 ポリペプチドもしくはその機能的等価物と、試験物質の存在下で接触させる段階；

（ b ） 該ポリペプチド間の結合レベルを検出する段階；

30

（ c ） 段階（ b ）で検出された結合レベルを、該試験物質の非存在下で検出されたものと比較する段階；および

（ d ）（ c ）の結合レベルを該試験物質の治療効果と相関させる段階。

本発明において、治療効果は、S M Y D 2 ポリペプチドと H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドまたは R B 1 ポリペプチドとの間の結合レベルと相関させてもよい。例えば、試験物質が、該ポリペプチド間の結合レベルを、該試験物質の非存在下で検出されたレベルと比較して抑制する場合、該試験物質を、治療効果を有する候補物質として同定または選択してもよい。あるいは、試験物質が、該ポリペプチド間の結合レベルを、該試験物質の非存在下で検出されたレベルと比較して抑制または阻害しない場合、該試験物質を、有意な治療効果を有しない物質として同定してもよい。

40

【 0 2 1 1 】

S M Y D 2 による R B 1 のメチル化を介した R B 1 のリン酸化を使用するスクリーニング
：

本明細書において実証されたように、S M Y D 2 タンパク質は R B 1 タンパク質をメチル化し、L C - M S / M S 分析により、R B 1 のリジン 8 1 0 が S M Y D 2 によってメチル化されることが明らかになった（図 7 B）。さらに、S M Y D 2 による R B 1 のリジン 8 1 0 のメチル化は、セリン 8 0 7 および／またはセリン 8 1 1 における R B 1 のリン酸化を促進した（図 9、10）。さらに、S M Y D 2 によってメチル化された R B 1 は、E 2 F 転写活性を加速させ、細胞周期進行を促進する（図 10 C、図 12）。

これらの結果は、S M Y D 2 による R B 1 のメチル化を介した R B 1 のリン酸化が癌細

50

胞成長に關与することを実証している。したがって、S M Y D 2 による R B 1 のメチル化を介した R B 1 ポリペプチドのリン酸化レベルを低下させる物質は、癌を治療もしくは予防するか、または癌細胞成長を阻害するための候補物質になり得る。

したがって、本発明はまた、S M Y D 2 による R B 1 のメチル化を介した R B 1 のリン酸化を指標として使用して、癌の治療および予防のいずれかまたは両方のための候補物質をスクリーニングする方法を提供する。

【 0 2 1 2 】

例示的な癌には、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌が含まれる。

本発明との関連において、このようなスクリーニング方法は、例えば、以下の段階を含んでもよい：

(a) 試験物質を、S M Y D 2 遺伝子および R B 1 遺伝子を発現する細胞と接触させる段階；

(b) (a) の細胞における R B 1 ポリペプチドのリン酸化レベルを検出する段階；および

(c) R B 1 ポリペプチドのリン酸化レベルを該試験物質の非存在下で検出されたリン酸化レベルと比較して低下させる試験物質を選択する段階。

【 0 2 1 3 】

あるいは、いくつかの実施形態において、本発明はまた、以下の段階を含む、癌の治療もしくは予防、または S M Y D 2 遺伝子の過剰発現に関連する癌の阻害に対する試験物質の治療効果を評価または推定するための方法を提供する：

(a) 試験物質を、S M Y D 2 遺伝子および R B 1 遺伝子を発現する細胞と接触させる段階；

(b) (a) の細胞における R B 1 ポリペプチドのリン酸化レベルを検出する段階；および

(c) 潜在的な治療効果と該試験物質とを相関させる段階であって、試験物質が、R B 1 ポリペプチドのリン酸化レベルを、該試験物質の非存在下で検出されたリン酸化レベルと比較して低下させる場合に、潜在的な治療効果が示される、段階。

【 0 2 1 4 】

本発明のスクリーニング方法を以下により詳細に説明する。

S M Y D 2 遺伝子および R B 1 遺伝子を発現する細胞には、例えば、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病もしくは前立腺癌から樹立された細胞株、または S M Y D 2 遺伝子発現ベクターおよび R B 1 発現ベクターの両方をトランスフェクトされた細胞株が含まれる；このような細胞のいずれかは、本発明の上記スクリーニング方法に使用されることができる。いくつかの実施形態において、S M Y D 2 遺伝子および R B 1 遺伝子を発現する細胞は、S M Y D 2 および R B 1 遺伝子をインビトロで外因的または内因的に発現する単離された培養細胞である。

【 0 2 1 5 】

リン酸化レベルは、当業者に周知の方法、例えば、ウエスタンブロットアッセイおよび免疫染色分析によって推定することができる。

R B 1 ポリペプチドのリン酸化は、配列番号 6 8 のセリン 8 0 7 および / またはセリン 8 1 1 アミノ酸残基でリン酸化された R B 1 に対する抗体を使用して、ウエスタンブロットティング分析によって検出することができる。

【 0 2 1 6 】

上記のように、「リン酸化レベルの低下させる」という語句は、R B 1 ポリペプチドのリン酸化レベルの、物質の非存在下のリン酸化レベルと比較した少なくとも 1 0 % の低下、より好ましくは少なくとも 2 5 %、5 0 %、または 7 5 % のレベル低下、および最も好ましくは 9 5 % のレベル低下を指す。本明細書における物質には、化学物質などが含まれる。スクリーニング方法において、R B 1 ポリペプチドのリン酸化レベルを低下させる物

10

20

30

40

50

質を、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、精上皮腫、皮膚癌、膵臓癌、リンパ腫、卵巣癌、白血病および前立腺癌などの癌の治療または予防に使用されるべき候補物質として選択することができる。

【 0 2 1 7 】

癌を治療もしくは予防するか、または癌細胞成長を阻害するための候補物質をスクリーニングするためのキット：

本発明はさらに、S M Y D 2 ポリペプチドのメチルトランスフェラーゼ活性を測定するためのキットを提供する。キットは、癌を治療もしくは予防するか、または癌細胞成長を阻害するための候補基質をスクリーニングするために使用することができる。本発明の間に、公知の基質であるヒストンタンパク質（好ましくは、H 3 または H 4）に加えて、H S P 9 0 A B 1 タンパク質および R B 1 タンパク質を、S M Y D 2 ポリペプチドの新規な基質として同定した。したがって、本発明は、S M Y D 2 ポリペプチドのメチルトランスフェラーゼ活性を測定するためのキットであって、S M Y D 2 ポリペプチドの基質としてヒストンポリペプチドもしくはその機能的等価物、H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドもしくはその機能的等価物、または R B 1 ポリペプチドもしくはその機能的等価物を含有するキットを提供する。このようなキットは、S M Y D 2 ポリペプチド、または試料から精製もしくは単離された S M Y D 2 ポリペプチドを含有する試料における S M Y D 2 媒介性のメチルトランスフェラーゼ活性を測定するために使用することができる。

10

【 0 2 1 8 】

さらに、本発明は、試験物質が、S M Y D 2 ポリペプチドによるヒストン、H S P 9 0 A B 1 または R B 1 ポリペプチドのメチル化を阻害する能力を検出するためのキットであって、S M Y D 2 ポリペプチドと、S M Y D 2 ポリペプチドの基質としてヒストン、H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドまたは R B 1 ポリペプチドとを含有する、キットを提供する。

20

本発明の上記キットは、S M Y D 2 ポリペプチドによるヒストン、H S P 9 0 A B 1 または R B 1 ポリペプチドのメチル化レベルを調節する物質を同定するための用途を見出すものである。さらに、本発明のキットは、癌を治療もしくは予防するか、または癌細胞成長を阻害するための候補物質をスクリーニングするために有用である。

【 0 2 1 9 】

具体的には、本発明は、以下の [1] ~ [6] のキットを提供する：

[1] 以下の構成要素 (a) ~ (d) を含む、癌を治療もしくは予防するか、または癌細胞成長を阻害するための候補物質をスクリーニングするためのキット：

30

(a) S M Y D 2 ポリペプチドまたはその機能的等価物；

(b) (i) ~ (i i i) からなる群より選択される構成要素

(i) ヒストンタンパク質、または少なくとも 1 つのメチル化部位を含むその断片、

(i i) H S P 9 0 A B 1 ポリペプチド、または少なくとも 1 つのメチル化部位を含むその機能的等価物、

(i i i) R B 1 ポリペプチド、または少なくとも 1 つのメチル化部位を含むその機能的等価物

(c) (i) ~ (i i i) からなる群より選択される試薬；

(i) ヒストンタンパク質またはその断片のメチル化レベルを検出するための試薬、

40

(i i) H S P 9 0 A B 1 ポリペプチドまたはその機能的等価物のメチル化レベルを検出するための試薬、

(i i i) R B 1 ポリペプチドまたはその機能的等価物のメチル化レベルを検出するための試薬；および

(d) メチル供与体。

[2] 該ヒストンタンパク質が、ヒストン H 4 またはヒストン H 3 である、[1] に記載のキット。

[3] 段階 (c) (i) の試薬が、メチル化ヒストン H 4 タンパク質またはメチル化ヒストン H 3 タンパク質に対する抗体である、[1] に記載のキット。

[4] 段階 (c) (i i) の試薬が、リジン 5 3 1 および / またはリジン 5 7 4 でメチル

50

化されたHSP90AB1ポリペプチドに対する抗体である、[1]に記載のキット。

[5]段階(c)(iii)の試薬が、リジン810でメチル化されたRB1ポリペプチドに対する抗体である、[1]に記載のキット。

[6]該メチル供与体が、S-アデノシルメチオニンである、[1]~[5]のいずれかに記載のキット。

【0220】

本発明のキットの詳細を以下に説明する。

本発明のキットに含まれるヒストンH3タンパク質またはH4タンパク質は、H3タンパク質またはH4タンパク質の全長でもよいし、またはそれらの機能的等価物、例えば、ヒストンH3タンパク質またはH4タンパク質の全長の断片でもよい。本明細書において、ヒストンH3タンパク質またはH4タンパク質の機能的等価物は、SMYD2ポリペプチドによってメチル化され得る、ヒストンH3タンパク質またはH4タンパク質の全長の修飾ポリペプチド、断片または修飾断片を指す。好ましくは、ヒストンH3タンパク質またはH4タンパク質の機能的等価物は、SMYD2ポリペプチドによってメチル化され得る少なくとも1つのメチル化部位を保持する。このようなメチル化部位には、ヒストンH4タンパク質のリジン20、およびヒストンH3タンパク質のリジン36が含まれる。

【0221】

したがって、ヒストンH3タンパク質またはH4タンパク質の機能的等価物の好ましい例には、ヒストンH3タンパク質またはH4タンパク質の断片が含まれ、このような断片は、ヒストンH3のリジン36、またはヒストンH4のリジン20を含有してもよく、10個よりも多くのアミノ酸残基を有する。より具体的には、このような断片は、配列番号66のアミノ酸配列からなる断片でもよい。

【0222】

本発明のキットに含まれるHSP90AB1ポリペプチドは、HSP90AB1ポリペプチド(例えば、配列番号65)の全長でもよいし、またはその機能的等価物、例えば、HSP90AB1ポリペプチドの全長の断片でもよい。本明細書において、HSP90AB1ポリペプチドの機能的等価物は、SMYD2ポリペプチドによってメチル化され得る、HSP90AB1の全長の修飾ポリペプチド、断片または修飾断片を指す。好ましくは、HSP90AB1ポリペプチドの機能的等価物は、SMYD2ポリペプチドによってメチル化され得る少なくとも1つのメチル化部位を保持する。このようなメチル化部位には、HSP90AB1ポリペプチド(配列番号65)のリジン531およびリジン574が含まれる。

【0223】

したがって、HSP90AB1ポリペプチドの機能的等価物の好ましい例には、配列番号65のアミノ酸配列のリジン531および/またはリジン574に対応するリジン残基を保持するHSP90AB1ポリペプチドの断片が含まれる。好ましくは、このような断片は、配列番号65のアミノ酸配列の連続する配列であって、リジン531および/または574を含む配列を含有してもよく、10個よりも多くのアミノ酸残基を有する。より好ましくは、断片は、15個、20個、25個、30個、50個、75個、100個、150個、200個、250個、300個、350個または400個よりも多くのアミノ酸残基を有してもよい。さらにより好ましくは、断片は、配列番号65の500位~724位のアミノ酸残基を含有してもよい。

【0224】

本発明のキットに含まれるRB1ポリペプチドは、RB1ポリペプチド(例えば、配列番号68)の全長でもよいし、またはその機能的等価物、例えば、RB1ポリペプチドの全長の断片でもよい。本明細書において、RB1ポリペプチドの機能的等価物は、SMYD2ポリペプチドによってメチル化され得る、RB1ポリペプチドの全長の修飾ポリペプチド、断片または修飾断片を指す。好ましくは、RB1ポリペプチドの機能的等価物は、SMYD2ポリペプチドによってメチル化され得る少なくとも1つのメチル化部位を保持する。このようなメチル化部位には、RB1ポリペプチド(配列番号68)のリジン81

0が含まれる。

【0225】

したがって、RB1ポリペプチドの機能的等価物の好ましい例には、配列番号68のアミノ酸配列のリジン810に対応するリジン残基を保持するRB1ポリペプチドの断片が含まれる。好ましくは、このような断片は、配列番号68のアミノ酸配列の連続する配列であって、リジン810を含む配列を含有してもよく、10個よりも多くのアミノ酸残基を有する。より好ましくは、断片は、15個、20個、25個、30個、50個、75個、100個、150個、200個、250個、300個、350個または400個よりも多くのアミノ酸残基を有してもよい。さらにより好ましくは、断片は、配列番号68の773位～813位のアミノ酸残基を含有してもよい。

10

【0226】

ヒストンタンパク質、HSP90AB1ポリペプチドもしくはRB1ポリペプチド、またはそれらの機能的等価物は、1つまたは複数の標識メチル基、例えば、放射標識メチル基を有してもよい。メチル基に付加することができる他の適切な標識の例には、発色標識、蛍光標識などが含まれる。標識メチル基を有するヒストンタンパク質、HSP90AB1ポリペプチドまたはRB1ポリペプチドは、当技術分野において周知の方法によって調製することができる。

【0227】

本発明のキットに含まれるSMYD2ポリペプチドは、SMYD2ポリペプチド（例えば、配列番号63）の全長でもよいし、またはその機能的等価物、例えば、SMYD2ポリペプチドの全長の断片でもよい。本明細書において、SMYD2ポリペプチドの機能的等価物は、ヒストンタンパク質、HSP90AB1ポリペプチドまたはRB1ポリペプチドに対するメチルトランスフェラーゼ活性を有する、SMYD2ポリペプチドの全長の修飾ポリペプチド、断片または修飾断片を指す。

20

【0228】

本明細書において、SMYD2ポリペプチドのHSP90AB1結合領域は、配列番号63の100位～247位のアミノ酸残基を有する領域に位置することが発見された。したがって、HSP90AB1ポリペプチドまたはその機能的等価物の組み合わせにおいて、SMYD2ポリペプチドの適切な機能的等価物は、配列番号63の100位～247位のアミノ酸残基を含有するポリペプチドでもよい。

30

【0229】

あるいは、本発明の間に、SMYD2ポリペプチドのRB1結合領域は、配列番号63の330位～443位のアミノ酸残基を有する領域に位置することが見出された。したがって、RB1ポリペプチドまたはその機能的等価物の組み合わせにおいて、SMYD2ポリペプチドの適切な機能的等価物は、配列番号63の330位～443位のアミノ酸残基を含有するポリペプチドでもよい。

