

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5797554号
(P5797554)

(45) 発行日 平成27年10月21日 (2015. 10. 21)

(24) 登録日 平成27年8月28日 (2015. 8. 28)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 A
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	G O 1 N 33/53 D

請求項の数 2 (全 54 頁)

(21) 出願番号	特願2011-513442 (P2011-513442)	(73) 特許権者	509338400
(86) (22) 出願日	平成21年6月9日 (2009. 6. 9)		ベルゲン・テクノロジーヴァーフォーリン
(65) 公表番号	特表2011-525352 (P2011-525352A)		グ・アクティーゼルスカブ
(43) 公表日	平成23年9月22日 (2011. 9. 22)		ノルウェー国 5 0 0 6 ベルゲン, トル
(86) 国際出願番号	PCT/N02009/000214		モーレンズゲート 5 1
(87) 国際公開番号	W02009/151337	(74) 代理人	100117787
(87) 国際公開日	平成21年12月17日 (2009. 12. 17)		弁理士 勝沼 宏仁
審査請求日	平成24年5月29日 (2012. 5. 29)	(74) 代理人	100091487
(31) 優先権主張番号	20082550		弁理士 中村 行孝
(32) 優先日	平成20年6月9日 (2008. 6. 9)	(74) 代理人	100120617
(33) 優先権主張国	ノルウェー (N0)		弁理士 浅野 真理
(31) 優先権主張番号	20090358	(74) 代理人	100126099
(32) 優先日	平成21年1月23日 (2009. 1. 23)		弁理士 反町 洋
(33) 優先権主張国	ノルウェー (N0)		
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規レチノイド誘導因子およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

欠失 5 q を有する骨髓異形成 (M D S , 骨髓異形成症候群)、急性骨髓性白血病 (A M L)、乳癌または黒色腫の検出を補助するための方法であって、配列番号 1 もしくは配列番号 2 の配列を含む核酸の発現レベル、または配列番号 3 の配列を含むタンパク質の発現レベルを *in vitro* で検出することを含んでなる、方法。

【請求項 2】

前記タンパク質の発現レベルが抗体の使用により決定される、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の分野】

【0 0 0 1】

本発明は、新規レチノイド応答性核酸、および新規タンパク質に関する。さらに、本発明は、様々な疾患におけるかかる核酸またはタンパク質の使用、ならびに様々な疾患の治療、診断および予後のためのその使用、さらにレチノイド類に対する応答性の予後のための方法のためのその使用にも関する。

【発明の背景】

【0 0 0 2】

レチノイド類は多くのヒト組織において抗癌性を有する。これらの薬剤は、急性前骨髄球性白血病 (A P L) の治療においてそれらの有効性が特に証明されており、急性前骨髄球性白血病はこれらの薬剤に対する応答性のモデルとして用いることができる癌である。

重要なことには、レチノイド受容体は十分に特定されており（RAR、RXR、PML-RAR）この20年広く研究されているが、それらの抗増殖性および抗癌性に関するこれらの標的遺伝子の大部分はまだ明らかにされないままである。本発明者らは、マイクロアレイアプローチにより、本発明者らが初めて機能的に特徴付けRINF（レチノイド誘導核因子(Retinoid-Inducible Nuclear Factor)）と名付けた核因子をコードする、レチノイド類の新たな標的遺伝子、CXXC5を同定した。

【0003】

RINF発現は、レチノイド類によって引き起こされる白血病細胞の最終分化に必要であるように思われる。実際には、RINF発現が白血病細胞のレチノイド誘導性分化や正常CD34+前駆体のサイトカイン誘導性骨髄造血に関連があるだけでなく、さらに、シ

ョートヘアピン型RNA(shRNA)干渉がこの遺伝子について正常骨髄造血および腫瘍性骨髄造血の両方において調節機能を誘因する。また、RINFは癌において重要な役割を果たすこともある。興味深いことに、RINF遺伝子は骨髄性白血病（急性骨髄性白血病[AML] / 骨髄異形成[MD5]）では欠失していることが多い小領域5q31.3に局在する。

10

【0004】

造血幹細胞の最終成熟顆粒球への分化は、系統限定転写因子により調整される遺伝子群の協調的発現を必要とする多段階プロセスである。これまでのところ、造血に不可欠であると証明されている転写因子は比較的少数である。これらの因子の脱調節または突然変異は、細胞の運命を分化から増殖へと変え、骨髄、血液、および他の組織における成熟停止および未成熟芽球の蓄積を特徴とする悪性血液疾患群である急性骨髄性白血病(AML)の一因となり得る。

20

【0005】

急性前骨髄球性白血病(APL)としても知られるAML-M3サブタイプ(the French-American-British(FAB)分類による)は、顆粒球への分化の前骨髄球段階において阻止される白血病芽球のクローン性増加に相当する。この病変は、t(15;17)転座を遺伝的特徴とし、最終分化を回復する転写に基づく療法により治療した最初の癌の代表である。実際には、この病変において、薬理学的用量の全トランス型レチノイン酸(ATRA)は白血病芽球の最終成熟を引き起こす。分子レベルにおいて、ATRAは、APL細胞においてレチノイン酸受容体(RAR、PML-RAR...)のリガンドとして働くことが分かっており、下流の標的遺伝子の転写活性化を調節する。実験モデル、NB4細胞系統を用いた広範な研究にもかかわらず、これまでのところ前骨髄球細胞のレチノイド誘導性分化に実際に不可欠であることが示されている、転写因子をコードする標的遺伝子はほんの数種類である。

30

【発明の概要】

【0006】

本発明者らは、マイクロアレイアプローチを用いることにより、NB4細胞においてレチノイド類により早期に誘導され、ATRAによる最終分化の回復に関与する可能性がある転写因子をコードするいくつかの新規遺伝子を同定した。レチノイド処置により誘導されるこれらの遺伝子の1つは、本発明者らがRINF（レチノイド誘導核因子）と名付けた核因子をコードする。RNA干渉によるRINF無効化は、レチノイド耐性表現型を強化することによりNB4細胞におけるATRAの分化作用を排除し、正常CD34+骨髄前駆体のサイトカイン誘導性顆粒球分化を遅延させることから、骨髄分化におけるRINFの重要で一般的な調節的役割が示される。

40

【発明の具体的説明】

【0007】

本発明の第一の実施態様は、配列番号1および配列番号2の配列またはその機能的断片もしくは変異体、またはそれとハイブリダイズ可能な機能的に同等の単離DNA配列、またはそれに対応するmRNAを含んでなることを特徴とする新規レチノイド応答性核酸に関する。

50

【 0 0 0 8 】

本発明の第二の実施態様は、配列番号 3 (C X X C 5) の配列またはその機能的断片もしくは変異体を含んでなることを特徴とするタンパク質またはタンパク質誘導体に関する。

【 0 0 0 9 】

本発明の第三の実施態様は、様々な疾患の予防および/または治療のための医薬組成物の製造のための、請求項 2 に記載のタンパク質もしくはタンパク質配列、または請求項 1 に記載の核酸の使用に関する。

【 0 0 1 0 】

好ましい実施態様は、哺乳類における、造血疾患の予防および/または治療、または造血細胞の分化の増進に関する。さらなる実施態様は、in vitroまたは哺乳類における造血細胞の分化および/または増殖増進の障害または阻止に関する。

10

【 0 0 1 1 】

前記造血細胞は、骨髄細胞、末梢血液細胞、臍帯血液細胞であり得、その細胞は腫瘍性または非腫瘍性であり得る。

【 0 0 1 2 】

好ましい使用は、リンパ系細胞または急性骨髄性白血病細胞などの細胞における分化の回復のための使用である。

【 0 0 1 3 】

前記造血疾患は、骨髄異形成 (M D S , 骨髄異形成症候群)、急性骨髄性白血病 (A M L)、急性リンパ性白血病 (A L L)、骨髄増殖性症候群 (M P S)、慢性骨髄性白血病 (C M L) または慢性リンパ性白血病 (C L L) であり得る。

20

【 0 0 1 4 】

好ましい実施態様は、癌の予防および/または治療に関する。

【 0 0 1 5 】

前記癌は、白血病、(骨髄異形成 (M D S , 骨髄異形成症候群)、急性骨髄性白血病 (A M L)、急性リンパ性白血病 (A L L)、骨髄増殖性症候群 (M P S)、慢性骨髄性白血病 (C M L)、慢性リンパ性白血病 (C L L) および固形腫瘍 (乳癌、黒色腫、肺癌、甲状腺癌、前立腺癌、神経芽腫、および腎癌) を含んでなる群から選択される癌タイプのうちの 1 つであり得る。

30

【 0 0 1 6 】

本発明のさらなる態様は、それを必要とする哺乳類において、請求項 1 に記載の核酸の発現を活性化するための、および/または請求項 2 に記載のタンパク質もしくはタンパク質配列の発現を増強するための、レチノイドの使用に関する。好ましい実施態様は A T R A である。

【 0 0 1 7 】

本発明のさらなる態様は、C X X C 5 の発現を、レトロウイルスまたはレンチウイルスのベクター (過剰発現) により、または s h R N A 分子 (抑制) により調節する方法に関する。

【 0 0 1 8 】

本発明のさらなる実施態様は、レチノイド応答性の予後の、または疾患の予後のための方法に関する。

40

【 0 0 1 9 】

本発明のさらなる実施態様は、癌または造血疾患、または骨髄造血減少状態の診断のための方法であって、本発明による核酸の発現レベルおよび/または状態、または本発明によるタンパク質もしくはタンパク質配列の発現レベルおよび/または状態の検出を含んでなる方法に関する。好ましい実施態様は、急性前骨髄球性白血病 (A P L) 遺伝子型の診断に関する。もう 1 つの好ましい実施態様は、白血病、前白血病 (骨髄異形成) または癌の状態の診断に関する。好ましい実施態様は、診断のために抗体を用いる。

【 0 0 2 0 】

50

本発明のさらなる態様は、モノクローナルまたはポリクローナル抗体の製造のために、本発明によるタンパク質配列または核酸を用いる。

【0021】

さらなる態様は、分子を癌細胞にターゲティングする方法に関する。

【0022】

さらなる態様は、請求項2に記載のタンパク質またはタンパク質配列と、または請求項1に記載のヌクレオチドと相互作用することができる分子に関する。

【0023】

定義

造血(Hematopoiesis)：

造血(Hematopoiesis) (古代ギリシャ語：「haima」血液；「poiesis」作ること) (hemopoiesisと呼ばれることもある) は、血液細胞成分 (赤血球、血小板、顆粒球 (好中球、好塩基球、好酸球)、単球、マクロファージ、およびリンパ球 (B、T およびNK) を形成することである。血液細胞成分は総て造血幹細胞に由来する。

【0024】

造血細胞：

造血組織の任意の細胞 (リンパ系、骨髄の細胞を含む)。この細胞は、幹細胞 (HSC)、前駆細胞 (骨髄またはリンパ系の共通前駆体)、委任細胞または最終分化血液細胞であり得る。

【0025】

骨髄造血：骨髄幹細胞による骨髄における多能性造血幹細胞からの骨髄細胞の形成。骨髄造血とは、一般的に、単球および顆粒球などの、血液中の白血球の生産を意味する。このプロセスは、リンパ系組織において見られるマクロファージおよび樹状細胞の前駆細胞も生産する。血液学において、「骨髄細胞」という用語は、リンパ球ではない任意の白血球を記載しさらに顆粒球、単球、マクロファージおよび樹状細胞に加えて赤血球および血小板 (erythrocytes (platelet)) も含むように用いられる。

【0026】

急性骨髄性白血病 (Acute myeloid leukemia) (AML)：

急性骨髄性白血病 (AML) (acute myelogenous leukemiaとしても知られる) は、骨髄に蓄積し正常な血液細胞の生産を妨げる異常細胞の急速増殖を特徴とする白血球の骨髄系癌である。AMLの症状は正常な骨髄が白血病細胞で置き換えられることによって起こり、その結果、赤血球、血小板、および正常な白血球の減少が起こる。これらの症状としては、倦怠感、息切れ、あざや出血が生じ易いこと、および感染症の危険性の増加が挙げられる。AMLは成熟時計を特徴とする。the French-American-British (FAB) 分類によれば、AMLの8つのサブタイプは、分化が阻止される段階、関係している造血コンパートメント、および白血病細胞の成熟度に基づいて区別することができる (M0 ~ M7)。

【0027】

遺伝子またはタンパク質の「状態」とは、その遺伝子またはタンパク質の配列解析または発現レベル、および遺伝子のコピー数、およびメチル化状態を意味する。

【0028】

レチノイド類：ビタミンAと構造的にまたは機能的に関連している化学化合物の種類。本願において、レチノイドという用語は、レチノイン酸受容体と結合し活性化することができる任意の化合物を意味する。これらの受容体は、直接標的遺伝子のプロモーター中に存在するレチノイン酸応答性エレメント (RARE) に結合し通常それらのリガンド (例えば、レチノイン酸) との結合後に遺伝子の転写を活性化する。

【0029】

本明細書において、レチノイド応答性遺伝子またはタンパク質は、レチノイド (レチノイン酸など) による処置により発現レベルが誘導される遺伝子またはタンパク質である。

【0030】

10

20

30

40

50

レチノイド応答性の予後：

レチノイド類による療法に应答するのは白血病または癌の細胞のうちのほんのわずかである。さらに、この療法に対する臨床応答は通常、患者に有益な効果があるまで数日または数週間の処置を必要とする。これらの薬剤による疾患治療の後の結果を予測することができる、レチノイド応答性についての初期遺伝子またはタンパク質バイオマーカーの存在は、患者がかかる治療を受けるべきかまたは別の治療を受けるべきかを臨床医が判断するに際して助けになる重要な予後指標となるであろう。

【実施例】【0031】実験の節材料および方法細胞培養、処置およびRNA調製

ヒト乳癌細胞(MCF7)および骨髓細胞(NB4、NB4-LR1、NB4-LR2、K562、LAMA-84およびHL60)を、10%ウシ胎児血清(Biochrom AG)、2 mM L-グルタミン、50 単位/ml ペニシリンGおよび50 µg/ml ストレプトマイシン(Invitrogen)を添加したRPMI 1640 培地(Invitrogen)で培養し、5% CO₂ / 加湿雰囲気中暗所にて37 °C でインキュベートした。ヒト骨髓一次CD34+ 細胞(StemCell technologies)のin vitro増加のため、本発明者らは、上記培地に20 ng/ml のインターロイキン3(IL3)、20 ng/ml の顆粒球-コロニー刺激因子(G-CSF)およびPeprotechから購入した幹細胞因子(SCF)50 ng/ml を添加した。Duprez E, Ruchaud S, Houge G, et al. A retinoid acid 'resistant' t(15;17) acute promyelocytic leukemia cell line: isolation, morphological, immunological, and molecular features. Leukemia. 1992; 6: 1281-1287. において従前に記載されているようにMay-Grunwald-Giemsa(MGG)染色による形態学によりおよびニトロブルーテトラゾリウム(NBT)還元解析により成熟を評価した。細胞密度は、コールターカウンター(Beckman)を使用して決定した。細胞増殖は、式： $PD = \log(N/N_0) / \log 2$ (式中、Nは計数した細胞数であり、N₀は第0日目に播種した細胞数である)により算出される集団倍加数(PD)として表した。ATRA(Sigma)により処置した細胞または処置していない細胞と一緒に集め、Trizol(Invitrogen)またはRNeasy mini kit(Qiagen)を用いるRNA調製のためにそのまま-80 °C で保存した。抽出されたRNAの収量および品質をNanoDrop(登録商標)ND-1000 分光光度計(NanoDrop Technologies)により評価した。

