

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008年3月6日 (06.03.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/026584 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/02 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
C12Q 1/48 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/066653
- (22) 国際出願日: 2007年8月28日 (28.08.2007)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2006-229999 2006年8月28日 (28.08.2006) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 萬有製薬株式会社 (BANYU PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1028667 東京都千代田区九段北一丁目13番12号北の丸スクエア Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 番場 理恵 (BAMBA, Rie) [JP/JP]; 〒3002611 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内 Ibaraki (JP). 江口 朋宏 (EGUCHI, Tomohiro) [JP/JP]; 〒3002611 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内 Ibaraki (JP). 駒谷 秀也 (KOMATANI, Hideya) [JP/JP]; 〒3002611 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内 Ibaraki (JP). 小谷 秀仁 (KOTANI, Hidehito) [JP/JP]; 〒3002611 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内 Ibaraki (JP). 下山 晋 (SHIMOYAMA, Susumu) [JP/JP]; 〒3002611 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内 Ibaraki (JP).
- (74) 共通の代表者: 萬有製薬株式会社 (BANYU PHARMACEUTICAL CO., LTD.); 〒1028667 東京都千代田区九段北一丁目13番12号北の丸スクエア Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: METHOD FOR EVALUATING COMPOUND USING PKC-iota

(54) 発明の名称: PKC-iotaを用いた化合物の評価方法

(57) Abstract: It is intended to find a target gene for an antitumor agent effective specifically in a cancer cell caused by abnormality of p53 or PI3 kinase, and to realize the evaluation of a compound using the gene. A method for evaluating a compound effective in the treatment of cancer characterized by comprising the steps of: preparing a cell expressing PKC-iota by introducing a PKC-iota gene; bringing a test compound into contact with the cell; and detecting a specific binding of the test compound to the PKC-iota. A method for evaluating a compound having the step of measuring the activity or expression level of an intracellular signal transducer induced by the contact instead of the detection step.

(57) 要約: 【課題】 p53又はPI3キナーゼの異常に起因する癌細胞で特異的に有効な抗癌剤標的遺伝子を見出し、当該遺伝子を用いた化合物の評価を可能とすることを目的とする。【解決手段】 癌の治療に有効な化合物の評価方法であって、PKC-iota遺伝子を導入し、PKC-iotaを発現する細胞を調製する工程と、当該細胞に被検化合物を接触させる工程と、当該PKC-iotaに対する被検化合物の特異的結合を検出する工程と、を含むことを特徴とする化合物の評価方法。当該検出する工程に代えて、接触により生じた細胞内情報伝達物質の活性や発現レベルを測定する工程を有する、化合物の評価方法。

WO 2008/026584 A1

明 細 書

PKC-iotaを用いた化合物の評価方法

技術分野

[0001] 本発明は、PKC-iotaを用いた化合物の評価方法及び当該方法によって得られた化合物に関する。また、PKC-iota阻害剤の効果を予測する遺伝子・タンパク質マーカに関する。

背景技術

[0002] 癌細胞において遺伝子に異常が見られることは広く知られており、これまでに多くの癌遺伝子や癌抑制遺伝子が見出されている。また、正常細胞が癌化するには複数の遺伝子の異常を要する多段階発癌機構が存在することが明らかにされている。具体的には、正常細胞の癌化には、DNA修復遺伝子、癌抑制遺伝子及び癌遺伝子を含む複数の遺伝子異常の蓄積が必要とされている。

[0003] なかでも、癌抑制遺伝子として知られるp53は、当初、腫瘍ウイルスであるSV40のT抗原と複合体を形成する分子として発見された(非特許文献1)。その後、p53遺伝子が多くの癌で欠失が見られる17番染色体の短腕(17p13)に存在し、対立遺伝子の双方が欠失と変異により不活性化されている癌抑制遺伝子であることが明らかとなった(非特許文献2)。また、その遺伝子産物は393アミノ酸からなる転写制御因子で、4量体を形成して機能することが明らかとなっている。さらに、細胞周期に関与するp21、14-3-3、アポトーシスに関与するbax、PIG3、GADD45等、非常に多くの遺伝子がp53の標的遺伝子として同定されており、p53に異常が生じることにより標的遺伝子の転写制御に異常を来すと考えられる。

[0004] 実際、p53遺伝子の変異は、肺癌では70%、胃癌では45%、乳癌では30%、大腸癌では65%、膀胱癌では61%、膵臓癌では70%にのぼることが明らかとなっており、他の癌抑制遺伝子と比較しても顕著に高い。

[0005] このような状況の下、p53遺伝子の変異や機能異常と疾患との関連に関する研究が盛んになされている。例えば、Soussiらは15000例以上にのぼるp53の変異をデータベース化しており(非特許文献3)、p53のDNA結合ドメイン領域内に位置するコドン1

75、245、248、273等には変異が頻発することを示している。また、ある種の肝細胞癌では、DNA結合ドメイン内のコドン249にはArgからSerへの変異が認められることが明らかにされている(非特許文献4)。また、紫外線によって生じる皮膚癌においてもp53遺伝子中のCCがチミンダイマー化していることが報告されている(非特許文献5)。このように、p53は多くの癌の発症に大きな影響を及ぼしているため、p53異常細胞においてのみ有効な創薬標的遺伝子の同定が望まれている。

[0006] 一方、PI3キナーゼは、85kD(p85)と110kD(p110)のサブユニットからなる。p85サブユニットはキナーゼ活性部位を有さないが、p85サブユニットに存在するSH2ドメインを介して膜結合受容体と会合するアダプタータンパク質として機能している。一方、p110サブユニットは、キナーゼ活性を有する触媒サブユニットとして機能し、両サブユニットが一体となって細胞内情報伝達を司るリン酸化酵素として機能している。

[0007] PI3キナーゼは、様々な増殖因子受容体を介した刺激によって活性化され、ホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸(PIP2)をリン酸化して、ホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸(PIP3)を生成し、さらに下流の主にAktを介するシグナルを活性化する。Aktも癌遺伝子として知られる分子である。また、PIP3を基質としてPI3キナーゼ経路を負に制御している癌抑制遺伝子PTENの変異も癌化の原因となることが知られており、PI3キナーゼ経路の異常は癌化に重要な役割を果たしている。PI3キナーゼは、正常細胞においてPIP3を介して下流に存在するPDK1、Akt、プロテインキナーゼCを活性化することが報告されている(非特許文献6)。また、atypical PKCの一種であるプロテインキナーゼC-zetaはPDK-1によって活性化されるとの報告もある(非特許文献8)。さらに、atypical PKCの一種であるプロテインキナーゼC-zetaとプロテインキナーゼC-lambdaとがインシュリン刺激によって活性化されたPI3キナーゼの下流に位置することが報告されている(非特許文献9)。

[0008] また、p53の変異はPTENの発現を減少させることも知られており、p53パスウェイとPI3キナーゼパスウェイとは互いにクロストークしながら、細胞の増殖、生存に不可欠な役割を果たしている。

[0009] PI3キナーゼ(Phosphatidyl Inositol 3-kinase)もp53と同様にその変異が種々の癌の原因となっていることが知られている。例えば、子宮内膜癌、腸癌、乳がん、卵巣癌な

ど、多くの癌においてp85及びp110のいずれのサブユニットにも変異が見られることが報告されている(非特許文献7)。

[0010] 一方、PKC (Protein kinase C) は、1970年代に発見されたセリン-スレオニンリン酸化酵素である。PKCは、受容体刺激等によって細胞質膜から産生されるジアシルグリセロールと、同時に産生されるイノシトール三リン酸によって誘導されたCa²⁺により活性化される。活性化されたPKCは、基質タンパク質をリン酸化することにより所定の細胞応答を生じさせ、生理機能を発揮させる。哺乳類のPKCはその構造上の違いから大きく、cPKC(conventional PKC)、nPKC(novel PKC)及びaPKC(atypical PKC)の3種類に分類される。cPKCの調節領域には、ジアシルグリセロールやホルボールエステルが作用する2つのC1ドメインと、カルシウムが結合するC2ドメインが存在するが、nPKCにはC2ドメインが、aPKCには一つのC1ドメインが欠損している。

[0011] PKC-iota (PKC- ι : 配列番号1及び2) はaPKCに分類されるセリン-スレオニンリン酸化酵素として、既知のPKCの触媒部位において塩基配列が高度に保存された部位の配列を元にdegenerate PCRにより単離された(非特許文献10)。PKC-iotaは587アミノ酸からなるタンパク質であり、aPKCに属するPKC- ζ と72%の相同性を有する。

[0012] PKC-iotaの生理機能に関してはまだ不明な点が多いが、Jin Z.らは、ニコチン(nicotine)のニトロソ化によって生じる発癌物質であるNitrosamine 4-(Methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)が、PKC-iotaを介してBcl2ファミリーに属するBadをリン酸化することによりBadのアポトーシス促進機能を止め、結果的に肺癌細胞の生存を維持すると報告している(非特許文献11)。すなわち、PKC-iotaは、癌細胞の生命維持を司るシグナル伝達経路において、アポトーシスを誘導するBclファミリーを直接リン酸化している。

[0013] 非特許文献1: J. Virol., 第31巻、463頁、1979年

非特許文献2: N. Engl. J. Med., 第319巻、525頁、1988年

非特許文献3: Nucleic Acids Res., 第22巻、3551頁、1994年

非特許文献4: Nature, 第350巻、427頁、1991年

非特許文献5: PNAS, 第88巻、10124頁、1991年

非特許文献6: Science, 第281巻、2042頁、1998年

非特許文献7:Cancer Cell、第12巻、104頁、2007年

非特許文献8:Curr. Biol.、第8巻、1069頁、1998年

非特許文献9:J. Cell Biol.、第164巻、279頁、2004年

非特許文献10:J.Biol.Chem.、第268巻、24296頁、1993年

非特許文献11:J.Biol.Chem.、第280巻、16045頁、2005年

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0014] しかしながら、PKC-iotaとp53との関連については何ら知見がなく、PKC-iotaをp53変異細胞特異的に有効な抗癌剤標的遺伝子とすることの可能性については何ら示唆がないのが現状であった。またPKC-iotaとPI3キナーゼの間には正常細胞においてPI3キナーゼの下流でPKC-iotaやaPKCが機能していることを示す報告はあったものの(非特許文献6、8及び9)、癌細胞におけるPKC-iotaの活性化の機序については知見がなく、PKC-iotaの発現とPI3キナーゼに起因する癌との関連についても知見はないのが現状であった。また、p53又はPI3キナーゼの異常を原因とする癌細胞で特異的に有効な抗癌剤標的遺伝子についても知見が少なく、創薬標的遺伝子としてより多くの情報が望まれているのが現状であった。

[0015] 本発明は、上記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、p53又はPI3キナーゼの異常を原因とする癌細胞で特異的に有効な抗癌剤標的遺伝子を見出し、当該遺伝子を用いた化合物の評価を可能とすることを目的とする。

課題を解決するための手段

[0016] 本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、PKC-iotaの発現を抑制することにより変異型p53又は変異型PI3キナーゼを有する細胞の増殖が抑制されること、その際、PKC-iotaがBADのリン酸化を介して細胞増殖を制御していること、すなわち、PKC-iotaの阻害によってBADが脱リン酸化され、Bcl-XLの機能抑制を介してアポトーシスを誘導していることを見出した。言い換えれば、p53又はPI3キナーゼに変異を有する癌細胞において、PKC-iotaの発現又は活性を阻害することによりアポトーシスを誘導可能であることを見出し、本発明を完成した。また、本発明者らは、PKC-iotaを阻害することにより発現が増加又は減少し、PKC-iota阻害剤の薬効予測

のマーカーとして使用し得る一連の遺伝子群を見出し、本発明を完成した。

[0017] すなわち、本発明の化合物の評価方法は、癌の治療に有効な化合物の評価方法であって、PKC-iota遺伝子を導入し、PKC-iotaを発現する細胞を調製する工程と、当該細胞に被検化合物を接触させる工程と、当該PKC-iotaに対する該被検化合物の特異的結合を検出する工程と、を含むことを特徴とする。

[0018] また、本発明の化合物の評価方法は、癌の治療に有効な化合物の評価方法であって、PKC-iota遺伝子を導入し、PKC-iotaを発現する細胞を調製する工程と、当該細胞に被検化合物を接触させる工程と、当該接触により生じた細胞内情報伝達物質の活性を測定する工程と、当該活性と被検化合物を接触させない場合の該細胞内情報伝達物質の活性とを比較する工程と、を含むことを特徴とする。

[0019] さらに、本発明の化合物の評価方法は、癌の治療に有効な化合物の評価方法であって、PKC-iota遺伝子を導入し、PKC-iotaを発現する細胞を調製する工程と、当該細胞に被検化合物を接触させる工程と、当該PKC-iotaの発現レベル又はPKC-iotaを介した細胞内情報伝達物質の発現レベルを測定する工程と、を含むことを特徴とする。

[0020] ここで、上記化合物の評価方法において、前記細胞内情報伝達物質が、BAD、LLGL2、HMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKからなる群より選択されるいずれか一つであることが好ましい。

[0021] また、本発明の化合物の評価方法は、癌の治療に有効な化合物の評価方法であって、被検化合物を、PKC-iotaに接触させる工程と、当該接触によるPKC-iotaの活性の変化を検出する工程と、を含むことを特徴とする。

[0022] さらに、本発明の化合物の評価方法は、癌の治療に有効な化合物の評価方法であって、BAD又はLLGL2存在下で、被検化合物をPKC-iotaに接触させる工程と、当該接触によるPKC-iotaの活性の変化を検出する工程と、を含むことを特徴とする。

[0023] ここで、上述した化合物の評価方法すべてにおいて、癌がp53の機能異常に起因するものである場合に好適に適応可能である。

[0024] また、上述した化合物の評価方法すべてにおいて、癌がPI3キナーゼ(Phosphatidylinositol 3-kinase)の機能異常に起因するものである場合に好適に適応可能である。

- [0025] また、本発明の診断方法は、被検組織又は被検細胞における、PKC-iota遺伝子の発現量を測定する工程と、当該発現量と正常組織又は正常細胞におけるPKC-iota遺伝子の発現量とを比較する工程と、比較した結果、被検組織又は被検細胞におけるPKC-iota遺伝子の発現量が正常組織又は正常細胞におけるPKC-iota遺伝子の発現量より有意に多いか否かを判断する工程と、を含むことを特徴とする。
- [0026] さらに、本発明の診断方法は、被検組織又は被検細胞における、PKC-iotaの活性を測定する工程と、当該活性と正常組織又は正常細胞におけるPKC-iotaの活性とを比較する工程と、比較した結果、被検組織又は被検細胞におけるPKC-iotaの活性が正常組織又は正常細胞におけるPKC-iotaの活性より有意に高いか否かを判断する工程と、を含むことを特徴とする。
- [0027] また、本発明のPKC-iota阻害剤の効果の予測又は診断方法は、PKC-iota阻害剤を投与した被検体由来の組織におけるPKC-iotaの活性を測定する測定工程と、PKC-iota阻害剤投与前後の活性を比較する比較工程を含むことを特徴とする。
- [0028] さらに、本発明の遺伝子マーカーは、PKC-iota阻害剤の薬効を予測又は診断する遺伝子マーカーであって、当該遺伝子が、BAD、LLGL2、HMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKからなる群より選択されるいずれか一つであることを特徴とする。
- [0029] ここで、前記遺伝子マーカーを備えるマイクロアレイも本発明に含まれる。
- [0030] また、本発明のタンパク質マーカーは、PKC-iota阻害剤の薬効を予測又は診断するタンパク質マーカーであって、当該タンパク質が、LLGL2、HMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKからなる群より選択されるいずれか一つであることを特徴とする。
- [0031] ここで、前記タンパク質マーカーを備えるマイクロアレイも本発明に含まれる。
- [0032] また、本発明の癌診断キットは、前記タンパク質マーカーを検出可能な抗体を含むことを特徴とする。
- [0033] さらに、本発明の抗体アレイは、前記タンパク質マーカーを検出可能な抗体を備えることを特徴とする。
- [0034] また、本発明のPKC-iota阻害剤の効果の予測又は診断方法は、PKC-iota阻害剤

を投与した被検体由来の組織におけるHMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKからなる群より選択されるいずれか一つの遺伝子を検出する工程と、PKC-iota阻害剤投与前後の発現量を比較する工程を含むことを特徴とする。

[0035] ここで、本発明のPKC-iota阻害剤の効果の予測又は診断方法において、検出に用いる検出手段がPCR又はDNAマイクロアレイであることが好ましい。

[0036] また、本発明のPKC-iota阻害剤の効果の予測又は診断方法は、PKC-iota阻害剤を投与した被検体由来の組織におけるHMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKからなる群より選択されるいずれか一つのタンパク質の活性を測定する工程と、PKC-iota阻害剤投与前後の活性を比較する工程を含むことを特徴とする。