【0230】

ヒストンタンパク質、HSP90AB1またはRB1ポリペプチドのメチル化レベルを検出するための試薬は、ヒストンタンパク質、HSP90AB1またはRB1ポリペプチドのメチル化レベルの検出に使用することができる任意の試薬でもよい。例えば、メチル化ヒストンタンパク質、HSP90AB1またはRB1ポリペプチドに対する抗体、特に、ヒストンH3のメチル化リジン36、ヒストンH4のメチル化リジン20、配列番号65のアミノ酸配列のメチル化リジン531もしくは574、または配列番号68のアミノ酸配列のメチル化リジン810に対する抗体は、好ましくは、このような試薬として使用してもよい。抗メチル化ヒストン、HSP90AB1またはRB1抗体はモノクローナルでもよいしまたはポリクローナルでもよい。さらに、断片が、メチル化ヒストン、HSP90AB1またはRB1ポリペプチドに対する結合能を保持している限り、抗体の任意の断片または修飾物（例えば、キメラ抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fvなど）を、試薬として使用することができる。これらの種類の抗体を調製する方法は、当技術分野において周知であり、本発明においては、このような抗体およびそれらの等価物を調

40

50

製するために、任意の方法を利用することができる。さらに、直接結合または間接標識技術を介して、シグナル生成分子によって抗体を標識してもよい。標識、および抗体を標識して抗体とその標的との結合を検出するための方法は、当技術分野において周知であり、任意の標識および方法を本発明に利用することができる。例えば、好ましくは、放射標識、発色標識、蛍光標識などを、抗体を標識するために使用してもよい。キットが、標識を有する抗メチル化ヒストン、H S P 9 0 A B 1またはR B 1抗体を含有する場合、キットは、該標識によって生成されるシグナルを検出するための試薬をさらに含有してもよい。あるいは、抗体を、発色反応を触媒する酵素、例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなどと結合してもよい。キットが、酵素と結合された抗メチル化ヒストン、H S P 9 0 A B 1またはR B 1抗体を含有する場合、キットは、該酵素の発色基質をさらに含有してもよい。あるいは、発色反応を触媒する酵素で標識されたかまたはそれと結合された二次抗体が、本発明のキットに含まれてもよい。

10

【0231】

あるいは、ヒストンタンパク質、H S P 9 0 A B 1ポリペプチドまたはR B 1ポリペプチドのメチル化レベルを検出するための試薬は、ヒストンタンパク質、H S P 9 0 A B 1ポリペプチドまたはR B 1ポリペプチドのメチル化によって放出される過酸化水素またはホルムアルデヒドを検出するための試薬でもよい。このような試薬は、当技術分野において周知である。

【0232】

キットは、前記試薬を複数含有してもよい。さらに、キットは、抗メチル化ヒストンH 3もしくはH 4抗体、抗メチル化H S P 9 0 A B 1抗体または抗メチル化R B 1抗体を結合させるための固体マトリックス、メチル化に適切な条件下でポリペプチドをインキュベートするための培地または緩衝液および容器、S A M (S - アデノシルメチオニン)などのメチル化補因子、陽性および陰性対照試料を含んでもよい。

20

本発明のキットは、緩衝液、希釈剤、フィルタ、針、注射器、および使用のための説明を含む添付文書(例えば、文書、テープ、C D - R O Mなど)を含む、商業的見地および使用者の見地から望ましい他の材料をさらに含んでもよい。これらの物質などは、ラベルを有する容器に入っているもよい。適切な容器には、ボトル、バイアル、および試験管が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの多様な材料から形成されてもよい。

【0233】

30

以下、実施例を参照して本発明をより詳細に説明する。しかしながら、以下の材料、方法、および例は本発明の局面を例証するに過ぎず、本発明の範囲を何ら限定するものではない。したがって、本明細書に記載されるものと類似または等価な方法および材料を、本発明の実施または試験に使用することができる。

【実施例】

【0234】

実施例1：材料および方法

膀胱組織試料およびR N A調製。

膀胱組織試料およびR N A調製は、以前に記載された(Wallard, M.J. et al. Br J Cancer 94, 569-577 (2006))。簡単に説明すると、膀胱切除術または経尿道的膀胱腫瘍切除術(T U R B T)のいずれかの際に、原発性尿路上皮癌の外科的標本125例を採取し、液体窒素中で急速凍結させた。正常膀胱尿路上皮組織の標本28例を、悪性病变の証拠がない患者の巨視的に正常な膀胱尿路上皮の区域から採取した。ビメンチンは、間葉系由来細胞で主として発現しており、間質マーカーとして使用した。ウロプラキンは、尿路上皮分化のマーカーであり、最大90%の上皮由来腫瘍で保存されている(Olsburgh, J. et al. The Journal of pathology 199, 41-49 (2003))。本研究における組織の使用は、Cambridgeshire Local Research Ethics Committee(Ref 03/018)によって承認された。正常組織(脳、乳房、大腸、食道、眼、心臓、肝臓、肺、膵臓、胎盤、腎臓、直腸、脾臓、胃および精巣)のR N A試料は、BioChainから購入した。

40

50

【0235】

細胞培養。

CCD-18Co、HFL1、5637、SW780、SCaBER、UMUC3、RT4、T24、HT-1197、HT-1376、A549、H2170、SW480、HCT116、LoVoおよび293T細胞は、2001年および2003年にAmerican Type Culture Collection (ATCC) から入手し、SW780以外は、多型ショート・タンデム・リピート (STR) マーカーのDNAプロファイリングによって試験および確認した。SW780株は、1974年に、A. Leibovitzによって悪性度Iの移行細胞癌腫から樹立された。REF-LC-AIおよびSBC5細胞は、2001年にJapanese Collection of Research Bioresources (JCRB) から入手し、多型ショート・タンデム・リピート (STR) マーカーのDNAプロファイリングによって試験および確認した。253J、253J-BVおよびSNU-475細胞は、2001年にKorean Cell Line Bank (KCLB) から入手し、多型ショート・タンデム・リピート (STR) マーカーのDNAプロファイリングによって試験および確認した。EJ28細胞は、2003年にCell Line Service (CLS) から入手し、多型ショート・タンデム・リピート (STR) マーカーのDNAプロファイリングによって試験および確認した。ACC-LC-319細胞は、2003年に愛知県がんセンターから入手し、SNP、変異および欠失分析のDNAプロファイリングによって試験および確認した。すべての細胞株を次の適切な培地において単層で増殖させた：EJ28、REF-LC-AI、HeLa、COS-7および293T細胞にはダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM)；CCD-18Co、WI-38、253J、253J-BV、HT-1376、SCaBER、UMUC3およびSBC5細胞にはイーグル最小必須培地 (EMEM)；SW480およびSW780細胞にはLeibovitz's L-15；RT4、T24およびHCT116^{p53+}細胞にはMcCoy's 5A培地；5637、A549、H2170、ACC-LC-319およびSNU-475細胞にはRPMI 1640培地。LoVo細胞は、10%ウシ胎仔血清および1%抗生物質/抗真菌溶液 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) が補足された20%ウシ胎仔A549細胞が補足されたHam's F-12培地で培養した。すべての細胞を、37℃で、5%CO₂条件を含むか (SAEC、5637、253J、253J-BV、EJ28、HT-1197、HT-1376、J82、RT4、SCaBER、T24、UMUC3、A549、H2170、ACC-LC-319、REF-LC-AI、SBC5および293T、RT4、A549、SBC5、293T、HCT116^{p53+}、HeLaおよびCOS-7) またはCO₂を含まない (SW480およびSW780) 湿潤空气中で維持した。製造業者のプロトコルにしたがって、FuGENE6 (商標) (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) を用いて、細胞をトランスフェクトした。

【0236】

定量的リアルタイムPCR (qRT-PCR)。

上記のように、膀胱癌組織125例および正常膀胱組織28例をAddenbrooke's Hospital, Cambridgeで調製した。定量的RT-PCR反応のために、ヒトGAPDH (ハウスキーピング遺伝子)、SDH (ハウスキーピング遺伝子)、SMYD2のすべてに対する特異的プライマーを設計した (表1のプライマー配列)。製造業者のプロトコルにしたがってLightCycler (登録商標) 480 System (Roche Applied Science) を使用して、PCR反応を実施した。

【0237】

10

20

30

40

【表 1】
定量的RT-PCR用のプライマー配列。

遺伝子	名称	プライマー配列
<i>GAPDH</i> (ハウスキーピング遺伝子)	GAPDH-f	GCAAATTCCATGGCACCGTC (配列番号1)
	GAPDH-r	TCGCCCCACTTGATTTTGG (配列番号2)
<i>SDH</i> (ハウスキーピング遺伝子)	SDH-f	TGGGAACAAGAGGGCATCTG (配列番号3)
	SDH-r	CCACCACTGCATCAAATTCATG (配列番号4)
<i>SMYD2</i>	SMYD2-f	ATCTCCTGTACCCAACGGAAG (配列番号5)
	SMYD2-r	CACCTTGGCCTTATCCTTGTCC (配列番号6)

10

【 0 2 3 8 】

免疫組織化学染色。

20

パラフィン包埋組織のスライドは、BioChain (Hayaward, CA, USA) から購入した。免疫組織化学は、VECTASTAIN (登録商標) ABC REAGENT (PK-7100, Vector Laboratories, CA, USA) および DAB SUBSTRATE KIT FOR PEROXIDASE (登録商標) (SK-4100, Vector Laboratories, CA, USA) を使用して実施した。パラフィン包埋した膀胱腫瘍標本および正常ヒト組織のスライドをキシレンで脱パラフィン処理し、続いて99%エタノールで再水和した。1×PBS(-)で洗浄した後、スライドを、抗原賦活液、高pH9 (S2367; Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) において高圧下で処理し(125、30秒間)、0.3%過酸化水素(H₂O₂)メタノール溶液によって、反応停止を15分間実施した。3%BSAによってブロッキングした後、組織切片を希釈比1:250のヤギ抗SMYD2ポリクローナル抗体(sc-79084, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)と共に一晚インキュベートし、続いて、抗ヤギビオチン化IgGと共に1時間反応させた。VECTASTAIN (登録商標) ABC REAGENTと共にインキュベートした後、DAB SUBSTRATE KIT FOR PEROXIDASE (登録商標) を使用して、発色現像を実施した。最後に、マイヤーヘマトキシリン(Muto pure chemicals, Tokyo, Japan Hematoxylin QS, Vector Laboratories)によって組織標本を20秒間染色して、細胞質から核を識別した。

30

【 0 2 3 9 】

siRNAトランスフェクション。

40

ヒトSMYD2の転写物を標的とするためのsiRNAオリゴヌクレオチド二重鎖は、Sigma-Aldrichから購入した。3種の異なるオリゴヌクレオチド二重鎖の混合物であるsiNegative対照(sinc)を、対照siRNAとして使用した。siRNA配列を表2に記載する。siRNA二重鎖(最終濃度100nM)を、Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)によって、膀胱癌細胞株および肺癌細胞株にトランスフェクトした。

【 0 2 4 0 】

【表 2】
siRNA配列。

siRNAの名称		配列	
siEGFP	セン	センス	GCAGCACGACUUCUUCAAG (配列番号7)
		アンチセンス	CUUGAAGAAGUCGUGCUGC (配列番号8)
	標的#1	センス	AUCCGCGCGAUAGUACGUA (配列番号9)
		アンチセンス	UACGUACUAUCGCGCGGAU (配列番号10)
	標的#2	センス	UUACGCGUAGCGUAAUACG (配列番号11)
		アンチセンス	CGUAUUACGCUACGCGUAA (配列番号12)
siNegative対照 (カクテル)	標的#3	センス	UAUUCGCGCGUAUAGCGGU (配列番号13)
		アンチセンス	ACCGCUAUACGCGCGAAUA (配列番号14)
siSMYD2 #1	セン	センス	GAUUUGAUUCAGAGUGACA (配列番号15)
		アンチセンス	UGUCACUCUGAAUCAAUUC (配列番号16)
siSMYD2 #2	セン	センス	GAAAUGACCGGUUAAGAGA (配列番号17)
		アンチセンス	UCUCUUAACCGGUCAUUUC (配列番号18)

【0241】

コロニー形成能アッセイ。

DMEM 10% FBSで培養したCOS-7細胞に、p3xFLAG-Mock、p3xFLAG-SMYD2野生型(WT)またはp3xFLAG-SMYD2酵素失活変異体ベクター(NHSC/GEEV)をトランスフェクトした。トランスフェクトしたCOS-7細胞を2日間培養し、10cmディッシュあたり細胞10000個の密度で10cmディッシュにトリPLICATEで播種した。続いて、0.4(mg/ml)ジェネテシン/G-418を含有するDMEM 10% FBS中、コロニーが見られるまで、細胞を2週間培養した。Giemsa(MERCK, Whitehouse station, NJ, USA)でコロニーを染色し、コロニー・カウンタ・ソフトウェアによってカウントした。

【0242】

質量分析。

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動のタンパク質バンドを切り出し、ジチオスレイトールで還元し、ヨード酢酸によってカルボキシメチル化した。ゲルを洗浄した後、アク

ロモバクター (Achromobacter) プロテアーゼ I (API、Lys-C、茨城大学、正木博士より寄贈) を用いて、バンドを 37 で一晩消化した (Masaki T, et al (1981). Biochim Biophys Acta 660, 44-50.). LCQ Deca XP plus (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) を使用するナノ LC-MS/MS によって、消化物のアリコート进行分析した。逆相材 (Inertsil ODS-3、3 マイクロメートル、GL Science, Tokyo, Japan) を充填したナノESI スプレーカラム (100 マイクロメートル i.d. x 50 mm) を使用して、ペプチドを流量 200 nl / 分で分離した。陽イオンモードで質量分析計を作動させ、データ依存 MS/MS モードでスペクトルを得た。ローカル MASCOT サーバ (バージョン: 2.2.1, Matrix Sciences, UK) を使用して、社内データベースに対して、MS/MS スペクトルを検索した。エンドプロテアーゼ Asp-N (Roche Applied Science) を用いて、還元およびカルボキシメチル化したゲルバンドも 37 で一晩消化した。消化物のアリコートを脱塩処理し、Ultraflex (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) を使用する MALDI-TOF-MS にアプライした。そして、選択したピークを LIFT モードの MALDI-TOF/TOF タンデム質量分析で分析した。

【0243】

アミノ酸分析。

内部標準として 50 pmol のノルバリンを含有する清潔な 6 mm X 32 mm ガラス管に、PVDf 膜上にプロットされ切り出されたタンパク質バンドを個々に挿入し、110 の 6N HCl 蒸気で 20 時間加水分解した。蛍光体検出のために、6-アミノキノリル-N-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメート (AQC) によって、加水分解した試料をインサイチューで誘導体化した。C18 逆相カラム (Inertsil ODS-3、4.6 mm i.d. X 150 mm、3 マイクロメートル、GL Science, Tokyo, Japan) でのイオン対クロマトグラフィーによって、AQC-アミノ酸を分離した。モノメチル化リジンの存在を明らかにするために、レーザー誘起蛍光検出器 (LIF726, GL Sciences)、および Xe フラッシュランプを備える蛍光検出器 (G1312A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) の両方を使用した (Masuda, A. et al. Anal Chem 82, 8939-8945 (2010))。