【0032】マイクロアレイハイブリダイゼーション

マイクロアレイ実験は総て、化学発光検出に基づいているApplied Biosystems(AB) Expression Array systemを使用して行った。ABヒトマイクロアレイは、27,868の個別ヒト遺伝子を表す31,700のオリゴヌクレオチドプローブ(60 量体)を含む。標識する前に、抽出されたRNAの量および品質をNanoDrop(登録商標)ND-1000 分光光度計およびAgilent 2100 バイオアナライザ(Agilent technologies)により確認した。AB Chemiluminescent RT-IVT labelling kit version 2.0(PN 4363252, Roche)を利用して各サンプルから2 µgの全RNAを(DIG-dUTPを用いて)ジゴキシゲニン(DIG)標識cRNAに変換した。DIG標識cRNAの量(50~70 µg)および品質は、NanoDrop 分光光度計およびAgilent 2100 バイオアナライザにより制御した。20 µgのDIG標識cRNAをAB Human Genome Survey Microarray version 1.0と製造業者の使用説明書によりハイブリダイズした。マイクロアレイの化学発光シグナル検出、画像取得および画像解析は、AB 1700 Chemiluminescent Microarray Analyser(PN 4338036)において製造業者のプロトコール(PN 4339629)に従って行った。画像に

10

20

30

40

50

自動グリッド表示し、化学発光シグナルを定量し、バックグラウンドについて補正し、最後に、AB 1700 Chemiluminescent Microarray Analyser software v1.03 (PN 4336391) を使用してスポットおよび空間的に正規化した。解析には合計6つのマイクロアレイを用いた。3時間の時点においてNB4サンプルについて2つのレプリケート(独立した標識および独立したハイブリダイゼーション工程)を作成した。アレイ間正規化のため、各アレイについて同じシグナル強度中央値を達成するために本発明者らは総てのマイクロアレイでグローバルな中央値正規化を行った。マイクロアレイ実験についてのM I A M E 対応の資料は、欧州バイオインフォマティクス研究所(the European Bioinformatics Institute) (www.ebi.ac.uk/arrayexpress)のArray Expressに受託番号E - B A S E - 7で寄託されている。

10

【0033】

マイクロアレイデータ解析および遺伝子分類

Applied Biosystems Expression System softwareを使用してシグナルおよびシグナル対ノイズ比(SIH)を抽出した。研究には5,000を超える平均正規化シグナル強度と600より低いバックグラウンド中央値を示すマイクロアレイだけを含めた。シグナル強度をDysvik B, Jonassen I. J-Expressに従ってJ-Express Pro V2.7ソフトウェア(MolMine, Bergen, Norway)にインポートし:Java. Bioinformatics. 2001;17:369-370.を用いて遺伝子発現データを探索し、この際、データに導入される外部変数の影響を最小にするためにアレイ間分位点正規化を行った。適切な場合には、正規化の前に信頼性に欠けるスポットのクオリティーフィルタリング($S/N < 3$)を行った。同定された総ての遺伝子を、PANTHER(商標)(Protein ANALysis THrough Evolutionary Relationships)およびGene Ontology(商標)(GO)を用いて分類した。

20

【0034】

定量RT-PCR

オリゴdTプライマーをTranscript Reverse Transcriptase(Roche)とともに用い製造業者の使用説明書に従って20- μ l容量において全RNA(0,1-1 μ g)から一本鎖cDNA合成(RT)を実施した。Light Cycler 480装置(Roche)においてSYBR green検出キットを用い製造業者の使用説明書に従って定量PCRを行った。各遺伝子(cxxc5、cd34、gcsfrおよびcd11b)について、相対mRNA発現をrpP2遺伝子発現に対して正規化した。cxxc5(5'-tccgctgctctggagaag-3'および5'-cacacgagcagtgacattgc-3')、rpP2(5'-atgcgctacgtcgcc-3'および5'-ttaatcaaaaaggccaaatcccat-3')、cd34(5'-cagctggagccccacag-3'および5'-gaggtcccaggtcctgagc-3')、gcsfr(5'-gtgcccacaatcatggaggag-3'および5'-catcctcctccagcactgtg-3')、およびcd11b(5'-ctgctcctggccctcatc-3'および5'-gacccccttcactcatcatgtc-3')の検出用プライマーは総て、同じリアルタイムPCR増幅条件で用いられるように設計した:95 で10秒の変性;58 で10秒のアニーリング;72 で12秒の伸長。

30

【0035】

図12、図13および図14に示した結果については、定量RT-PCRに患者材料を使用している

40

様々な血液疾患に罹患している94名の患者および13名の健康ドナーから一連の105の骨髄または血液のサンプルを採取した。様々な病状をthe French-American-British分類(FAB, Bennet et al. 1982)およびWHO分類(Vardiman et al. 2002)により分類し次のとおりであった:5 染色体5q欠失を有するMDS、14 染色体5q欠失がないMDS、20 AML(骨髄サンプル)および37 AML(血液サンプル)、14 ALL B(血液)および2 ALL T(血液)。総ての患者がインフォームド・コンセントに署名した。

【0036】

50

患者サンプルにおける R I N F の定量 R T - P C R (図 1 2 、 図 1 3 および 図 1 4)

オリゴ d T プライマーおよびランダムヘキサマープライマーを T r a n s c r i p t o r
r R e v e r s e T r a n s c r i p t a s e (R o c h e - 0 5 5 3 1 2 8 7 0
0 1) とともに用い製造業者の使用説明書に従って 2 0 - μ l 容量において全 R N A (0
, 1 ~ 1 μ g) から一本鎖 c D N A 合成 (R T) を実施した。 L i g h t C y c l e r
4 8 0 装置 (R o c h e) において C X X C 5 遺伝子を標的とする特異的ハイブリダイゼーシ
ョンプローブを用い、キット L i g h t c y c l e r (登録商標) 4 8 0 P r o b e s
M a s t e r (0 4 7 0 7 4 9 4 0 0 1) の製造業者の使用説明書に従って定量 P
C R を行った。相対 m R N A 発現を r p P 2 遺伝子発現に対して正規化した。 c x x c 5
(5' - t c c g c t g c t c t g g a g a a g - 3' , 5' - c a c a c g a g c a g t g a c a t t g c - 3' および 6 F A M - A A C C C A A A g C T g C C
C T C T C C - B B Q) , r p P 2 (5' - a t g c g c t a c g t c g c c - 3' , 5' - t t a a t c a a a a a g g c c a a t c c c a t - 3' お
よび C y 5 - A g C T g A A T g g A A A A A C A T T g A A g A C g T C - B B Q) の検出用プライマーは総て、 9 5 で 5
分間の最初の変性後に同じリアルタイム P C R 増幅条件で用いられるように設計した。よ
って、次のとおり 4 4 サイクルの間処理される：変性 9 5 で 1 0 秒間；および伸長 5 5
で 2 0 秒間。

【 0 0 3 7 】C X X C 5 の配列決定

配列決定の前に P C R 産物を E x o S A P - I T キット (G E h e a l t h c a r e - 7 8 2 0 1
) を用いて製品の使用説明書により精製に付した。 B i g D y e (登録商標) v 3 . 1
c y c l e s e q u e n c i n g K i t (A B I - 4 3 3 7 4 5 6) を特異的なフォワ
ード (5' - g c a c a a a a g t g g t g c t g t g - 3') およびリバース - (5' - g c g t g g t g c a g g a g c a t - 3') 配列
決定プライマーとともに用いて全容量 1 0 μ l で次の反応条件により配列決定を行った：
変性 9 6 、 1 0 秒； 5 0 で 5 秒のアニーリング； 6 0 で 4 分の伸長、 2 5 サイク
ルの間実施。

【 0 0 3 8 】固形腫瘍

固形腫瘍に関して、本発明者らは、乳癌に罹患している患者の 3 5 サンプル (および 7
つの健康対照) 、 転移性黒色腫に罹患している患者の 4 0 サンプル (および 8 つの健康母
斑対照) ならびに腫瘍および良性対応の両方を含む 2 8 の甲状腺癌サンプルにおける R
I N F m R N A 発現レベルを調査した。

【 0 0 3 9 】クロマチン免疫沈降実験

2 0 0 0 万の N B 4 細胞を R P M I 培地 (I n v i t r o g e n) 中でホルムアルデヒド (1 % v /
v) により 3 7 で 1 0 分間架橋し、氷冷 P B S で 2 回洗い流し、低張細胞溶解バッファ
ー (0 . 2 5 % T r i t o n X - 1 0 0 , 1 0 m M N a - E D T A , 0 . 5 m M N a - E G T A , 1 0 m M T r i s - H C l , p H 8 . 0 , およびプロテアーゼ阻害剤カ
クテル) に再懸濁した。 D o u n c e (2 0 ストローク) を使用して原形質膜を破壊し、
集めた核 (6 5 0 g , 4 で 5 分の遠心分離) を 1 2 0 0 μ l の C h I P バッファー (0
. 1 % S D S , 0 . 1 % デオキシコール酸 N a , 1 % T r i t o n x - 1 0 0 , 1 m M
E D T A , 1 4 0 m M N a C l , 1 0 m M T r i s p H 8 , およびプロテアーゼ
阻害剤カクテル) に再懸濁し、その後超音波処理して 5 0 0 ~ 1 0 0 0 b p 長の D N A 断
片を得た。各 I P では、 2 0 0 μ l の超音波処理産物を回収し、希釈バッファー (2 0 m
M T r i s p H 8 , 2 m M E D T A , 1 5 0 m M N a C l , 1 % T r i t o n
x - 1 0 0) で 1 0 倍希釈した。特異的結合を減少させるために、ハイブリダイゼーシ
ョンの前に回転板上で 7 0 μ l のサケ精子 D N A / プロテイン A アガロース 5 0 % スラリー
(U p s t a t e) を 4 で 2 時間加えることにより前清浄工程を行った。免疫沈降 (I P) では
断片化したクロマチン混合物に 4 μ g の抗 R A R 抗体 (A b c a m - H 1 9 2 0) 、または
抗 P M L 抗体 (S a n t a C r u z , s c - 9 6 6) を加えることによりハイブリダイゼーション
を行った (4 で一晩) 。回転板上で 7 0 μ l のサケ精子 D N A / プロテイン A アガロ
ース 5 0 % スラリー (U p s t a t e) を 4 で 4 時間加えることにより免疫沈降を行った。遠心分

離により免疫複合体を回収し、十分な洗浄後に200 µlの溶出バッファー(1% SDS、100 mM NaHCO₃)で溶出した。DNA-タンパク質架橋を外すために、溶出液に8 µlの5 M NaClを加え、続いて65 °Cで一晩加熱した。次いで、これらの画分をRNアーゼA(10 µg/ml)およびプロテイナーゼKにより42 °Cで2時間処理した。各IPから結果として得られたDNAをフェノール/クロロホルム抽出により精製し、40 µlのTE(10 mM Tris-HCl、pH 8.0、1 mM EDTA、pH 8.0)に再懸濁した。インプット分として、前洗浄工程後に20 µlの架橋クロマチンを確保し、H₂Oで10倍希釈し、DNA-タンパク質架橋を外すために同じ工程に付した。インプット、IPおよび無Abの画分を、RINFまたはRARh2のプロモーター領域に位置するレチノイン酸応答性エレメントを含むプライマー対を用いるPCRにより解析した。RINFプロモーターのプライマー(105 bp) 5'-gcagtctgagatgggtccagg-3'/5'-tgcatgtaccattccctctgcc-3' およびRARb2プロモーターのプライマー(247 bp) 5'-tcctgggagttggatgatgcag-3'/5'-aaaccctgctcgatcgctc-3'。

【0040】

細胞質および核の画分の調製

細胞分画を4で行った。NB4細胞を200 gでの遠心分離により集め、PBSで2回洗浄し、プロテアーゼおよびホスファターゼの阻害剤を含有する低張溶解バッファー(25 mM Tris-HCl pH 7.5、12.5 mM NaF、0.2 mM オルトバナジン酸ナトリウム、1%プロテアーゼ阻害剤カクテル、Sigma P8340)に懸濁し、40分間膨潤させた。マイクロチューブ(Eppendorf)中での円錐形乳棒による細胞懸濁液のホモジナイゼーションにより原形質膜を破壊した。1,000 gで3分間の遠心分離の直前にTriton-X 100を0.1%終濃度に加えた。細胞質画分からなる上清が、核からなるペレットから分離される。プロテアーゼおよびホスファターゼの阻害剤を含有する溶解バッファーで核を2回洗浄し、1,000 gでの遠心分離により回収し、4xサンプルバッファー(Laemmli 1970)で100 °Cで8分間抽出した。

【0041】

ウエスタンブロット

Wu YL, Dudognon C, Nguyen E, et al. Immunodetection of human telomerase reverse-transcriptase (hTERT) re-appraised: nucleolin and telomerase cross paths. J Cell Sci. 2006;119:2797-2806により従前に記載されているようにウエスタンブロッティングを実施した。

【0042】

RINFに対する特注ウサギポリクローナルペプチド特異的抗体は、Biogenes GmbHにより生産されたものである。免疫原ペプチドは、RINFタンパク質のアミノ酸45~48に相当する。一次抗体溶液への免疫原ペプチドの添加によるウエスタンブロットシグナルの競合阻害により抗体特異性を確認した。要するに、ブロットをRINFに対する一次抗体(ポリクローナル抗体)、PARP(モノクローナルマウスIgG、Calbiochem、n°AM30)またはアクチン(ポリクローナルウサギIgG、Sigma、n°A2066)とともにインキュベートした後、適当なペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体とともにインキュベートした。化学発光検出システム(Amersham Pharmacia Biotech)を用いてタンパク質の検出を行った。ヒト組織抽出物を含むブロットはMilliporeから購入した(TB300)。

【0043】

細胞質および核の画分の調製

細胞分画を4で行った。NB4細胞を200 gでの遠心分離により集め、PBSで2回洗浄し、プロテアーゼおよびホスファターゼの阻害剤を含有する低張溶解バッファー(25 mM Tris-HCl pH 7.5、12.5 mM NaF、0.2 mM オルトバナジン酸ナトリウム、1%プロテアーゼ阻害剤カクテル、Sigma P8340)に懸濁し、40分間膨潤させた。マイクロチューブ(Eppendorf)中での円錐形乳棒による細胞懸濁液のホモジナイゼーションにより原形質膜を破壊した。1,000 gで3分間の遠心分離

の直前にT r i t o n - X 100を0.1%終濃度に加えた。細胞質画分からなる上清が、核からなるペレットから分離される。プロテアーゼおよびホスファターゼの阻害剤を含有する溶解バッファーで核を2回洗浄し、1,000gでの遠心分離により回収し、4xサンプルバッファー(Laemmli 1970)で100で8分間抽出した。

【0044】

免疫蛍光

F L A Gタグ付きR I N FをコードするプラスミドをN B 4細胞 c D N Aから構築した。P C R産物をp F L A G - C M V - 4発現ベクター(Sigma)に挿入した。M C F 7細胞をカバースリップ上で増殖させ、F u g e n e H D製造業者のプロトコル(Roche)によりF L A Gタグ付きR I N F構築物でトランスフェクトした。トランスフェクションの2日後に、細胞をP B Sで1回洗浄し、2%パラホルムアルデヒド中で15分間固定した。固定した細胞をP B Sで3回洗浄し、0.1%T r i t o n X - 100で10分間透過処理した後、ブロッキングバッファー(P B S、2% B S A)中で30分間インキュベートした。次いで、細胞を、ブロッキングバッファー(P B S、2% B S A)で1:3, 000希釈した一次抗体(ウサギポリクローナル抗F l a g M 2、Sigma)とともに一晩インキュベートし、P B Sで2回洗浄し、1:1, 000希釈(P B S、2% B S A)した二次抗体(Molecular ProbesのA l e x a - 488コンジュゲート抗ウサギ、Invitrogen)とともに室温で1時間インキュベートした。続いて、細胞をP B Sで3回洗浄し、V e c t a s h i e l d封入剤4', 6 - ジアミニジン - 2 - フェニルインドール(D A P I、Vector Laboratories)で封入して核を対比染色した。P l a n A p o c h r o m a t 63X N . A . 1.4油浸対物レンズを搭載したZeiss L S M 510 M E T A共焦点レーザー顕微鏡において共焦点顕微鏡によりL S M 510ソフトウェアv 4.0(Zeiss)を用いて免疫蛍光像を取得した。