[0037] さらに、本発明のPKC-iota阻害剤の効果の予測又は診断方法は、PKC-iota阻害剤を投与した被検体由来の組織におけるBAD又はLGLL2のリン酸化レベルを測定する工程と、PKC-iota阻害剤投与前後のリン酸化レベルを比較する工程を含むことを特徴とする。

発明の効果

[0038] p53又はPI3キナーゼの発現・機能異常を原因とする癌に特異的に働くターゲット遺伝子としてPKC-iotaが見出されたことから、当該遺伝子を創薬標的とする化合物の評価(例えば、医薬候補化合物のスクリーニング)が可能となる。p53又はPI3キナーゼの発現・機能の異常を原因とする癌は非常に多種に渡ることから、多くの癌の治療に有効な化合物の提供が可能となる。また、PKC-iotaの発現量を指標として診断を行うことにより、p53又はPI3キナーゼの発現・機能の異常を原因とする癌の診断が可能となる。また、PKC-iota阻害剤の薬効予測のマーカーとしてBAD、LLGL2、HMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKを使用することが可能となる。

発明を実施するための最良の形態

[0039] 以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

[0040] 先ず、本発明にかかる用語について説明する。

[0041] 本発明における「PKC-iota」とは、由来となる生物種は特に限定されず、例えば、ヒト、サル、マウス、ラット、イヌ又はウサギ由来のPKC-iotaが挙げられる。中でも、評価

される化合物の投与対象がヒトであることから、ヒトPKC-iota遺伝子であることが好ましい。

[0042] また、本発明に係るPKC-iota遺伝子には、PKC-iotaと同等の生理機能を有し、キナーゼ活性を有するものであれば1又は2以上の塩基の置換、欠失、付加又は挿入がある遺伝子も含まれる。ここで、当該遺伝子としては、かかるタンパク質をコードする遺伝子であればその配列は特に制限されないが、相同性が90%以上(例えば、91、92、93、94、95、96、97、98、99%以上)であることが好ましい。

[0043] また、本発明に係るPKC-iota遺伝子には、PKC-iota遺伝子とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする核酸も含まれる。ここで、「ストリンジेंटな条件下でハイブリダイズする」とは、二つの核酸断片が、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、コールドスプリングハーバー(1989)、9.47-9.62及び11.45-11.61に記載されたハイブリダイゼーション条件下で、相互にハイブリダイズすることを意味する。より具体的には、例えば、約45°Cにて6.0×SSCでハイブリダイゼーションを行った後に、50°Cにて2.0×SSCで洗浄する条件が挙げられる。ストリンジエンシー選択のため、洗浄工程における塩濃度を、例えば低ストリンジエンシーとしての約2.0×SSC、50°Cから、高ストリンジエンシーとしての約0.2×SSC、50°Cまで選択することができる。さらに、洗浄工程の温度を低ストリンジエンシー条件の室温、約22°Cから、高ストリンジエンシー条件の約65°Cまで上昇させることができる。

[0044] また、本発明に係るPKC-iotaタンパク質には、PKC-iotaと同等の生理機能を有し、キナーゼ活性を有するものであれば1又は2以上のアミノ酸の置換、欠失、付加又は挿入があるものも含まれる。ここで、当該タンパク質の配列は特に制限されないが、相同性が80%以上であることが好ましく、90%以上(例えば、91、92、93、94、95、96、97、98、99%以上)であることがより好ましい。

[0045] 本発明者らは、PKC-iotaの発現を阻害することにより変異型p53又はPI3キナーゼを有する細胞の増殖が抑制されることを見出した。p53又はPI3キナーゼの発現量は細胞の癌化と密接な関連があることが知られている。従って、PKC-iotaの発現量や活性を測定することにより、p53又はPI3キナーゼに異常を有する癌の検出をすることが可能となる。また、PKC-iotaの発現量とp53の変異又はPI3キナーゼの発現量との間

に相関があることから、p53又はPI3キナーゼの発現量の異常を原因とするp53又はPI3キナーゼの機能異常による細胞の癌化とPKC-iotaの発現又は活性とは密接な関係を示す。従って、PKC-iotaを創薬の標的としてPKC-iotaに作用する化合物等を探索することにより、抗癌剤を得ることが可能となる。

[0046] ここで、本発明に係る「p53の機能異常」とは、p53遺伝子における塩基の欠失(例えばナンセンス変異)、置換(例えば、ミスセンス変異、ポイントミューテーション)、挿入、フレームシフト等を原因とするものが考えられるが、本発明の対象としては、機能異常の原因は特に限定されず、これらのいずれが機能異常の原因であってもよい。

[0047] また、p53の機能異常の具体例としては、p53タンパク質の転写活性が低下又は活性化する場合や、転写が全く起こらない場合が挙げられるが、活性には異常を認めないがコードされる遺伝子には変異を生じている場合も含まれる。具体的には、例えば、p53との関与が示唆されているLi-Fraumeni Syndrome (Science、第250巻、1233頁、1990年)、肝細胞癌 (Nature、第350巻、377頁、1991年)、骨原性肉腫 (Proc Natl Acad Sci USA、第84巻、7716頁、1987年)、横紋筋肉種 (Proc Natl Acad Sci USA、第87巻、5863頁、1990年)、結腸癌 (Science、第244巻、217頁、1989年)、肺癌 (Science、第246年、491頁、1989年)、グリア芽細胞腫 (Am. J. Hum. Genet.、第47巻(suppl.)、A4、1990年)、食道癌 (Proc Natl Acad Sci USA、第87巻、9958頁、1990年)、膀胱癌 (Science、第252巻、706頁、1991年)、扁平上皮癌 (Proc Natl Acad Sci USA、第88巻、10124頁、1991年)、子宮頸癌 (Lancet、第339巻、1070頁、1992年)、肺癌 (Proc Natl Acad Sci USA、第89巻、7262頁、1992年)、白血病・リンパ腫 (J Clin Invest.、第90巻、653頁、1992年)が挙げられる。

[0048] また、本発明に係る「PI3キナーゼの機能異常」とは、PI3キナーゼ遺伝子における塩基の欠失(例えばナンセンス変異)、置換(例えば、ミスセンス変異、ポイントミューテーション)、挿入、フレームシフト等を原因とするものが考えられるが、本発明の対象としては、機能異常の原因は特に限定されず、これらのいずれが機能異常の原因であってもよい。

[0049] また、PI3キナーゼの機能異常の具体例としては、PI3キナーゼの活性が低下又は活性化する場合や、リン酸化が全く起こらない場合が挙げられるが、活性には異常を

認めないがコードされる遺伝子には変異を生じている場合も含まれる。具体的には、例えば、子宮内膜癌、腸癌、乳がん、卵巣癌、が挙げられる。

[0050] 本発明における「被検組織」とは、癌の検査対象となる生体から抽出可能な組織であり、p53の関与を検討する必要がある癌組織や、癌診断の必要があると認められる組織であればその種類は特に限定されない。かかる組織の例としては、ヒトの各種組織のほか、例えば、神経芽腫、網膜芽細胞腫、脳腫瘍、頭頸部癌、下垂体腺腫、神経膠腫、聴神経鞘腫、口腔癌、咽頭癌、喉頭癌、甲状腺癌、胸腺腫、中皮腫、乳癌、肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、肝臓癌、膵臓癌、膵内分泌腫瘍、胆道癌、陰茎癌、外陰癌、腎盂尿管癌、腎臓癌、精巣癌、前立腺癌、膀胱癌、子宮癌、絨毛性疾患、膣癌、卵巣癌、卵管癌、卵巣胚細胞腫瘍、皮膚癌、菌状息肉症、悪性黒色腫、軟部肉腫、骨腫瘍、悪性リンパ腫、白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、リンパ浮腫が疑われる組織が挙げられる。

[0051] また、本発明における「被検細胞」も同様に、癌の検査対象となる生体から抽出可能な組織であり、p53の関与を検討する必要がある癌組織由来の細胞や、癌診断の必要があると認められる組織由来の細胞であればその種類は特に限定されない。かかる細胞の例としては、例えば、神経芽腫、網膜芽細胞腫、脳腫瘍、頭頸部癌、下垂体腺腫、神経膠腫、聴神経鞘腫、口腔癌、咽頭癌、喉頭癌、甲状腺癌、胸腺腫、中皮腫、乳癌、肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、肝臓癌、膵臓癌、膵内分泌腫瘍、胆道癌、陰茎癌、外陰癌、腎盂尿管癌、腎臓癌、精巣癌、前立腺癌、膀胱癌、子宮癌、絨毛性疾患、膣癌、卵巣癌、卵管癌、卵巣胚細胞腫瘍、皮膚癌、菌状息肉症、悪性黒色腫、軟部肉腫、骨腫瘍、悪性リンパ腫、白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、リンパ浮腫が疑われる細胞が挙げられる。

[0052] (1)化合物の評価

PKC-iota遺伝子又はタンパク質を用いて、PKC-iotaに作用する化合物の評価をすることができる。PKC-iotaに対する作用を検出する方法として、被検化合物のPKC-iotaに対する特異的結合(例えば、酵素活性の阻害を生じる結合)を検出する方法、被検化合物の接触によって変化した遺伝子の発現量を検出する方法、及び、当該接触によって生じた細胞内情報伝達物質の活性又は発現レベルを測定する方法が挙

げられる。以下、順に説明する。

[0053] 先ず、被検化合物のPKC-iotaに対する特異的結合を検出することにより、被検化合物を評価する方法について説明する。

[0054] 本発明の第1の化合物の評価方法は、PKC-iota遺伝子を導入し、PKC-iotaを発現する細胞を調製する工程と、当該細胞に被検化合物を接触させる工程と、当該PKC-iotaに対する当該被検化合物の特異的結合を検出する工程と、を含むことを特徴とする。

本発明の化合物の評価方法において、被検化合物としては特に制限はなく、具体的には、例えば、天然化合物、有機化合物、無機化合物、タンパク質、ペプチド等の単一化合物、並びに、化合物ライブラリー、遺伝子ライブラリーの発現産物、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、原核細胞抽出物、真核単細胞抽出物若しくは動物細胞抽出物等を挙げることができる。上記被験試料は必要に応じて適宜標識して用いることができる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識等を挙げることができる。また、上記被験試料に加えて、これらの被験試料を複数種混合した混合物も含まれる。

[0055] また、「特異的結合」とは、PKC-iotaと被検化合物との結合であつて、被検化合物がPKC-iotaに結合することにより、PKC-iotaの活性及び/又は発現に影響を与えるような結合をいう。

[0056] また、PKC-iota遺伝子を発現する細胞は、当業者が公知の方法で調製すればよく、具体的な方法としては特に制限はないが、例えば以下の方法によることができる。すなわち、PKC-iota遺伝子又はその一部からなる核酸を好適なプロモーター及び転写調節エレメントを含む発現ベクターにクローニングし、クローニングされた核酸を有するベクターを宿主細胞に導入することにより調製する。ここで、前記ベクターとしては、発現ベクターとして利用可能なものであれば特に限定されないが、例えば、pCMV-Tag、pcDNA3.1、pBlueBacHis2、pCI-neo、pcDNA1、pMC1neo、pXT1、pSG5、pEF1/V5-HisB、pCR2.1、pET11、 λ gt11又はpCR3.1が挙げられる。

[0057] 次に、PKC-iota遺伝子又はその一部からなる核酸が導入された発現ベクターを宿主細胞に導入する。かかる宿主細胞としては、遺伝子の発現に通常使用されるもの

であれば特に限定されず、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、微生物のいずれであってもよく、具体的には、例えば、COS1、COS7、CHO、NIH/3T3、293、Raji、CV11、C1271、MRC-5、CPAE、HeLa、293T又はSf9が挙げられる。また、発現ベクターを宿主細胞に導入する方法としては、公知の方法であれば特に限定されないが、具体的には、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、リポフェクション法又は遺伝子銃が挙げられる。

[0058] 次に、このようにして調製したPKC-iotaを発現する細胞に被検化合物を接触させる。接触させる方法としては特に制限はなく、PKC-iotaが細胞内に発現した状態であれば、細胞の培養液や細胞を含む緩衝液に被験試料を添加することにより行うことができる。

[0059] また、上記のようにして調製したPKC-iotaを発現する細胞を破碎又は可溶化した後、細胞抽出液を用いてPKC-iotaと被検化合物の接触を行うこともできる。細胞の破碎方法としては、例えば、ホモジナイザーで細胞を押しつぶす方法、超音波による破碎を挙げることができる。また、細胞の可溶化方法としては、例えば、可溶化剤(例えば、TritonX-100、コール酸ナトリウム、NP-40)を含む緩衝液に細胞を懸濁し、氷上で静置する方法を挙げることができる。

被験試料がタンパク質の場合には、例えば、当該タンパク質をコードするDNAを含むベクターを、PKC-iotaが発現している細胞へ導入することにより接触させてもよい。

[0060] PKC-iotaと被検化合物との結合は、例えば、結合した化合物に付された標識による検出(例えば、結合量を放射活性や蛍光強度による検出)のほか、PKC-iotaが基質タンパク質(例えば、BAD、LLGL2)又は基質ペプチドをリン酸化する反応を被検化合物が阻害することを指標とした検出(例えば、リン酸化量を放射活性や蛍光強度を用いた検出)、また、被検化合物のPKC-iotaへの結合によって生じたシグナル伝達の阻害(例えば、BAD等の基質タンパク質のリン酸化、アポトーシスの誘導)を指標に検出することができる。基質としてBADを用いる場合、BADにおいてリン酸化を受ける部位は112番目、136番目及び155番目のアミノ酸であることが本発明者らによって見出されている。従って、当該部位を含んだBADの部分ペプチドを基質として使用することもできる。

- [0061] PKC-iotaと被検化合物との結合を検出し、被検化合物非存在下において同様に反応を行った対照区の結果と比較した結果、結合によりPKC-iotaの活性が阻害されている場合には、当該被検化合物はPKC-iota阻害剤として機能する。
- [0062] また、本発明の第2の化合物の評価方法は、PKC-iota遺伝子を導入し、PKC-iotaを発現する細胞を調製する工程と、当該細胞に被検化合物を接触させる工程と、当該接触により生じた細胞内情報伝達物質の活性を測定する工程と、当該活性と被検化合物を接触させない場合の細胞内情報伝達物質の活性とを比較する工程と、を含むことを特徴とする。
- [0063] 本評価方法においては、第1の化合物の評価方法と同様にして調製した細胞を用い、細胞に被検化合物を接触させることにより接触により生じた細胞内情報伝達物質の活性を測定する。
- [0064] ここで、細胞内情報伝達物質としては、情報伝達パスウェイにおいてPKC-iotaの下流に位置し、PKC-iotaの発現や活性によってその発現や活性に影響を受ける分子であれば特に限定されず、例えば、BAD (Accession No. NM_032989.1:配列番号3及び4)、LLGL2 (Accession No. NM_001031803:配列番号5及び6)、HMGB3 (Accession No. NM_005342:配列番号7及び8)、NFIB (Accession No. NM_005596:配列番号9及び10)、PXDN (Accession No. NM_012293:配列番号11及び12)、CLDN12 (Accession No. NM_012129:配列番号13及び14)、RPIA (Accession No. NM_144563:配列番号15及び16)、AKT3 (Accession No. NM_005465:配列番号17及び18) 及びSNF1LK (Accession No. NM_173354:配列番号19及び20)を挙げることができる。
- [0065] 細胞内情報伝達物質の活性の測定は、当該物質の種類に応じて適宜好適な条件で行えばよい。例えば、転写調節因子であるHMGB3であれば、ゲルシフト法や比色法のELISAアッセイにより活性測定を行うことができる。また、BADであれば、PKC-iotaが活性化していればそれによってBADの112番目、136番目及び155番目のアミノ酸がリン酸化を受け、脱リン酸化することによってBel-xlの活性を抑制することから、Bel-xlの活性抑制活性を測定することによりBADの活性化状態を測定することができる。
- [0066] さらに、本発明の第3の化合物の評価方法は、PKC-iota遺伝子を導入し、PKC-iota

aを発現する細胞を調製する工程と、当該細胞に被検化合物を接触させる工程と、当該PKC-iotaの発現レベル又はPKC-iotaを介した細胞内情報伝達物質の発現レベルを測定する工程、を含むことを特徴とする。また、化合物の評価を行った結果、所望の化合物を選択(スクリーニング)するには、接触前と比較して、PKC-iotaの発現レベル又はPKC-iotaを介した細胞内情報伝達物質の発現レベルを増加又は減少させた被検化合物を選択する工程をさらに含んでもよい。