【0244】

免疫細胞化学。

4% パラホルムアルデヒドを含有する PBS (-) で細胞を 30 分間固定し、0.1% Triton X-100 を含有する PBS (-) を用いて室温で 2 分間透過処理した。続いて、細胞を、室温で 1 時間、3% ウシ血清アルブミンを含有する PBS (-) で覆って、非特異的ハイブリダイゼーションをブロックし、次いで、ウサギ抗 Rb (sc-102, Santa Cruz Biotechnology)、抗 p-Rb (セリン 807/811) - R (sc-16670-R, Santa Cruz Biotechnology)、ヤギ抗 SMYD2 (sc-79084, Santa Cruz Biotechnology)、希釈比 1:500 のマウス抗 FLAG (Sigma-Aldrich)、希釈比 1:1000 のマウス抗 HSP90 抗体 (sc-13119, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) および希釈比 1:500 のヤギ抗 SMYD2 (sc-79084, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) と共にインキュベートした。PBS (-) で洗浄した後、Alexa Fluor (登録商標) 488 結合抗ウサギ二次抗体 (Life Technologies)、または希釈比 1:500 の Alexa Fluor (登録商標) 594 結合抗マウス二次抗体 (Life Technologies) によって、細胞を染色した。4', 6'-ジアミジン-2'-フェニルインドール二塩酸塩 (DAPI) で核を対比染色した。TCS SP2 AOB S 顕微鏡 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) 下で、蛍光画

像を得た。

【0245】

免疫沈降。

293TまたはCOS-7細胞を、細胞 5×10^5 個の密度で100mmディッシュ上に播種した。翌日、製造業者の推奨にしたがってFuGENE6 (Roche Applied Science) を使用して、細胞に発現ベクターコンストラクトをトランスフェクトした。48時間後、トランスフェクトした293T細胞をPBSで洗浄し、コンブリートプロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche Applied Science) を含有するCell Lytic (商標) M Cell Lysis Reagent (Sigma-Aldrich) に溶解した。500マイクログラムの全細胞抽出物を抗FLAG M2アガロース (Sigma-Aldrich) と共に4で1時間インキュベートした。ビーズを1mlのTBS緩衝液 (pH7.6) で3回洗浄した後、Lane Marker Sample Buffer (Thermo Scientific Thermo Fisher Scientific, Hudson, NH) 中で煮沸することによって、ビーズに結合したFLAGタグ付タンパク質を溶出した。次いで、試料をSDS-PAGEに供し、銀染色またはウエスタンブロットによって検出した。

10

【0246】

ウエスタンブロット。

コンブリートプロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche Applied Science) を含有するRIPA様緩衝液またはCell Lytic (商標) M Cell Lysis Reagent (Sigma-Aldrich) を用いて、細胞から全細胞ライセートを調製し、全タンパク質または免疫沈降試料をニトロセルロース膜に転写した。抗SMYD2 (sc-79084, Santa Cruz Biotechnology)、抗Rb (sc-102, Santa Cruz Biotechnology)、抗ホスホ-Rb (セリン807/811)-R (sc-16670-R, Santa Cruz Biotechnology)、抗ホスホ-Rb (セリン780) (C84F6, Cell Signaling Technology, Denver, MA)、抗HSP90 (sc-13119, Santa Cruz Biotechnology)、抗ACTB (I-19, Santa Cruz Biotechnology)、抗FLAG (Sigma-Aldrich)、抗HA (Santa Cruz Biotechnology)、抗His (631212, Clontech Laboratories, Mountain View, CA)、抗HOP (Stressgen Bioreagents)、抗Cdc37 (Santa Cruz Biotechnology) および抗p23 (abcam) 抗体で、膜をプローブした。抗モノメチル化HSP90AB1 K574抗体は、Sigma-Aldrich製であった。西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗体 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) と共にインキュベートし強化化学発光 (GE Healthcare) で可視化することによってタンパク質バンドを検出した。抗モノメチル化RB1 K810抗体は、Sigma-Aldrich製であった。MemCode (商標) Reversible Protein Stain Kit (24580, Thermo Fisher Scientific) によって、タンパク質バンドを検出した。

20

30

40

【0247】

インビトロのメチルトランスフェラーゼアッセイ。

インビトロのメチル化アッセイでは、His-WT-RB1、His-K810A-RB1、His-HSP90AB1およびHis-SMYD2を上記のように使用した。1.0M Tris-HCl (pH8.8)、1.0マイクロCi/ml L-[メチル- ^3H]メチオニン (Perkin Elmer) およびMilliQ水の中で、1マイクログラムのHSP90AB1 RB1を1マイクログラムのSMYD2と共に1時間インキュベートした。試料緩衝液中で煮沸した後、試料をSDS-PAGEに供し、続いてフルオログラフィーによって可視化した。

50

【0248】

インビトロのキナーゼアッセイ

40 mM MOPS (pH 7.0)、1 mM EDTA、20 mM ATPを含有する反応緩衝液中、30 で10分間にわたるキナーゼアッセイのために、CDK4/サイクリンD1 (ab55695, Abcam, Cambridge, UK)を使用した。試料緩衝液中で煮沸した後、試料をSDS-PAGEに供した。

【0249】

インビボの標識。

以前に記載されているように(Cho, H.S. et al. Cancer Res (2010))、インビボの標識を実施した。シクロヘキシミド(100マイクログラム/ml)およびクロラムフェニコール(40マイクログラム/ml)を含む無メチオニン培地で、細胞を1時間飢餓状態にさせた。次いで、それらを γ -[メチル- 3 H]メチオニン(10マイクロCi/ml、Perkin Elmer)で5時間標識した。抗HSP90抗体(Santa Cruz Biotechnology)を用いてFLAG-mock、SMYD2(WT)またはSMYD2(NHSC/GEEV)を免疫沈降し、メチル化HSP90をフルオログラフィーによって可視化した。

10

【0250】

インビトロの架橋アッセイ。

以前に記載されているように(Allan, R.K., Mok, D., Ward, B.K. & Ratajczak, T. J Biol Chem 281, 7161-7171 (2006))、インビトロの架橋アッセイを実施した。SMYD2の存在下または非存在下におけるインビトロのメチルトランスフェラーゼアッセイの後、HSP90AB1を94.7 mM PBS (pH 7.4)および10 mM BS³(Thermo Scientific)と共に室温で30分間インキュベートした。1 M Tris-HClを添加することによって、架橋反応を停止した。試料緩衝液中で煮沸した後、各反応混合物を、SDS-PAGE、および抗HSP90抗体(Santa Cruz Biotechnology)を使用するWBに供した。WBの後、ボンソーSによって膜を染色した。

20

【0251】

インビボの架橋アッセイ。

HeLa細胞を、細胞 5×10^5 個の密度で100 mmディッシュ上に播種した。翌日、細胞をsiSMYD2#2で処理した。siRNA処理の24時間後、細胞にpCAGGS-n3FC-HSP90AB1(WT)またはpCAGGS-n3FC-HSP90AB1(K531A/K574A)をトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後、EMEMを、L-フォト-ロイシンおよびL-フォト-メチオニン(Thermo Scientific)を含有するダルベッコ変法イーグル制限培地(DMEM-LM)(Thermo Scientific)と交換し、UV照射(Stratalinker(登録商標)UV Crosslinker, American Laboratory Trading, 10800 J)に供した。次いで、細胞を回収し、全タンパク質(5マイクログラム)をニトロセルロース膜に転写し、続いて、SDS-PAGE、ならびに、抗FLAG(Sigma-Aldrich)、抗SMYD2(Santa Cruz Biotechnologies)および抗ACTB(Santa Cruz Biotechnologies)抗体を使用するWBを行った。上記のように、タンパク質バンドを検出した。

30

40

【0252】

プライマー配列。

哺乳動物発現ベクターおよび大腸菌(E. coli)における組換えタンパク質用発現ベクターを構築するためのオリゴヌクレオチドをそれぞれ表3-1、表3-2および表4に記載する。

【0253】

【表 3 - 1】

哺乳動物発現ベクターを構築するためのオリゴヌクレオチド。

遺伝子	名称	プライマー配列
SMYD2 (1-433)	SMYD2 (1-433)-f	TGCGCGGCCGCGGGCCACCATGAGGGCCGAGG GCCTCGGCG (配列番号19)
	SMYD2 (1-433)-r	CCGCTCGAGGTGGCTTTCAATTTCTGTTTGATC (配列番号20)
SMYD2 (△NHSC/ △GEEV)	SMYD2 (△NHSC)-f	GATATTTCTGATGTTGCATTGATGTGCCCCAATG TCATTGTG (配列番号21)
	SMYD2 (△GEEV)-f	CTGTACAGGAAATCAAGCCGTTTACCAGCTATATT GATCTCCTG (配列番号22)
	pCAGGS-r	TATTTGTGAGCCAGGGCATT (配列番号23)
SMYD2 (1-100)	SMYD2 (1-100)-f	TGCGCGGCCGCGGGCCACCATGAGGGCCGAGG GCCTCGGCG (配列番号24)
	SMYD2 (1-100)-r	CCGCTCGAGCCAGTTTTCCCAAAAACAACC (配列番号25)
SMYD2 (1-250)	SMYD2 (1-250)-f	TGCGCGGCCGCGGGCCACCATGAGGGCCGAGG GCCTCGGCG (配列番号26)
	SMYD2 (1-250)-r	CCGCTCGAGTCTATCTTCCGTTGGGTACAGGAG (配列番号27)
SMYD2 (100-433)	SMYD2 (100-433)-f	TGCGCGGCCGCTCGCCACCATGTGGAATCCCTC GGAGACTG (配列番号28)
	SMYD2 (100-433)-r	CCGCTCGAGGTGGCTTTCAATTTCTGTTTGATC (配列番号29)
SMYD2 (250-433)	SMYD2 (250-433)-f	TGCGCGGCCGCTCGCCACCATGAGAAATGACCG GTTAAGAG (配列番号30)
	SMYD2 (250-433)-r	CCGCTCGAGGTGGCTTTCAATTTCTGTTTGATC (配列番号31)
SMYD2 (330-433)	SMYD2 (330-433)-f	TGCGCGGCCGCTCGCCACCATGTCTGTGTTTGAG GACAGTAACG (配列番号32)
	SMYD2 (330-433)-r	CCGCTCGAGGTGGCTTTCAATTTCTGTTTGATC (配列番号33)

【 0 2 5 4 】

10

20

30

【表 3 - 2】

哺乳動物発現ベクターを構築するためのオリゴヌクレオチド。

遺伝子	名称	プライマー配列
HSP90AB1 (1-724)	HSP90AB1 (1-724)-f	TGCCAATTGGGCCACCATGCCTGAGGAAGTGCAC CATG (配列番号34)
	HSP90AB1 (1-724)-r	TGCGTCGACATCGACTTCTTCCATGCGAGAC (配列番号35)
HSP90AB1 (1-500)	HSP90AB1 (1-500)-f	TGCCAATTGGGCCACCATGCCTGAGGAAGTGCAC CATG (配列番号36)
	HSP90AB1 (1-500)-r	TGCGTCGACCACAAAAGCTGAGTTGGCCAC (配列番号37)
HSP90AB1 (250-724)	HSP90AB1 (250-724)-f	TGCCAATTGGGCCACCATGATCGAAGATGTGGGT TCAGATG (配列番号38)
	HSP90AB1 (250-724)-r	TGCGTCGACATCGACTTCTTCCATGCGAGAC (配列番号39)
HSP90AB1 (500-724)	HSP90AB1 (500-724)-f	TGCCAATTGGGCCACCATGGTGGAGCGAGTGCG GAAACGGGGC (配列番号40)
	HSP90AB1 (500-724)-r	TGCGTCGACATCGACTTCTTCCATGCGAGAC (配列番号41)
HSP90AB1 (K531A)	HSP90AB1 (K531A)-f	CAAGGAATTTGATGGGGCGAGCCTGGTCTCAGTT AC (配列番号42)
	HSP90AB1 (K531A)-r	GTAAGTGAGACCAGGCTCGCCCCATCAAATTCCT TG (配列番号43)
HSP90AB1 (K574A)	HSP90AB1 (K574A)-f	GCGGTTGAGAAGGTGACAATCTCC (配列番号44)
	HSP90AB1 (K574A)-r	CTTATCTAAGATTTCTTTCATGAGCTTG (配列番号45)

【 0 2 5 5 】

10

20

【表 4】

大腸菌における組換えタンパク質用発現ベクターを構築するためのオリゴヌクレオチド。

遺伝子	タグ	名称	プライマー配列
SMYD2 (1-433)	His	SMYD2-Bam-f	CGGGATCCATGAGGGCCGAGGGCCTCGGC G (配列番号46)
		SMYD2-GEX-r	CCGCTCGAGTCAGTGGCTTTCAATTTCTGT TTG (配列番号47)
HSP90AB1 (1-724)	GST, His	HSP90AB1 (1-724)-GEX-f	TGCCAATTGATGCCTGAGGAAGTGCACC (配列番号48)
		HSP90AB1 (1-724)-GEX-r	TGCGTCGACCTAATCGACTTCTTCCATGCGA G (配列番号49)
HSP90AB1 (1-250)	GST, His	HSP90AB1 (1-250)-f	TGCCAATTGATGCCTGAGGAAGTGCACC (配列番号50)
		HSP90AB1 (1-250)-r	TGCGTCGACCTAGATCTTGGGCTTTTCTTCA TCATC (配列番号51)
HSP90AB1 (1-500)	GST, His	HSP90AB1 (1-500)-f	TGCCAATTGATGCCTGAGGAAGTGCACC (配列番号52)
		HSP90AB1 (1-500)-r	TGCGTCGACCTACACAAAAGCTGAGTTGGCC AC (配列番号53)
HSP90AB1 (250-724)	GST, His	HSP90AB1 (250-724)-f	TGCCAATTGATGATCGAAGATGTGGGTTTCAG ATG (配列番号54)
		HSP90AB1 (250-724)-r	TGCGTCGACCTAATCGACTTCTTCCATGCGA G (配列番号55)
HSP90AB1 (500-724)	GST, His	HSP90AB1 (500-724)-f	TGCCAATTGATGGTGGAGCGAGTGCGGAAA CGGGGC (配列番号56)
		HSP90AB1 (500-724)-r	TGCGTCGACCTAATCGACTTCTTCCATGCGA G (配列番号57)
HSP90AB1 (K531A)	His	HSP90AB1 (K531A)-f	CAAGGAATTTGATGGGGCGAGCCTGGTCTC AGTTAC (配列番号58)
		HSP90AB1 (K531A)-r	GTAAGTGAAGACAGGCTCGCCCCATCAAATT CCTTG (配列番号59)
HSP90AB1 (K574A)	His	HSP90AB1 (K574A)-f	GCGGTTGAGAAGGTGACAATCTCC (配列番号60)
		HSP90AB1 (K574A)-r	CTTATCTAAGATTTCTTTCATGAGCTTG (配列番号61)