【0045】

レンチウイルス感染のためのプラスミド

R I N F発現を標的とするレンチウイルスプラスミド(p L K O . 1 / s h R N A / R I N F)は、Sigmaから購入し(M I S S I O N(登録商標) s h R N A大腸菌グリセロールストック)、対照ベクター(p L K O . 1 / T R Cおよびp L K O . 1 / s h R N A / スクランブル対照)は、マテリアル移転契約を通じてDavid RootおよびDavid M. Sabatiniにより厚意で提供されたものである(A d d g e n eプラスミド10879および1864)。要するに、レンチウイルス粒子の作製は、H E K 293T細胞と、Trono's labにより開発された第二世代のパッケージングシステム(例えば、パッケージングプラスミドp s P A X 2およびエンベローププラスミドp M D 2 . G)(A d d g e n eプラスミド12260および12259)との一過性同時トランスフェクション(F u g e n e H D、Roche)により行った。トランスフェクションの2日後にウイルス上清を回収し濾過した後、スピンのために増殖細胞に適用し(2400rpm、室温で1時間)、そしてそれは硫酸プロテアミン(5μg/mL)の存在下で実施した。感染の2日後に、1μg/mLのピューロマイシン(Sigma)を用いて少なくとも2日間N B 4細胞を選抜した。

【0046】

プラスミドおよびレトロウイルス感染

脳筋炎ウイルス内部リボソーム進入配列とリポーター遺伝子としての緑色蛍光タンパク質(G F P)を含むネズミ幹細胞ウイルスレトロウイルスベクターM i g - R 1は、W. S. Pear(University of Pennsylvania, Philadelphia, PA)により厚意で提供されたものである。5'ウイルス長い末端反復配列(L T R)プロモーターがR I N Fの発現を駆動できるようにM i g - R 1にR I N Fを挿入した。M i g - R 1構築物(M i g - R 1 / エンベティおよびM i g - R 1 / R I N F)をP h o e n i xレトロウイルスパッケージング細胞系統にトランスフェクトして(V S V - G偽型)ウイルス上清を生成し、このウイルス上清をトランスフェクションの2日後に回収した。次いで、4μg/mLの硫酸プロテアミンの存在下で感染を実施した。感染の9日後に感染した細胞をG F P蛍光につい

て選別した。

【0047】

URL

C x x c 5 遺伝子のエキソン - インtron構築およびゲノム組織化は、de la Grange P, Dutertre M, Martin N, Auboeuf D. FAST DB: a website resource for the study of the expression regulation of human gene products. Nucleic Acids Res. 2005;33:4276-4284に従って f a s t D B (<http://www.fast-db.com>)を利用して行った。R I N F タンパク質の理論分子量は、E x P A S y (Expert Protein Analysis System) p r o t e o m i c s e r v e r ウェブサイト(www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)において計算した。推定NLSモチーフのコンピュータによる解析は、P r e d i c t N L S (cubic.bioc.columbia.edu/predictNLS/)を利用して行った。

10

【0048】

結果

本発明および本発明につながる実験の結果を、以下の図を参照してさらに記載する。

【0049】

実験結果

N B 4 細胞系統における、レチノイン酸により早期に誘導される遺伝子である C x x c 5 の同定

A P L における新規レチノイン酸標的遺伝子についての本発明者らの探索において、本発明者らは、A T R A (1 μ M) により短時間 (9 0 分および 3 時間) 処置した N B 4 細胞を用いてマイクロアレイ実験を行った。マイクロアレイ発現解析によって本発明者らは 3 5 個の遺伝子を同定でき、それらの遺伝子は、処置 9 0 分の時点において一貫してアップレギュレートされ、未処置対照と比べて少なくとも 2 倍の誘導があり、3 時間後もアップレギュレートされたままであった (表 1)。これらの 3 5 個の遺伝子の慎重な解析と分類によって、周知の転写因子または推定転写因子をコードする 9 個の遺伝子を同定した。他の 2 6 個の遺伝子は、遺伝子オントロジーおよび / または配列解析による推定転写因子であるための基準を満たさなかった。9 個の候補遺伝子のうちの 7 個は、顆粒球または単球への分化時に骨髄組織において発現されることが分かっている、明確に特徴付けられた転写因子をコードする。重要なことには、これらの遺伝子のうちの 6 個は N B 4 細胞においてレチノイン酸により早期に誘導され、5 個は直接標的であることはこれまでに確認されている。本発明者らのマイクロアレイスクリーニングの精度はこれらの観察により確認され、証明された。

20

30

【0050】

【表 1】

表 1：NB 4 細胞におけるレチノイン酸の早期標的遺伝子を同定するためのマイクロアレイ結果および選抜プロセス

プローブ数		遺伝子		核因子
検出された プローブ*	アップレギュレー トされた プローブ†	共通してアップレ ギュレートされた プローブ‡	共通してアップレ ギュレートされた 遺伝子§	
NB 4 細胞 処置	対照	ATRA (1μM)		
9 0 分	15853	16299	96	9
3 時間	16062	14464	313	
3 時間	16869	16166	240	

*アレイ上に存在する 31, 700 プローブから検出された信頼できるシグナルを有するプローブの数。† ATRA 処置後に (対応する未処置対照と比べて) 少なくとも 2 倍の増加したシグナルを有するプローブの数。‡ 正規化後 (方法参照)、40 個のプローブは早ければ 9 0 分で一貫してアップレギュレートされた信頼できるシグナルを示し、それらは 3 時間の時点においてもなお一貫してアップレギュレートされていた (その際、マイクロアレイ実験は二連で行った)。§ 重複する遺伝子および信頼性に欠けるスポットのフィルタリング (6 アレイにおいてシグナル/ノイズ < 3 である場合) 後に、これらの条件において 35 個より多い遺伝子がアップレギュレートされたことが確認された。|| 35 個の遺伝子候補のこのリストから、9 個が「既知または潜在的転写因子」をコードする遺伝子と分類された

【 0 0 5 1 】

本発明は、これまでのところ機能的特性評価を受けていないゲノム配列である C x x c 5 に関する。

【 0 0 5 2 】

本発明者らの選択は 2 つの決定的な実験的発見後に行った。第 1 に、定量 R T - P C R 解析 (図 1 A) により、C x x c 5 m R N A 発現の A T R A による誘導が見事に確認された (ここではレチノイン酸処置 4 時間において観察された)。第 2 に、レチノイド添加の 3 0 分前に 4 時間続けたタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドによる NB 4 細胞の前

10

20

30

40

50

処置は、A T R AによるC X X C 5 mRNAアップレギュレーションを阻止しなかった（図1A）。これらの実験は、C x x c 5のA T R A媒介性転写がデノボタンパク質合成を必要としないことを示しており、C x x c 5がレチノイン酸の一次標的であることを示唆している。これは、N B 4細胞におけるレチノイド受容体（R A Rおよび/またはP M L - R A R q）とC x x c 5遺伝子のプロモーターとの直接結合を証明したC h I P実験（図1B）により確認された。

【0053】

C x x c 5 遺伝子のコンピュータによる特性評価

データベースから入手可能なC x x c 5（E N S G 0 0 0 0 0 1 7 1 6 0 4）の主なゲノムの特徴を図2に簡潔にまとめた。C x x c 5遺伝子は、5番染色体の長腕、5 q 3 1 . 3に位置する（図2A）。この遺伝子は3 5 . 5 k b pに及び、4つのエキソンに組織化されている（図2B）。この遺伝子上流プロモーター領域は、まだ機能的に解析されていないが本発明者らの研究に関連しており、転写開始部位から- 3 1 1 6 b pに潜在的レチノイド応答性エレメントを含む。2つの潜在的代替転写開始部位（エキソン1に1つとエキソン2にもう1つ）が存在するにもかかわらず、それらの2つのm R N A配列はエキソン3に開始コドンをもつ同じオープンリーディングフレームを示す。概念翻訳により、3 2 2個のアミノ酸からなるタンパク質（図2C）であり理論分子量が3 2 . 9 8 k D aであると予測される。タンパク質配列解析により、C末端の近位において、独特の保存されたドメイン、アミノ酸2 5 7 ~ 3 0 2間に典型的なC X X C 亜鉛フィンガーモチーフ（C X₂C X₂C X₄-₅C X₂C X₂C₉-₁₅C x₂C x₄C）が示された。2つの亜鉛イオンに配位している8個の保存されたシステイン残基を含むことが分かっているこのモチーフは、1 1個の他のタンパク質（多くの場合クロマチン関連タンパク質）において見られ、非メチル化C p Gを認識すると考えられている。図2Dは、このモチーフを有するタンパク質ファミリーの既知メンバー総てのアラインメントを示している。

【0054】

レチノイド類により処置した前骨髄球細胞におけるC x x c 5の遺伝子発現プロファイル

本発明者らのマイクロアレイデータに一致して、C X X C 5 mRNAレベルの経時的解析（定量R T - P C Rによる）により、早くもA T R A処置90分に2倍の誘導が示された（図3A）。C x x c 5の転写レベルは、処置12時間の時点においてその最大レベルに達した（未処置対照において観察された発現レベルのおよそ6倍）。その後、そのレベルは少なくとも48時間の間安定にアップレギュレートされたままであった（図3A）。本発明者らは、C x x c 5発現およびそのタンパク質レベルの誘導を確認するために、予測されるC X X C 5ポリペプチド鎖のアミノ酸4 5 ~ 4 8に対するポリクローナル抗体を特別注文した（方法参照）。C X X C 5タンパク質の基礎発現レベルは未処置N B 4細胞抽出物において非常に低かったが（図3B）、A T R A処置開始後4時間以内に予想分子重量3 3 k D aにC X X C 5タンパク質に対して特異的な強いバンド（その免疫原性ペプチドとの競合により確認された、示していない）が現われた。C X X C 5タンパク質の誘導動態は、m R N Aレベルにおいて観察された誘導に一致している。興味深いことに、N B 4細胞と比較すると、成熟耐性サブクローンN B 4 - L R 1およびN B 4 - L R 2のA T R A処置後にはC X X C 5タンパク質の非常に弱い誘導しか認められなかった（図7）。これらの観察は、A P L細胞の最終成熟時にC X X C 5が参加する可能性があることと一致する。さらに、公的に利用可能なマイクロアレイデータセットから抽出したデータ（図8）により、A P L患者の一次細胞におけるA T R AによるC x x c 5 mRNAの早期誘導が確認され、N B 4細胞系統を用いて得たデータが証明された。

【0055】

レチノイド誘導核因子、R I N F（C X X C 5）の細胞内局在性

A T R A処置N B 4細胞の核および細胞質の画分のウエスタンブロット解析により、核抽出物におけるC X X C 5の発現がはっきりと検出された（図3C）。この増加した発現レベルは少なくとも48時間続いた。本発明者らのポリクローナル抗体では折り畳まれた天然タンパク質の関連エピトープ（アミノ酸4 5 ~ 4 8）がほとんど検出されなかった

め、本発明者らは、*in situ*免疫化学実験のためにFLAGタグ付きCXXC5をコードするプラスミドを作製した。この構築物で一過性にトランスフェクトしたMCF7細胞の*in situ*共焦点解析により強い核の染色が示され(図3D)、CXXC5タンパク質の核局在パターンが確認された。注目すべきは、細胞によっておよび過剰発現レベルによって、蛍光パターンが核内の微細クロマチンマトリックス、核質および/または不連続断続構造(discrete punctured structures)と少しは関係していたことである。しかしながら、核膜においても核小体内においても蛍光シグナルは検出されなかった。

【0056】

これらの実験的証拠に基づいて、本発明者らは、レチノイド誘導核因子(Retinoid-Inducible Nuclear Factor)にちなんでCXXC5をRINFと新たに命名することを提案する。この提案した名前にふさわしく、RINF(CXXC5)配列の詳細な解析により、亜鉛フィンガードメインのN末端側に位置する、アミノ酸残基257~262間の推定核局在シグナル(Nuclear Localization Signal)(NLS)(KKKRKR)が明らかになった。

【0057】

異なる骨髓細胞系統および様々なヒト組織におけるRINFの発現パターン

本発明者らは、他の骨髓細胞系統(図3E-F)および様々なヒト組織(図3G)におけるRinf遺伝子の基礎発現レベル、ならびにレチノイド類によるその潜在的調節も評価した。検証したより未成熟な細胞系統、K562細胞およびLAMA-84細胞は最大のRINF mRNAレベル(それぞれ、NB4細胞の基礎レベルの16倍および12倍)と、さらに最大のRINFタンパク質発現も示した。これらの細胞系統ではATRA処置によりRINF mRNAレベルもタンパク質レベルもアップレギュレートされないように思われた(図3E-F)。相対的に、HL60(M2-サブタイプ)細胞系統とNB4(M3-サブタイプ)細胞系統は両方ともRINF mRNAおよびタンパク質の基礎レベルが低い。重要なことには、ATRAによる後者の細胞系統の処置により、HL60細胞(かかる処置により最終分化を始めることが分かっている)がRINF誘導に関してmRNAレベルとタンパク質レベルの両方においてNB4細胞に似た挙動をする(ここでは4時間の時点において観察された)ことが示された。重要なことには、キメラ受容体PML-RAR α の発現が起こらない細胞系統であるHL60におけるこの誘導により、ATRAによるRINF誘導にPML-RAR α が必要でないことが証明された。この観察に一致して、本発明者らは、NB4細胞に似た基礎発現レベル(データは示していない)を有する2つの他の細胞系統、A549肺癌細胞(3倍増加)およびHeLa頸癌細胞(2倍増加)においてもATRAによりRINF mRNA発現を誘導されることに注目した。最後に、RINF発現が骨髓組織に限定されないという事実を実証するために、本発明者らは異なる器官からの様々なタンパク質抽出物においてウエスタンブロット解析を行った(図3G)。RINFタンパク質は検証したヒト組織において種々の発現レベルを示し、胎盤において発現レベルが最大であり、脳において最小であった。要するに、これらのデータは、RINFの調節発現および推定機能はPML-RAR α 発現に依存しておらず、APL病理学よりもずっと広範な関心分野を含むことを示している。

【0058】

RINF発現は前骨髓球性白血病細胞の分化に必要である

ATRA処置後のNB4細胞最終分化へのRINFの潜在的関与を調査するために、本発明者らは、レンチウイルスベクターにより送達されるshRNAを用いてRNA干渉アプローチを行った(図4A)。RINF mRNAに対して向けられた5つの異なるshRNA構築物のそれぞれを安定に発現するNB4細胞の感染および選抜後に、(基礎RINF mRNA発現レベルを標的とするための)それらの有効性を対照ベクター、すなわち、スクランブルドshRNAを発現する対照ベクターおよびエンブティベクターである対照ベクターと比較した。2つの最高ノックダウン効率がshRNA/RINF-3(61%)およびshRNA/RINF-4(85%)で観察され、それらに関してはレチノイドの不在下ではNB4細胞において増殖変化も形態学的変化も認められなかった。かかるサイレンシング効率に関し(図4A)、本発明者らは、細胞の大きな割合においてAT