[0067] 本評価方法においては、第1の化合物の評価方法と同様にして調製した細胞を用い、細胞に被検化合物を接触させることにより、接触により生じたPKC-iota又はPKC-iotaを介した細胞内情報伝達物質の発現レベルを測定する。

[0068] ここで、PKC-iotaを介した細胞内情報伝達物質としては、情報伝達パスウェイにおいてPKC-iotaの下流に位置し、PKC-iotaの発現や活性によってその発現や活性に影響を受ける分子であれば特に限定されず、例えば、BAD、LLGL2、HMGB3、NFIB、PXD、CLDN12、RPIA、AKT3又はSNF1LKを挙げることができる。

[0069] ここで、当該発現レベルを指標とする場合、発現レベルの測定法は特に制限されないが、例えば、ノーザンブロットイング、ウェスタンブロットイング又はDNAチップが挙げられる。ここで、本発明における「発現レベル」とは、PKC-iotaを介した情報伝達パスウェイ上に存在するタンパク質をコードする遺伝子の転写産物の絶対量又は相対量をいう。この場合、当該遺伝子にはDNA又はmRNAのいずれもが含まれる。また、発現の検出対象がタンパク質の場合、その「発現レベル」とは、PKC-iotaを介した情報伝達経路上に存在するタンパク質の翻訳産物の絶対量又は相対量をいう。また、シグナル伝達上の分子の活性を指標にする場合、活性測定方法は特に制限されず、測定の対象となる分子の種類によって好適な方法を選択すればよい。

[0070] 一方、単離されたPKC-iotaタンパク質を化合物の評価に直接使用することもできる。すなわち、被検化合物をPKC-iotaタンパク質に接触させ、次に、接触によって生じたPKC-iotaタンパク質の活性の変化を検出する方法である。

[0071] かかる接触の方法としては特に制限はなく、具体的には、例えば、緩衝液(リン酸緩衝液、Tris塩酸緩衝液、HEPES緩衝液等)等の溶液中で混合することにより接触させる方法や、PKC-iotaタンパク質をメンブレン上に固定し、メンブレン上で被検化合物

と接触させる方法が挙げられる。緩衝液中で接触させる場合の反応条件としては、特に限定されないが、例えば、pH5.0～10、好ましくはpH6.5～8.5、さらに好ましくはpH7.0～8.0で、通常、10～50℃、好ましくは20～40℃、より好ましくは35～40℃、さらに好ましくは37℃の条件下、1分間～24時間、好ましくは5分間～10時間、より好ましくは10分間～3時間、さらに好ましくは30分間～1時間インキュベーションすることが挙げられる。

[0072] 次に、接触によって生じたPKC-iotaの活性の変化を検出する。

[0073] タンパク質の活性測定方法としては、使用するタンパク質の性質により所望の方法を選択すればよく、具体的には、例えば、PKC-iotaに対する適当な基質を準備し、溶媒中でPKC-iota、基質及び被検化合物の存在下でキナーゼアッセイを実施する方法が挙げられる。この場合、酵素反応の確認は放射性標識されたリン(例えば、³²P、³³P)の取り込み等で確認することができる。

[0074] また、PKC-iotaタンパク質の活性を測定する際に、基質としてBAD又はLLGL2を用いることもできる。PKC-iotaはBAD及びLLGL2を基質として直接リン酸化していることを、本発明者らは見出している。その際、BADであれば、PKC-iotaによって少なくともBADの112番目、136番目及び155番目のアミノ酸がリン酸化を受けていることから、当該アミノ酸を含む部分ペプチドを基質として使用することもできる。また、LGLL2であれば、PKC-iotaによって少なくともLLGL2の653番目のセリンがリン酸化を受けていることから、当該セリンを含む部分ペプチドを基質として使用することもできる。ここで、基質として当該部分ペプチドを使用する場合、そのアミノ酸数は特に限定されないが、BAD及びLGLL2のいずれについても、8～50アミノ酸であることが好ましく、10～30アミノ酸であることがより好ましく、12～20アミノ酸であることが特に好ましい。

[0075] BADを基質として使用しPKC-iotaの活性を測定する方法としては、公知のリン酸化検出手段により行うことができるが、例えば、放射性標識されたリン(例えば、³²P)の取り込みを確認するキナーゼアッセイ、リン酸化BAD抗体を使用したウエスタンブロットを挙げることができる。リン酸化BAD抗体は、公知の方法により作製することができ、例えば、BADの112番目、136番目及び155番目のアミノ酸のうち少なくともいずれかのアミノ酸を含むペプチド断片を抗原として使用し、公知の方法に従ってポリクロー

ナル又はモノクローナル抗体を作製すればよい。

[0076] LGLL2を基質として使用しPKC-iotaの活性を測定する方法としては、公知のリン酸化検出手段により行うことができるが、例えば、放射性標識されたリン(例えば、³²P、³³P)の取り込みを確認するキナーゼアッセイ、リン酸化LGLL2抗体を使用したウェスタンブロットを挙げることができる。リン酸化LGLL2抗体は、公知の方法により作製することができるが、例えば、LGLL2の653番目のセリンを含むペプチド断片を抗原として使用し、公知の方法に従ってポリクローナル又はモノクローナル抗体を作製すればよい。

[0077] 以上のように、本発明の化合物の評価方法により化合物の評価をした結果、被検化合物の存在下におけるPKC-iotaの活性が、被検化合物の非存在下における結合活性(対照)より低い値を示した場合には、当該被検化合物は、本発明に係るPKC-iotaとリガンドとの結合を阻害する活性を有するアンタゴニストと判定される。アンタゴニストは、PKC-iotaに対するリガンド及びそのアナログが有する生理活性を抑制する。このため、アンタゴニストは、p53の機能異常に基づき、PKC-iotaを介したシグナル伝達系の異常などに起因する癌の治療などのための医薬組成物として有用である。

[0078] また、本発明の化合物の評価方法により、PKC-iotaへの被検化合物結合後の細胞内シグナル伝達を促進又は阻害する物質のスクリーニングを行うことができる。すなわち、本発明の化合物の評価方法によって複数の被検化合物を評価することにより、アゴニスト又はアンタゴニストとして機能する化合物を選択することができる。かかる選択の結果、被検化合物非存在下においてリガンド及びそのアナログを作用させた場合の下流へのシグナル伝達の変化と比較して、その変化が抑制されれば、当該被検化合物は、PKC-iotaへの被検化合物結合後の下流へのシグナル伝達を阻害する化合物であると判定される。逆に、被検化合物が細胞内シグナル伝達を増強させれば、当該化合物は、PKC-iotaへの被検化合物結合後の細胞内シグナル伝達を促進する化合物であると判定される。このようなスクリーニング方法によって選択された化合物は、p53の機能異常に起因する癌の治療及び診断に有効である。

(2)PKC-iotaリガンド

(1)において説明した本発明の化合物の評価方法により、PKC-iotaリガンドを単離することができる。かかるリガンドは単独で抗癌作用を有する薬剤として使用できる。

- [0079] PKC-iotaリガンドとなり得る被検化合物としては特に制限はなく、例えば、天然化合物、有機化合物、無機化合物、タンパク質、ペプチド等の単一化合物、PKC-iotaの抗体、アンチセンス、RNAi又はリボザイムが挙げられる。このようなPKC-iotaリガンドとしては、具体的には、例えば、myristoylated atypical PKC pseudosubstrate inhibitor peptide (BIOSOURCE社)が挙げられる。
- [0080] 本発明のPKC-iotaリガンドをヒトや他の動物の医薬として使用する場合には、これらの物質自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体若しくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤等と適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。
- [0081] 錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常製剤実施に従って処方することができる。
- [0082] 注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80(TM)、HCO-50と併用してもよい。
- [0083] 油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、

ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

- [0084] 患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内の、経気管支的、筋内の、経皮的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、当該化合物がDNAによりコードされるものであれば、当該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。
- [0085] 化合物の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、1日あたり約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgであると考えられる。
- [0086] 非経口的に投与する場合は、その1回の投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人(体重60kgとして)においては、通常、1日当り約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合であると考えられる。
- (3) 癌の分子診断方法
- 被検組織におけるPKC- ι の発現量又は活性を測定して正常組織におけるPKC- ι の発現量又は活性と比較をすることにより、その組織が癌化しているか否かを予測・診断することができる。
- [0087] 本発明の第1の癌の分子診断方法は、被検組織又は被検細胞における、PKC- ι a遺伝子の発現量を測定する工程と、当該発現量と正常組織又は正常細胞におけるPKC- ι a遺伝子の発現量とを比較する工程と、比較した結果、被検組織又は被検細胞におけるPKC- ι a遺伝子の発現量が正常組織又は正常細胞におけるPKC- ι a遺伝子の発現量より有意に多いか否かを判断する工程と、を含むことを特徴とする。
- [0088] 本発明の第1の癌の分子診断方法において、先ず、被検組織又は被検細胞にお

けるPKC-iota遺伝子の発現量を測定する。遺伝子の発現量の測定の方法としては特に制限はないが、例えば、被検組織又は被検細胞から抽出したmRNAを鋳型としてRT-PCRを行う方法、前記遺伝子がプロットされたマイクロアレイを用いる方法、ノーザンブロットが挙げられる。ここで、遺伝子の「発現量」とは、遺伝子転写産物の絶対量又は相対量をいい、相対量の場合は、後述する正常組織における発現量との相対的な比較において当該遺伝子の発現量を決定すればよい。

[0089] 次に、上記の方法により測定した遺伝子の発現量と正常組織又は正常細胞における対応遺伝子の発現量とを比較する。

[0090] ここで、「正常組織又は正常細胞」とは、被検組織又は被検細胞と比較の対象となる組織又は細胞であればその由来は特に限定されず、健常人由来であっても癌患者由来であってもよい。また、被検組織の近辺に存在する正常組織又は正常細胞であってもよい。

[0091] 本工程においては、被検組織又は細胞に発現するPKC-iota遺伝子と正常組織又は細胞に発現するPKC-iota遺伝子(対応遺伝子)の発現量を比較するが、発現量の絶対量を比較してもよく、また、比較による相対値を算出してもよい。

[0092] 次に、比較した結果、被検組織又は被検細胞における遺伝子の発現量が正常組織又は正常細胞における遺伝子の発現量より有意に多いか否かを判断する。

[0093] 前記の有意差の判断手法としては特に制限はないが、当業者に公知の統計学的手法を用いて検定すればよい。

[0094] 被検組織又は被検細胞と、正常組織又は正常細胞における前記遺伝子の発現量の比較の結果、有意差をもって被検組織又は被検細胞において発現が高いと認められた場合には当該被検組織又は被検細胞におけるp53又はPI3キナーゼの発現量に変異を有する可能性が高く、p53又はPI3キナーゼの変異に起因して当該組織又は細胞が癌化している可能性があるとして判断できる。

[0095] また、本発明の第2の癌の分子診断方法は、被検組織又は被検細胞における、PKC-iotaの活性を測定する工程と、当該活性と正常組織又は正常細胞におけるPKC-iotaの活性とを比較する工程と、比較した結果、被検組織又は被検細胞におけるPKC-iotaの活性が正常組織又は正常細胞におけるPKC-iotaの活性より有意に多いか否

かを判断する工程と、を含むことを特徴とする。

- [0096] PKC-iotaは細胞内で自己リン酸化することにより活性化することが知られている。すなわち、PKC-iotaのリン酸化状態を測定することにより、その活性化の状態を知ることができる。
- [0097] 本発明の第2の癌の分子診断方法において、先ず、被検組織又は被検細胞における、PKC-iotaの活性を測定する。活性の測定の方法としては特に制限はないが、例えば、被検組織又は被検細胞の抽出液に存在するPKC-iotaを単離又は抽出液ごと用い、これを適当な基質と溶媒中でリン酸化反応を生じせしめ、その活性を測定すればよい。この場合、酵素反応の確認は放射性又は蛍光標識されたリン酸の取り込み等で確認することができる。
- [0098] 次に、上記の方法により測定した遺伝子の活性と正常組織又は正常細胞におけるPKC-iotaの活性とを比較する。
- [0099] 活性を比較した結果、被検組織又は被検細胞におけるPKC-iotaの活性が正常組織又は正常細胞におけるPKC-iotaの活性より有意に強いかな否かを判断する。
- [0100] 前記の有意差の判断手法としては特に制限はないが、当業者に公知の統計学的手法を用いて検定すればよい。
- [0101] 被検組織又は被検細胞と、正常組織又は正常細胞におけるPKC-iotaの活性の比較の結果、有意差をもってPKC-iotaの活性が上昇している場合には、当該組織又は細胞におけるp53又はPI3キナーゼの機能又は発現量にに変異を有する可能性が高く、p53又はPI3キナーゼの変異に起因して当該組織又は細胞が癌化している可能性がある判断できる。
- [0102] (4) 遺伝子マーカー
- 本発明の遺伝子マーカーは、PKC-iota阻害剤の薬効を予測又は診断する遺伝子マーカーであって、当該遺伝子が、BAD、LLGL2、HMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKからなる群より選択されるいずれか一つの遺伝子又は該遺伝子と実質的に同等の機能を有する遺伝子であることを特徴とする。
- [0103] 本発明の「遺伝子マーカー」とは、評価対象となるPKC-iota阻害剤の薬効や生体に対する作用の指標となるものをいい、具体的には、PKC-iota阻害剤の作用によつ

て発現量や活性が変化する遺伝子又はこれらに関連する物質(例えば、DNA及びRNA並びにこれらの断片)をいう。

- [0104] また、本発明の遺伝子マーカーには、BAD、LLGL2、HMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3又はSNF1LKの一部からなるポリヌクレオチドも含む。このようなポリヌクレオチドは、BAD、LLGL2、HMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3又はSNF1LK遺伝子から転写されたRNA、これから産生されるcDNA、ならびにこれらの遺伝子由来の配列を有する合成核酸であってもよい。
- [0105] 本発明者らは、本発明の遺伝子マーカーの発現がPKC- ι の発現を抑制することによって増加又は減少することを確認している。すなわち、PKC- ι の発現を抑制することによって、SNF1LK、CLDN12及びRPIAの3遺伝子は発現が増加し、HMGB3、NFIB、PXDN及びAKT3の4遺伝子は発現が減少する。また、PKC- ι のキナーゼ活性依存的にBADの112番目、136番目及び155番目のアミノ酸、又はLLGL2の653番目のセリンがリン酸化を受けることも本発明者らにより見出されていることから、PKC- ι の活性が阻害されることによりBAD及び／又はLLGL2もリン酸化を受けないか、あるいは脱リン酸化される。従って、BAD及び／又はLLGL2のリン酸化状態もまたPKC- ι 阻害剤の遺伝子マーカーとして使用可能である(BAD及びLLGL2のリン酸化の検出については(5)タンパク質マーカーの項で述べる。)
- [0106] 本発明の遺伝子マーカーは、PKC- ι 阻害剤の投与により生体内組織中でその発現が増加又は減少する。PKC- ι 阻害剤の薬効を予測又は診断する場合には、遺伝子マーカーが発現している任意の組織における当該遺伝子マーカーの発現量を測定すればよいが、サンプルの入手が容易であるとの観点から血液又は皮膚組織における発現量を測定することが好ましい。
- [0107] また、本発明の遺伝子マーカーの発現量の測定方法としては特に制限はないが、具体的には、例えば、ノーザンブロット法、定量的RT-PCR法、DNAマイクロアレイによってmRNA量を測定することによりその発現量を定量することができる。
- [0108] ここで、前記ノーザンブロット法に使用するプローブとしては、本発明の遺伝子マーカーであるBAD、LLGL2、HMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3又はSNF1LK遺伝子を検出可能なプローブであればよく、具体的には、これらの遺伝子の塩基

配列の部分配列又は全部を使用することができる。また、当該プローブの塩基数についても特に制限はないが、少なくとも連続する20塩基の長さの核酸であることが好ましく、より好ましくは40塩基、さらに好ましくは60塩基、特に好ましくは80塩基以上のものが使用される。また、当該プローブは、必要に応じて検出可能なように標識して用いてもよい。具体的には、例えば、 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{35}S 等の放射性同位体で標識されていてもよく、ビオチン、蛍光色素、酵素、金コロイド等で標識されていてもよい。