【 0 2 5 6 】

実施例 2 : S M Y D 2 はヒト癌で過剰発現しており、癌細胞成長を調節している。

本発明者らは最初に、臨床膀胱試料の小サブセットにおいて多数のヒストンメチルトランスフェラーゼの発現レベルを調べ、正常細胞と癌細胞との間で S M Y D 2 遺伝子の発現レベルに有意差があることを見出した。その結果として、膀胱癌試料 1 2 5 例および正常対照試料 2 8 例（イギリス人）を分析し、腫瘍細胞では、S M Y D 2 発現が正常細胞と比較して有意に上昇していることを見出した（ $P < 0.0001$ 、マンホイットニー U 検定）（図 1 A および表 5 : 患者の特徴）。膀胱腫瘍と様々な種類の正常組織との間の S M Y D 2 発現レベルも比較し、膀胱腫瘍組織における S M Y D 2 発現レベルは、心臓、肺、肝臓および腎臓を含む正常な器官組織のものよりも有意に高いことを見出された（図 1 B）。加えて、免疫組織化学により、S M Y D 2 は、膀胱癌切片においてタンパク質レベルで過剰発現していることが示された（図 1 C）。さらに、Oncomine データベースにより、S M Y D 2 は、膀胱癌に加えて、大腸癌および前立腺癌のような様々な種類のヒト癌で過剰発現していることが実証された（図 1 F）。

【 0 2 5 7 】

10

20

30

40

50

【表 5】

臨床膀胱組織における S M Y D 2 発現レベルの統計分析。

特徴	n	S MY D 2		
		平均	SD	95%CI
正常（対照）	28	1.055	0.512	0.866 – 1.245
腫瘍（合計）	125	7.092	10.474	5.256 – 8.929
<u>腫瘍悪性度</u>				
G1	12	6.879	4.391	4.395 – 9.363
G2	63	8.633	13.833	5.217 – 12.049
G3	49	5.195	5.001	3.794 – 6.595
<u>転移</u>				
陰性	98	7.442	11.551	5.155 – 9.729
陽性	27	5.823	4.831	4.001 – 7.646
<u>性別</u>				
男性	91	6.623	8.600	4.856 – 8.390
女性	32	5.210	5.120	3.436 – 6.984
<u>再発</u>				
なし	28	9.221	13.198	4.332 – 14.110
あり	51	5.541	5.465	4.041 – 7.041
死亡	8	5.539	6.733	0.873 – 10.205
<u>喫煙歴</u>				
なし	27	5.882	4.601	4.147 – 7.618
あり	49	7.476	11.231	4.331 – 10.620

【 0 2 5 8 】

S M Y D 2 が癌細胞の生存に必須であるかを知るために、本発明者らは最初に、様々な細胞株における S M Y D 2 発現レベルを調べ、膀胱、肺、大腸および肝臓の癌細胞株では、S M Y D 2 が、正常な線維芽細胞由来の正常細胞株 W I - 3 8 と比較して過剰発現していることを見出した（図 1 D）。癌細胞における S M Y D 2 の過剰発現は、タンパク質レベルでも確認された（図 1 E）。次いで、2 種の独立した s i R N A（表 2：s i R N A 配列）によって、膀胱癌細胞（S W 7 8 0 および R T 4）における S M Y D 2 発現を阻害した。それらの s i R N A のノックダウン効果を確認した後に（図 2 A）、細胞成長アッセイを実施し、S M Y D 2 s i R N A で処理した細胞では、対照 s i R N A（s i N C）と比べて有意な成長抑制を見出した（図 2 B）。有意な成長抑制は、肺癌細胞株（A 5 4 9、L C 3 1 9 および S B C 5）でも観察された（図 2 F）。S M Y D 2 が発癌活性を有するかを調べるために、本発明者らは、コロニー形成能アッセイを行った。対照の m o c k ベクターと共に、野生型 S M Y D 2（S M Y D 2 W T）ベクターおよび酵素失活 S M Y D 2（S M Y D 2 N H S C / G E E V）ベクターを C O S - 7 細胞にトランスフェクトした。各培養物において、コロニー形成能アッセイを実施した（図 2 C）。野生型 S M Y D 2 ベクターをトランスフェクトした細胞は、酵素失活 S M Y D 2 ベクターまたは m o c k 対照ベクターをトランスフェクトしたものよりも多くのコロニーを形成したことから、細胞における発癌を促進するのは、S M Y D 2 のメチル化活性である。S M Y D 2 は癌進行の早期に過剰発現しているので、S M Y D 2 は、ヒトの発癌現象において重要な役割を果たすと思われる。

【 0 2 5 9 】

癌細胞成長に対する S M Y D 2 過剰発現の効果をより詳細に解明するために、F l p - I n T - R E x s y s t e m (T - R E x - 2 9 3 , I n v i t r o g e n) を含有するヒト胎児腎臓線維芽細胞 (H E K 2 9 3) 細胞を使用して、S M Y D 2 過剰発現の効果を調べた。V 5 タグ付 S M Y D 2 発現ベクター、空ベクター (m o c k) または V 5 タグ付 C A T 発現ベクター (対照) を T - R E x - 2 9 3 細胞にトランスフェクトして、S M Y D 2 を発現する安定細胞株を樹立した。本発明者らは、F A C S 解析によって細胞周期状態を分析し (図 2 D)、T - R E x - S M Y D 2 細胞では、S 期の割合が、対照細胞のものと比較して有意に増加していることを見出した (それぞれ $P < 0.01$ [M o c k 、 S M Y D 2] および $P < 0.05$ [C A T 、 S M Y D 2]) 。反対に、T - R E x - S M Y D 2 細胞における G_0 / G_1 期の割合は、対照細胞のものよりもわずかに低かった (それぞれ $P < 0.01$ [M o c k 、 S M Y D 2] および $P < 0.01$ [C A T 、 S M Y D 2]) 。B r d U および 7 - A A D 染色も実施して癌細胞の詳細な細胞周期状態を分析し、S M Y D 2 のノックダウン後に、S 期の癌細胞の割合が有意に減少したことを確認した (図 2 E および 2 G) 。

【 0 2 6 0 】

実施例 3 : S M Y D 2 は、H S P 9 0 A B 1 と複合体を形成する。

S M Y D 2 が癌細胞成長をどのように促進するのかを明らかにするために、本発明者らは、S M Y D 2 の相互作用パートナーの同定を試みた。2 9 3 T 細胞に F L A G - m o c k または F L A G - S M Y D 2 ベクターをトランスフェクトし、免疫沈降 (I P) および質量分析 (M S) 分析を行った。その結果として、H S P 9 0 A B 1 を S M Y D 2 の相互作用パートナーとして同定した (図 3 A) 。H S P 9 0 タンパク質は、多くの癌タンパク質をシャペロニングしかつそれらの機能を促進することを介して、ヒト癌における重要な役割を果たすと考えられているので (Trepel, J., Mollapour, M., Giaccone, G. & Neckers, L. Nat Rev Cancer 10, 537-549 (2010))、S M Y D 2 と H S P 9 0 A B 1 との間の機能的な関係を調べた。免疫共沈降分析によって、S M Y D 2 と H S P 9 0 A B 1 との間の相互作用を確認した (図 3 B および 3 C) 。H S P 9 0 A B 1 に対する S M Y D 2 の結合領域を決定するために、様々な割合の S M Y D 2 を発現するように設計したプラスミドクローンをコトランスフェクトし、免疫共沈降分析を実施した (図 3 D) 。次いで、S M Y D 2 は、S E T ドメインの一部を含む中央領域を介して H S P 9 0 A B 1 に結合することが見出された (図 3 E) 。S M Y D 2 に対する H S P 9 0 A B 1 の結合領域に関しては、C 末端領域が S M Y D 2 との相互作用に重要であり得ることが見出された (図 3 F および 3 G) 。加えて、免疫細胞化学的分析により、それらは、細胞質で共局在していることが明らかになった (図 3 H) 。これらの結果は、S M Y D 2 が H S P 9 0 A B 1 と複合体を形成することを示している。

【 0 2 6 1 】

実施例 4 : S M Y D 2 は、H S P 9 0 A B 1 をメチル化する。

H S P 9 0 タンパク質は複数の翻訳後修飾 (P T M) を受けることが公知であるが、メチル化に関する報告はない (Scroggins, B.T. et al. Mol Cell 25, 151-159 (2007), Martinez-Ruiz, A. et al. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 8525-8530 (2005), Mollapour, M. et al. Mol Cell 37, 333-343 (2010), Mollapour, M. et al. Mol Cell 41, 672-681 (2011)) 。したがって、S M Y D 2 が H S P 9 0 A B 1 をメチル化し、その機能に影響を与えることができるかを調べた。最初に、インピトロのメチルトランスフェラーゼアッセイを実施し、H S P 9 0 A B 1 が S M Y D 2 によって用量依存的にメチル化されることを見出した (図 4 A) 。次いで、本発明者らは、H S P 9 0 A B 1 が、細胞内でも S M Y D 2 によってメチル化されるかを検証した。2 9 3 T 細胞に F L A G - m o c k ベクター、F L A G - S M Y D 2 (W T) ベクターまたは F L A G - S M Y D 2 (N H S C / G E E V) をトランスフェクトし、続いて、実施例 1 に記載したようにインピボの標識実験を行った。その結果、メチル化 H S P 9 0 A B 1 に対応する特異的シグナルが観察され、メチル化は、S M Y D 2 の酵素活性に依存していた (図 4 B) 。次に、H S P 9 0 A B 1 のどの部分が S M Y D 2 によってメチル化されるかを決定するために、本発明者らは

、組換えHSP90AB1タンパク質の欠失変異体をいくつか調製し、インビトロのメチルトランスフェラーゼアッセイを実施した(図4Cおよび図4H)。このデータにより、GST-HSP90AB1のC末端部分(500~724aa)がSMYD2によってメチル化されることが明らかになった。続いて、本発明者らは、LC-MS/MS分析によってHSP90AB1のメチル化部位の同定を試み、リジン531および574がSMYD2によってメチル化されることを同定した(図4Dおよび4E)。K574をアラニンに置換することにより、SMYD2依存性のHSP90AB1メチル化のシグナルが減少し、K531およびK574の両方を置換したHSP90AB1タンパク質を使用すると、メチル化シグナルはより減少した(図4F)。この結果は、部分的なHSP90AB1(500~724aa)を使用しても確認された(図4G)。これらのメチル化部位は、ダニオ・レリオからホモ・サピエンスまで高度に保存されているので、これらの部位のメチル化は、HSP90AB1機能の調節に重要であり得る可能性がある(図4I)。

【0262】

実施例5：SMYD2依存性のメチル化は、HSP90AB1のシャペロン複合体形成を変化させる。

本発明者らは次に、HSP90AB1機能に対するSMYD2依存性のメチル化の効果をより詳細に分析する。SMYD2のメチルトランスフェラーゼ反応の後、架橋試薬であるビス[スルホスクシンイミジル]スベレート(BS³)を使用して、二量体化アッセイを実施し、続いてSDS-PAGEおよびウエスタンブロットを行った。その結果、本発明者らは、HSP90AB1のメチル化依存性の二量体化を見出したが(図5F)、これは、SMYD2依存性のHSP90AB1がその二量体化形成を促進し得ることを暗示している。続いて、本発明者らは、SMYD2によるメチル化依存性の二量体化が培養細胞で観察されるかを検証した。内因性SMYD2の効果を排除するためにsiSMYD2処理した後、FLAG-HSP90AB1(WT)ベクターおよびHA-mockベクターまたはHA-SMYD2ベクターを293T細胞にコトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、インビボの架橋アッセイを実施し、SMYD2がHSP90AB1の架橋を促進することを見出した(図5A)。免疫共沈降分析により、二重置換(K531A/K574A)は、HSP90AB1の二量体化プロセスに負の影響を与えたことが示された(図5B、レーン5と6との間を比較されたい)。どちらの残基がこのプロセスにより重要であるかを決定するために、単一置換(それぞれK531A、K574A)を含む変異体発現ベクターを調製し、HA-HSP90AB1のK531AではなくK574Aが、FLAG-HSP90AB1(WT)に対する親和性の低下をもたらしたことを見出した(図5C、レーン7と8との間を比較されたい)。この結果は、K574のメチル化がHSP90AB1の二量体化により重要であり得ることを示している。

【0263】

HSP90は、コシャペロンと共同してそのシャペロン機能を発揮し(Young, J.C., Agashe, V.R., Siegers, K. & Hartl, F.U. Nat Rev Mol Cell Biol 5, 781-791 (2004))、いくつかの翻訳後修飾(PTM)は、コシャペロンに対するHSP90の親和性を変化させると報告されている(Scroggins, B.T. et al. Mol Cell 25, 151-159 (2007), Molliapour, M. et al. Mol Cell 37, 333-343 (2010), Mayer, M.P. Mol Cell 37, 295-296 (2010))。したがって、本発明者らは、SMYD2によるHSP90AB1のメチル化が、コシャペロンへのHSP90AB1の結合に影響を与える可能性を調査した。FLAG-HSP90AB1(WT)ベクターまたはFLAG-HSP90AB1(K531A/K574A)ベクター293T細胞を293T細胞にトランスフェクトし、続いて、免疫沈降およびウエスタンブロット分析を行った。本発明者らは、HSP90AB1のK531A/K574A置換が、p23ではなくHOPおよびCdc37とのその相互作用を破壊したことを見出した(図5D、レーン3と4との間を比較されたい)。この際、モノメチル化HSP90AB1K574を認識する特異的抗体を使用して、HSP90AB1のメチル化状態もモニタリングした(図5Dおよび5G)。加えて、HSP90AB1のK531AおよびK574Aでの単一変異コンストラクトを使用する実験にしたがって、本

発明者らは、574位の残基をリジンからアラニンに置換することにより、p23ではなくHOPおよびCdc37に対する結合親和性の低下がもたらされたことを見出した(図5E、レーン7と8との間を比較されたい)。最後に、腫瘍成長におけるメチル化HSP90AB1の意義を解明するために、本発明者らは、FLAG-HSP90AB1(WT)およびFLAG-HSP90AB1(K531A/K574A)を過剰発現するHeLa細胞の安定トランスフェクタントを作製した。野生型および置換HSP90タンパク質の安定発現を確認した後に(図5Ha、レーンa1およびb2)、該安定細胞株を使用して成長アッセイを実施し、HSP90AB1の成長促進効果が、メチル化部位をアラニンに置換することによって減少したことを見出した(図5Hb、 $P < 0.05$)。総合すると、これらのデータにより、SMYD2依存性のメチル化は、HSP90AB1の二量体化プロセスおよびコシャペロンとの相互作用を容易にし、ヒトの発癌現象に寄与するようであることが示唆された。

10

【0264】

実施例6: SMYD2のメチルトランスフェラーゼ活性の阻害剤のスクリーニング

Histag付SMYD2(配列番号63のアミノ酸配列からなるHistag付ポリペプチド)を、メチルトランスフェラーゼ緩衝液(50mM Tris-HCl、100mM NaCl、4mM MgCl₂、10mM DTT、pH8.8)中で、1.8マイクロMのピオチン化-ヒストンH4ペプチド、0.18マイクロMのS-アデノシル-L-[メチル-³H]メチオニンおよび50マイクログラムのストレプトアビジンコーティングPVTビーズと共に、総容量15マイクロリットルでインキュベートした。室温で30分間インキュベートした後、リン酸カリウム緩衝液(pH6.0)を添加することによって反応を停止させ、次いで、シンチレーションカウンタを使用して、ビーズから放出された光を測定する。