R AによるR I N F m R N A誘導を効率的に阻止することをかなり期待することができ、このようにして、A T R A処置後の細胞表現型にもたらす影響を評価することができた。

【0059】

特筆すべきは、これらの2つのs h R N A構築物の発現により薬理的用量のA T R Aの存在下で増殖する能力がN B 4細胞集団に与えられることである(図4 B)。実際には、対照ベクターを発現する細胞はA T R A処置によって1週間以内に不可避に分化し死滅したが、一方s h R N A / R I N F - 4レンチウイルスベクターまたはs h R N A / R I N F - 3レンチウイルスベクターのいずれかに感染させた細胞培養物はどちらも増殖停止(図4 B)および最終分化プロセス(図4 C)を回避した。A T R A誘導性R I N F m R N A発現を阻止するための本発明者らのR N A干渉戦略の有効性を定量R T - P C Rにより、R I N F m R N A発現が最大であった(図3 Aも参照)処置12時間の時点において評価した(図4 C)。重要なことには、A T R Aにより処置した対照ベクターと比べてs h R N A / R I N F - 3(約50%)およびs h R N A / R I N F - 4(60%)に関して得たノックダウンレベルは、N B T還元および形態学的解析によって評価された通りN B 4細胞のおよそ30%~50%を最終分化から救うのに十分であった(図4 C、左パネル)。

10

【0060】

注目すべきは、これらの細胞(s h R N A / R I N F - 3および-4)がレチノイド類の存在下で増殖し続け、A T R Aなしでの2週間の培養後も(第6日~第20日)A T R Aに対するそれらの耐性が確認され、R I N F m R N A発現における効率的な阻止と密接に関連していた(図4 C、右パネル)ことである。要するに、これらの結果は、s h R N A媒介性R I N Fノックダウンが前骨髄球性白血病細胞のA T R A誘導性最終分化を障害することを示しており、N B 4細胞のレチノイド誘導性最終成熟にR I N F発現が必要であることを強く示唆している。

20

【0061】

次に、薬理的用量のA T R Aにより顆粒球分化経路に委任されたH L 6 0細胞系統においてR I N Fの関与を評価した(図9)。N B 4細胞で観察された通り、2つのs h R N AはR I N F発現を効率的に標的とし(図9)、成熟プロセス(N B Tおよび形態学的解析により評価される)を遅延させ、顆粒球分化時のR I N Fの機能的関与が実証された。しかしながら、レチノイド類の存在下で増殖し続けたN B 4 - s h R N A / R I N F細胞とは対照的に、A T R A処置H L 6 0 - s h R N A / R I N F細胞は不可避に衰弱し12日以内に死滅した。

30

【0062】

最後に、本発明者らは、R I N F過剰発現はA T R Aの不在下でN B 4細胞またはH L 6 0細胞の顆粒球成熟を誘導するのに十分であろうかと考えた(図10)。本発明者らのデータは、異所性R I N F発現(図10 B)は白血病細胞の顆粒球分化を引き起こすために必要であるが十分ではないことを示している。実際には、R I N F過剰発現の10日後でも、形態学的レベルにおいても(図10、パネルC)、分子レベルにおいても(抗C D 11 b表面マーカーを使用、データは示していない)分化の徴候は認められなかった。

40

【0063】

正常C D 3 4 + 前駆細胞のサイトカインによる骨髄造血時のR I N F発現および機能

本発明者らの上記発見は、造血組織および他のヒト組織における様々なR I N F発現を明確に示している。これらのデータは、R I N F発現は、薬理的濃度のA T R Aにより誘導でき、一部の骨髄性白血病細胞の分化に必要なが、正常前駆体骨髄造血時にはサイトカインにより生理学的に調節され得るということを示している。この場合、その調節発現は顆粒球系統に沿った正常発生時にも起こるより一般的な事象を意味することもあり得る。

【0064】

この仮説を検証するために、本発明者らは、健康成人ドナーの骨髄から単離されたC D

50

34 + 細胞のサイトカイン誘導性顆粒球分化時の R I N F 発現を検証した。形態学的変化 (図 5 A) と、R I N F との比較による C D 3 4、C D 1 1 b および G - C S F R の発現の解析 (図 5 B) により分化を評価した。R I N F m R N A レベルの経時的発現プロフィールを定量 R T - P C R 解析により決定した。R I N F m R N A レベルは、初期低下 (第 2 日 ~ 第 4 日) 後、第 4 日 ~ 第 6 日の間にその最小発現に達し、その時点において培養細胞の大部分は芽球段階と前骨髄球段階にあった。その後、第 6 日 ~ 第 8 日の間に、R I N F m R N A 発現は、骨髄球、後骨髄球へ、最後には短寿命多核好中球への最終細胞成熟と同時に、その最小レベルからおよそ 3 . 5 倍増加した (図 5 A - B)。サイトカインによる分化時の C D 3 4 + 前駆体および正常造血細胞における R I N F m R N A の検出により、その発現が A P L 細胞に限定されない (それゆえ P M L - R A R 発現に依存していない) こと、最も重要なことには、その誘導が A T R A の薬理的シグナル伝達に限定されないことが確認される。これらのデータは、正常骨髄造血時のその潜在的役割に一致している。

【 0 0 6 5 】

正常骨髄造血時の R I N F 発現の機能的関連性を評価するために、サイトカイン処置により顆粒球系統に向けた C D 3 4 + 前駆細胞をレンチウイルス s h R N A 構築物に感染させて、R I N F 発現をロックダウンした。非感染細胞同様に、対照ベクター (s h R N A / スクランブルおよび模擬対照) に感染させた細胞の大部分は多核顆粒球へと成熟した (図 5 A および 図 6) 後死滅し、細胞培養物に徐々に分解された (示していない)。異なるドナー由来の検証した 3 つの細胞培養物では、異なる動態で顆粒球への分化が起こり (図 6 参照)、総ての培養物は、急速に死滅する多核好中球の細胞成熟で終わった。寿命がずっと長いことが分かっている単球と付着性マクロファージは培養物中にわずかしかなかった。重要なことには、s h R N A / R I N F - 3 および s h R N A / R I N F - 4 に同じ条件下で感染させた細胞集団 (図 6) は、成熟していない細胞 (前骨髄球および骨髄球) の著しい蓄積を示した。対照培養物と比べて 2 つの s h R N A で観察された顆粒球成熟におけるこの違いは、A T R A により処置した白血病細胞系統 N B 4 および H L 6 0 に関して得た結果を見事に映し、正常骨髄造血時の R I N F の同様の役割を示唆している。

【 0 0 6 6 】

考察

造血細胞分化の多段階プロセスは、長年、腫瘍病因の理解のためや治療戦略の設計のためのモデル研究として扱われてきた。成熟機能細胞の産生を制御する発生プログラムの攪乱は、シグナル変換および / または遺伝子転写制御をその選好機能とする限られた重要な調節遺伝子における遺伝子変化または後成的変化 (遺伝子欠失、突然変異、メチル化など) によって頻繁に起こる。造血器悪性腫瘍の特定の症例では、この 10 年間でこれらの重要な調節遺伝子の発見に関して大きな進歩がもたらされたがそれらの機能階層については不確実性が残っている。

【 0 0 6 7 】

本研究において、本発明者らは、亜鉛フィンガーファミリーの新規メンバーである C X X C 5 (R I N F) を同定し特徴付け、骨髄球性白血病細胞のレンチノイド誘導性最終分化時だけでなくサイトカインによる正常骨髄造血時のそのかわりも示した。亜鉛フィンガーを含むタンパク質は、哺乳類ゲノムにおいて最大のタンパク質スーパーファミリーの 1 つを構成し、D N A、R N A、脂質、または他のタンパク質と相互作用する構造的に異なる保存されたドメインを有する、進化タンパク質ファミリーおよび機能的に多様なタンパク質ファミリーに分類することができる。C X X C 型亜鉛フィンガーは、該タンパク質のヒストンメチル - トランスフェラーゼ (M L L、M L L 2)、ヒストンデメチラーゼ (F B X L - 1 0、- 1 1、- 1 9)、D N A - メチル - トランスフェラーゼ (D N M T 1)、または C p G 結合 (C G B P、M B D 1) の活性によってクロマチン再構築に関与するというタンパク質の小サブセットにおいて見られる (図 2)。M L L、C G B P、および M B D 1 の C X X C ドメインは、非メチル化 C p G と結合することがわかっており、この

認識には保存されたK F G Gモチーフ（亜鉛フィンガーの2番目のリンカー中にある）が不可欠である。K F G Gモチーフを欠いているパラログ（C X X C - 4、- 5、- 6、および- 10、図2）は後の特性を共有しないと予想され、今後の課題の1つは、保存されているがK F G Gモチーフを欠いているC X X Cドメインを有するこの特異的サブセットのタンパク質により認識される分子標的（群）を同定することであろう。興味深いことに、C X X C型ファミリーの3メンバー（K F G Gモチーフを含むまたは含まない）、M L L、M L L 2、およびL C Xは、これまで、染色体転座や内部再配列によって白血病誘発に関与してきた。M L Lは、白血病において最も高頻度で転座される遺伝子の1つであり、記載されている種々の融合パートナーが30を超えるにもかかわらずC X X Cドメインは既知M L L融合タンパク質総ての中に残り、C X X Cドメインは骨髄変化に不可欠であると思われ、作用機序がまだ解明されていなくてもこの亜鉛フィンガー亜型の生物学的重要性を実証している。

10

【0068】

ここで報告したC x x c 5 (R i n f) 遺伝子の発現および誘導のパターンにより、正常骨髄造血および腫瘍性骨髄造血の両方における、少なくとも成熟プロセスの最終段階（前骨髄球、骨髄球）におけるR I N Fの機能的関与が裏付けられた。特異的R N A i ターゲティングを用いたノックダウン実験により、前骨髄球性白血病細胞の最終分化プロセスにR I N F発現が必要であることもさらに示された。しかしながら、重要なことには、本発明者らの研究は、R i n f病態生理学がA P Lに限定されず、他の造血器悪性腫瘍および正常造血においてより広いかかわりを有する可能性があるという概念をはっきりと裏付けている。よって、R i n fの状態（例えば突然変異、異常な発現/誘導）はA T R A応答性を予測するのに役に立つ可能性があり、それゆえ、A M L患者の治療計画に関する決定に重要なツールとなる可能性がある。

20

【0069】

臨床状況において、C x x c 5 (R i n f) 生物学に関する刺激的な見通しはその脱調節発現がいくつかの血液疾患の病因となり得るかどうかを評価することである。実際には、5番染色体の長腕の中間部欠失または完全喪失は、骨髄異形成（M D S、多くの場合前白血病性疾患として記載される）および急性骨髄性白血病（A M L）のような、異常骨髄造血および骨髄中の芽球過剰を特徴とする悪性骨髄疾患における再発性染色体異常である。染色体バンド5 q 3 1の主要な共通欠失領域（C D R）を明らかにした広範囲な研究にもかかわらず、白血病誘発の一因となると推測された候補腫瘍抑制遺伝子は、4 M b pサイズのこの領域においてまだ確認されていない。このセグメント内部において、R i n fは、今日記載されている(described at his date)最も小さい(1 M b p未満) C D Rを表す遠位マーカーD 5 S 5 9 4から20 k b pまでに局在することに注目することが重要である。驚くべきことに、R i n f遺伝子は、恐らくC D Rの外側に局在すると考えられていたため、これまでのところ遺伝学的および機能的調査を免れてきた。それでも、R i n fとC D Rとが極めて接近していることで、同定遺伝子の上流における調節配列の喪失と、さらに5 q 3 1内でのより遠位の欠失を理由にR i n f発現に影響を与える可能性がある。本発明者らの発見により、文献中のデータと合わせて考えて、本発明者らはR i n fを骨髄細胞形質転換についての強力な腫瘍抑制遺伝子候補であると考えに至った。興味深いことに、骨髄病変について公的に利用可能なマイクロアレイデータベースを調べて、本発明者らは正常な健康ドナーと比べて、欠失5 qを有する骨髄異形成患者のC D 3 4 +細胞でのより低いR I N F m R N A発現を明らかにした(図11)。この観察は推定ハプロ不全機構と一致し、不応性貧血、5 q - 症候群を含むM D Sのもう1つのサブグループにおいてリボソーム遺伝子r p S 1 4（特徴的なC D Rの5 q 3 2に位置する）について最近記載されたため、これらの血液疾患におけるr i n f脱調節の真の寄与を評価することが重要であろう。

30

40

【0070】

R i n f発現が骨髄組織に限定されないことから、この遺伝子は他の組織の発生および/またはホメオスタシスにも関与する可能性がある。レチノイド類によるその直接誘導は

50

、中間タンパク質レギュレーターのデノボ合成を必要とせず、これは、分化と関係なくとも R i n f が少なくともある程度はレチノイド類の多面発現効果のいくつか、例えば、様々な固形腫瘍におけるそれらの抗増殖作用などを媒介する可能性があることを示唆している。まとめると、本発明者らの発見により、異なる組織においてレチノイド類により薬理的に誘導できる R i n f 発現は、いくつかの発生プロセスおよび病変において予想されるそのかわりから、幅広い利益がある可能性があるという仮説が裏付けられる。

【 0 0 7 1 】

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> AS Bergen Teknologioverforing AS

<120> Novel reinoid inducible factor, and uses thereof

<130> P11828N001

<160> 37

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2778

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gttttgcggg cagccccggg gcagcggttca tagctcctgc ccgggcgggc gcgcggcggc 60

ggcggcagag gcggctgagc ctgagcgggg atgtagaggc ggccggcagca gaggcggcac 120

tggcggcaag agcagacgcc cgagccgagc gagaagagcg gcagagcctt atccccctgaa 180

gccggggccc gcgtcccagc cctgcccagc ccgcgcccag ccatgcgcgc cgctgtctga 240

gtccgggcgc cgcacgtga gccctccgcc cgcgagccgc gctcagctcg ggggtgatta 300

gttgcttttt gttgtttttt aatttggggc gcggggaggg ggaggagggg cagggtgctgc 360

aggctcccc ccctccccgc ctccggccag ccgcggcggc gcgactcggg ctccggaccc 420

gggcactgct ggccggtgga gcggagcgca ccgcggcggg ggtgccaga gcggagcgca 480

gctccctgcc ccgccctcc ccctcggcct cgcggcgacg gcggcgggtg cggttggac 540

gactcggaga gccggttcgg tgcgcggccg gggccggagt tcgctgcaag tcggcggaaa 600

gtttggctgc gcgggttccc ccgaagttca gaggtaagac atttccacct ggacacctga 660

ccatgtgcct gccctgagca gcgaggccca ccaggcatct ctgttgtggg cagcaggggc 720

10

20

30

40

50

aggctcctggt ctgtggaccc tcggcagttg gcaggctccc tctgcagtgg ggtctgggcc	780
tcggccccac catgtcgagc ctcggcggtg gctcccagga tgccggcggc agtagcagca	840
gcagcaccaa tggcagcggg ggcagtggca gcagtggccc aaaggcagga gcagcagaca	900
agagtgcagt ggtggctgcc gccgcaccag cctcagtggc agatgacaca ccaccccccg	960
agcgtcggaa caagagcggg atcatcagtg agccccctca caagagcctg cgccgctccc	1020
gcccgccttc ccactactct tcttttggca gcagtgggtg tagtggcggg ggcagcatga	1080
tgggcggaga gtctgtgac aaggccactg cggctgcagc cgctgcctcc ctgttggcca	1140
atgggcatga cctggcggcg gccatggcgg tggacaaaag caaccctacc tcaaagcaca	1200
aaagtgggtg tgtggccagc ctgctgagca aggcagagcg ggccacggag ctggcagccg	1260
agggacagct gacgctgcag cagtttgcgc agtccacaga gatgctgaag cgctgggtgc	1320
aggagcatct cccgctgatg agcgaggcgg gtgctggcct gcctgacatg gaggctgtgg	1380
caggtgccga agccctcaat ggccagtccg acttccccta cctgggcgct ttccccatca	1440
accaggcct cttcattatg accccggcag gtgtgttccg ggccgagagc gcgctgcaca	1500
tggcgggcct ggctgagtac cccatgcagg gagagctggc ctctgccatc agtccggca	1560
agaagaagcg gaaacgctgc ggcatgtgcg cgccctgccg gcggcgcatc aactgcgagc	1620
agtgcagcag ttgttagaat cgaaagactg gccatcagat ttgcaaattc agaaaatgtg	1680
aggaactcaa aaagaagcct tccgctgctc tggagaaggt gatgcttccg acgggagccg	1740
ccttccggtg gtttcagtga cggcggcgga acccaaagct gccctctccg tgcaatgtca	1800
ctgctcgtgt ggtctccagc aagggaattcg ggccaagaca aacggatgca cccgtcttta	1860
gaaccaaaaa tattctctca cagatttcat tcctgttttt atatatatat tttttgttgt	1920
cgttttaaca tctccacgtc cctagcataa aaagaaaaag aaaaaattt aaactgcttt	1980
ttcggaagaa caacaacaaa aaagaggtaa agacgaatct ataaagtacc gagacttcct	2040
gggcaaagaa tggacaatca gtttccttcc tgtgtcgatg tcgatgttgt ctgtgcagga	2100
gatgcagttt ttgtgtagag aatgtaaatt ttctgtaacc ttttgaaatc tagttactaa	2160
taagcactac tgtaatttag cacagtttaa ctccaccctc atttaaactt cctttgattc	2220