[0109] また、前記定量的RT-PCR法に使用するプライマーとしては、本発明の遺伝子マーカーであるBAD、LLGL2、HMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3又はSNF1LK遺伝子を検出可能なプライマーであればよく、その塩基数は特に制限されず、プライマーの塩基配列や単離する遺伝子の塩基配列等によって適宜設定することができるが、一般に、連続した10～60塩基であることが好ましく、15～30塩基であることがより好ましい。また、その塩基配列は、検出の対象となるBAD、LLGL2、HMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3又はSNF1LK遺伝子の塩基配列に基づいて決定する。

[0110] また、前記DNAマイクロアレイによって本発明の遺伝子マーカーの発現量を測定する場合、BAD、LLGL2、HMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3又はSNF1LK遺伝子のうちの少なくとも一つの遺伝子又は当該遺伝子の部分核酸がスポットされたDNAマイクロアレイを準備し、測定を行えばよい。

[0111] また、本発明の遺伝子マーカーは、PKC-iota阻害剤の薬効を予測又は診断するために用いられる。すなわち、PKC-iota阻害剤を生体に投与した後、当該遺伝子マーカーの発現量を測定し、投与前の発現量と比較して発現量が増加又は減少している場合に、当該阻害剤がPKC-iota特異的に作用し所定の薬効を発揮していると認定することができる。すなわち、SNF1LK、CLDN12及びRPIAの3遺伝子については発現が増加した場合に、HMGB3、NFIB、PXDN及びAKT3の4遺伝子については発現が減少した場合にPKC-iota阻害剤が所定の薬効を発揮すると認定することができる。具体的には、SNF1LK、CLDN12及びRPIAの3遺伝子については、PKC-iota阻害剤を投与後、本発明の遺伝子マーカーの発現が増加していれば、仮にPKC-iota阻

害剤の薬効が目に見える状態(例えば、癌症状の改善)に至っていない場合や、癌組織が非常に小さく、X線撮影のような従来の診断方法では診断が困難な場合であっても、阻害剤の薬効が発揮されるであろうと予測できる。一方、SNF1LK、CLDN12及びRPIAの3遺伝子については、PKC-iota阻害剤を投与後、本発明の遺伝子マーカーの発現が減少していれば、同様に阻害剤の薬効について予測することができる。また、PKC-iota阻害剤を薬剤として開発する段階において健常人を対象に臨床試験を行う場合、本発明の遺伝子マーカーの発現量を指標にして当該薬剤の効果を評価することが可能となる。

[0112] また、本発明の遺伝子マーカーは、癌の治癒成績を判定する際にも使用できる。すなわち、PKC-iota阻害剤を抗癌剤として生体に投与し癌治療を行った場合、抗癌剤が効いたかどうかを判定するには実際に癌組織が縮小したことや癌細胞が減少したことを確認する必要がある。このような確認作業には、X線断層撮影やX線造影撮影のような放射線を浴びるような検査や、内視鏡やバイオプシーのような患者の負担を伴う検査が必要となる。しかし、本発明の遺伝子マーカーによれば、血液や皮膚のような体組織の一部を極少量採取し、当該組織における遺伝子マーカーの発現を測定するだけで検査が完了する。従って、X線断層撮影、X線造影撮影、内視鏡又はバイオプシーのような検査に代えて又はこれらの検査の予備的な検査として、患者に苦痛や負担を与えることなくPKC-iota阻害剤の薬効を判定することが可能となる。

[0113] (5)タンパク質マーカー

本発明のタンパク質マーカーは、PKC-iota阻害剤の薬効を予測又は診断するタンパク質マーカーであって、当該タンパク質が、BAD、LLGL2、HMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKからなる群より選択されるいずれか一つのタンパク質又は実質的に同等の機能を有することを特徴とする。

[0114] 本発明の「タンパク質マーカー」とは、評価対象となるPKC-iota阻害剤の薬効や生体に対する作用の指標となるものをいい、具体的にはPKC-iota阻害剤の作用によって発現量や活性が変化するタンパク質又はこれらに関連する物質(例えば、部分ペプチド)をいう。

[0115] 本発明者らは、これらのタンパク質をコードする遺伝子のみならずタンパク質の発

現がPKC-iota阻害剤の投与によって増加又は減少することを確認している。

- [0116] 本発明のタンパク質マーカーは、PKC-iota阻害剤の投与により生体内組織中でその発現が増加又は減少する。PKC-iota阻害剤の薬効を予測又は診断する場合には、タンパク質マーカーが発現している任意の組織における当該タンパク質マーカーの発現量を測定すればよいが、サンプルの入手が容易であるとの観点から血液又は皮膚組織における発現量を測定することが好ましい。
- [0117] ここで、本発明のタンパク質マーカーは、BAD、LLGL2、HMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKからなる群より選択されるいずれか一つのタンパク質と実質的に同等の機能を有するタンパク質を含む。このようなタンパク質としては、BAD、LLGL2、HMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKタンパク質を構成するアミノ酸配列のうち1又は2以上のアミノ酸に置換、付加、欠失又は挿入があり、且つ、同等の活性を有するものが挙げられる。同等の活性とは、BADと実質的に同等の機能を有するタンパク質であればBAD活性を有することをいい、LLGL2と実質的に同等の機能を有するタンパク質であればLLGL2活性を、HMGB3と実質的に同等の機能を有するタンパク質であればHMGB3活性を、NFIBと実質的に同等の機能を有するタンパク質であればNFIB活性を、PXDNと実質的に同等の機能を有するタンパク質であればPXDN活性を、CLDN12と実質的に同等の機能を有するタンパク質であればCLDN12活性を、RPIAと実質的に同等の機能を有するタンパク質であればRPIA活性を、AKT3と実質的に同等の機能を有するタンパク質であればAKT3活性を、SNF1LKと実質的に同等の機能を有するタンパク質であればSNF1LK活性をそれぞれ有することをいう。
- [0118] 本発明のタンパク質マーカーの発現量の測定方法としては特に制限はないが、具体的には、例えば、ウエスタンブロット法、ELISA法、プロテインチップによってタンパク質量を測定することによりその発現量を定量することができる。
- [0119] ここで、前記ウエスタンブロット法は当業者に公知の方法で行うことができる。具体的には、例えば、PKC-iota阻害剤を投与した生体から採取した組織の総タンパク質をSDS-PAGEにより展開し、ニトロセルロース膜やPVDF膜等へ転写する。その後、当該膜に本発明のタンパク質マーカーの抗体を添加、反応させ、さらに2次抗体を添加

、反応させた後、当該2次抗体を検出することにより、当該タンパク質マーカーを検出すればよい。また、生体から採取した組織の総タンパク質をタンパク質マーカーの抗体で免疫沈降し、沈降物として得られたタンパク質をSDS-PAGEにより展開し、ウエスタンブロット法により検出してもよい。

[0120] 前記ウエスタンブロット法に使用する抗体としては、本発明のタンパク質マーカーであるBAD、LLGL2、HMGB3、NFIB、PXDND、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKタンパク質を検出可能な抗体であればよく、ポリクローナル抗体であってもよくモノクローナル抗体であってもよい。かかるポリクローナル抗体は当業者に公知の方法で調製すればよく、例えば下記の方法に従って調製できる。すなわち、例えば、抗原を、必要に応じてフロイントアジュバント(Freund's Adjuvant)とともに、マウス、ラット、ハムスター、モルモット又はウサギ等の哺乳動物に免疫し、当該免疫感作動物から得た血清から取得することができる。

[0121] また、前記モノクローナル抗体は、例えば、抗原を、必要に応じてフロイントアジュバントとともに、マウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはウサギ等の哺乳動物に免疫する。次に、当該免疫感作動物から得た抗体産生細胞と自己抗体産生能のない骨髓腫系細胞(ミエローマ細胞)からハイブリドーマ(融合細胞)を調製し、ハイブリドーマをクローン化し、哺乳動物の免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって調製することができる。さらに具体的には、抗原を、必要に応じてフロイントアジュバント哺乳動物の皮下内、筋肉内、静脈内又は腹腔内等に1又は数回注射するかあるいは移植することにより免疫感作を施す。通常、最初の免疫から1～14日毎に1～4回程度免疫を行い、最終免疫より1～5日程度後に免疫感作された哺乳動物から抗体産生細胞を取得する。

[0122] モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ(融合細胞)の調製は、定法に従って行うことができる。すなわち、上述した方法により免疫感作された哺乳動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髓あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、マウス、ラット又はヒト等由来の自己抗体産生能のないミエローマ細胞との細胞融合させることにより調製する。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマをマイクロタイタープレート等を用いて培養し、増殖

の見られたウェルの培養上清の免疫抗原に対する反応性を、例えばRIAやELISA等の酵素免疫測定法によって測定することにより行なうことができる。

[0123] ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロ、又はマウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等の腹水中等でのインビボで培養した後、得られた培養上清、又は哺乳動物の腹水から単離することにより行うことができる。モノクローナル抗体の単離、精製は、上述の培養上清あるいは腹水を、飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈澱法、カプロイン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー (DEAEまたはDE52等)、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインAカラム等のアフィニティカラムクロマトグラフィーに供すること等により行うことができる。

[0124] さらに、上述の方法により得られたポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を用いて抗体アレイを調製することも可能である。すなわち、上述の抗体をニトロセルロース膜やPVDF膜等の膜や、ニトロセルロースがコートされたスライドやガラス基盤に、マイクロアレイスポッターを用いて固定すればよい。

[0125] また、BADとLGLL2はPKC-*iota*によりリン酸化を受ける。従って、BAD及びLGLL2のリン酸化状態がPKC-*iota*の活性の指標、すなわちマーカーとなり得る。BADのリン酸化は、抗リン酸化BAD抗体を用いたウエスタンブロット法により検出することができる。また、上述した方法で調製した抗BAD抗体を用いてウエスタンブロットを行い、BADのバンドを確認した後、当該バンドが抗リン酸化セリン・スレオニン抗体により検出されるかどうかを確認することによってもBADのリン酸化を確認することができる。LGLL2についても同様にリン酸化を確認することができ、LGLL2のリン酸化をマーカーとしてPKC-*iota*の阻害活性を検出可能である。

[0126] 一方、本発明のタンパク質マーカーであるBAD、LLGL2、HMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKの少なくとも一つのタンパク質をニトロセルロース膜やPVDF膜等の膜や、ニトロセルロースがコートされた基盤やガラス基盤にマイクロアレイスポッターを用いて固定することによりプロテインアレイを調製することもできる。この場合、前記タンパク質を直接固定してもよく、タンパク質又は膜若しくは基盤との間にリンカーを介して固定してもよい。リンカーを介して固定することにより、タン

パク質の立体構造を損なわず活性を維持した状態でプロテインアレイ(マイクロアレイ)を調製することが可能となる。

[0127] また、本発明のタンパク質マーカーは、PKC- ι 阻害剤の薬効を予測又は診断するために用いられる。すなわち、PKC- ι 阻害剤を生体に投与した後、当該タンパク質マーカーの発現量を測定し、投与前の発現量と比較して発現量が増加又は減少している場合に、当該阻害剤がPKC- ι 特異的に作用し所定の薬効を発揮していると認定することができる。すなわち、SNF1LK、CLDN12及びRPIAの3タンパク質については発現が増加した場合に、HMGB3、NFIB、PXDN及びAKT3の4タンパク質については発現が減少した場合にPKC- ι 阻害剤が所定の薬効を発揮すると認定することができる。具体的には、SNF1LK、CLDN12及びRPIAの3タンパク質については、PKC- ι 阻害剤を投与後、本発明のタンパク質マーカーの発現が増加していれば、仮にPKC- ι 阻害剤の薬効が目に見える状態(例えば、癌症状の改善)に至っていない場合や、癌組織が非常に小さく、X線撮影のような従来の診断方法では診断が困難な場合であっても、阻害剤の薬効が発揮されるであろうと予測できる。一方、HMGB3、NFIB、PXDN及びAKT3の4タンパク質については、PKC- ι 阻害剤を投与後、本発明のタンパク質マーカーの発現が減少していれば、同様に阻害剤の薬効について予測することができる。また、PKC- ι 阻害剤を薬剤として開発する段階において健常人を対象に臨床試験を行う場合、本発明のタンパク質マーカーの発現量を指標にして当該薬剤の効果を評価することが可能となる。

[0128] また、本発明のタンパク質マーカーは、癌の治癒成績を判定する際にも使用できる。すなわち、PKC- ι 阻害剤を抗癌剤として生体に投与し癌治療を行った場合、抗癌剤が効いたかどうかを判定するには実際に癌組織が縮小したことや癌細胞が減少したことを確認する必要がある。このような確認作業には、X線断層撮影やX線造影撮影のような放射線を浴びるような検査や、内視鏡やバイオプシーのような患者の負担を伴う検査が必要となる。しかし、本発明のタンパク質マーカーによれば、血液や皮膚のような体組織の一部を極少量採取し、当該組織におけるタンパク質マーカーの発現を測定するだけで検査が完了する。従って、X線断層撮影、X線造影撮影、内視鏡又はバイオプシーのような検査に代えて又はこれらの検査の予備的な検査とし

て、患者に苦痛や負担を与えることなくPKC-iota阻害剤の薬効を判定することが可能となる。

[0129] (6) 癌診断キット

本発明の癌診断キットは、本発明のタンパク質マーカーを検出可能な抗体を含むことを特徴とする。当該抗体は、上述したBAD、LLGL2、HMGB3、NFIB、PXD、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKからなる群より選択されるいずれか一つのタンパク質又は実質的に同等の機能を有するタンパク質に対するポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体をいう。

[0130] 本発明の癌診断キットには、本発明のタンパク質マーカーを検出可能な抗体の他、例えば、抗体検出用試薬、抗体検出用2次抗体、反応に用いるプレートを備えていてもよい。

[0131] 本発明の癌診断キットを用いることにより、PKC-iota阻害剤を投与した生体から採取した組織(例えば、血液又は皮膚)におけるタンパク質マーカーを迅速且つ簡便に検出することが可能となり、投与前後のタンパク質量を比較することにより、PKC-iota阻害剤の薬効を予測又は診断することが可能となる。

[0132] (7) PKC-iota阻害剤の効果の予測又は診断方法

まず、本発明の第1のPKC-iota阻害剤の効果の予測又は診断方法について説明する。

[0133] 本発明の第1のPKC-iota阻害剤の効果の予測又は診断方法は、PKC-iota阻害剤を投与した被検体由来の組織におけるHMGB3、NFIB、PXD、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKからなる群より選択される少なくとも一つの遺伝子又は該遺伝子と実質的に同等の機能を有する遺伝子を検出する検出工程と、PKC-iota阻害剤投与前後の発現量を比較する比較工程を含むことを特徴とする。

[0134] 本発明に係る検出工程は、PKC-iota阻害剤を投与した被検体由来の組織におけるHMGB3、NFIB、PXD、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKからなる群より選択される少なくとも一つの遺伝子又は当該遺伝子と実質的に同等の機能を有する遺伝子(すなわち、本発明の遺伝子マーカー)を検出する工程である。

[0135] ここで、本発明に係る「組織」とは、PKC-iota阻害剤を投与した被験体由来の組織

であり、検出対象である遺伝子マーカーが発現している組織であればその組織の種類は限定されないが、採取が容易であるとの観点より血液又は皮膚組織であることが好ましい。

[0136] 本工程においては、PKC-iota阻害剤を投与した生体より前記組織を採取し、そこから遺伝子マーカー測定用のDNAを定法により抽出する。抽出するDNAはゲノムDNAであってもよく、抽出したRNAから逆転写反応によって得られたcDNAであってもよい。次に、得られたDNAを用いてHMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LK遺伝子の検出を行う。検出方法は定量的な手段であれば特に限定されないが、具体的には、例えば、PCR法又はマイクロアレイが挙げられる。

[0137] 検出工程でHMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LK遺伝子の検出が完了した後、PKC-iota阻害剤投与前後の発現量を比較する比較工程へと進む。比較工程では、検出工程で検出したHMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LK遺伝子の発現量と、PKC-iota阻害剤を投与する前の当該遺伝子の発現量とを比較することとなる。比較の結果、PKC-iota阻害剤の投与によってSNF1LK、CLDN12及びRPIAの3タンパク質については発現が増加した場合に、HMGB3、NFIB、PXDN及びAKT3の4タンパク質については発現が減少した場合には、投与したPKC-iota阻害剤が投与対象である人体に当該阻害剤が適切な作用機序で作用し、投与効果を示していると判断することができる。これは癌組織が非常に小さい場合や、医薬開発の臨床試験段階のように、物理的な癌組織の大きさだけで薬効を測定することが困難な場合に、PKC-iota阻害剤の薬効を測定する方法として非常に有益である。