20

多数の化学合成した化合物を上記アッセイによって評価した結果、SMYD2のメチルトランスフェラーゼ活性を阻害するいくつかの化合物を同定した。

【0265】

実施例7: SMYD2は、RB1のリジン810をインビトロおよびインビボの両方でメチル化する。

ヒトの発癌現象に関与する重要なSMYD2基質を同定するために、本発明者らは、様々な腫瘍関連タンパク質を基質として使用してインビトロのメチルトランスフェラーゼアッセイを実施し、RB1タンパク質を基質として使用した場合に強いメチル化シグナルを見出した(図6A)。RB1とSMYD2タンパク質との間の相互作用をさらに確認するために、本発明者らは、FLAG-SMYD2およびHA-RB1またはFLAG-RB1およびHA-SMYD2発現ベクターを293T細胞にコトランスフェクトした後に免疫共沈降アッセイを行い、それらの結合を確認した(図6BおよびC)。加えて、SMYD2の欠失変異体を使用する免疫沈降アッセイにより、SMYD2のC末端部分は、RB1と相互作用するために必須であることが示された(図6D)。さらに、本発明者らはまた、免疫細胞化学的分析によって、内因性のRB1およびSMYD2タンパク質が小細胞肺癌細胞株SBC5で共同在していることを確認した(図6E)。

30

【0266】

本発明者らは次に、SMYD2によるRB1のメチル化部位を同定するために、RB1タンパク質の一部を発現するように設計したプラスミドベクターを構築し、大腸菌で発現させた組換えタンパク質を調製した。それらのタンパク質を使用して、本発明者らは、インビトロのメチルトランスフェラーゼアッセイを行い(図7A)、RB1タンパク質のC末端領域(773aa~928aa)がメチル化部位を含むことを見出した。続いて、LC-MS/MS分析により、RB1のリジン810が、SMYD2によってモノメチル化されることが示された(図7B)。リジンのSMYD2依存性モノメチル化は、アミノ酸分析によっても確認された(図11)。同定したRB1のメチル化部位を検証するために、本発明者らは、リジン810をアラニンに置換した部分的なRB1タンパク質(K810A-RB1(773~813))を調製し、インビトロのメチルトランスフェラーゼア

40

50

ッセイを実施した(図7C)。SMYD2による野生型RB1タンパク質の特異的メチル化シグナルは、K810の置換によるものであった。これらの結果に基づいて、本発明者らは、K810モノメチル化RB1ペプチドを標的とするポリクローナル抗体を作製した。該抗体の特異性を検証するために、本発明者らは、SMYD2有りまたは無しでインビトロのメチルトランスフェラーゼアッセイを実施し、SMYD2依存性のメチル化シグナルを観察した(図7D)。本発明者らはまた、この抗体が、インビボにおいて野生型SMYD2で処理したK810置換RB1タンパク質(図7E)も、インビボにおいて酵素失活SMYD2で処理した野生型RB1タンパク質(図7F)も認識できないことを見出した。これらの結果は、SMYD2が、RB1タンパク質のリジン810をインビトロおよびインビボの両方でメチル化し、本発明者らが作製した抗体が、K810メチル化RB1を特異的に認識できることを暗示している。

10

【0267】

実施例8: SMYD2は、リジン810のメチル化を介して、セリン807/811におけるRB1のリン酸化を促進する。

リン酸化はRB1機能の調節において重要な役割を果たすことが周知であることから(Weinberg RA .Cell 81, 323-330(1995), Sherr CJ, et al.Cancer Cell 2, 103-112.(2002))、本発明者らは、RB1のリン酸化状態に対するリジン810のメチル化の効果を調べた。本発明者らは最初に、セリン807/811におけるRB1のリン酸化状態を調べるために、2種の非癌性細胞株および7種の癌細胞株のウエスタンブロット分析を実施し、RB1のより高いリン酸化状態と高SMYD2発現との間にある程度の相関関係を見出した(図8A)。SMYD2がリジン810のメチル化を介してRB1のリン酸化状態に影響を与えるかを明らかにするために、本発明者らは、機能獲得実験および機能喪失実験を行った。FLAG-SMYD2を293T細胞に導入した後、本発明者らは、セリン807/811におけるRB1のリン酸化状態が、mockベクターをトランスフェクトした細胞と比較して有意に上昇していることを検出した(図8B)。続いて、免疫細胞化学的分析により、HeLa細胞において、WT-SMYD2の過剰発現は、セリン807/811におけるRB1のリン酸化を促進したことが検出された(図8C)。それと一致して、セリン807/811におけるRB1のリン酸化は、SMYD2のノックダウン後に有意に減少した(図8D)。RB1のリン酸化状態に対するSMYD2のメチルトランスフェラーゼ活性の効果を調べるために、本発明者らは、部分的なRB1(FLAG-RB1(773~813))を発現するように設計したベクターを、野生型SMYD2発現ベクター(HA-SMYD2)または酵素失活SMYD2発現ベクター(HA-SMYD2(NHSC/GEEV))と共に293T細胞にトランスフェクトし、抗FLAG M2アガロースを使用して免疫沈降を行った。図7Eに示されているように、WT-SMYD2をトランスフェクトした細胞では、セリン807/811におけるRB1のリン酸化レベルは、酵素失活SMYD2を有する細胞のものよりも有意に高かった。したがって、SMYD2依存性のRB1メチル化は、セリン807/811におけるRB1のリン酸化状態を促進すると思われる。

20

30

【0268】

RB1のリン酸化状態に対するSMYD2依存性のメチル化の効果を評価するために、本発明者らは、SMYD2有りまたは無しで反応させる基質としてRB1を使用して、インビトロのキナーゼアッセイを実施した(図9A)。RB1のリジン810のメチル化を確認した後(図9B、上)、本発明者らは、試料をCDK4/サイクリンD1複合体(これは、RB1リン酸化の重要な調節因子である)と反応させ、セリン807/811におけるRB1のリン酸化状態をウエスタンブロットによってモニタリングした(図9B、下)。重要なことに、メチル化RB1は、非メチル化タンパク質よりも高いリン酸化レベルを示した。加えて、本発明者らが、セリン807/811におけるRB1のリン酸化に対するSMYD2の用量依存的な効果を調べたところ、それは用量依存的に増加し、リジン810におけるRB1のメチル化レベルと相関していた(図9C)。同様に、リジン810のアラニンへの置換を含有する変異体RB1は、野生型RB1よりもずっと弱いリン酸

40

50

化レベルを示したが（図9D）、これは、リジン810におけるRB1のメチル化が、RB1のリン酸化レベルを促進するようであることを暗示している。次いで、本発明者らは、K810モノメチル化RB1ペプチド（K810me-RB1ペプチド（配列番号70））およびK810非メチル化RB1ペプチド（対照-RB1ペプチド（配列番号69））を調製し、CDK4/サイクリンD1複合体によるセリン807/811におけるRB1のリン酸化に対するK810モノメチル化の効果をより詳細に調査した（図9E）。抗RB1-K810me抗体を使用して、ドットプロット分析によってK810モノメチル化を確認した後に、本発明者らはキナーゼアッセイを行い、セリン807/811におけるRB1のリン酸化レベルが、K810me-RB1ペプチドでは非メチル化ペプチドよりも有意に高いことを見出した（図9F）。K810me-RB1では、セリン807/811におけるRB1のリン酸化がCDK4用量依存的に上昇していることも確認された（図9G）。これらの知見は、SMYD2によるRB1のK810モノメチル化が、セリン807/811におけるRB1のリン酸化レベルを促進できることを示している。

【0269】

実施例9：RB1のリジン810のメチル化は、細胞周期進行を促進する。

インビボにおけるRB1のリン酸化状態に対するメチル化の効果をさらに評価するために、本発明者らは、FLAG-WT-RB1ベクターまたはFLAG-K810A-RB1ベクターを、HA-WT-SMYD2ベクターと共に293T細胞にトランスフェクトし、抗FLAG-M2アガロースを用いて免疫沈降を行った（図10A）。先のデータと一致して、WT-RB1は、リジン810置換RB1（K810A-RB1）よりも高い、セリン807/811におけるRB1のリン酸化レベルを示し、この結果は、部分的なRB1（773～813）を使用しても確認された（図10B）。総合すると、リジン810におけるRB1のメチル化はまた、RB1のリン酸化状態をインビボで促進するようである。

【0270】

RB1のCDK介在性リン酸化は、RB1とE2F1（G₁/S移行期における細胞周期進行に必要な遺伝子を活性化する多機能転写因子である）との相互作用を妨げ、E2F1依存性の遺伝子発現を可能にすることが公知である（Sherr CJ. et al. Cancer Cell 2, 103-112. (2002)）。リジン810のメチル化はRB1のリン酸化を促進したことから、本発明者らは、細胞周期に対するRB1メチル化の効果を調べるために、E2F受容体アッセイを実施した。リジン810置換RB1を過剰発現する細胞では、E2F-ルシフェラーゼ活性は、野生型RB1を過剰発現する細胞と比較して有意に低かった（図10C）。この結果は、RB1のリジン810のメチル化がE2F転写活性をインビボで促進し得ることを示している。さらに、本発明者らは、Flp-In（商標）T-REx（商標）293細胞株システムを使用したドキシサイクリンの誘導によって、野生型RB1（WT）およびK810置換RB1（K810A）を発現することができる安定細胞株を樹立した。上記データと一致して、野生型RB1を発現する細胞は、RB1（K810A）を発現する細胞よりも高い細胞成長速度を示した（図12）。総合すると、SMYD2によるRB1のリジン810のメチル化は、RB1のリン酸化の増加を介して、細胞周期進行を促進すると思われる。

【0271】

考察

本発明者らは以前に、特定のヒストンメチルトランスフェラーゼ（HMT）が、正常な細胞バイオロジーに加えて、ヒト癌の病因において重要な役割を果たすことを実証した（Hamamoto, R. et al. Nat Cell Biol 6, 731-740 (2004), Takawa, M. et al. Cancer Sci (2011), Yoshimatsu, M. et al. Int J Cancer 128, 562-573 (2011)）。加えて、他のグループは、HMTがヒト細胞の悪性化に関与すると提唱している（Portela, A. & Esteller, M. Nat Biotechnol 28, 1057-1068 (2010), Schneider, R., Bannister, A.J. & Kouzarides, T. Trends Biochem Sci 27, 396-402 (2002), Sparmann, A. & van Lohuizen, M. Nat Rev Cancer 6, 846-856 (2006)）。総合すると、この証拠は、HMTの調節解

10

20

30

40

50

除がヒトの発癌現象に有意に寄与することを明確に示唆しているが、HMTの異常とヒト癌との間の関係についてのより深い理解は、依然として不明である。

【0272】

本発明の間に、SMYD2は膀胱および様々な他の癌組織で過剰発現していること、ならびにSMYD2は新規な基質としてHSP90AB1およびRB1をメチル化することが、実証された。最近、特定のHMTは、非ヒストンタンパク質をメチル化し、それにより、それらの機能、例えば転写活性、タンパク質安定性、および相互作用パートナーに対する結合親和性を変化させることが示されている (Esteve, P.O. et al. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 5076-5081 (2009), Guo, Z. et al. Nat Chem Biol 6, 766-773 (2010))。

10

【0273】

本発明のアッセイにより、SMYD2によるHSP90AB1のメチル化は、二量体化プロセスおよびコシャペロンに対する結合親和性のようなその機能に影響を与えること、ならびにこのメチル化プロセスは、癌細胞増殖を促進することが明らかになった (図5) 。HSP90は真核細胞で普遍的に発現しており、全タンパク質の最大1~2%を含む (Borkovich, K.A., Farrelly, F.W., Finkelstein, D.B., Taulien, J. & Lindquist, S. Mol Cell Biol 9, 3919-3930 (1989))。構造的には、HSP90は、3つのドメイン：N-ドメイン (ATP結合ポケット)、M-ドメイン (コシャペロンおよびクライアントタンパク質に対する結合領域)、およびC末端二量体化ドメイン (二量体化モチーフ) からなる (Wandinger, S.K., Richter, K. & Buchner, J. J Biol Chem 283, 18473-18477 (2008))。重要なことに、HSP90は進化的に保存されている分子シャペロンとして働き、これは、多数の新たに合成されたポリペプチドおよび不安定なフォールディングタンパク質が正しくフォールディングするのを助けることで、それらが誤って凝集するのを防ぐ (Wandinger, S.K., Richter, K. & Buchner, J. J Biol Chem 283, 18473-18477 (2008), Young, J.C., Agashe, V.R., Siegers, K. & Hartl, F.U. Nat Rev Mol Cell Biol 5, 781-791 (2004))。クライアントタンパク質には、シグナル伝達およびストレス適応反応に重要な転写因子およびタンパク質キナーゼが含まれるので、HSP90は、複数の細胞機能の調節において必須の役割を果たすと思われる (Zhao, R. et al. Cell 120, 715-727 (2005), Chiosis, G., Vilenchik, M., Kim, J. & Solit, D. Drug Discov Today 9, 881-888 (2004))。シャペロン機能を発揮するためには、ホモ二量体化、ならびにp21、HOPおよびCdc37などのコシャペロンタンパク質との協調 (Taipale, M., Jarosz, D.F. & Lindquist, S. Nat Rev Mol Cell Biol 11, 515-528 (2010)., Wayne, N. & Bolon, D.N. J Biol Chem 282, 35386-35395 (2007)) が、ATPase活性と同様に必須である。クライアントタンパク質が、ATP結合HSP90タンパク質によってクランプされ、HSP90が、他のシャペロンおよびコシャペロンと共同してフォールディングプロセスを行い、続いて、ATPの加水分解によるHSP90の立体構造変化に応じて、成熟したクライアントが放出される (Ali, M.M. et al. Nature 440, 1013-1017 (2006), Vaughan, C.K. et al. Mol Cell 23, 697-707 (2006), Hessling, M., Richter, K. & Buchner, J. Nat Struct Mol Biol 16, 287-293 (2009))。加えて、HSP90の機能は、リン酸化およびアセチル化などの複数のPTMによって調節されると報告されている (Scroggins, B.T. et al. Mol Cell 25, 151-159 (2007), Martinez-Ruiz, A. et al. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 8525-8530 (2005), Mollapour, M. et al. Mol Cell 37, 333-343 (2010), Mollapour, M. et al. Mol Cell 41, 672-681 (2011))。

20

30

40

【0274】

癌細胞では、正常細胞と比較してより多くのコシャペロンがシャペロン複合体中に存在し (Kamal, A. et al. Nature 425, 407-410 (2003))、この癌特異的なシャペロン機構により、癌細胞は、癌タンパク質をミスフォールディングおよびプロテアソーム分解から保護することができる (Trepel, J., Mollapour, M., Giaccone, G. & Neckers, L. Nat Rev Cancer 10, 537-549 (2010))。臨床状況では、シャペロンタンパク質はヒト癌で過剰発現しており (Whitesell, L. & Lindquist, S.L. Nat Rev Cancer 5, 761-772 (2005)