10

20

30

40

50

tttccgacca tgaatagtg catagtttgc ctggagaatc cactcacgtt cataaagaga	2280
atgttgatgg cgccgtgtag aagccgctct gtatccatcc acgcgtgcag agctgccagc	2340
agggagctca cagaagggga gggagcacca ggccagctga gctgcaccca cagtcccag	2400
actgggatcc cccaccccaa cagtgatfff ggaaaaaaaa atgaaagtgc tgttcgttta	2460
tccattgcga tctggggagc cccatctcga tatttccaat cctggctact tttcttagag	2520
aaaataagtc ctttttttct ggccttgcta atggcaacag aagaaagggc ttttttgcgt	2580
ggtcccctgc tgggtgggggt gggccccag ggggccccct gcggcctggg cccccctgcc	2640
cacggccagc ttcttgctga tgaacatgct gtttgtattg ttttaggaaa ccaggctggt	2700
ttgtgaataa aacgaatgca tgtttgtgtc acgaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	2760
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	2778

10

20

<210> 2
 <211> 969
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 2	
atgtcgagcc tcggcggttg ctcccaggat gccggcggca gtagcagcag cagcaccaat	60
ggcagcggtg gcagtggcag cagtggccca aaggcaggag cagcagacaa gattgcagtg	120
gtggctgccg ccgcaccagc ctcatgtgga gatgacacac cccccccga gcgtcggaac	180
aagagcggta tcatcagtga gcccctcaac aagagcctgc gccgctcccg cccgctctcc	240
cactactctt cttttggcag cagtgggtgt agtggcggtg gcagcatgat gggcggagag	300
tctgctgaca aggccactgc ggctgcagcc gctgcctccc tgttggccaa tgggcatgac	360
ctggcggcgg ccatggcggt ggacaaaagc aaccctacct caaagcaca aagtgggtgt	420
gtggccagcc tgctgagcaa ggagagcgg gccacggagc tggcagccga gggacagctg	480
acgctgcagc agtttgcgca gtccacagag atgctgaagc gcgtgggtgca ggagcatctc	540
ccgctgatga gcgaggcggg tgctggcctg cctgacatgg aggctgtggc aggtgccgaa	600
gccctcaatg gccagtcgga cttcccctac ctgggcgctt tccccatcaa cccaggcctc	660
ttcattatga ccccggcagg tgtgttcttg gccgagagcg cgctgcacat ggcgggcctg	720

30

40

50

gctgagtacc ccatgcaggg agagctggcc tctgccatca gctccggcaa gaagaagcgg	780	
aaacgctgcg gcatgtgctg gccctgccgg cggcgcatca actgcgagca gtgcagcagt	840	
tgttaggaatc gaaagactgg ccatcagatt tgcaaattca gaaaatgtga ggaactcaaa	900	
aagaagcctt ccgctgctct ggagaagggtg atgcttccga cgggagccgc cttccgggtgg	960	
tttcagtga	969	10

<210> 3

<211> 322

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ser Ser Leu Gly Gly Gly Ser Gln Asp Ala Gly Gly Ser Ser Ser	20
1 5 10 15	

Ser Ser Thr Asn Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Ser Gly Pro Lys Ala	
20 25 30	

Gly Ala Ala Asp Lys Ser Ala Val Val Ala Ala Ala Ala Pro Ala Ser	
35 40 45	

30

Val Ala Asp Asp Thr Pro Pro Pro Glu Arg Arg Asn Lys Ser Gly Ile	
50 55 60	

Ile Ser Glu Pro Leu Asn Lys Ser Leu Arg Arg Ser Arg Pro Leu Ser	
65 70 75 80	

His Tyr Ser Ser Phe Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Met	40
85 90 95	

Met Gly Gly Glu Ser Ala Asp Lys Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala	
100 105 110	

Ser Leu Leu Ala Asn Gly His Asp Leu Ala Ala Ala Met Ala Val Asp	
115 120 125	

50

Lys Ser Asn Pro Thr Ser Lys His Lys Ser Gly Ala Val Ala Ser Leu
 130 135 140

Leu Ser Lys Ala Glu Arg Ala Thr Glu Leu Ala Ala Glu Gly Gln Leu
 145 150 155 160

Thr Leu Gln Gln Phe Ala Gln Ser Thr Glu Met Leu Lys Arg Val Val
 165 170 175

10

Gln Glu His Leu Pro Leu Met Ser Glu Ala Gly Ala Gly Leu Pro Asp
 180 185 190

Met Glu Ala Val Ala Gly Ala Glu Ala Leu Asn Gly Gln Ser Asp Phe
 195 200 205

20

Pro Tyr Leu Gly Ala Phe Pro Ile Asn Pro Gly Leu Phe Ile Met Thr
 210 215 220

Pro Ala Gly Val Phe Leu Ala Glu Ser Ala Leu His Met Ala Gly Leu
 225 230 235 240

Ala Glu Tyr Pro Met Gln Gly Glu Leu Ala Ser Ala Ile Ser Ser Gly
 245 250 255

30

Lys Lys Lys Arg Lys Arg Cys Gly Met Cys Ala Pro Cys Arg Arg Arg
 260 265 270

Ile Asn Cys Glu Gln Cys Ser Ser Cys Arg Asn Arg Lys Thr Gly His
 275 280 285

40

Gln Ile Cys Lys Phe Arg Lys Cys Glu Glu Leu Lys Lys Lys Pro Ser
 290 295 300

Ala Ala Leu Glu Lys Val Met Leu Pro Thr Gly Ala Ala Phe Arg Trp
 305 310 315 320

Phe Gln

50

<210>	4		
<211>	18		
<212>	DNA		
<213>	Homo sapiens		
<400>	4		
cgagttcatg aggtgagc	18	10	
<210>	5		
<211>	5000		
<212>	DNA		
<213>	Homo sapiens		
<400>	5		
ccccaagcac tgtctgagca cccattcct tggagtctga agggaagggc agagtagggg	60	20	
gtggtagctg gggctcttggg gccccaggtc tgaagagaaa gaggctgggc cattttcgga	120		
agtctcagtg cgggccattt ctgaccctgc actgccctcc aggaccagat ttgtagagag	180		
gaggctgagc cccaccctgc ctccctcagc aggcctcccc cacaccacca caccctagcc	240		
ttcaggcttt gggctgggca gggcactttc agggcaggct ggcttctcct gcccagggca	300		
cccctcctcc aggtgcaggg ctccagattg ggacactgtg cctctgcctc ccctaaggcc	360	30	
ccattcagtt acctccccac ctctcagcaa tgctctccct ccctcttcct gaagtgtggc	420		
agggaggctg gagccacagc tttaggcctct gggagcactc agtccactc ccataggaca	480		
gagttgaacc atgatttgtt ctagagaagc caagggttat tgtcaggggc acaacagccc	540		
ccaaactgtc cctctcccca tcaatatccc atatacaggc tgagttccct gtgcctcact	600		
gagaacaggg ctgtatctgg ttgtctatgg cgtgtatgta gctgtgcctg ggcaatggga	660	40	
aatatagctt gcttctgct ttctctcagc ctctgtcccc agagtcattt tgttctggga	720		
ctggagtctt ccttctgtcc tcatcccttc ccctctgttt acacagggtca aggccaggca	780		
ttggccacca aactgacttc tcaggaatgg gcaagcctgg gttacttgag agacttggct	840		
ttttgaattt tcatttcaca gctctctgct ccttcagacg tcatgggggt ggggtgggga	900		
ggacctaaag tccagtggtc agtgcgtgag ggcccagacc caaaggcccg gggccacagt	960	50	

ctggtgcggt taggtcctc cctgcctctg cccgtgtttg caccgccagg cctgccctgg	1020
gattttggct gaggtcacag tccagcatga cccactgaa cactatcctg tggcctgccc	1080
cagcaggcag ggtttcaaat gcctttgctc ccctcctttg tgatacaggt gacagaactg	1140
gggccc aaag aagggtaaac cttagactga gttccaaatt ggccatcttt attggagatc	1200
ctaactccca cactcctctc catgtggcca ttccagtc ctggatgttt aatcaatgac	1260
agatattagc agataaatgg cagtcatgga aaatgcctca gacaaggcat ggattgaaat	1320
cctggttttg ctactttgta acctcacaca ggtgtccaag cctgtggatt taataagcct	1380
atgttcaaaa agcaattagc atggtccctg acaagcaaga gctcagaaag attctggcta	1440
caattgttat tactggtacc tctttggagg ccaagcttcg ggccaaggc aggtagggga	1500
ctcctccta ccttcaaaga atttcatgg cgggaggtag tggcgagggg acaagtagtg	1560
agatgagcaa ataaaagcta ttctgtgca ttgtggcac tgtggccata ggaggggtcc	1620
caaagccaga tgaaggaccc aaagccaggc cacagagtac atctgtcctg tgcatgcaact	1680
gcaaaaaggc acctagcaaa ggagactagg aagctgaaag gcagtctgtg acctccttca	1740
tggtttcctg tatctgcca aagtgggtac ctttttctga ttgcacaaa ggctagtgg	1800
ggccctgtag gtatggcca aactcaggct ggaagtggca gtctgagatg gttcccagg	1860
gatatgtgct cctggctctc catgaggagt tcatgagggt agcttgatga ggcctatctt	1920
ggcagaggga atggtacatg caaagctctg gaaatctgga gaggagtctt ggggtgtcag	1980
aggaactgc cagtgttaga tggcattggc cagcagggcc tggcaggga gagagtcagt	2040
tagggaagcc aggtgagta ggtagtctg tgaggaacca ctgcaggatg tgaagcagat	2100
gagcctcact ggaggctgtg gaaagcctcc ctagaatagc acatggcctc aggggtttga	2160
gaacagctct gatgccaatc tcatctcagt ttctcatct gaataatggg gatgacatta	2220
ttgcaggggc tgctataagg gctaaataag ataatgtacc ttaactgttt agcacaatgc	2280
cctgctcagg gtaagggtc cacaataacc agccatgggt attatcagca ggatccagga	2340
gagcacactc cagggtcccg ggtggacgca cccctcccta gaagacaagg ctggtgatgc	2400
aggggccatc tccccagcg gtgctggaga ctgaaggagc ttcttcctga ctgaaggct	2460

10

20

30

40

50

gattggttca aaaaactcag caaaaagttt aatagcaagg tgagacttca attctccttt	2520
ttgaggtagg cagaggtggg agaatagtga accaagcttc ccttcttctt ggggaagggg	2580
gctgtggtgg ggacagtctc acccaagggc agagatcctc accccatcct tcctggatgt	2640
ccccgccttg tctcattggc atctgtggtg gagagtcttt tgtggatggc ttgcacatga	2700
cattttctgt ttctgtaaca ctttctgtgt ggacaattct gtccttttcc tctgtggctc	2760
ccatatgggt tggatagggt acagtctagg tctccctccc aagggtgtta tttccagcaa	2820
gggaaaactc caagatccac cccctaaact gggccagaca agtcaacacc ccttccctga	2880
ggaagccatc accactggga ccacctggcc ttcttccatt gcagcctgtg gatccctggc	2940
ctcccgctg agttgggggt gggggtggag gcataagtct gaaaaaaaaag tgggtaatag	3000
tcagcagttc cctaaagtag aattactacc caccctctgc catggacccc agcataaagc	3060
tttttgtggg gcgtgcatga cctgactctg tactggcgtt aggcttcagg agatctgtgg	3120
aatagagttt gacttcatgg atcctaacct tctgagacct gctgctgact cccagggagc	3180
aggtcctccc tcacagtctg tgcctcagct tcccagaaa aggtagatgg aggtgagtta	3240
aatgcttggg gatcctacac ctgggctttt gcttctttt tccttgcacg gtcagtggcc	3300
aacacagtgc ctgacattca cactgaggcc cagcatacct atctttaagc agtttgaag	3360
tgatcttctg ggggtgatgg gcgtcttaaa acggtttcca tagcaagcac ctactttta	3420
ctcacatggg atgtttgttt ggaggggggc attaaaagga ctgctggcaa ggaggagaga	3480
gactaaacgc ctccccaagg gagccatttc ttggcatagt agttaaggga gaccacttct	3540
cagcattcgg aaggaaactgg ttgggagcag gtgtccacga tgtctgggga ggggtcactt	3600
cgtgtggtct tggatatcag gagtggcaga gaggcaacac attccagatg agctctgccc	3660
tttgacacct cccccaccc caccctggct gggtaaggc cccaaggcca catatagaag	3720
gcgtggaagg tgggcaccag ctgctgctgc caggagatcc atgctccata agccctcgcg	3780
ccagcctcgg agacagccag gctgcgaga gcagaggaga ggaagcagcg aggtgggaga	3840
cagtttcgct tctcccaccg aggccgccc tgtggctgca ggcgcccga tcgccacagt	3900
taactccctg ttatctgggc cccaatcgat ctcaggctgt aacgtttaac cctaggctga	3960