[0138] 次に、本発明の第2のPKC-iota阻害剤の効果の予測又は診断方法について説明する。

[0139] 本発明の第2のPKC-iota阻害剤の効果の予測又は診断方法は、PKC-iota阻害剤を投与した被検体由来の組織におけるHMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKからなる群より選択される少なくとも一つのタンパク質又は該タンパク質と実質的に同等の機能を有するタンパク質を検出する検出工程と、PKC-iota阻害剤投与前後の発現量を比較する比較工程を含むことを特徴とする。

- [0140] 本発明に係る検出工程は、PKC-iota阻害剤を投与した被検体由来の組織におけるHMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKからなる群より選択される少なくとも一つのタンパク質又は当該タンパク質と実質的に同等の機能を有するタンパク質(すなわち、本発明のタンパク質マーカー)を検出する工程である。
- [0141] ここで、本発明に係る「組織」とは、PKC-iota阻害剤を投与した被験体由来の組織であり、検出対象であるタンパク質マーカーが発現している組織であればその組織種は限定されないが、採取が容易であるとの観点より血液又は皮膚組織であることが好ましい。
- [0142] 本工程においては、PKC-iota阻害剤を投与した生体より前記組織を採取し、そこからタンパク質マーカー測定用のタンパク質を定法により抽出するか、又は、当該タンパク質を含む総タンパク質を採取する。具体的には、例えば、ウエスタンブロット法による検出に供することができるよう、当該タンパク質を含む総タンパク質を可溶化サンプルとして調製し、本工程に係る抽出タンパク質とすることができる。また、総タンパク質をサンプルとして、検出対象となるタンパク質の抗体を用いて免疫沈降を行い、当該タンパク質のみを抽出してもよい。
- [0143] 次に、得られたタンパク質を用いてHMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKタンパク質の検出を行う。検出方法は定量的な手段であれば特に限定されないが、具体的には、例えば、ウエスタンブロット法又はELISA法が挙げられる。ここで、ウエスタンブロット法又はELISA法による検出には抗HMGB3抗体、抗NFIB抗体、抗PXDN抗体、抗CLDN12抗体、抗RPIA抗体、抗AKT3抗体又は抗SNF1LK抗体を用いる必要がある。これらの抗体はポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体のいずれであってもよい。また、これらの抗体は定法により調製することができ、例えば、先の(5)タンパク質マーカーの項で述べた方法により調製することができる。
- [0144] また、BADとLGLL2はPKC-iotaによりリン酸化を受ける。従って、BAD及びLGLL2のリン酸化状態がPKC-iotaの活性の指標、すなわちマーカーとなり得る。BADのリン酸化は、抗リン酸化BAD抗体を用いたウエスタンブロット法により検出することができる。また、上述した方法で調製した抗BAD抗体を用いてウエスタンブロットを行い、BADのバンドを確認した後、当該バンドが抗リン酸化セリン・スレオニン抗体により検出さ

れるかどうかを確認することによってもBADのリン酸化を確認することができる。LGLL2についても同様にリン酸化を確認することができ、LGLL2のリン酸化をマーカーとしてPKC-iotaの阻害活性を検出可能である。

- [0145] 検出工程でHMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKタンパク質の検出が完了した後、PKC-iota阻害剤投与前後の発現量を比較する比較工程へと進む。比較工程では、検出工程で検出したHMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKタンパク質の発現量と、PKC-iota阻害剤を投与する前の当該タンパク質の発現量とを比較することとなる。BAD及びLGLL2の場合はそのリン酸化レベルを比較する。比較の結果、PKC-iota阻害剤の投与によってSNF1LK、CLDN12及びRPIAの3タンパク質については発現が増加した場合に、HMGB3、NFIB、PXDN及びAKT3の4タンパク質については発現が減少した場合には、投与したPKC-iota阻害剤が投与対象である人体に当該阻害剤が適切な作用機序で作用し、投与効果を示していると判断することができる。また、BAD及びLGLL2の場合には、そのリン酸化レベルが低下している場合にPKC-iota阻害剤が適切な作用機序で作用し、投与効果を示していると判断することができる。これは癌組織が非常に小さい場合や、医薬開発の臨床試験段階のように、物理的な癌組織の大きさだけで薬効を測定することが困難な場合に、PKC-iota阻害剤の薬効を測定する方法として非常に有益である。

実施例

- [0146] 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は、以下の実施例に限定されるものではない。

[0147] 実施例1

(変異型p53を有する細胞に対し、活性阻害が特異的に細胞毒性を示すKinaseの同定)

まず、変異型p53発現誘導細胞の作製を行った。野生型p53を持つU2OS Tet-on細胞(以下、U2OS WTp53と示す)に、変異型p53(157番目のコドンに変異を有する)発現用プラスミドを導入することにより、変異型p53発現誘導細胞(以下、U2OS MT157と示す)を樹立した。U2OS MT157はドキシサイクリン(Doxycycline)添加により変異

型p53を発現することができる。

[0148] 次に、樹立した細胞に対するsiRNAのトランスフェクションと細胞毒性の評価を行った。すなわち、ドキシサイクリン存在下で培養したU2OS WT p53とU2OS mt p53細胞にkinome wide siRNAをトランスフェクションした。72時間後、WST-8(キシダ化学社製)を用いて細胞数を定量し、各リン酸化酵素の阻害による細胞毒性効果を調べた。U2OS mt p53細胞に対する毒性効果がU2OS WT p53に比べて1.5倍以上であるリン酸化酵素を変異型p53 context specific target geneを選択したが、この中にPKC-iotaが含まれていた。図1に示すとおり、PKC-iotaの阻害は、変異型p53を有する細胞に対し特異的に細胞毒性を示すことが分かった。

[0149] 実施例2

(肺癌細胞株を用いたPKC-iota阻害の効果)

野生型p53を有することが知られている4種類の細胞(A427、A549、LU99及びNCI-H460)、変異型p53を有する4種類の細胞(HOP62、HOP92、NCI-H322M及びNCI-H226)に対してPKC-iotaのsiRNAをトランスフェクションした。その72時間後にWST-8(キシダ化学社製)を用いて細胞数を定量し、各リン酸化酵素の阻害による細胞毒性効果を調べた。なお、HOP62細胞は212番目のコドンに、HOP92細胞は175番目のコドンに、NCI-H226細胞は158番目のコドンに、それぞれ変異を有する。

[0150] 図2～9に示すように、PKC-iotaの発現抑制により、変異型p53を有する細胞(図2～5)は全て増殖が抑制されたが、野生型p53を有する細胞(図6～9)では4細胞中3細胞で増殖がほとんど抑制されなかった。このことから、肺癌細胞株においても、PKC-iotaの阻害は変異型p53を有する細胞に対してより効果を示すと考えられた。

[0151] 実施例3

(PKC-iota阻害はBADのリン酸化を抑制する)

PKC-iota阻害による増殖抑制のメカニズムを明らかにするため、PKC-iotaの基質であることが知られているBADの、PKC-iotaによるリン酸化について検討した。すなわち、ドキシサイクリン存在下で培養したU2OS WT p53及びU2OS mt p53細胞にPKC-iotaのsiRNAをトランスフェクションした。72時間後、細胞を回収し、各細胞溶解液中のBAD Ser155のリン酸化状態をウエスタンブロットにより解析した。

[0152] 図10に示すとおり、U2OS WT p53及びU2OS mt p53細胞のいずれも、PKC-iota阻害によりBADのSer155のリン酸化が抑制された。このことから、PKC-iotaが阻害されるとBADのSer155が脱リン酸化され、アポトーシスに向かうことが確認できた。

[0153] 実施例4

(過剰発現したp53はBcl-XLに結合する)

これまでの文献報告(J.Biol.Chem.、第276巻、40583頁、2001年)から、変異型p53を有する細胞は野生型p53を有する細胞に比べてp53の発現量が高いことと、p53はBcl-XLに結合して不活化することが知られている。そこで、変異型p53を有する細胞が野生型p53を有する細胞に比べて、PKC-iota阻害に対する感受性が高いメカニズムを明らかにするため、下記の試験を行った。

[0154] 先ず、ドキシサイクリン存在下で培養したU2OS WT p53及びU2OS mt p53細胞を回収した。次に、各細胞溶解液に対して抗p53抗体及びProtein A agaroseを加え遠心することで、p53及びp53結合産物を回収した。回収したp53結合産物中のBcl-XLタンパク量をウエスタンブロット法(図11中、IB)により解析した。

[0155] 図11に示すとおり、p53過剰発現時にはBcl-XLの結合量が増えることが分かった。このことから、p53が過剰発現した細胞ではp53の結合によりBcl-XLが不活化して、ミトコンドリアを介したアポトーシスが起きやすくなっていると結論された。

[0156] 実施例5

(PI3キナーゼパスウェイが活性化した細胞におけるPKC-iotaの発現抑制の効果)

PKC-iotaはPI3キナーゼによって活性化されることが知られている。このことから、PKC-iotaの活性を阻害することにより、これらのパスウェイ上に異常を有する癌細胞に対して増殖抑制効果を有することが期待される。そこで、PI3キナーゼが活性化している細胞を用いて、PKC-iota阻害の効果調べた。

[0157] PI3キナーゼのらせん状ドメイン(helical domain)に変異(E545K又はE545A)を有する3種類の細胞(NCI-H460、NCI-H596及びNCI-H1869)にPKC-iotaのsiRNAを導入した。72時間後、WST-8を用いて細胞数を定量し、PKC-iotaの阻害による細胞毒性効果を調べた。

[0158] 図12A(NCI-H460細胞)、図12B(NCI-H596細胞)及び図12C(NCI-H1869細胞)

に示すとおり、全ての細胞について細胞増殖が40%以上抑制された。このことから、PKC-iotaの発現阻害はPI3-kinaseが活性化している細胞に対してより効果を示す、すなわち、PKC-iotaを阻害することにより、PI3キナーゼが活性化している癌細胞の増殖抑制効果が期待されることが確認できた。

[0159] 実施例6

(LLGL2はPKC-iotaの基質である)

siRNAを用いてPKC-iota/PKC-zetaダブルノックダウンすることによりLLGL2のリン酸化が阻害されるか否かを検討した。

[0160] MCF7及びHCC1419細胞株にPKC-iota siRNA(GGUUCGAGACAUGUGUUCUT T:配列番号21、GGAAGGAGACCCGUGUACATT:配列番号22及びGGAGACCC GUGUACAGUAUTT:配列番号23を混合溶液として使用)とPKC-zeta siRNAの混合溶液か、又は陰性対照としてルシフェラーゼ(Luciferase) siRNAをsiLentFect (Bio-Rad社)を用いて導入した。MCF7については72時間後、HCC1419については120時間後にsiRNA処理した細胞の溶解液を調製した。BCA protein assay kit(PIERCE社)を用いて、各細胞溶解液中のタンパク質量を測定・調整し、ウェスタンブロットによって、リン酸化LLGL2(pS653)、LLGL2、PKC-iota及びPKC-zetaを検出した。ただしMCF7細胞溶解液中のphospho-LLGL2(pS653)及びLLGL2については、LLGL2抗体によって免疫沈降を行った後、ウェスタンブロットを行い検出した。

[0161] 図13A(MCF7細胞)及び図13B(HCC1419細胞)に示すとおり、PKC-iotaとPKC-zetaのsiRNA処理によりPKC-iota及びPKC-zetaのタンパク量の減少がウェスタンブロットによって確認された。また、このときリン酸化LLGL2(pSer653)の発現レベルも、未処理及びLuciferase siRNA処理した場合と比較して顕著に低下していた。すなわち、LLGL2 Ser653のリン酸化はatypical PKCの発現に依存していることが確認された。

[0162] 次に、ドキシサイクリンでPKC-iotaの発現が誘導される細胞を樹立するため、下記の手順で細胞の調製を行った。

[0163] まず、PKC-iota、常活性変異体PKCi(A120E)及びPKCi(K274W)をpTRE2hyg vectorにクローニングした(以下、順に、pTRE2hyg/PKCi-WT、pTRE2hyg/PKCi-CA及びpTRE2hyg/PKCi-KDとする)。次に、pTRE2hyg/PKCi-WT、pTRE2hyg/PKCi-CA、p

TRE2hyg/PKCi-KD及びpTRE2hyg vectorをそれぞれU-2OS Tet-on 細胞株にNucl eofector (amaxa社) 又はFugene 6 (ロシュ社) を用いて導入した。24時間後に細胞を回収・再播種し、150 μ g/ml ハイグロマイシン (Hygromycin) 存在下で約2週間培養し、出現したハイグロマイシン耐性の細胞コロニーをシリンダークローニング法により単離した。樹立したこれらの細胞をそれぞれPKCi-WT Tet-on, PKCi-CA Tet-on, PK Ci-KD Tet-on及びVector Tet-on U-2OSとする。

[0164] 次に、N末端にHAタグをつけたLLGL2をpcDNA3.1 vectorにクローニングした(以下pcDNA3.1/HA-LLGL2とする)。このpcDNA3.1/HA-LLGL2を、PKCi-WT Tet-on、PKCi-CA Tet-on、PKCi-KD Tet-on及びVector Tet-on U-2OSに、Fugene HDを用いて導入し、ドキシサイクリン(Doxycycline)を加えてPKC-iotaの発現を誘導した。24時間後、これらの細胞の溶解液を調製し、BCA protein assay kitを用いて各細胞溶液中のタンパク量を測定・調整した後、リン酸化LLGL2 (pS653)、LLGL2 (HA)及びPKC-iotaをウェスタンブロッティングにより検出した。

[0165] 図14に示すとおり、ドキシサイクリンによる常活性変異体PKC-iota(PKCi-CA) の発現の誘導により、リン酸化LLGL2 (pSer653)のバンドの顕著な増加がウェスタンブロットで認められた。一方kinase dead PKCi (PKCi-KD) の発現を誘導してもLLGL2 Ser653のリン酸化の増強は認められなかった。この実験からPKC-iotaのkinase活性依存的にLLGL2 Ser653のリン酸化が引き起こされることが確認された。

[0166] 以上の2つの実験からLLGL2がPKC-iotaの下流の基質であることが確認された。

[0167] 実施例7

(LLGL2のリン酸化を指標とした化合物評価系の樹立)

LLGL2の653番目のセリン(Ser653)のリン酸化を指標にPKC-iotaの阻害剤の評価を行うことができる系を構築するため、下記の試験を行った。

[0168] まず、化合物評価に用いる細胞を調製するため、PKCi-CA Tet-on U-2OS細胞にpcDNA3.1/Zeo/HA-LLGL2をFugene HDを用いて導入した。48時間後に細胞を回収・再播種し、50 μ g/mlゼオシン(Zeocin)存在下で約2週間培養し、出現したゼオシン耐性の細胞コロニーをシリンダークローニング法により単離した。以下、この樹立した細胞をLLGL2 stable/PKCi-CA Tet-on U-2OSとする。

[0169] 次に、LLGL2 stable/PKCi-CA Tet-on U-2OSをドキシサイクリン存在下で24時間培養した後、さまざまな濃度のPKC-iota阻害剤Xと共に培養した。PKC-iota阻害剤処理中は血清不含の培養液を使用した。PKC-iota阻害剤処理開始から4時間後に細胞溶解液を調製し、ウェスタンブロットと、LLGL2抗体及びリン酸化LLGL2(pS653)抗体を用いたsandwich ELISAによりリン酸化LLGL2(pS653)を検出した。

[0170] 図15に示すとおり、ドキシサイクリン添加によって誘導されるLLGL2 Ser653のリン酸化がPKC-iota阻害剤の濃度依存的に抑制されることが、ウェスタンブロット及びsandwich ELISAにより確認された。すなわち、本実験系がPKC-iotaの阻害剤の評価に使用可能であることが示された。またsandwich ELISAを阻害剤評価系に用いることで、ハイスループットなスクリーニングを実現可能であることが確認された。

[0171] 実施例8

(マイクロアレイ解析による遺伝子発現マーカーの探索)

PKC-iotaの発現をsiRNAによって抑制したときに、発現がup-regulation又はdown-regulationされるような遺伝子の探索を試みた。

[0172] 解析に用いる細胞を調製するため、まず、対数増殖期のHOP62細胞に1種類のPKC-iotaのsiRNAを導入した。また、対数増殖期のNCI-H596細胞に、2種類のPKC-iotaのsiRNAを導入した。それぞれ、siRNAの導入後から16、24又は48時間後に細胞を回収し、RNeasy kit(キアゲン社)を用いて各サンプルからmRNAを抽出した。