50

)、シャペロンの発現上昇は、予後不良 (Jameel, A. et al. Int J Cancer 50, 409-415 (1992), Pick, E. et al. Cancer Res 67, 2932-2937 (2007)) および薬物耐性 (Trieb, K. et al. Br J Cancer 82, 85-87 (2000)) に関連している。総合すると、この証拠は、HSP90を含むシャペロン複合体が、ヒトの発癌現象に深く関与することを示唆している。実際、HSP90を標的とする阻害剤であって、ATP結合ポケットに結合する阻害剤が開発され、臨床試験において評価中である (Trepel, J., Mollapour, M., Giaccone, G. & Neckers, L. Nat Rev Cancer 10, 537-549 (2010))。代表的な阻害剤であるゲルダナマイシンの17-アリルアミノ誘導体 (17-AAGまたはタネスピマイシン) は、臨床試験で評価中のゲルダナマイシン誘導体の1つである (Solit, D.B. & Chiosis, G. Drug Discov Today 13, 38-43 (2008))。例えば、トラスツズマブと組み合わせた17-AAGの、HER-2陽性転移性乳癌患者に対する副作用および治療有効性を検証するために、第II相試験が行われ、この併用療法は患者の予後を改善し、毒性は許容可能であることが証明された。このデータにより、さらなる研究ではその治療関連性が調査される可能性があることが確実になる (Modi, S. et al. Clin Cancer Res (2011))。

【0275】

p107およびp130とのポケットファミリーのメンバーであるRB1遺伝子は、最初に知られた腫瘍抑制因子であった (Friend SH. et al. Nature 323, 643-646(1986), Ianari A. et al. Cancer Cell 15, 184-194(2009))。RBタンパク質は転写補因子として主に機能し、多数の転写因子を調節できかつ多くの標的遺伝子の発現に影響を与えることができる。加えて、RB1タンパク質は、アデノウイルスE1AなどのDNA腫瘍ウイルスの形質転換タンパク質によって標的とされ、大部分のヒト腫瘍細胞では、RB1遺伝子それ自体またはその上流の調節因子のいずれかの変異により機能的に不活性化されていることが周知である (Trimarchi JM. et al. Nat Rev Mol Cell Biol 3, 11-20(2002))。その腫瘍抑制活性は、E2F転写ファミリーのメンバーに直接結合し、それらが細胞増殖に必要な遺伝子の転写を促進するのを防ぐ能力に、大きく依存している (Trimarchi JM. et al. Nat Rev Mol Cell Biol 3, 11-20(2002))。RB/E2F経路は、癌細胞では変化していることが多く、細胞増殖制御系を調節解除するので、研究者によって注目されている (Knudsen ES. et al. Clin Cancer Res 16, 1094-1099(2010))。細胞増殖の調節に関して、マイトジェンは、CDK-サイクリン複合体の連続的な活性化を介してE2F依存性プロモーターの転写阻害を回復させ、次いでこれがRBをリン酸化し、その転写コリプレッサー能力を弱める (Knudsen ES. et al. Nat Rev Cancer 8, 714-724(2008), Harbour JW. et al. Cell 98, 859-869(1999), Hinds PW. et al. Cell 70, 993-1006(1992))。このリン酸化は、E2Fを放出するようRBタンパク質を誘導し、かつ続いて後期G₁期にE2F応答遺伝子を誘導するために十分である。重要なことに、大多数のヒト腫瘍は、E2FのRBタンパク質媒介性抑制を無効にする変異を有する (Sherr CJ. et al. Cancer Cell 2, 103-112(2002))。これらの変異は、正常な分裂促進シグナルの非存在下で、サイクリンD-CDK4/6キナーゼの活性化またはCDK阻害因子p16の不活性化を介して、RB1遺伝子それ自体を不活性化するか、またはRBタンパク質のリン酸化を促進する。これらの変化はE2Fの不適切な放出をもたらし、それによりE2F標的遺伝子の転写活性化を誘導し、その結果として癌細胞の細胞増殖を促進する (Ianari A. et al. Cancer Cell 15, 184-194 (2009))。

【0276】

本発明の間に、RB1のリジン810はSMYD2によってモノメチル化され、次いでこれがRB1リン酸化およびE2F1転写活性の上昇を介して、細胞周期進行を促進することが発見された (図10D)。この知見は、ヒト癌細胞におけるRB/E2F経路の調節解除機構に新たな洞察を加える。興味深いことに、最近、他のグループが、RBタンパク質のリジンのメチル化を同定した (Carr SM. et al. EMBO J 30, 317-327 (2011), Sadic LA. et al. J Biol Chem 285, 37733-37740(2010))。総合すると、リジンのメチル化は、RB機能の調節において重要な役割を果たす可能性がある。したがって、さらなる機能分析により、RB/E2F経路におけるリジンのメチル化の重要性が明らかになり得

る。

【 0 2 7 7 】

膀胱癌について、いくつかの新規な標的が同定されており、新たに登場した薬物が臨床試験を受けているが、現在の化学療法では十分な転帰を保証することはできず、有害事象を無視することはできない (Black, P.C., Agarwal, P.K. & Dinney, C.P. Urol Oncol 25, 433-438 (2007), Sonpavde, G. et al. Lancet Oncol 11, 861-870 (2010))。したがって、膀胱癌に対する癌化学療法的能力を拡張する理想的な治療標的を発見することは、依然として重要な目標である。本発明の間に、膀胱癌組織および他の癌組織における S M Y D 2 の発現レベルは、対応する非新生物組織のものよりも有意に高いことが発見された。さらに、S M Y D 2 のノックダウンは、癌細胞成長を有意に抑制する。H M T 阻害剤を作製する研究が最近始まっているという事実 (Copeland, R.A., Solomon, M.E. & Richon, V.M. Nat Rev Drug Discov 8, 724-732 (2009) Spannhoff, A. et al. J Med Chem 50, 2319-2325 (2007)) を考慮すると、S M Y D 2 は、有害事象がより少ない理想的な癌治療標的であると思われる。S M Y D 2 のさらなる機能分析は、抗癌治療の新規標的としての S M Y D 2 の有用性を確認するために役立つであろう。加えて、H S P 9 0 阻害剤および S M Y D 2 阻害剤の組み合わせは、現在の癌治療戦略を強化するために役立ち得る。S M Y D 2 依存性の H S P 9 0 メチル化と、1 7 - A A G のような H S P 9 0 阻害剤の感度との間の関係は、将来解明されるべき重要な課題である。

10

【産業上の利用可能性】

【 0 2 7 8 】

20

本明細書に記載される癌の遺伝子発現分析により、癌の予防および治療の標的として特定の遺伝子 (すなわち、S M Y D 2) が同定された。この差次的に発現している遺伝子の発現に基づいて、本発明は、癌を同定および検出するための新規な分子診断マーカーを提供する。したがって、本発明はまた、S M Y D 2 を使用する新規な診断戦略を提供する。さらに、本明細書に記載されるように、S M Y D 2 は、癌細胞の生存に関与する。したがって、本発明はまた、癌を治療および/または予防し、かつ癌細胞成長を阻害するための新規な分子標的を提供する。さらに、本明細書において実証されたように、S M Y D 2 ポリペプチドによってメチル化される新規な基質を同定した。したがって、本発明はまた、癌の治療および/または予防のための新規なスクリーニング戦略を提供する。

本発明はまた、S M Y D 2 と相互作用する遺伝子として H S P 9 0 A B 1 および R B 1 を同定した。したがって、本発明はまた、S M Y D 2 および H S P 9 0 A B 1 または R B 1 を利用する新規な抗癌剤スクリーニング戦略を提供する。

30

本明細書において実証されたように、S M Y D 2 による R B 1 のメチル化は、R B 1 リン酸化の増加を介して細胞周期進行を促進した。したがって、本発明はまた、S M Y D 2 による R B 1 メチル化を介した R B 1 リン酸化を阻害する抗癌剤を同定するための新規なスクリーニング戦略を提供する。

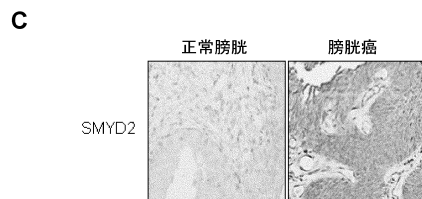
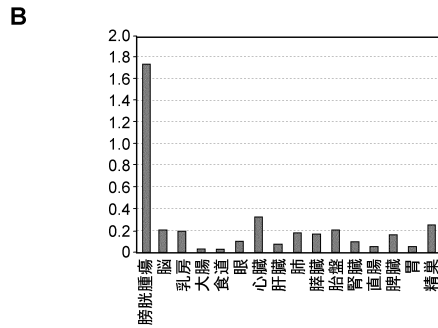
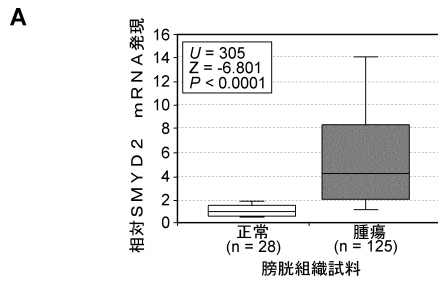
【 0 2 7 9 】

本明細書に記載される材料および方法はまた、癌の予防、診断、および治療のためのさらなる分子標的を同定するために有用である。本明細書で提供されたデータは、癌の包括的な知識を与え、新規の診断戦略の構築を容易にし、治療薬および予防剤のための分子標的の同定の糸口を提供する。このような情報は、腫瘍化に関する知識をより深めるのに貢献し、癌を診断、治療、および究極的には予防する新規の戦略を構築するための指標を提供する。

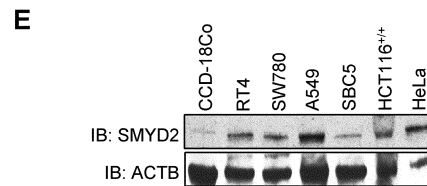
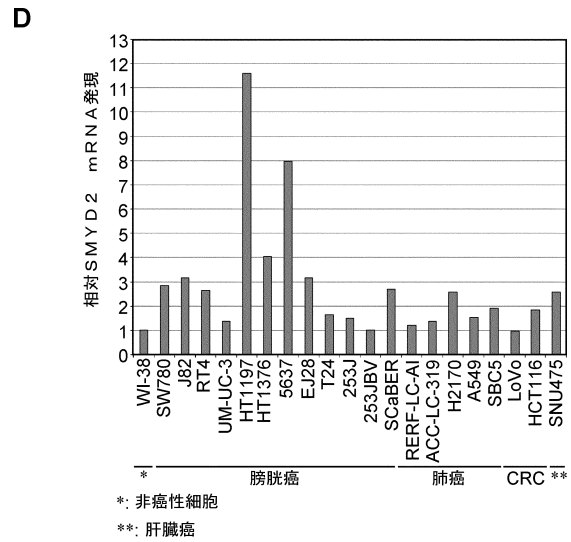
40

本発明を、その特定の態様を参照して詳細に説明したが、上記の詳細は本来的には例示および説明のためのものであり、本発明およびその好ましい実施形態を例証することを意図するものと理解されるべきである。当業者であれば、ルーチンな実験によって、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本発明において様々な変更および修正を行うことができることを容易に認識するであろう。したがって、本発明は、上記説明ではなく、添付の特許請求の範囲およびその等価物によって規定されることを意図する。