10

20

30

40

50

cttccccaac cgccctcccc ctctccctcc cctgcttggg tctggggact gcgttttctt	4020
cgctcgcag aggaaggctg gccttgaca aatccgcccc cacgaatccc aaagaattgg	4080
agaaaacttc cactttggga ttatatgcag ttgggattat atgagcccg ggcttgcacc	4140
atgggtacgt gaggtgaaga catctgcagc agcaggatta attagcctaa gatgggcata	4200
tggaggccac tgatggagtg aaagcgggat atgcggggcc aactctgtcc ccactgggcg	4260
cctactctgg caaggctgag ttttccttct gtctttcaat cagtacctat tgagcgtgc	4320
tgttccaagc attgtttcgg gttttgagtg cgtaggcat ggtctcaggg caccaaatgt	4380
acgtagtcgt tttagccccg ggactcaaga gttgaggctg atgcctgcct gagagataaa	4440
atatcctttc tcggatcagt ttcctcacct gagaaatggg aacgggaatc tccgcccctt	4500
ttctcccggg gccctagtgc ccactgaatc cattaaggag ctcttgggaag ggtgggtct	4560
tggaacacgc gtctacctcc caggacctc gactaggaat ctctggcccg ccgcgcacct	4620
gagctggggg gcgcggccaa attctccctc ccggtcctcg aagcttctgg cccgctcta	4680
gagggggcag aaagatagca gatttccccg gaggtgcgtc tctaaacca gaccgcctca	4740
ccaaagcggg gaggtcgtcc tttttttttt tttttgtaa agttgcggga aataggcgaa	4800
gacggggcgc gcaaggagc tgagcctggg tggaccgcgt cagggcgcg ggagctcgag	4860
gcgcagcggc tgcagctccg gcctcagagc ccgcggcgtc caagtggccc gagctgcgt	4920
gggaggagg cggcgggagg agggagggga gccgaggtgg agggggttg gggaggagg	4980
gagcggcgag tccggtccg	5000

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic primer

<400> 6

tccgctgctc tggagaag	18
---------------------	----

<210> 7

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic primer

<400> 7
 cacacgagca gtgacattgc

20

10

<210> 8
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic primer

<400> 8
 atgctgctacg tgcgc

15

20

<210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic primer

30

<400> 9
 ttaatacaaaa aggccaaatc ccat

24

<210> 10
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

40

<220>
 <223> Synthetic primer

<400> 10
 cagctggagc cccacag

17

<210> 11
 <211> 19
 <212> DNA

50

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic primer

<400> 11

gaggtcccag gtcctgagc

19

<210> 12

10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthtic primer

<400> 12

gtgcccacaa tcatggagga g

21

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic primer

<400> 13

catcctcctc cagcactgtg

20

30

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic primer

<400> 14

ctgctcctgg ccctcatc

18

40

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

50

<220>

<223> Synthtic primer

<400> 15

gaccccccttc actcatcatg tc

22

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> artificial sequence

<400> 16

aaccccaaagc tgccctctcc

20

<210> 17

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> artificial sequence

<400> 17

agctgaatgg aaaaaacatt gaagacgtc

29

30

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> artificial sequence

<400> 18

gcacaaaagt ggtgctgtg

19

40

<210> 19

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> artificial sequence

50

<400> 19			
gcgtggtgca ggagcat	17		
<210> 20			
<211> 22			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			10
<220>			
<223> artificial sequence			
<400> 20			
gcagtctgag atggttccca gg	22		
<210> 21			
<211> 22			
<212> DNA			20
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> artificial sequence			
<400> 21			
tgcattgtacc attccctctg cc	22		
<210> 22			30
<211> 22			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> artificial sequence			
<400> 22			
tcctgggagt tggatgatgtc ag	22		40
<210> 23			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> artificial sequence			
<400> 23			50

aaaccctgct cggatcgctc

20

<210> 24

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

10

Lys Lys Lys Arg Lys Arg Cys Gly Met Cys Ala Pro Cys Arg Arg Arg
 1 5 10 15

Ile Asn Cys Glu Gln Cys Ser Ser Cys Arg Asn Arg Lys Thr Gly His
 20 25 30

Gln Ile Cys Lys Phe Arg Lys Cys Glu Glu Leu Lys Lys Lys
 35 40 45

20

<210> 25

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Lys Lys Lys Arg Lys Arg Cys Gly Val Cys Val Pro Cys Lys Arg Leu
 1 5 10 15

30

Ile Asn Cys Gly Val Cys Ser Ser Cys Arg Asn Arg Lys Thr Gly His
 20 25 30

Gln Ile Cys Lys Phe Arg Lys Cys Glu Glu Leu Lys Lys Lys
 35 40 45

40

<210> 26

<211> 45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Arg Lys Lys Arg Lys Arg Cys Gly Thr Cys Glu Pro Cys Arg Arg Leu
 1 5 10 15

50

Glu Asn Cys Gly Ala Cys Thr Ser Cys Thr Asn Arg Arg Thr His Gln
 20 25 30

Ile Cys Lys Leu Arg Lys Cys Glu Val Leu Lys Lys Lys
 35 40 45

10

<210> 27

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Lys Lys Lys Arg Lys Arg Cys Gly Val Cys Glu Pro Cys Gln Gln Lys
 1 5 10 15

20

Thr Asn Cys Gly Glu Cys Thr Tyr Cys Lys Asn Arg Lys Asn Ser His
 20 25 30

Gln Ile Cys Lys Lys Arg Lys Cys Glu Glu Leu Lys Lys Lys
 35 40 45

<210> 28

30

<211> 52

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Gly Arg Arg Ser Arg Arg Cys Gly Gln Cys Pro Gly Cys Gln Val Pro
 1 5 10 15

40

Glu Asp Cys Gly Val Cys Thr Asn Cys Leu Asp Lys Pro Lys Phe Gly
 20 25 30

Gly Arg Asn Ile Lys Lys Gln Cys Cys Lys Met Arg Lys Cys Gln Asn
 35 40 45

Leu Gln Trp Met
 50

50

<210> 29

<211> 52

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Lys Met Arg Met Ala Arg Cys Gly His Cys Arg Gly Cys Leu Arg Val 10
 1 5 10 15

Gln Asp Cys Gly Ser Cys Val Asn Cys Leu Asp Lys Pro Lys Phe Gly
 20 25 30

Gly Pro Asn Thr Lys Lys Gln Cys Cys Val Tyr Arg Lys Cys Asp Lys
 35 40 45 20

Ile Glu Ala Arg
 50

<210> 30

<211> 52

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Met Phe Lys Arg Val Gly Cys Gly Glu Cys Ala Ala Cys Gln Val Thr
 1 5 10 15

Glu Asp Cys Gly Ala Cys Ser Thr Cys Leu Leu Gln Leu Pro His Asp
 20 25 30

Val Ala Ser Gly Leu Phe Cys Lys Cys Glu Arg Arg Arg Cys Leu Arg 40
 35 40 45

Ile Val Glu Arg
 50

<210> 31

<211> 50

50

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Val Glu Arg Ser Arg Gly Cys Gly Val Cys Arg Gly Cys Gln Thr Gln
 1 5 10 15

Glu Asp Cys Gly His Cys Pro Ile Cys Leu Arg Pro Pro Arg Pro Gly 10
 20 25 30

Leu Arg Arg Gln Trp Lys Cys Val Gln Arg Arg Cys Leu Arg Gly Lys
 35 40 45

His Ala
 50

20

<210> 32

<211> 52

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Arg Arg Gln Asn Arg Lys Cys Gly Ala Cys Ala Ala Cys Leu Arg Arg 30
 1 5 10 15

Met Asp Cys Gly Arg Cys Asp Phe Cys Cys Asp Lys Pro Lys Phe Gly
 20 25 30

Gly Ser Asn Gln Lys Arg Gln Lys Cys Arg Trp Arg Gln Cys Leu Gln
 35 40 45

40

Phe Ala Met Lys
 50

<210> 33

<211> 52

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

50

Lys Arg Ser Ala Arg Met Cys Gly Glu Cys Glu Ala Cys Arg Arg Thr
 1 5 10 15

Glu Asp Cys Gly His Cys Asp Phe Cys Arg Asp Met Lys Lys Phe Gly
 20 25 30

Gly Pro Asn Lys Ile Arg Gln Lys Cys Arg Leu Arg Gln Cys Gln Leu
 35 40 45

10

Arg Ala Arg Glu
 50

<210> 34

<211> 51

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 34

Ala Phe Lys Arg Arg Arg Cys Gly Val Cys Glu Val Cys Gln Gln Pro
 1 5 10 15

Glu Cys Gly Lys Cys Lys Ala Cys Lys Asp Met Val Lys Phe Gly Gly
 20 25 30

30

Ser Gly Arg Ser Lys Gln Ala Cys Gln Glu Arg Arg Cys Pro Asn Met
 35 40 45

Ala Met Lys
 50

40

<210> 35

<211> 51

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Arg Arg Arg Arg Thr Arg Cys Arg Lys Cys Glu Ala Cys Leu Arg Thr
 1 5 10 15

50

Glu Cys Gly Glu Cys His Phe Cys Lys Asp Met Lys Lys Phe Gly Gly
 20 25 30

Pro Gly Arg Met Lys Gln Ser Cys Ile Met Arg Gln Cys Ile Ala Pro
 35 40 45

Val Leu Pro
 50

10

<210> 36

<211> 51

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

20

Arg Arg Arg Arg Val Arg Cys Arg Lys Cys Lys Ala Cys Val Gln Gly
 1 5 10 15

Glu Cys Gly Val Cys His Tyr Cys Arg Asp Met Lys Lys Phe Gly Gly
 20 25 30

Pro Gly Arg Met Lys Gln Ser Cys Val Leu Arg Gln Cys Leu Ala Pro
 35 40 45

30

Arg Leu Pro
 50

<210> 37

<211> 51

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40

<400> 37

Arg Arg Arg Arg Thr Arg Cys Arg Arg Cys Arg Ala Cys Val Arg Thr
 1 5 10 15

Glu Cys Gly Asp Cys His Phe Cys Arg Asp Met Lys Lys Phe Gly Gly
 20 25 30

50

Pro Gly Arg Met Lys Gln Ser Cys Leu Leu Arg Gln Cys Thr Ala Pro
 35 40 45

Val Leu Pro
 50

10

【図面の簡単な説明】

【0072】

【図1】CXXC5 (RINF) がレチノイン酸の直接標的であることを示す図である。(A) . ATRA 処置 (1 μ M) の4時間後に定量 RT-PCR により RINF mRNA 発現レベルを測定した。10 μ g/mL にて用いたシクロヘキシミド (CHX) による翻訳の障害は、RINF mRNA レベルの ATRA による上昇を阻止しなかった。これは、このプロセスがデノボタンパク質合成を必要としないことを示しており、Rinf がレチノイン酸の一次標的であることを強く示唆している。ヒストグラムは、2つの独立した細胞培養処置の平均 (+/- s.e.m) を表している。(B) . NB4 細胞における RAR および PML-RAR の RINF プロモーターとの *in vivo* 結合。1 μ M ATRA で3時間処置した NB4 細胞または処置していない NB4 細胞から架橋クロマチンを調製し、抗 RAR 抗体または抗 PML 抗体により免疫沈降させた。この沈降物を、ヒト RINF または RARb2 遺伝子プロモーターにわたるプライマー対を用いる PCR 解析に付した。これらのプライマーは、RINF プロモーターに見られる推定レチノイド応答性エレメント (ggagttcatgaggtgagc) または RARb2 プロモーター (ここでは陽性対照として用いた) において確立されている RARE (gggtcaccgaaagtca) を含むように設計された。インプット: IP の前に NB4 細胞の全クロマチンについて PCR を行った。無 Ab (無抗体対照): 無関係の抗体を用いたまたは抗体を用いない IP 後に得られたサンプルについて PCR を行った。

20

【図2】Cxxc5 遺伝子構造とタンパク質産物 (RINF) を示す図である。(A) Cxxc5 (Rinf) 遺伝子は、染色体 5q31.3 に局在する。Cxxc5 遺伝子は pter の 139,008,130bp に始まり、pter の 139,043,651bp に終わる。Cxxc5 遺伝子はプラス鎖方向に配向され、35,522kbp 長である。(B) Cxxc5 (Rinf) 遺伝子のゲノム組織化。Cxxc5 遺伝子は4つのエクソンに組織化され、オープンリーディングフレームの95%はエクソン3に位置する。ダイレクトリピート2 (Direct Repeat 2) (DR2) タイプの推定レチノイン酸応答性エレメント (RARE) は、エクソン1転写開始部位の上流側 -3116bp に位置する。(C) 一文字アミノ酸表示による RINF の予測アミノ酸配列。オープンリーディングフレームは322個のアミノ酸残基からなるタンパク質配列であり理論分子量が32.98kDa である (www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) が見込まれる。亜鉛フィンガードメインに下線を施している。(D) CXXC 亜鉛フィンガードメインを除いては、保存された構造ドメインは見られなかった。RINF タンパク質の CXXC - モチーフとそのヒトパラログとのアラインメントを示している。CXXC - モチーフの中で不変であるアミノ酸は灰色で示し、保存されたシステイン残基は赤色で示している。CXXC 型亜鉛フィンガーのコンセンサス配列は、Cx2Cx2Cx4-5Cx2Cx2C9-15Cx2Cx4C により定義することができる。

30

40

【図3】NB4 細胞と他の骨髓細胞系統および組織における RINF 発現と細胞内局在性を示す図である。(A) NB4 細胞の ATRA 処置 (1 μ M) 中の RINF mRNA レベルの相対発現 (定量 RT-PCR により測定した)。(B) ATRA (1 μ M) により処置した NB4 細胞または処置していない NB4 細胞からの全抽出物における RINF タンパク質の発現。33kDa において特定バンドを検出する本発明者らの特注ポリクロー

50

ナルウサギ抗体（方法参照）を用いてRINFを検出した。アクチンをローディング対照として用いた。（C）ATRA（1 μ M）により処置したNB4細胞または処置していないNB4細胞の核および細胞質の画分におけるRINFタンパク質の発現。前記ポリクローナル抗体を用いてRINFを検出した。この実験では、PARPおよびアクチンを対照として用いて核および細胞質の抽出物の品質、純度、およびローディングを評価した。（D）FLAGタグ付きRINF（緑色；Alexa Fluor 488コンジュゲート抗FLAGモノクローナル抗体）は、共焦点および微分干渉コントラスト（DIC）顕微鏡法により解析したMCF7細胞の核に局在する（DAPIにより青色に染色された）。スケールバー、10 μ m。（E）ATRAを用いたまたは用いない、処置4時間の時点における、定量RT-PCRにより測定した様々な骨髄細胞系統におけるRINF mRNA発現（方法参照）。ATRA（1 μ M、4時間）により処置したまたは処置していない様々な骨髄細胞系統における（F）、および様々なヒト組織における（G）RINFタンパク質の発現。骨髄細胞系統（20 μ g）およびヒト組織抽出物（65 μ g、方法参照）の各々には同量のタンパク質（BCA定量法により決定した）をローディングした。アクチンをローディング対照として用いた。

【図4】RinfのshRNA媒介性サイレンシングがNB4細胞のATRA誘導性最終分化に対する耐性を与えることを示す図である。（A）レンチウイルスshRNAベクターと、Rinf発現をロックダウンするために用いたそれらのmRNA標的配列。レンチウイルスベクター構築物を用いたNB4細胞の感染および選抜（方法参照）後に、基礎RINF mRNA発現レベルを測定する定量RT-PCRにより基礎Rinf発現を標的とする標的配列の有効性をモニタリングした（模擬対照、pLKO.1/エンブティベクターに対する割合%で示した）。shRNA/RINF-3構築物およびshRNA/RINF-4構築物で最も有効なロックダウンを得た（それぞれ61%および85%、ATRAの不在下）。（B）ATRA（1 μ M）の存在下でshRNA構築物を安定に発現するNB4細胞の細胞増殖（集団倍加数）。示した動態実験（ここでは12日のATRA処置中）は3つの独立した実験（異なる感染群から行った）を代表するものである。対照細胞の成熟後細胞死を†により示している。（C）定量RT-PCRにより評価したRINF mRNA発現（培養12時間の時点における未処置模擬対照に対する割合%）と第4日目に細胞形態学により評価した最終分化（スケールバー、25 μ m）とエンブティベクター、hRNA/スクランブルベクター、shRNA/RINF-3ベクターおよびshRNA/RINF-4ベクターに感染させたNB4細胞の第2日目に評価したNB4還元解析（スケールバー、25 μ m）。細胞をATRA（1 μ M）により4日間処置したまたは処置しなかった（第1回目のATRA、第0日～第4日、左パネル）。さらに2週間のATRAの不在下での培養後に、第1回目のATRAを免れたshRNA/RINF-3細胞およびshRNA/RINF-4細胞をATRA（1 μ M）により4日間再処置した（第2回目のATRA、第20日～第24日、右パネル）。