[0173] 次に、各サンプルにおけるmRNAの発現量をAffymetrix GeneChip(アフィメトリクス社)を用いて測定した。測定されたmRNAの発現量をRosetta Resolver System(ロゼッタ社)を用いて解析することで、コントロール(Luciferase siRNA)処理とPKC-iota siRNA処理の間で有意な発現変化が観察された遺伝子を検出した。すなわち、HOP62細胞及びNCI-H596細胞のいずれにおいても有意な発現変化が観察された遺伝子を抽出することで、PKCiの調節に関連してmRNA発現量に変化する、マーカー候補遺伝子の探索を行った。

[0174] その結果、2種類の細胞と2種類のsiRNAに共通して、その発現がup-regulationされる遺伝子が28個、down-regulationされるような遺伝子が17個見つかった。

[0175] 次に、マイクロアレイ解析によって発現変化の見られた遺伝子の解析を行った。

[0176] まず、A549、NCI-H460、HOP62、NCI-H596及びU2OS細胞からRNeasy kitを用いてRNAを抽出した。次に、得られたRNAから、SUPERSCRIPITIII PLATINUM TWO-STEP QRT-PCR(インビトロジェン社)を用いてcDNAを調製した。こうして得られたcDNAを鋳型にしてTaq-man RT-PCRを行うことで、それぞれの細胞中の候補遺伝子のmRNA量を定量した。

以上の解析によって発現変化の見られた遺伝子のなかから、発現変化が統計的に有意で、PKCiを調節するPI3Kパスウェイや、PKCiが関わる細胞極性関連因子などに注目してマーカー候補遺伝子を絞った。

[0177] 図16～23に示すとおり、PKCiotaの発現を抑制した場合、試験に供した5つの細胞全てにおいて、SNF1LK、CLDN12及びRPIAの3遺伝子はup-regulationされ、AKT3、HMGB3、NFIB及びPXDNの4遺伝子はdown-regulationされることが確認された。すなわち、これらの遺伝子は、PKCiotaの発現調節に関連して変化する遺伝子マーカーとして有用であることが確認できた。なお、図16～23中、■は無処置の場合の結果を表し、□はコントロールの結果を表し、斜線はPKC-iota siRNA処理した場合の結果を表す。

産業上の利用可能性

[0178] p53の発現・機能異常を原因とする癌に特異的に働くターゲット遺伝子としてPKC-iotaが見出されたことから、当該遺伝子を創薬標的とする化合物の評価が可能となる。p53の発現・機能の異常を原因とする癌は非常に多種に渡ることから、多くの癌の治療に有効な化合物の提供が可能となる。また、PKC-iotaの発現量を指標として診断を行うことにより、p53の発現・機能の異常を原因とする癌の診断が可能となる。

図面の簡単な説明

[0179] [図1]U2-OS細胞への変異型p53の導入の有無による細胞毒性の影響を検討した結果を示す図である。

[図2]A427細胞へのPKC-iotaのsiRNAの導入による細胞増殖の変化を検討した結果を示す図である。

[図3]A549細胞へのPKC-iotaのsiRNAの導入による細胞増殖の変化を検討した結果を示す図である。

[図4]LU99細胞へのPKC-iotaのsiRNAの導入による細胞増殖の変化を検討した結果を示す図である。

[図5]NCI-H460細胞へのPKC-iotaのsiRNAの導入による細胞増殖の変化を検討した結果を示す図である。

[図6]HOP62細胞へのPKC-iotaのsiRNAの導入による細胞増殖の変化を検討した結果を示す図である。

[図7]HOP92細胞へのPKC-iotaのsiRNAの導入による細胞増殖の変化を検討した結果を示す図である。

[図8]NCI-H322M細胞へのPKC-iotaのsiRNAの導入による細胞増殖の変化を検討した結果を示す図である。

[図9]NCI-H226細胞へのPKC-iotaのsiRNAの導入による細胞増殖の変化を検討した結果を示す図である。

[図10]PKC-iotaの阻害の有無及びp53の変異の有無によって生じるBADのリン酸化を確認した結果を示す図である。

[図11]p53の変異の有無(発現量の多少)とBcl-XLの結合量との関係を確認した結果を示す図である。

[図12]図12Aは、NCI-H460(E545K)細胞を用いてPKC-iotaの阻害による効果を確認した結果を示す図である。

[0180] 図12Bは、NCI-H596(E545K)細胞を用いてPKC-iotaの阻害による効果を確認した結果を示す図である。

[0181] 図12Aは、NCI-H1869(E545A)細胞を用いてPKC-iotaの阻害による効果を確認した結果を示す図である。

[図13]図13Aは、MCF7細胞を用いてPKC-iota及びPKC-zetaの阻害によるLLGL2のリン酸化の変化を確認した結果を示す図である。

[0182] 図13Bは、Hcc1419細胞を用いてPKC-iota及びPKC-zetaの阻害によるLLGL2のリン酸化の変化を確認した結果を示す図である。

[図14]常活性変異体PKC-iotaの発現誘導によるLLGL2のリン酸化の変化を確認した結果を示す図である。

[図15]PKC-iota阻害剤の添加によるLLGL2のリン酸化の変化を確認した結果を示す図である。

[図16]図16Aは、A549細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のPKC-iotaの発現量を示す図である。

[0183] 図16Bは、HOP62細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のPKC-iotaの発現量を示す図である。

[0184] 図16Cは、H460細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のPKC-iotaの発現量を示す図である。

[0185] 図16Dは、H596細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のPKC-iotaの発現量を示す図である。

[0186] 図16Eは、U2OS細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のPKC-iotaの発現量を示す図である。

[図17]図17Aは、A549細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のAKT3の発現量を示す図である。

[0187] 図17Bは、HOP62細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のAKT3の発現量を示す図である。

[0188] 図17Cは、H460細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のAKT3の発現量を3示す図である。

[0189] 図17Dは、H596細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のAKT3の発現量を示す図である。

[0190] 図17Eは、U2OS細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のAKT3の発現量を示す図である。

[図18]図18Aは、A549細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のHMGB3の発現量を示す図である。

[0191] 図18Bは、HOP62細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のHMGB3の発現量を示す図である。

[0192] 図18Cは、H460細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のHMGB3の発現量を示す図である。

[0193] 図18Dは、H596細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のHMGB3の発現量を示す図である。

[0194] 図18Eは、U2OS細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のHMGB3の発現量を示す図である。

[図19]図19Aは、A549細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のNFIBの発現量を示す図である。

[0195] 図19Bは、HOP62細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のNFIBの発現量を示す図である。

[0196] 図19Cは、H460細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のNFIBの発現量を示す図である。

[0197] 図19Dは、H596細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のNFIBの発現量を示す図である。

[0198] 図19Eは、U2OS細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のNFIBの発現量を示す図である。

[図20]図20Aは、A549細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のPXDNの発現量を示す図である。

[0199] 図20Bは、HOP62細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のPXDNの発現量を示す図である。

[0200] 図20Cは、H460細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のPXDNの発現量を示す図である。

[0201] 図20Dは、H596細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のPXDNの発現量を示す図である。

[0202] 図20Eは、U2OS細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のPXDNの発現量を示す図である。

[図21]図21Aは、A549細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のSNF1LKの発現量を示す図である。

[0203] 図21Bは、HOP62細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のSNF1LKの発現量を示す図である。

- [0204] 図21Cは、H460細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のSNF1LKの発現量を示す図である。
- [0205] 図21Dは、H596細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のSNF1LKの発現量を示す図である。
- [0206] 図21EAは、U2OS細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のSNF1LKの発現量を示す図である。
- [図22]図22Aは、A549細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のCLDN12の発現量を示す図である。
- [0207] 図22Bは、HOP62細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のCLDN12の発現量を示す図である。
- [0208] 図22Cは、H460細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のCLDN12の発現量を示す図である。
- [0209] 図22Dは、H596細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のCLDN12の発現量を示す図である。
- [0210] 図22Eは、U2OS細胞を用いてPKC-iotaの発現を抑制した場合のCLDN12の発現量を示す図である。

請求の範囲

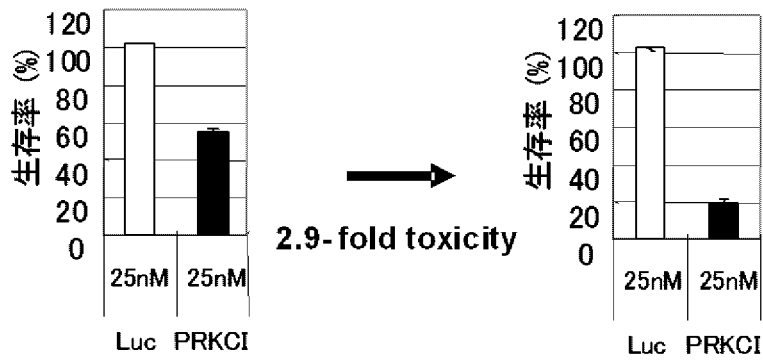
- [1] 癌の治療に有効な化合物の評価方法であって、
PKC-iota遺伝子を導入し、PKC-iotaを発現する細胞を調製する工程と、
該細胞に被検化合物を接触させる工程と、
該PKC-iotaに対する該被検化合物の特異的結合を検出する工程と、を含むことを特徴とする化合物の評価方法。
- [2] 癌の治療に有効な化合物の評価方法であって、
PKC-iota遺伝子を導入し、PKC-iotaを発現する細胞を調製する工程と、
該細胞に被検化合物を接触させる工程と、
該接触により生じた細胞内情報伝達物質の活性を測定する工程と、
該活性と被検化合物を接触させない場合の該細胞内情報伝達物質の活性とを比較する工程と、を含むことを特徴とする化合物の評価方法。
- [3] 癌の治療に有効な化合物の評価方法であって、
PKC-iota遺伝子を導入し、PKC-iotaを発現する細胞を調製する工程と、
該細胞に被検化合物を接触させる工程と、
該PKC-iotaの発現レベル又はPKC-iotaを介した細胞内情報伝達物質の発現レベルを測定する工程と、
を含むことを特徴とする化合物の評価方法。
- [4] 前記細胞内情報伝達物質が、BAD、LLGL2、HMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKからなる群より選択されるいずれか一つである、請求項2又は3に記載の化合物の評価方法。
- [5] 癌の治療に有効な化合物の評価方法であって、
被検化合物を、PKC-iotaに接触させる工程と、
該接触によるPKC-iotaの活性の変化を検出する工程と、を含むことを特徴とする化合物の評価方法。
- [6] 癌の治療に有効な化合物の評価方法であって、
BAD又はLLGL2存在下で、被検化合物をPKC-iotaに接触させる工程と、
該接触によるPKC-iotaの活性の変化を検出する工程と、を含むことを特徴とする化合物の評価方法。

化合物の評価方法。

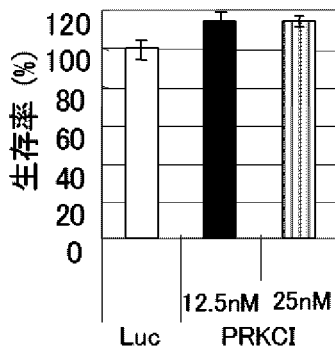
- [7] 前記癌がp53の機能異常に起因することを特徴とする請求項1～6のいずれか一項に記載の化合物の評価方法。
- [8] 前記癌がPI3キナーゼ(Phosphatidyl Inositol 3-kinase)の機能異常に起因することを特徴とする請求項1～6のいずれか一項に記載の化合物の評価方法。
- [9] 被検組織又は被検細胞における、PKC- ι 遺伝子の発現量を測定する工程と、
該発現量と正常組織又は正常細胞におけるPKC- ι 遺伝子の発現量とを比較する工程と、
比較した結果、被検組織又は被検細胞におけるPKC- ι 遺伝子の発現量が正常組織又は正常細胞におけるPKC- ι 遺伝子の発現量より有意に多いか否かを判断する工程と、を含む癌の診断方法。
- [10] 被検組織又は被検細胞における、PKC- ι の活性を測定する工程と、
該活性と正常組織又は正常細胞におけるPKC- ι の活性とを比較する工程と、
比較した結果、被検組織又は被検細胞におけるPKC- ι の活性が正常組織又は正常細胞におけるPKC- ι の活性より有意に高いか否かを判断する工程と、を含む癌の診断方法。
- [11] PKC- ι 阻害剤を投与した被検体由来の組織におけるPKC- ι の活性を測定する測定工程と、
PKC- ι 阻害剤投与前後の活性を比較する比較工程を含む、PKC- ι 阻害剤の効果の予測又は診断方法。
- [12] PKC- ι 阻害剤の薬効を予測又は診断する遺伝子マーカーであって、
該遺伝子が、BAD、LLGL2、HMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKからなる群より選択されるいずれか一つである、遺伝子マーカー。
- [13] 請求項12に記載の遺伝子マーカーを備える、マイクロアレイ。
- [14] PKC- ι 阻害剤の薬効を予測又は診断するタンパク質マーカーであって、
該タンパク質が、BAD、LLGL2、HMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKからなる群より選択されるいずれか一つである、タンパク質マーカー。
- [15] 請求項14に記載のタンパク質マーカーを備える、マイクロアレイ。

- [16] 請求項14に記載のタンパク質マーカーを検出可能な抗体を含む、癌診断キット。
- [17] 請求項14に記載のタンパク質マーカーを検出可能な抗体を備える、抗体アレイ。
- [18] PKC-iota阻害剤を投与した被検体由来の組織におけるHMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKからなる群より選択されるいずれか一つの遺伝子を検出する工程と、
PKC-iota阻害剤投与前後の発現量を比較する工程を含む、PKC-iota阻害剤の効果の予測又は診断方法。
- [19] 前記検出に用いる検出手段がPCR又はDNAマイクロアレイである、請求項18に記載のPKC-iota阻害剤の効果の予測又は診断方法。
- [20] PKC-iota阻害剤を投与した被検体由来の組織におけるHMGB3、NFIB、PXDN、CLDN12、RPIA、AKT3及びSNF1LKからなる群より選択されるいずれか一つのタンパク質の活性を測定する工程と、
PKC-iota阻害剤投与前後の活性を比較する工程を含む、PKC-iota阻害剤の効果の予測又は診断方法。
- [21] PKC-iota阻害剤を投与した被検体由来の組織におけるBAD又はLGLL2のリン酸化レベルを測定する工程と、
PKC-iota阻害剤投与前後のリン酸化レベルを比較する工程を含む、PKC-iota阻害剤の効果の予測又は診断方法。

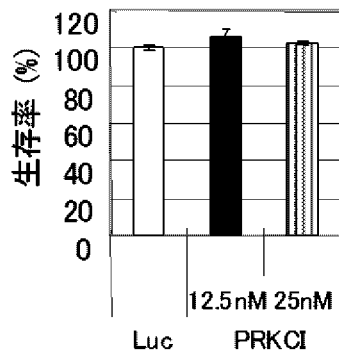
[図1]



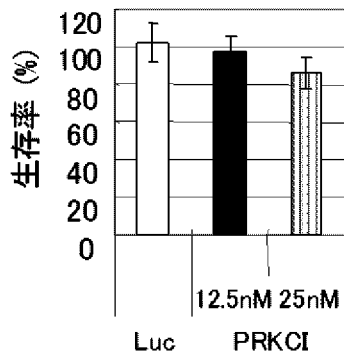
[図2]



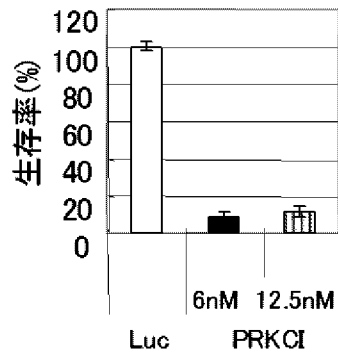
[図3]



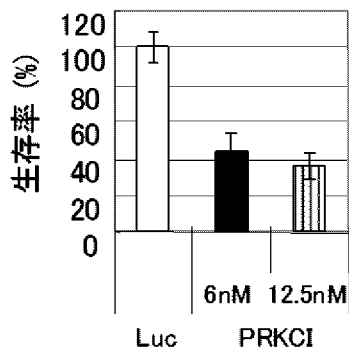
[図4]



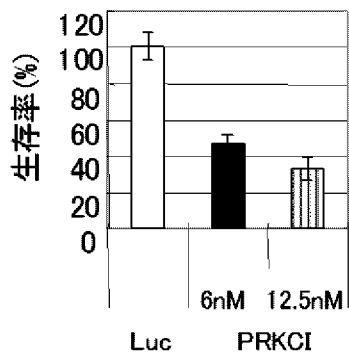
[図5]



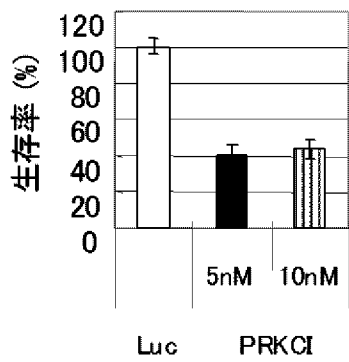
[図6]