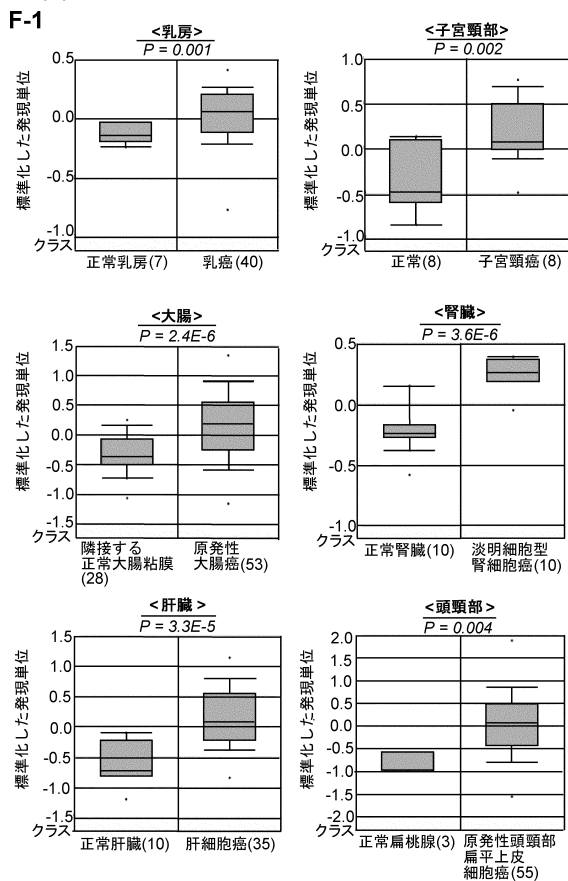
【図 1 A - C】



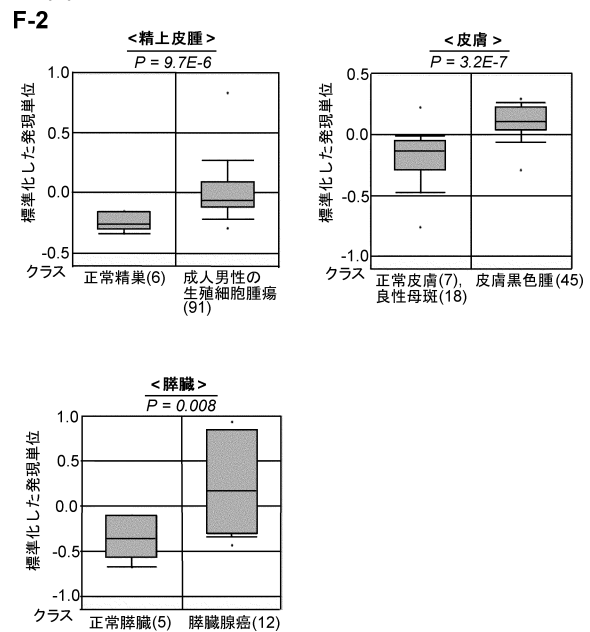
【図 1 D - E】



【図 1 F - 1】

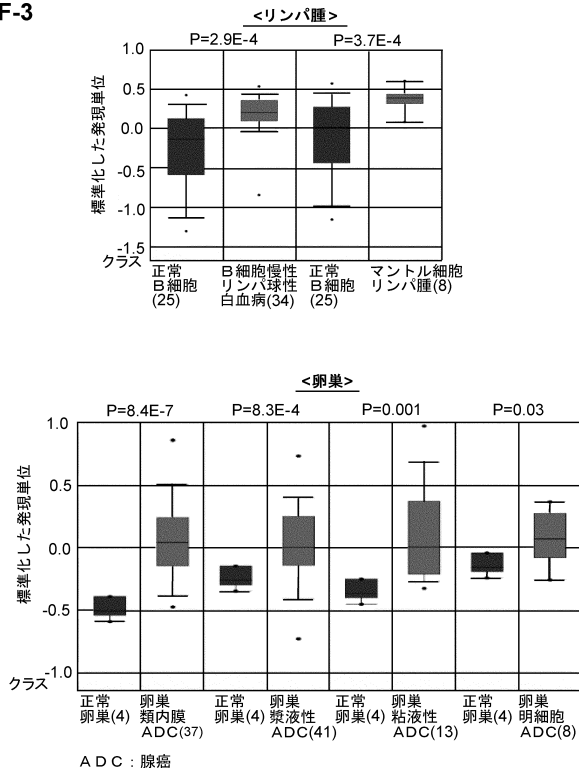


【図 1 F - 2】



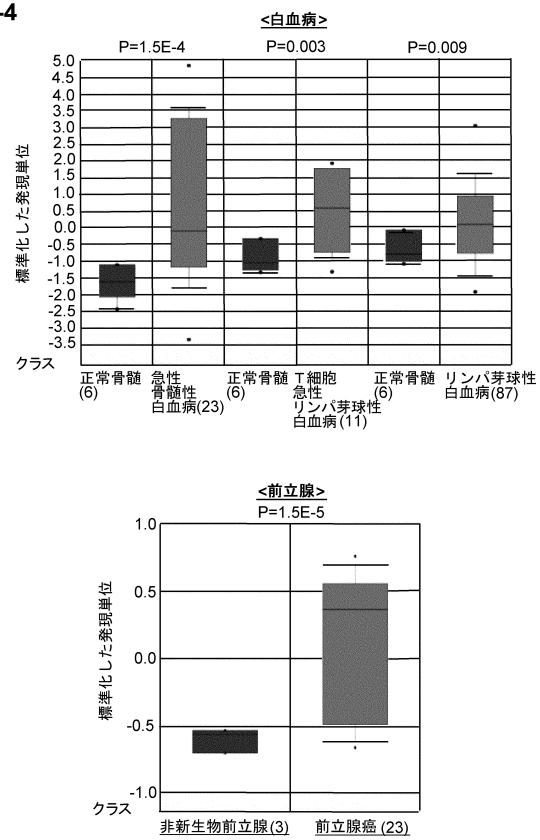
【図 1 F - 3】

F-3



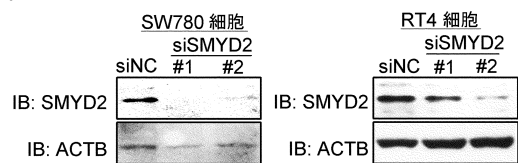
【図 1 F - 4】

F-4

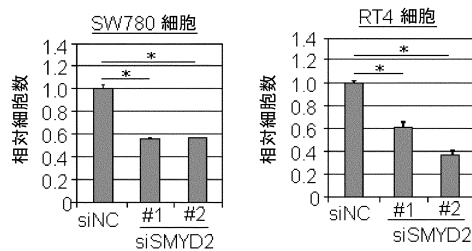


【図 2 A - C】

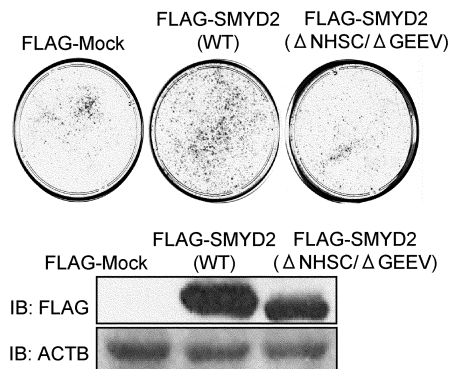
A



B

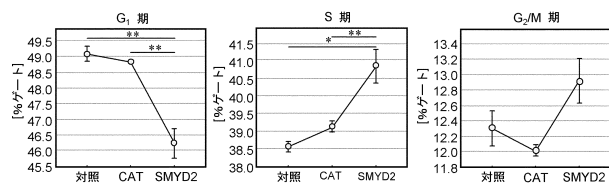


C

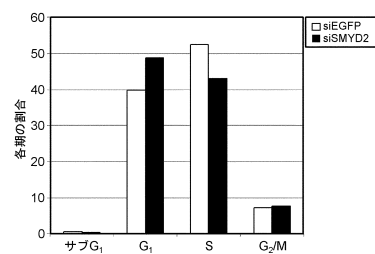


【図 2 D - E】

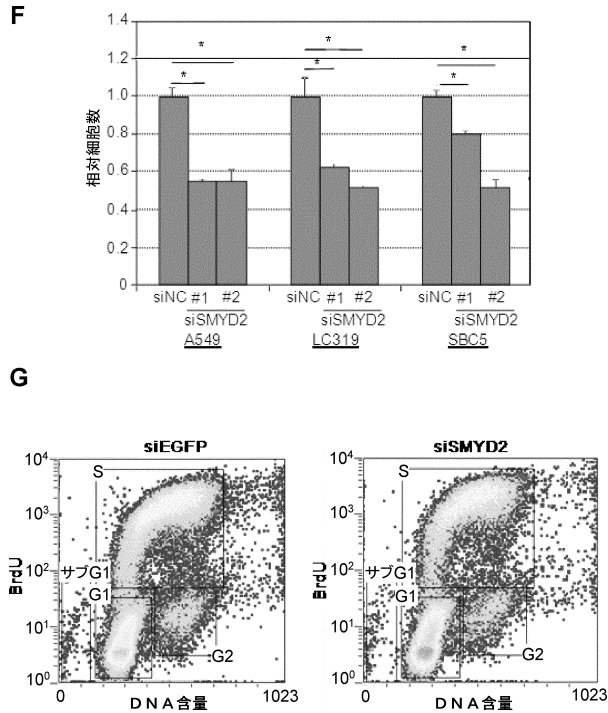
D



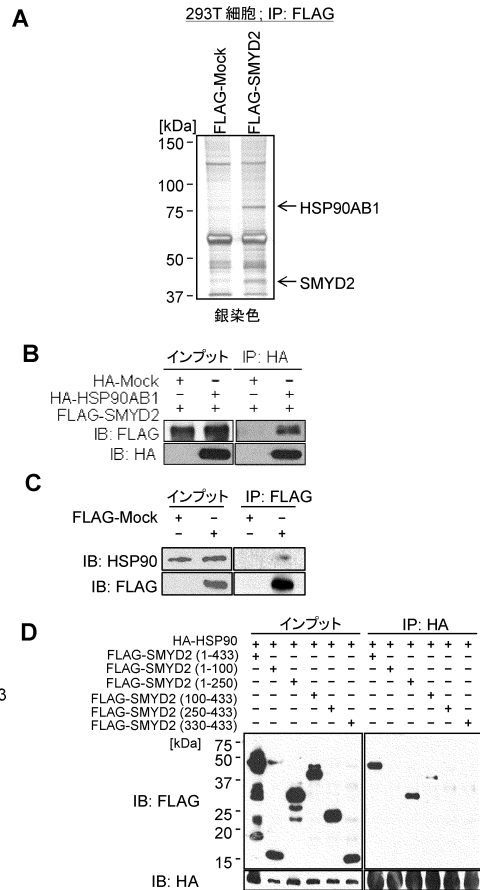
E



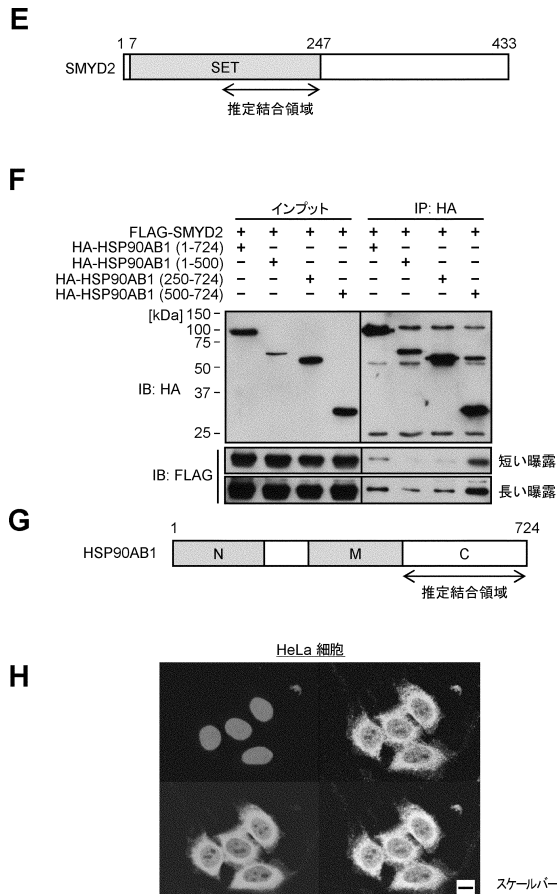
【図 2 F - G】



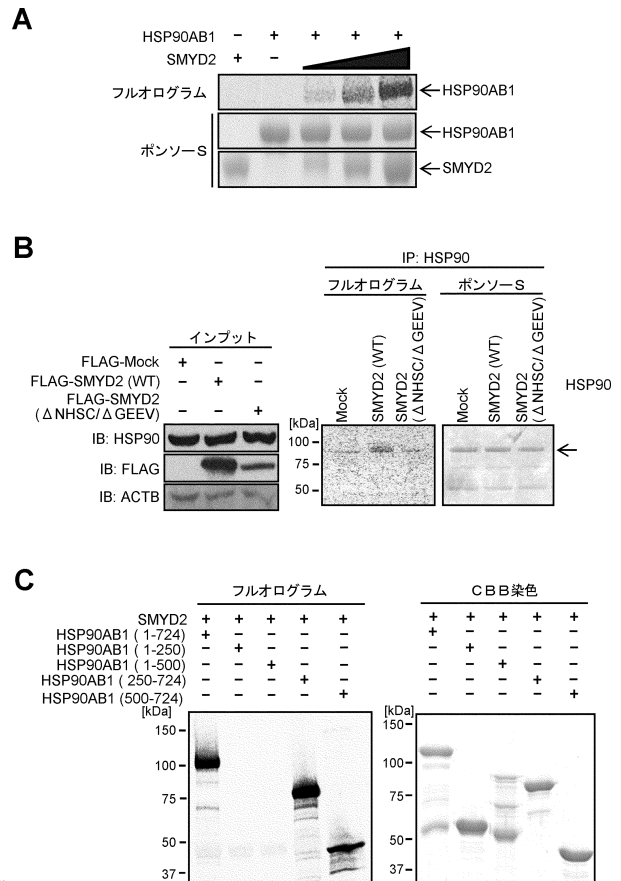
【図 3 A - D】



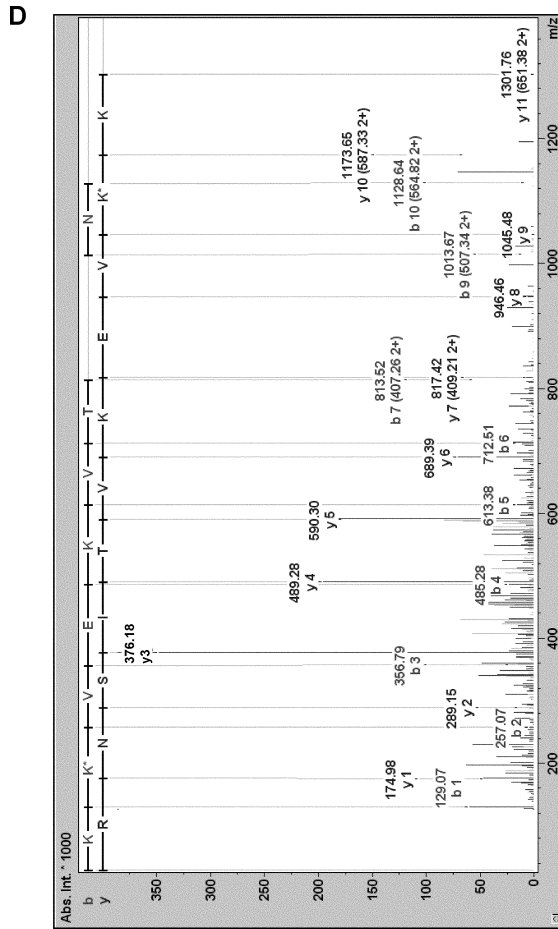
【図 3 E - H】



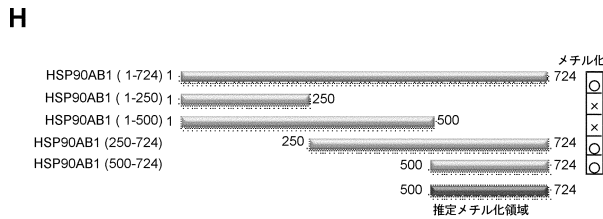
【図 4 A - C】



【 図 4 D 】



【 図 4 H - I 】



1

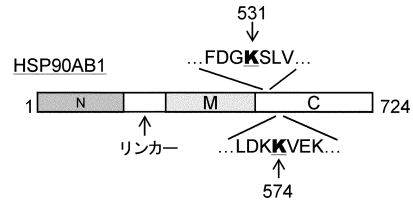
HSP90AB1のリジン531




ホモ・サビエンス(ヒト): Q L K E F D G K S L V S V T K E G L E L (配列番号71)
 カイウサギ(ササギ): Q L K E F D G K S L V S V T K E G L E L (配列番号72)
 ドブネズ(ラット): Q L K E F D G K S L V S V T K E G L E L (配列番号73)
 ハツカネズミ(マウス): Q L K E F D G K S L V S V T K E G L E L (配列番号74)
 アフリカツマゲル(ツマゲル): Q L K E F D G K T L V S V T K E G L E L (配列番号75)
 ダニオ・レリダ(ゼブラフィッシュ): Q L K D F D G K S L V S V T K E G L E L (配列番号76)

HSP90AB1のリジン574

ホモ・サピエンス (ヒト):	M	K	E	I	L	D	K	V	T	I	S	N	R	L	V	S	(配列番号 77)
カイウサギ(ウサギ):	M	K	E	I	L	D	K	V	T	I	S	N	R	L	V	S	(配列番号 78)
ドブネズミ (ラット):	M	K	E	I	L	D	K	V	T	I	S	N	R	L	V	S	(配列番号 79)
ハツカネズミ (マウス):	M	K	E	I	L	D	K	V	T	I	S	N	R	L	V	S	(配列番号 80)
アフリカツメガエル (ツメガエル):	M	K	E	I	L	D	K	V	T	V	S	N	R	L	V	S	(配列番号 81)
ダニオ・レリオ (ゼブラフィッシュ):	M	K	E	I	L	D	K	V	T	V	S	N	R	L	V	S	(配列番号 82)

【 図 4 E - G 】

**F**

	HSP90AB1 (完全長)				
SMYD2	+	+	+	+	
HSP90AB1 (WT)	-	+	-	-	
HSP90AB1 (K531A/K574A)	-	-	+	-	
HSP90AB1 (K574A)	-	-	-	+	
フルオログラム					← HSP90AB1
ボンソーS					← HSP90AB1
					← SMYD2

G

	HSP90AB1 (500-724)				
SMYD2	+	+	+	+	
HSP90AB1 (WT)	-	+	-	-	
HSP90AB1 (K531A)	-	-	+	-	
HSP90AB1 (K574A)	-	-	-	+	

フルオログラム

ボンソーS

100 kDa

75 kDa

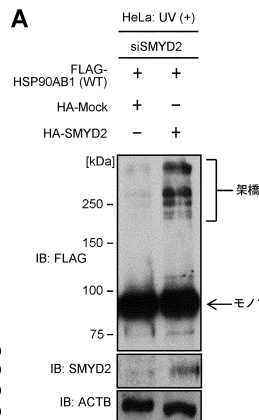
SMYD2

HSP90AB1

SMYD2

HSP90AB1

【 図 5 A - E 】



B

	インプット			IP: FLAG		
FLAG-Mock	+	-	-	+	-	-
FLAG-HSP90A1 (WT)	-	+	+	-	+	+
HA-HSP90A1 (WT)	+	+	-	+	+	-
HA-HSP90A1 (K531A/K574A)	-	+	+	-	+	+
HA-SMYD2	+	+	+	+	+	+