【図5】正常骨髄造血時のRINF発現を示す図である。（A）骨髄CD34+細胞（健康ドナー由来）のサイトカイン誘導性（20 ng/mLのIL3およびG-CSF、50 ng/mLのSCF）顆粒球分化。細胞形態学（スケールバー、25 μ m）では、細胞をサイトスピンによりガラススライド上に広げ、風乾させ、培養の異なる時点（第2日～第10日）においてMay-Grünwald-Giemsa（MGG）により染色した。記録した培養日それぞれには、観察した骨髄造血の主要段階を示している。第1日目に、細胞の大部分が多核好中性顆粒球へと最終分化した。本発明者らの実験条件において、いくつかの単球細胞も認められた（示していない）。（B）CD34+前駆体のサイトカイン誘導性顆粒球分化時の様々な遺伝子の相対mRNA発現（定量RT-PCRにより測定した）（+/-s.e.m.）。

【図6】正常骨髄造血時のRINFの機能的関与を示す図である。3名の健康ドナー（A、BおよびC）由来のCD34+骨髄前駆体を、RINF発現を標的とするレンチウイルスshRNA構築物（shRNA/RINF-3および-4）または対照ベクター（エンブティおよびshRNA/スクランブル）に感染させ、サイトカイン（20 ng/mLの

10

20

30

40

50

IL3およびG-CSF、50 ng/mLのSCF)により処置してそれらを顆粒球にさせた。各ドナーでは、培養の2~3日おきにサイトスピンおよびMGG染色後の細胞形態学解析(スケールバー、25 μm)により骨髄分化を評価した。培養した前駆体の細胞分化は異なる動態で進展した。それらの図は、それぞれ14日後、30日後、および18日後の細胞集団の形態を示している。留意すべきは、shRNA-RINF-3構築物またはshRNA-RINF-4構築物に感染させた細胞培養物が、前骨髄球/骨髄球段階において対照(エンブティベクターまたはスクランブルベクターに感染させた細胞培養物)よりも未成熟な細胞(矢印で示している)を表示していることである。ドナーAでは、顆粒球分化動態は速く(第10日まで)、第14日目において対照培養物にはごくわずかの接着単球/マクロファージだけが存在した。

10

【図7】ATRA(1 μM)により処置した、NB4細胞、NB4-LR1細胞およびNB4-LR2細胞からの全抽出物におけるRINFタンパク質の発現を示す図である。33 kDaにおいて特定バンドを示す本発明者らの特注ポリクローナルウサギ抗体(方法参照)を用いてRINFを検出した。アクチンをローディング対照として用いた。RINF発現はNB4細胞において、2つの耐性サブクローンNB4-LR1およびNB4-LR2よりも顕著であった。

【図8】3名の(PML-RARα陽性)APL患者に由来する芽球におけるCxxc5 mRNA発現を示す図である。細胞をATRA(1 μM)により4時間処置したまたは処置しなかった。データは、公的に利用可能なデータベースArrayExpress(E-MEXP-149)から抽出した。マイクロアレイ実験は、Meani et al.により、Affymetrix GeneChip Human Genome HG-U133AおよびHG-U133Bにより行った(各サンプルに対して2つの表示したハイブリダイゼーション)。発現値測定に用いた定量様式はaffymetrix:CHPSignalである。Cxxc5発現を標的とする3つのプローブは、プローバ(222996_s_at)、b(224516_s_at)およびc(233955_x_at)であった。2箇所の点線は、未処置群およびATRA処置群の平均を示している。本発明者らは、対応のある学生t検定を適用し、これらの2群についての値に有意差がある(p値<0.05)ことを示した。

20

【図9】RinfのshRNA媒介性サイレンシングがHL60細胞のATRA誘導性最終分化を遅延させることを示す図である。HL60細胞を、エンブティレンチウイルスベクター、shRNA/スクランブルレンチウイルスベクター、shRNA/RINF-3レンチウイルスベクターまたはshRNA/RINF-4レンチウイルスベクターに感染させ、選抜した。次いで、細胞をATRA(1 μM)により処置したまたは処置しなかった。RINF mRNA発現を定量RT-PCRにより評価した(培養6時間の時点における未処置模擬対照に対する割合%)。最終分化を、第2日目にNB-T還元解析により第6日目に細胞形態学および(スケールバー、25 μm)により評価した。

30

【図10】RINF過剰発現がNB4細胞系統およびHL60細胞系統の分化を誘導するのに十分ではないことを示す図である。(A)ネズミ幹細胞ウイルス(MSCV)由来のレトロウイルス系を用いて、2つの細胞系統においてRINFを過剰発現させた。細胞を感染させ、感染の9日後にGFP発現について選別した。(B)2つの細胞系統では、RINF mRNA発現を定量RT-PCRにより測定し(ここでは第10日目)、それらのそれぞれの模擬対照に対する割合%で表した(+/-s.e.m)。(C)細胞をサイトスピンし、細胞形態学解析についてMGGにより染色し、ここでは2つの異なる大きさで視覚化した(スケールバー、25 μm)。RINF過剰発現の10日後でも分化の徴候は認められなかった。RINFを過剰発現している細胞培養物においてわずかな割合の細胞死(全体の約10%)が一貫して認められた。

40

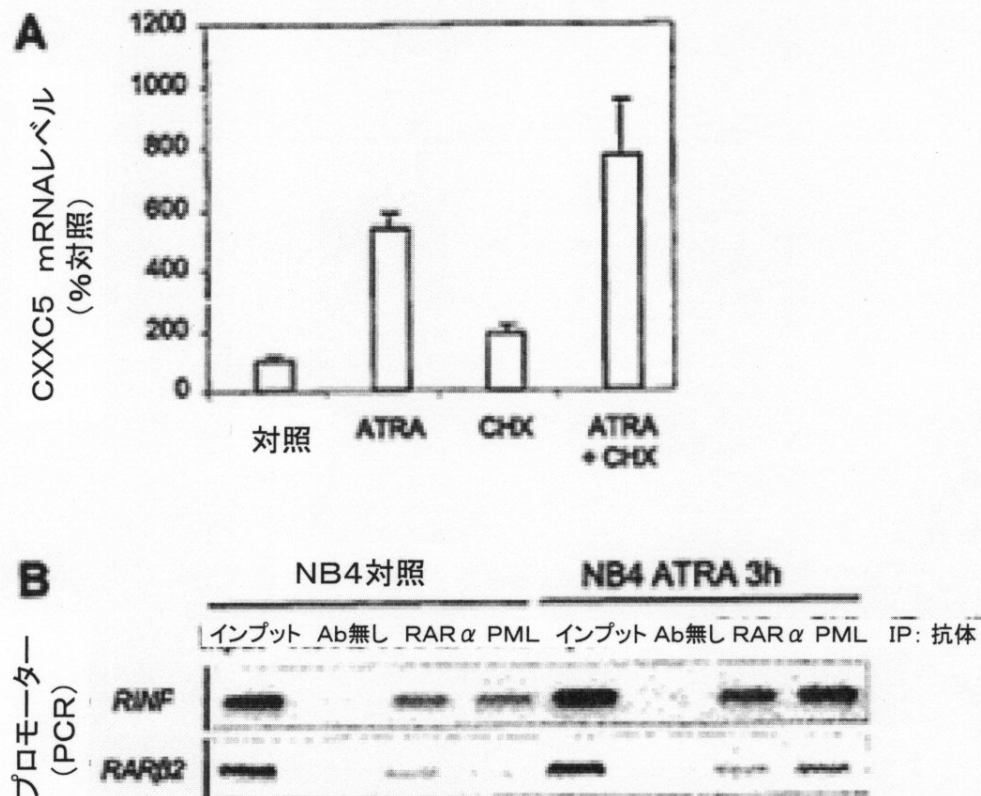
【図11】骨髄異形成(MDS)に罹患している55名の患者に由来するCD34+細胞におけるCxxc5 mRNA発現を示す図である。データは、公的に利用可能なデータベースArrayExpress(E-GEO-4619)およびGene Expression Omnibus(GDS2118)から抽出した。マイクロアレイ実験は

50

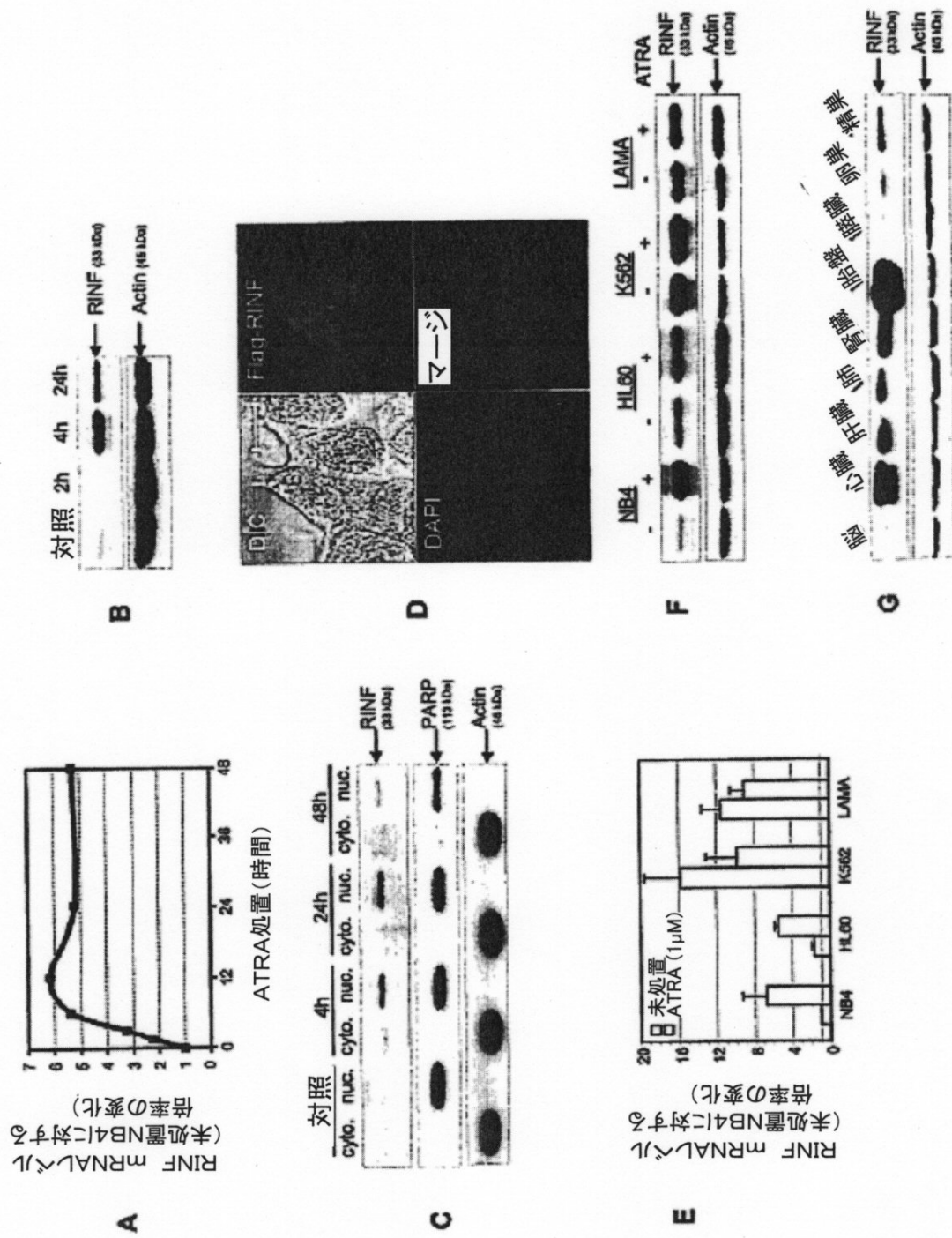
【図 15】甲状腺癌患者の対応サンプルの良性に対する腫瘍の R I N F 発現を示す図である。