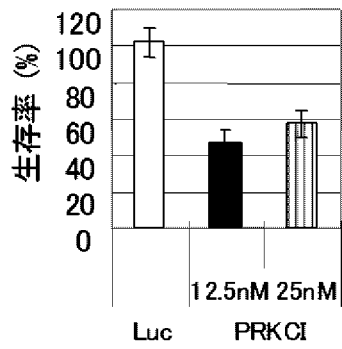
[図7]



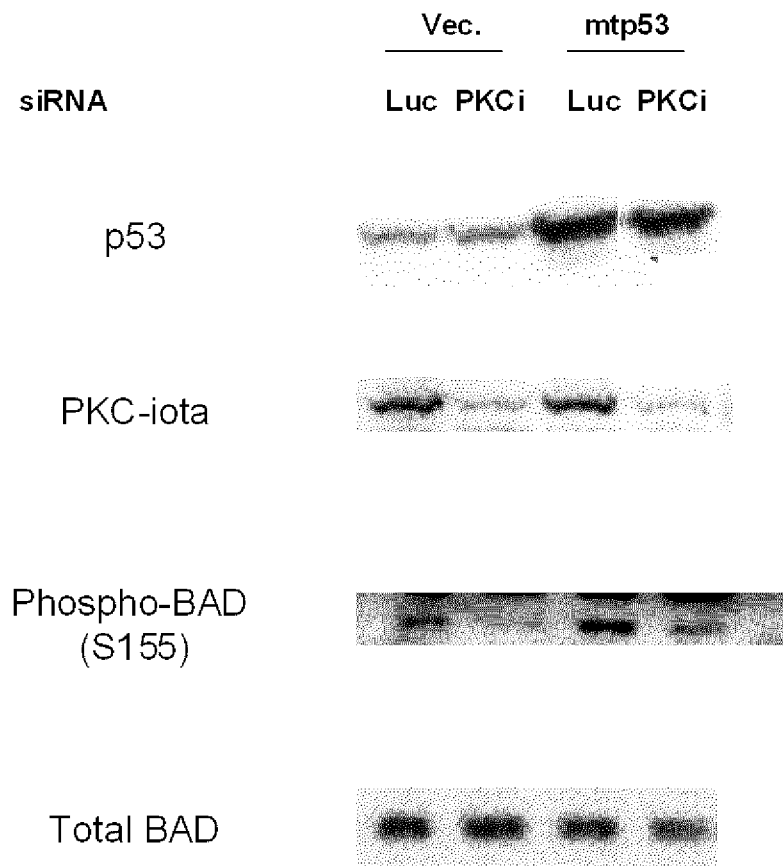
[図8]



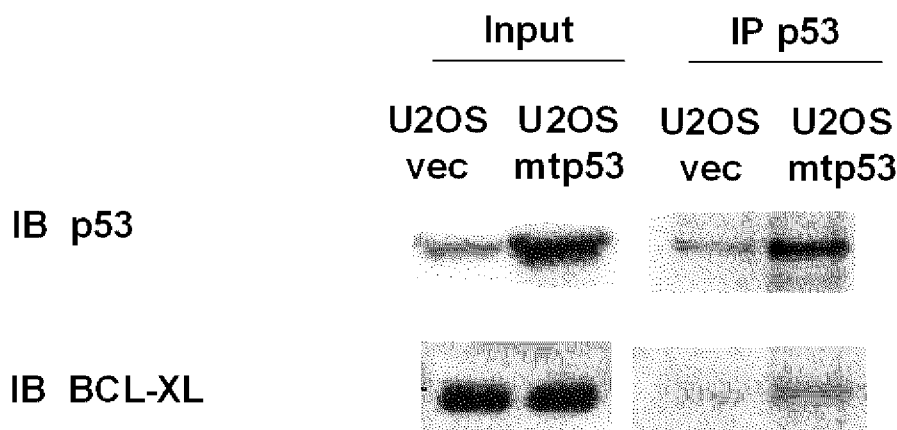
[図9]



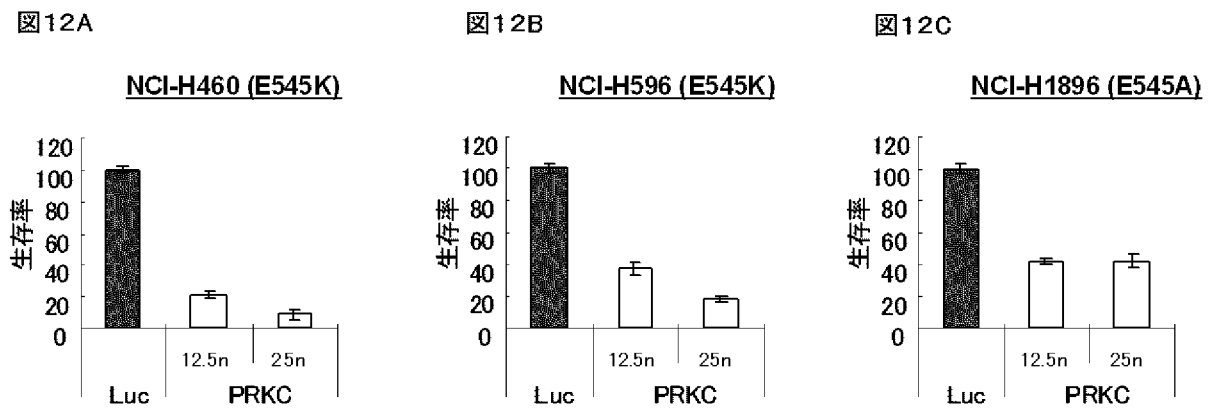
[図10]



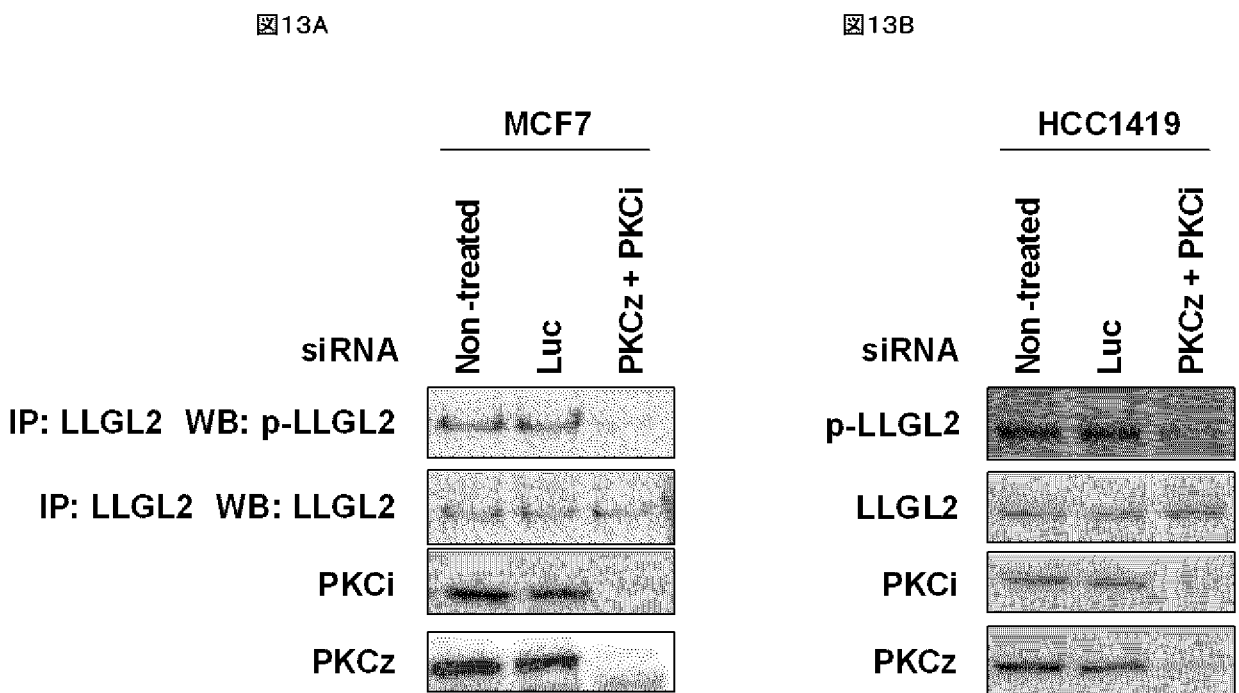
[図11]



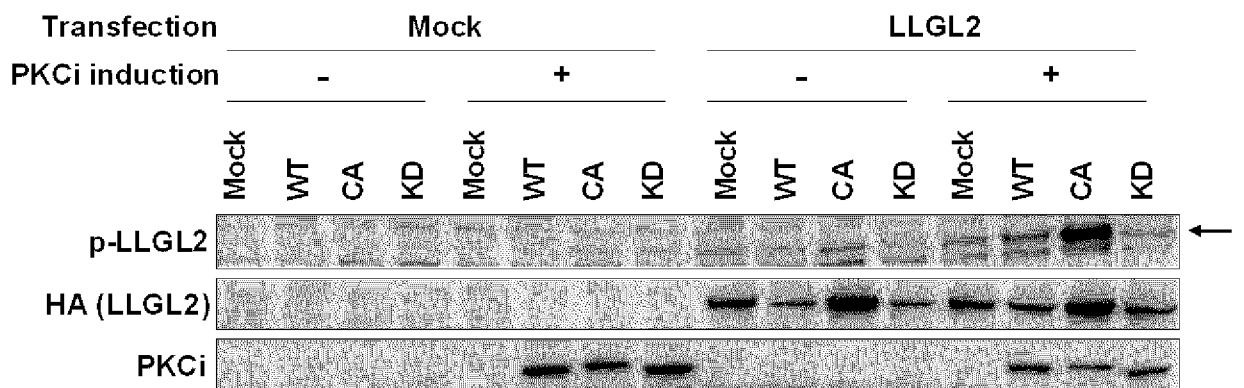
[图12]



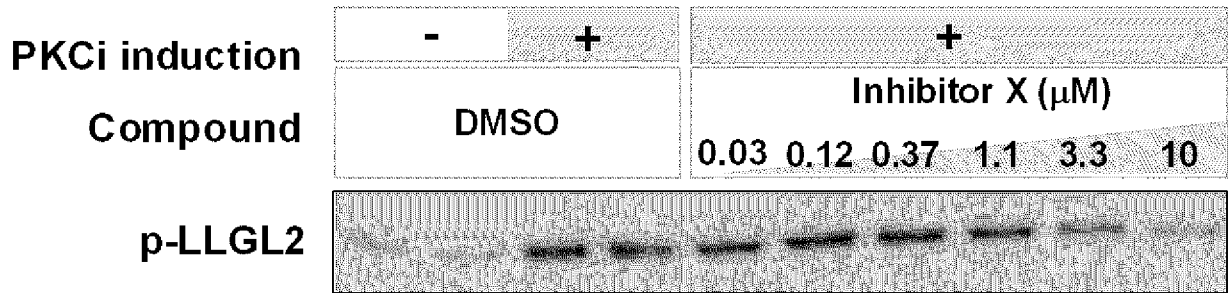
[图13]



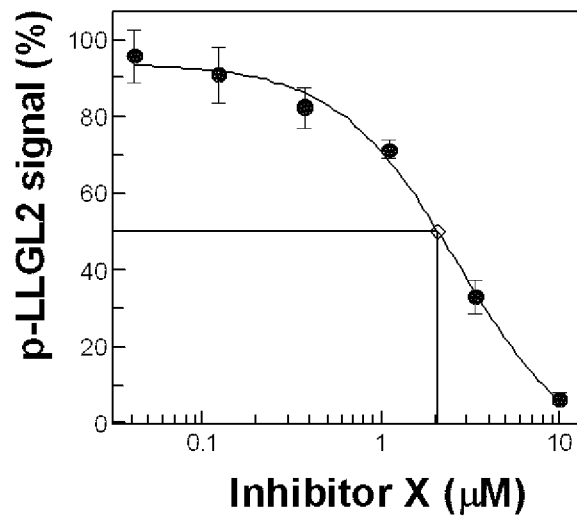
[图14]



[図15]



Phospho-LLGL2 ELISA



[圖] 16

圖 16A

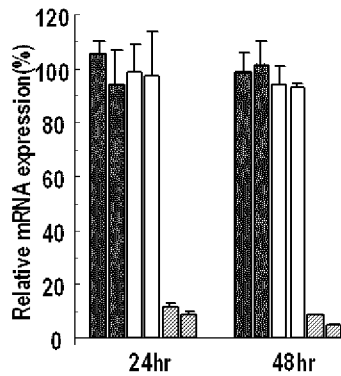


圖 16B

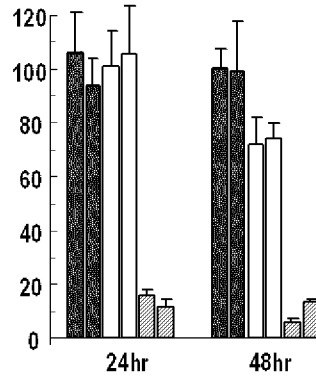


圖 16C

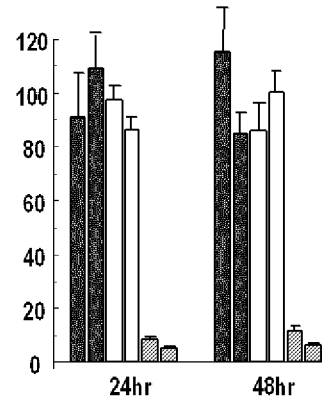


圖 16D

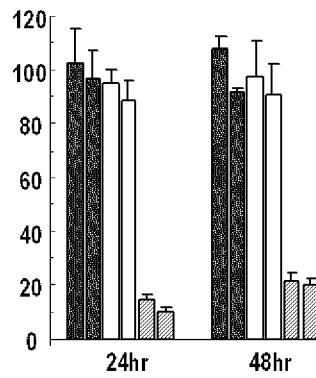
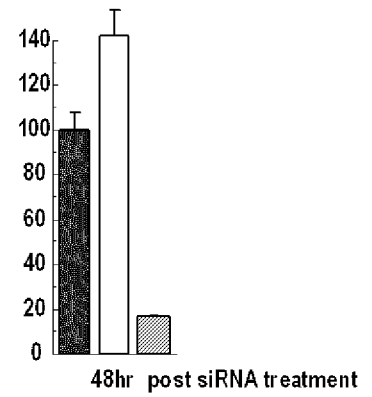


圖 16E



[圖] 17

圖 17A

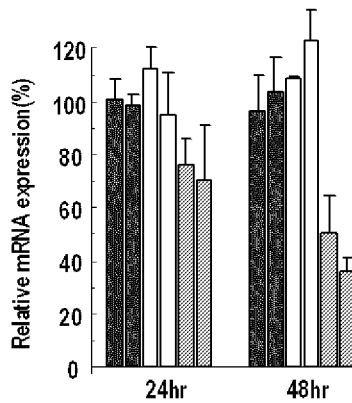


圖 17B

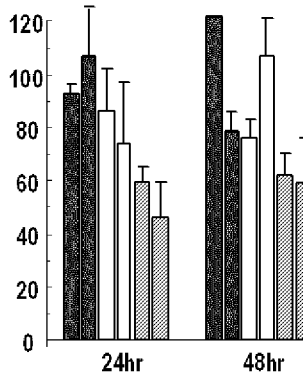


圖 17C

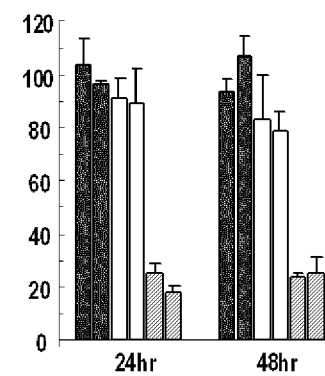


圖 17D

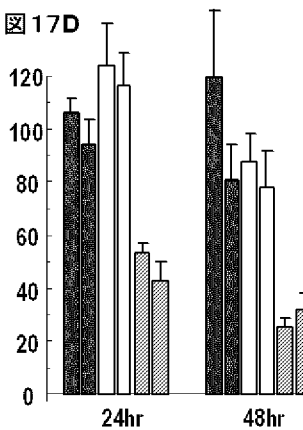
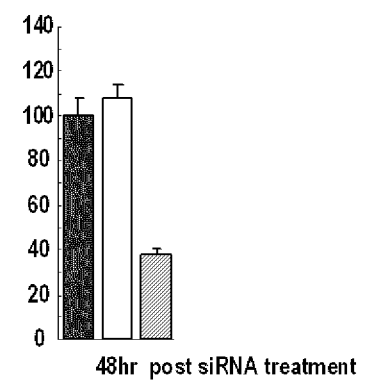
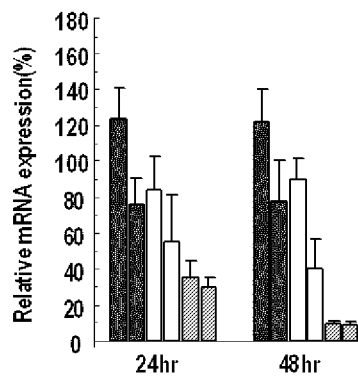