IB: FLAG						
IB: HA						
	1	2	3	4	5	6

C

C	インプット			IP: FLAG		
	+	-	-	+	-	-
FLAG-Mock	+	-	-	+	-	-
FLAG-HSP90A1 (WT)	+	+	+	+	+	+
HA-HSP90A1 (WT)	+	+	-	+	+	-
HA-HSP90A1 (K531A)	-	+	-	-	+	-
HA-HSP90A1 (K574A)	-	-	+	-	-	+
HA-SMDY2	+	+	+	+	+	+

IB: FLAG								
IB: HA								
	1	2	3	4	5	6	7	8

E

E

	インプット				IP: FLAG			
	+	-	-	-	+	-	-	-
FLAG-Mock	+	-	-	-	+	-	-	-
FLAG-HSP90AB1 (WT)	-	+	-	-	-	+	-	-
FLAG-HSP90AB1 (K531A)	-	-	+	-	-	-	+	-
FLAG-HSP90AB1 (K574A)	-	-	-	+	-	-	-	+
HA-SMYD2	+	+	+	+	+	+	+	+

IB: HOP

IB: Cdc37

IB: p23

IB: HSP90K574me

IB: FLAG

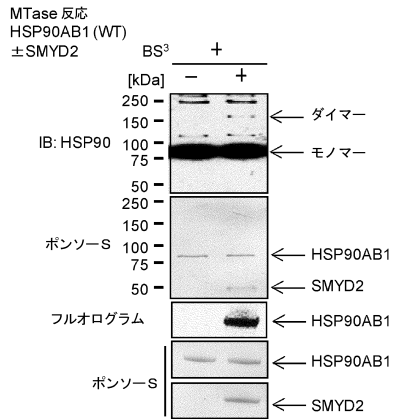
1 2 3 4 5 6 7 8

D

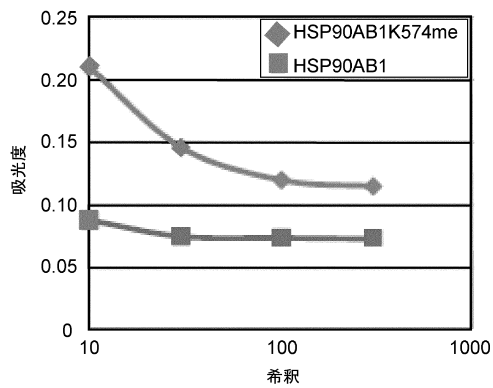
	インプット		IP: FLAG	
FLAG-HSP90A1 (WT)	+	-	+	-
FLAG-HSP90A1 (K531A/K574A)	-	+	-	+
HA-SMYD2	+	+	+	+
IB: HOP				
IB: Cdc37				
IB: p23				
IB: HSP90K574me				
IB: FLAG				
	1	2	3	4

【図 5 F - G】

F

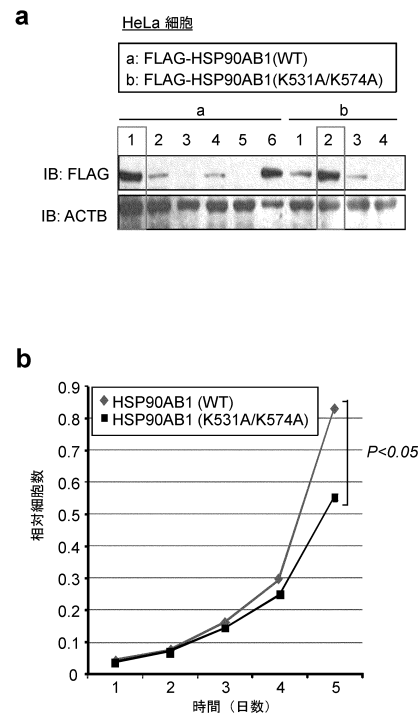


G



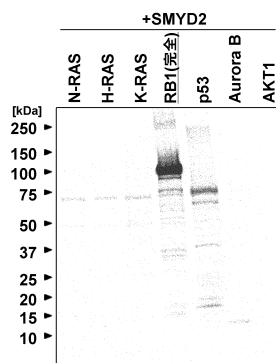
【図 5 H a - b】

H

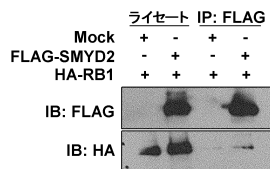


【図 6 A - C】

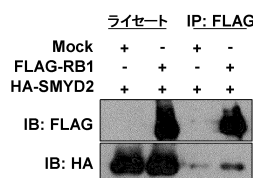
A



B

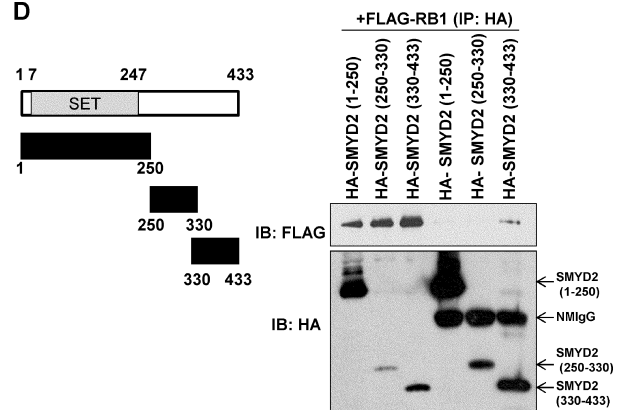


C

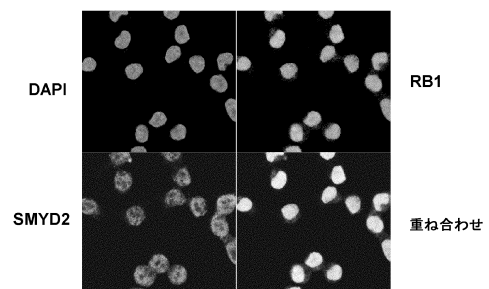


【図 6 D - E】

D

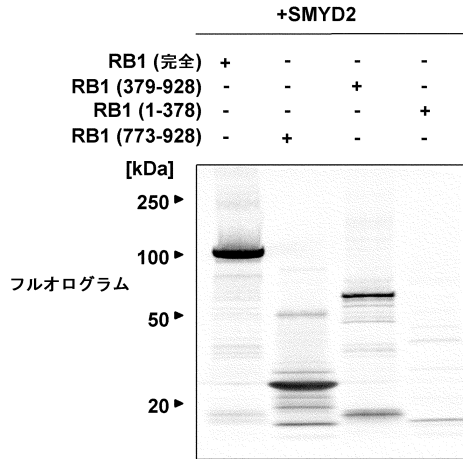


E



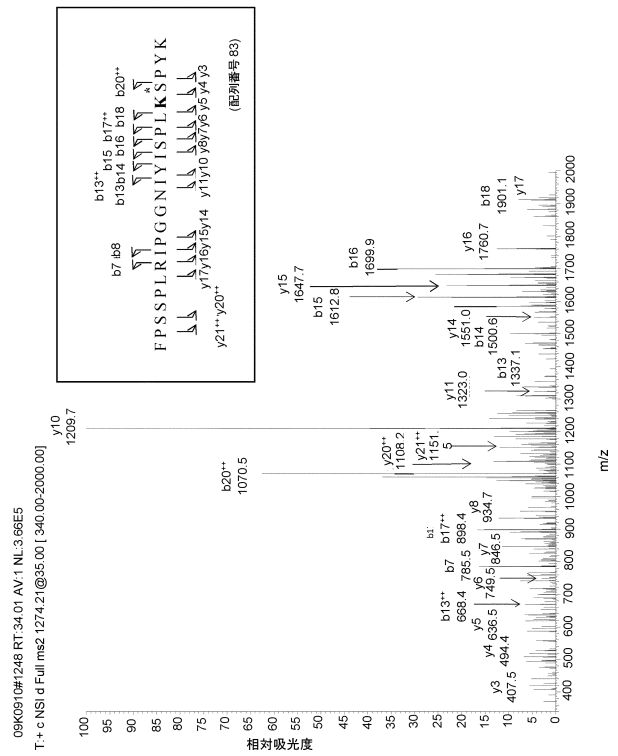
【図 7 A】

A



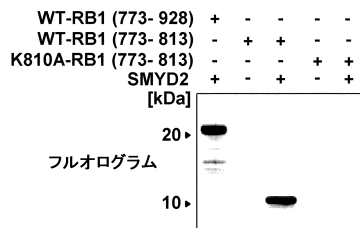
【図 7 B】

B



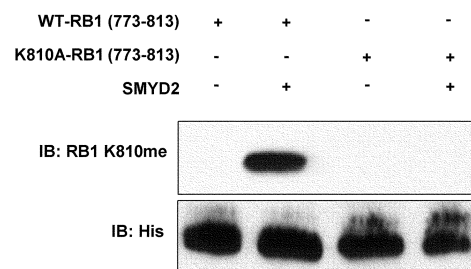
【図 7 C - D】

C

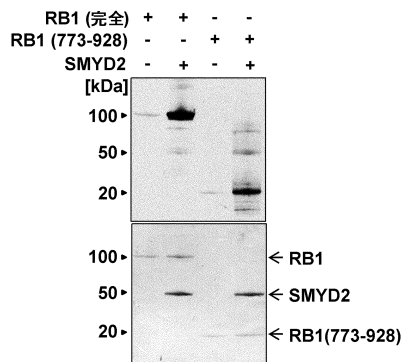


【図 7 E - F】

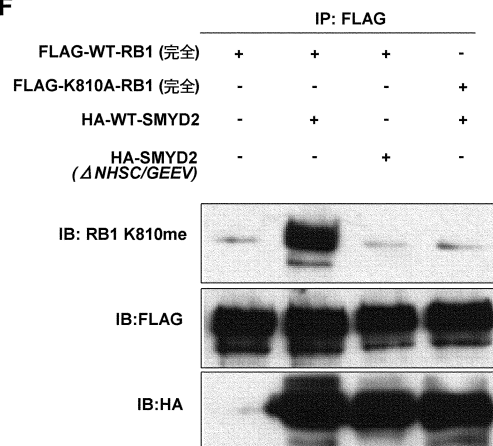
E



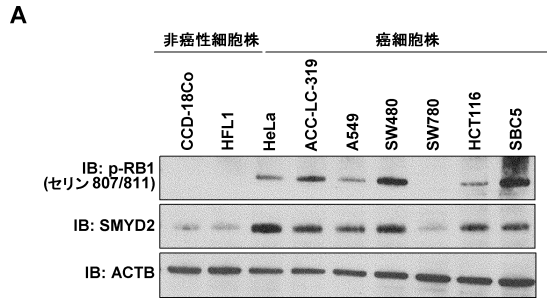
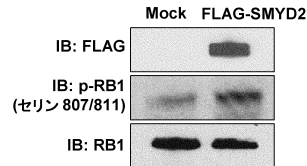
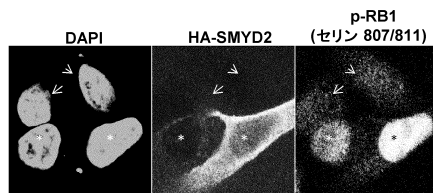
D



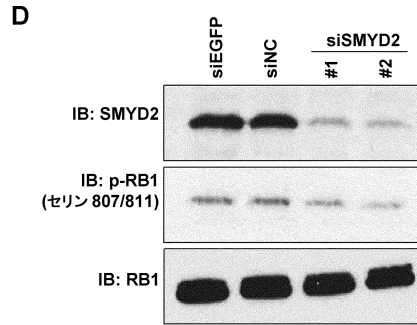
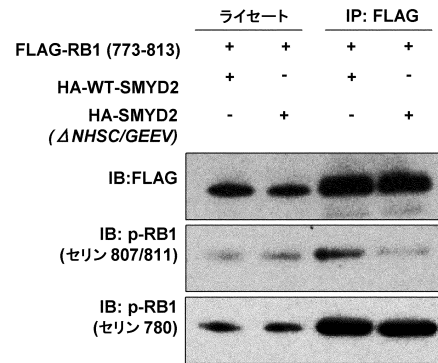
F



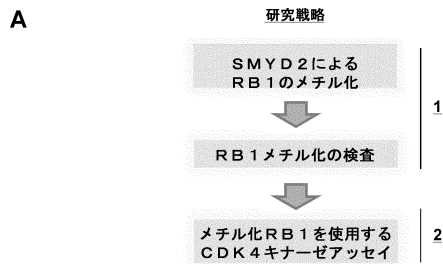
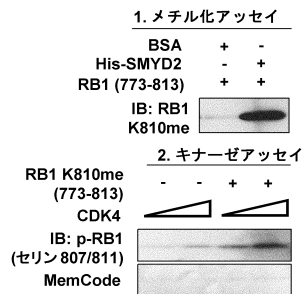
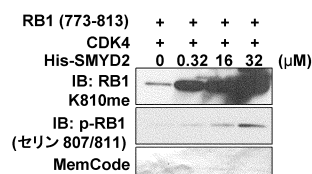
【図 8 A - C】

**B****C**

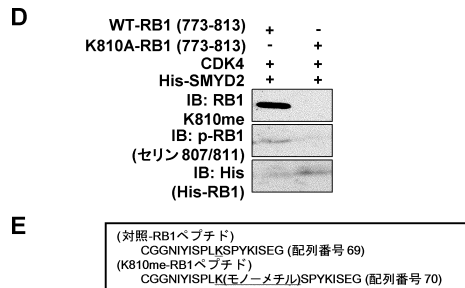
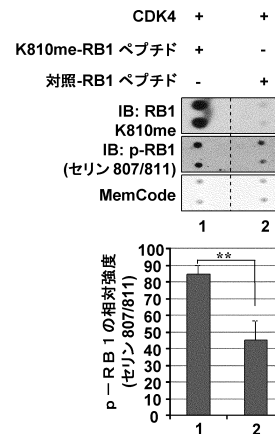
【図 8 D - E】

**E**

【図 9 A - C】

**B****C**

【図 9 D - F】

**F**

【配列表】

0006051373000001.app

フロントページの続き

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

(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 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 浜本 隆二
東京都港区白金台四丁目6番1号 国立大学法人東京大学 医科学研究所内

(72)発明者 中村 祐輔
東京都港区白金台四丁目6番1号 国立大学法人東京大学 医科学研究所内

(72)発明者 角田 卓也
神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1 オンコセラピー・サイエンス株式会社内

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 特開2010-220577(JP,A)
FERGUSON, A.D. et al., "Structural basis of substrate methylation and inhibition of SM
YD2.", STRUCTURE, 2011年 9月 7日, Vol.19, No.9, P.1262-1273
KOMATSU, S. et al., CARCINOGENESIS, 2009年 7月, Vol.30, No.7, P.1139-1146
BARROS FILHO, M.C. et al., BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH, 20
10年12月, Vol.43, No.12, P.1225-1231
ABU-FARHA, M. et al., JOURNAL OF MOLECULAR CELL BIOLOGY, 2011年10月, Vol.3, No.5
, P.301-308
CHO, H.S. et al., NEOPLASIA, 2012年 6月, Vol.14, No.6, P.476-486, with supplemen
t(p.1-5)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00 - 15/90

C 1 2 Q 1/00 - 3/00

C 1 2 N 9/00 - 9/99

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

PubMed