圖 17E

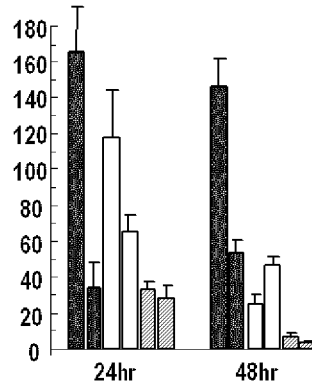


[18]

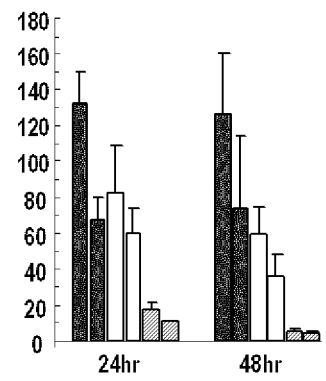
18A



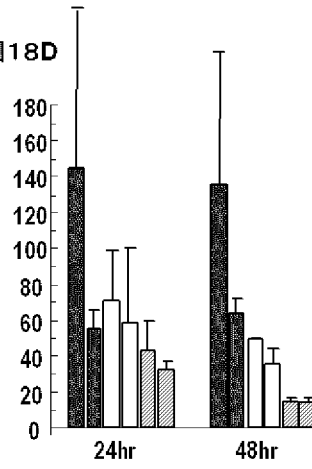
18B



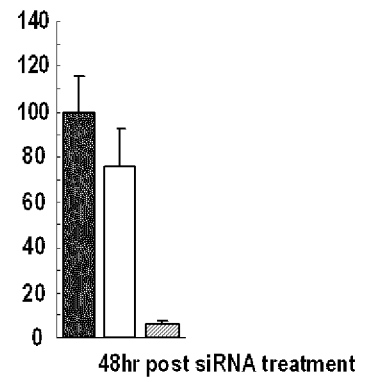
18C



18D



18E



[図] 19

図 19A

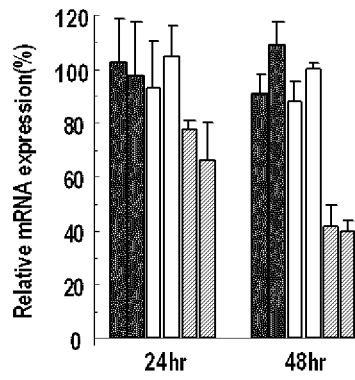


図 19B

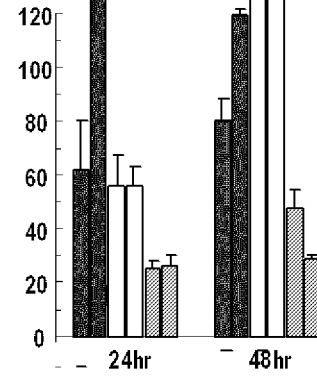


図 19C

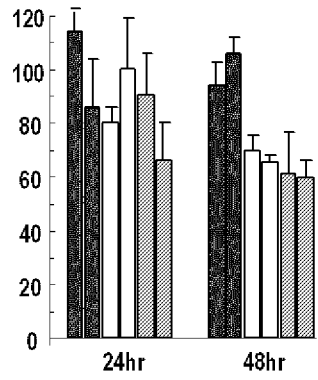


図 19D

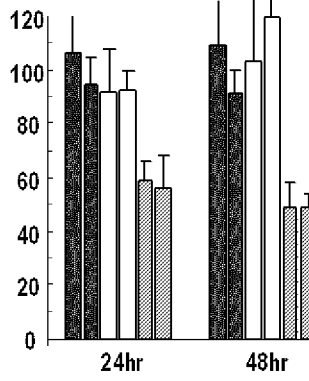
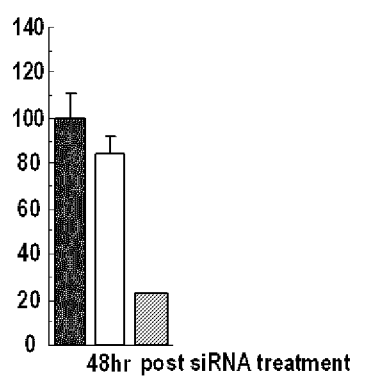


図 19E



[図20]

図20A

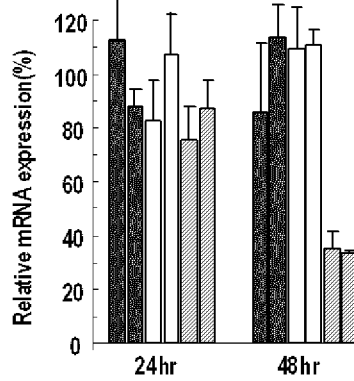


図20B

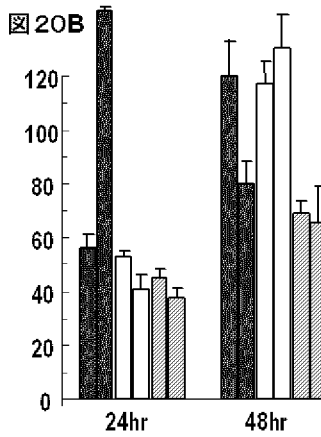


図20C

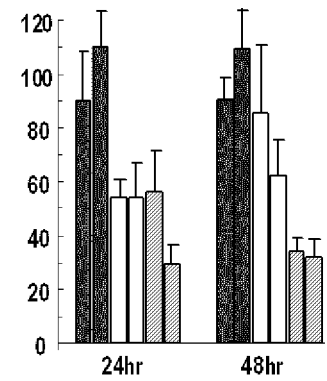


図20D

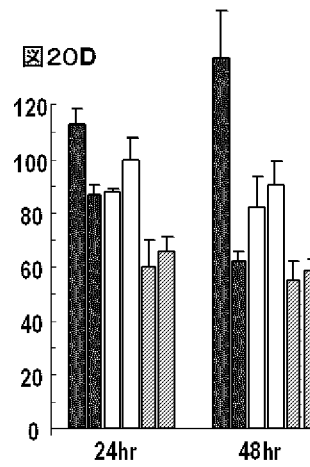
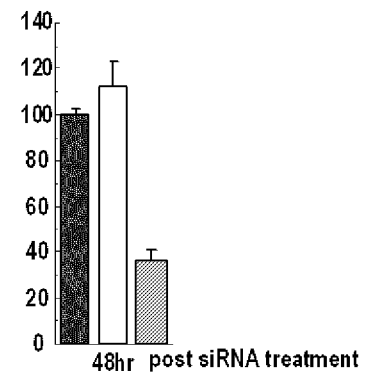


図20E



[図21]

図21A

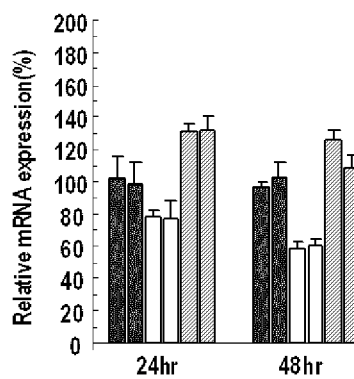


図21B

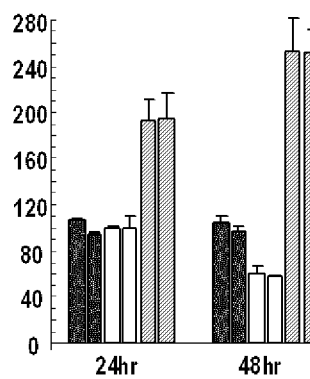


図21C

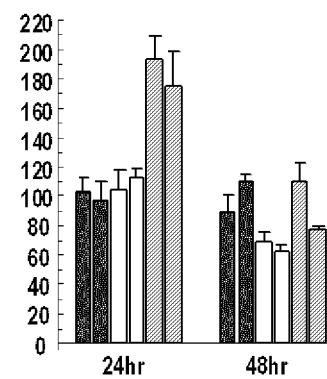


図21D

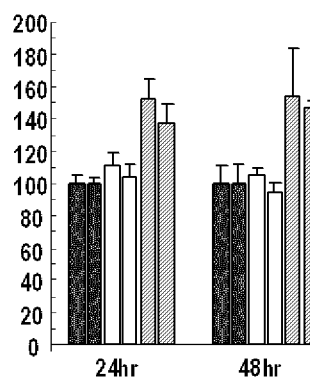
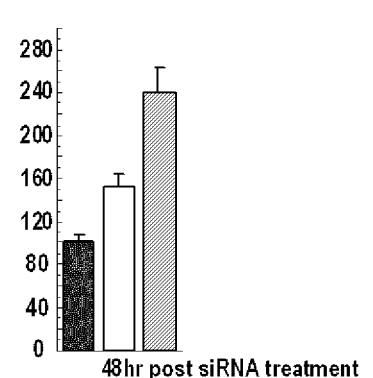


図21E



[図22]

図22A

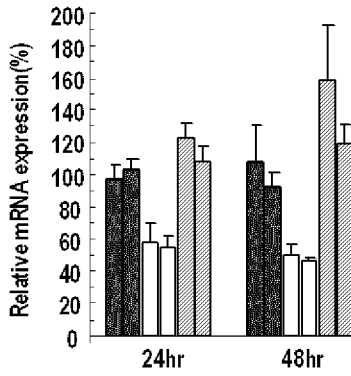


図22B

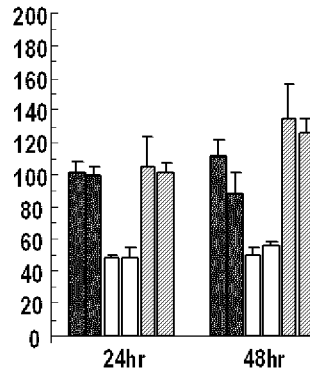


図22C

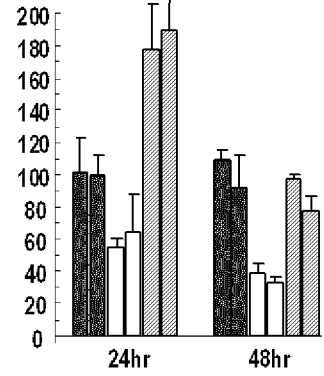


図22D

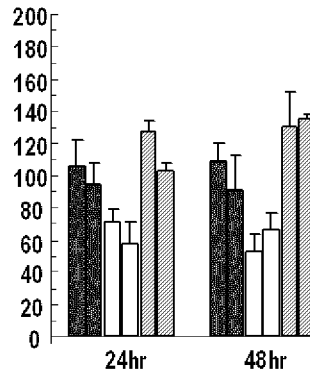
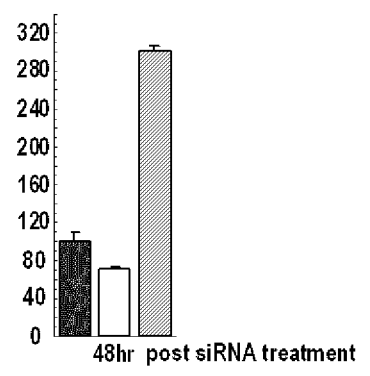


図22E



[図23]

図23A

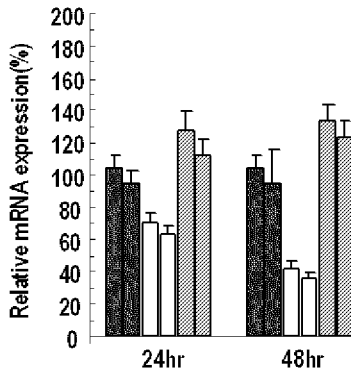


図23B

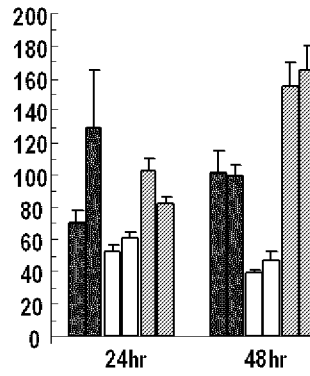


図23C

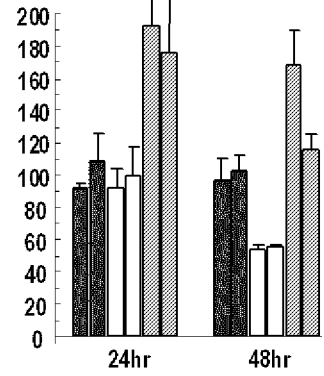


図23D

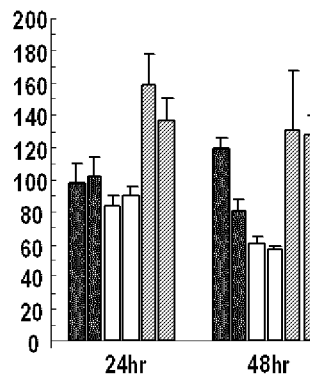
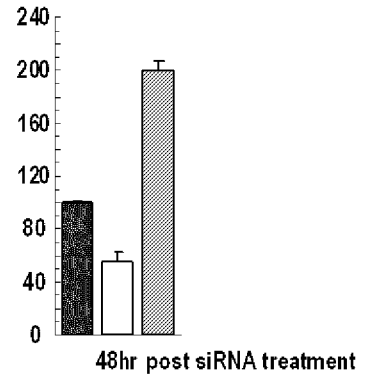


図23E



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/066653

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/48(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/02, C12Q1/48, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2007	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2007

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

BIOSIS/WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, PubMed, JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/ A	MESSERSCHMIDT A. et al., Crystal structure of the catalytic domain of human atypical protein kinase C- ι reveals interaction mode of phosphorylation site in turn motif., J.Mol.Biol., 2005, Vol.352, No.4 p.918-931	1-6,11-21/ 7,8
X/ A	REGALA R.P. et al., Atypical protein kinase Ciota plays a critical role in human lung cancer cell growth and tumorigenicity., J.Biol.Chem., 2005, Vol.280, No.35, p.31109-31115	1-6,11-21/ 7,8
X/ A	MURRAY N.R. et al., Protein kinase C ι is required for Ras transformation and colon carcinogenesis in vivo., J.Cell Biol., 2004, Vol.164, No.6, p.797-802	1-6,11-21/ 7,8

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 September, 2007 (13.09.07)

Date of mailing of the international search report
25 September, 2007 (25.09.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/066653

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/ A	JIN Z.et al., Survival function of protein kinase C iota as a novel nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-activated bad kinase., J.Biol.Chem., 2005, Vol.280, No.16, p.16045-16052	1-6,11-21/ 7,8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/066653

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 9, 10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 9 and 10 pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/48(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12Q1/02, C12Q1/48, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2007年
 日本国実用新案登録公報 1996-2007年
 日本国登録実用新案公報 1994-2007年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 BIOSIS/WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, PubMed, JSTPlus (JDream2)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/ A	MESSERSCHMIDT A. et al., Crystal structure of the catalytic domain of human atypical protein kinase C-iota reveals interaction mode of phosphorylation site in turn motif, J.Mol.Biol., 2005, Vol. 352, No. 4 p. 918-931	1-6, 11-21/ 7, 8
X/ A	REGALA R.P. et al., Atypical protein kinase Ciota plays a critical role in human lung cancer cell growth and tumorigenicity., J.Biol.Chem., 2005, Vol. 280, No. 35, p. 31109-31115	1-6, 11-21/ 7, 8

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

<p>* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

国際調査を完了した日 13.09.2007	国際調査報告の発送日 25.09.2007
--------------------------	--------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 富永 みどり 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B	9152
-------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------	----	------

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/ A	MURRAY N.R. et al., Protein kinase C iota is required for Ras transformation and colon carcinogenesis in vivo., J.Cell Biol., 2004, Vol.164, No.6, p.797-802	1-6,11-21/ 7,8
X/ A	JIN Z. et al., Survival function of protein kinase C iota as a novel nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-activated bad kinase., J.Biol.Chem., 2005, Vol.280, No.16, p.16045-16052	1-6,11-21/ 7,8

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 9、10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 9、10 は、人体の診断方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。