10

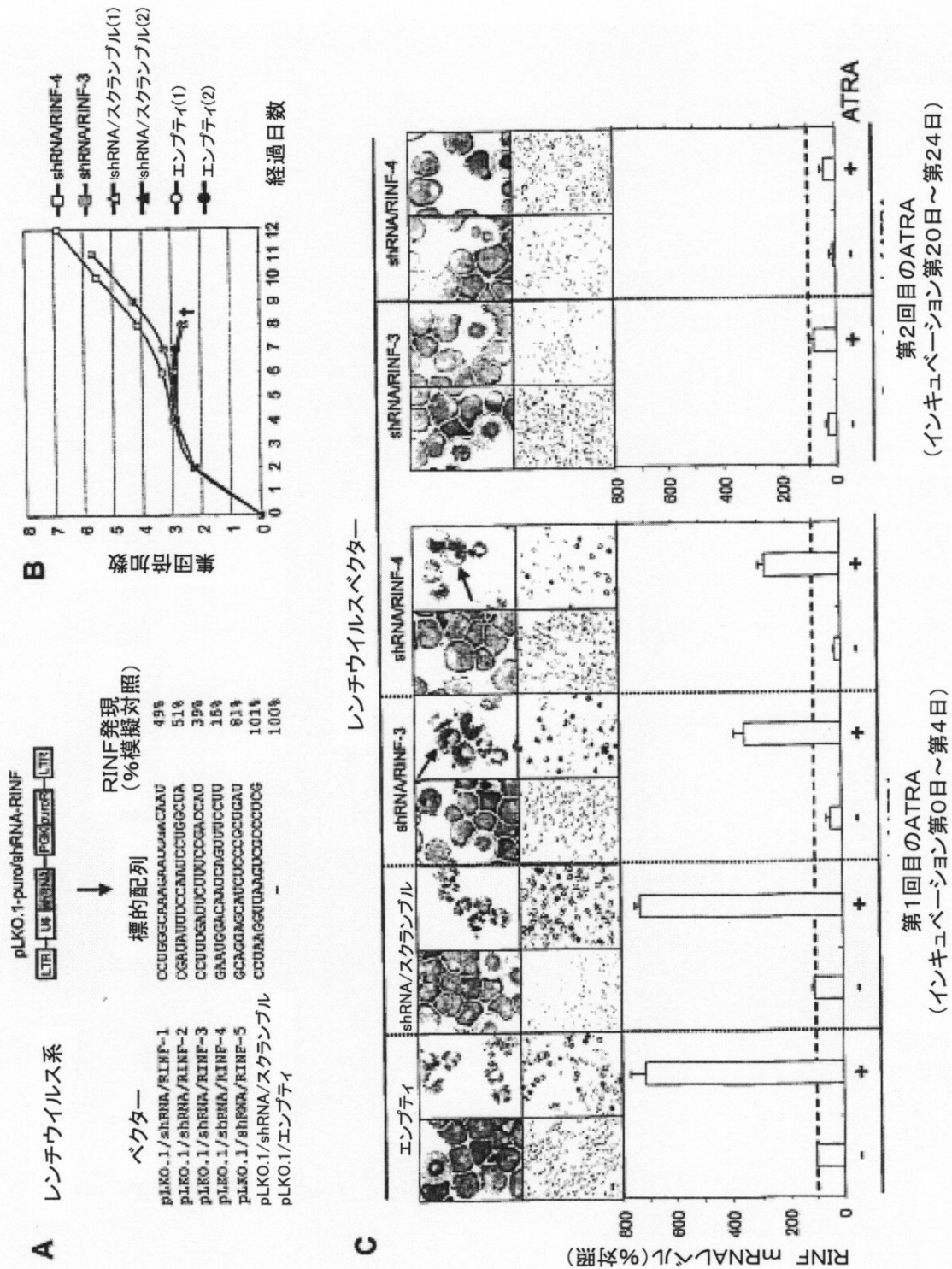
【圖 1】



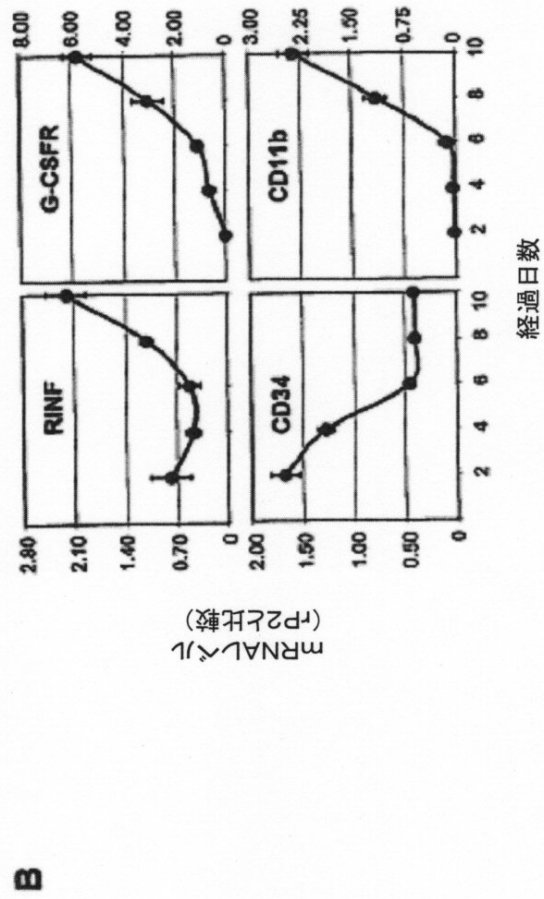
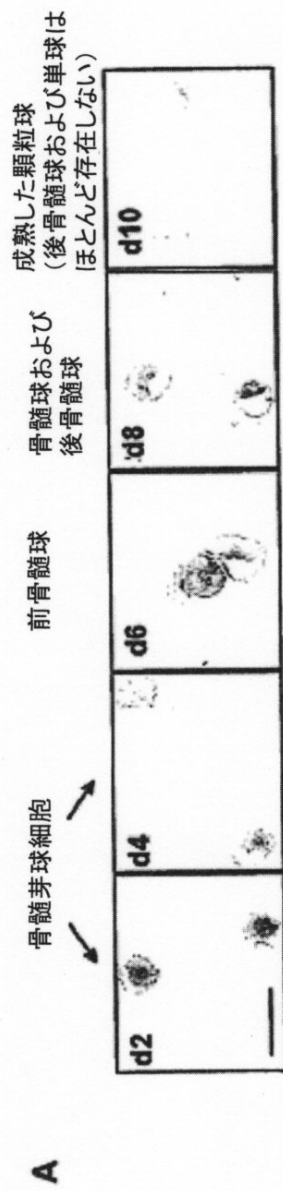
【図3】



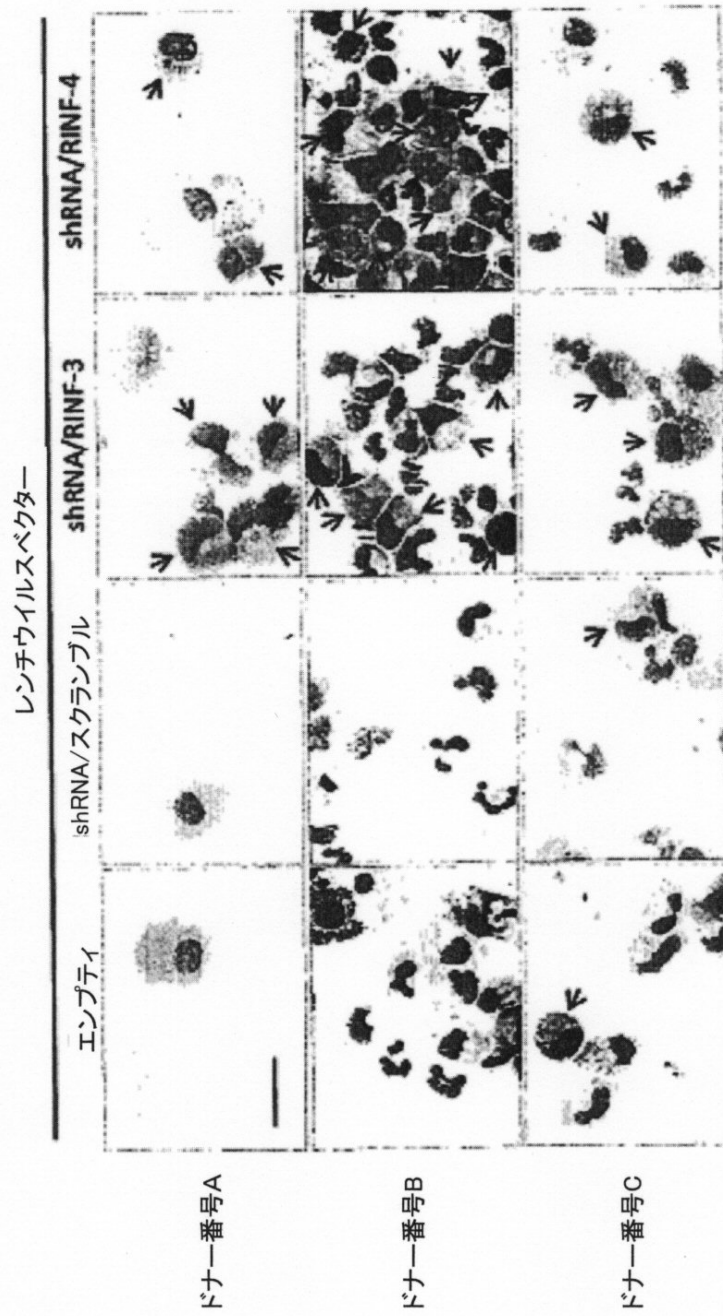
【図4】



【図 5】



【図6】

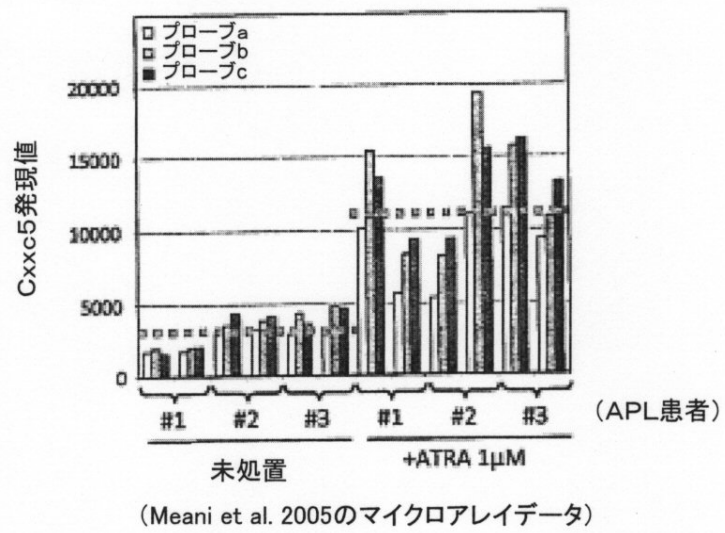


Western blot analysis showing RINF and Actin expression. The top row is probed with anti-RINF antibody, showing a band at 33 KDa. The bottom row is probed with anti-Actin antibody, showing a band at 45 KDa. The lanes are grouped by cell line: NB4, NB4-LR1, and NB4-LR2. Each group has four time points: 0h, 2h, 4h, and 24h. ATRA (1 μM) treatment is indicated above the 2h, 4h, and 24h lanes. RINF expression increases over time in NB4 and NB4-LR1 cells, while NB4-LR2 cells show no expression. Actin expression is consistent across all lanes.

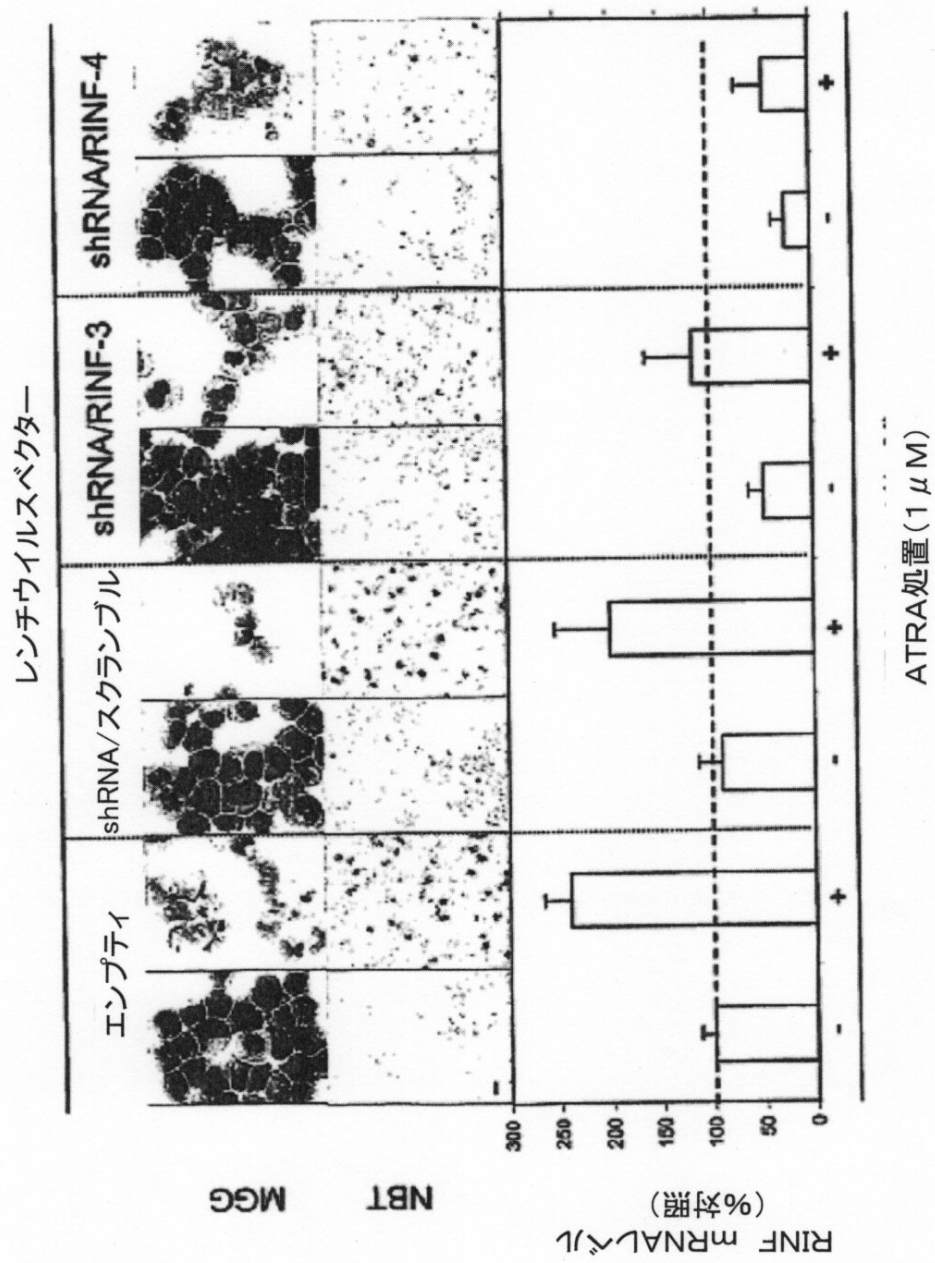
抗RINF

抗Actin

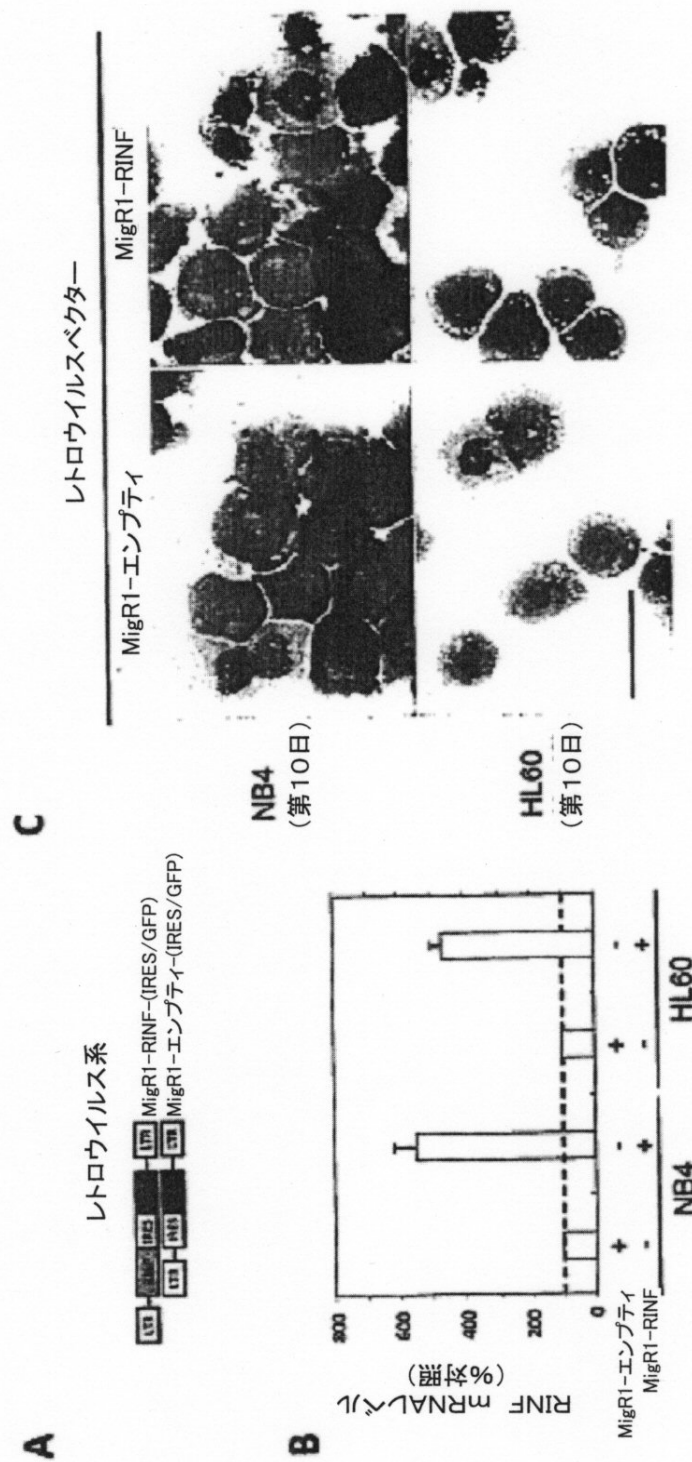
【図 8】



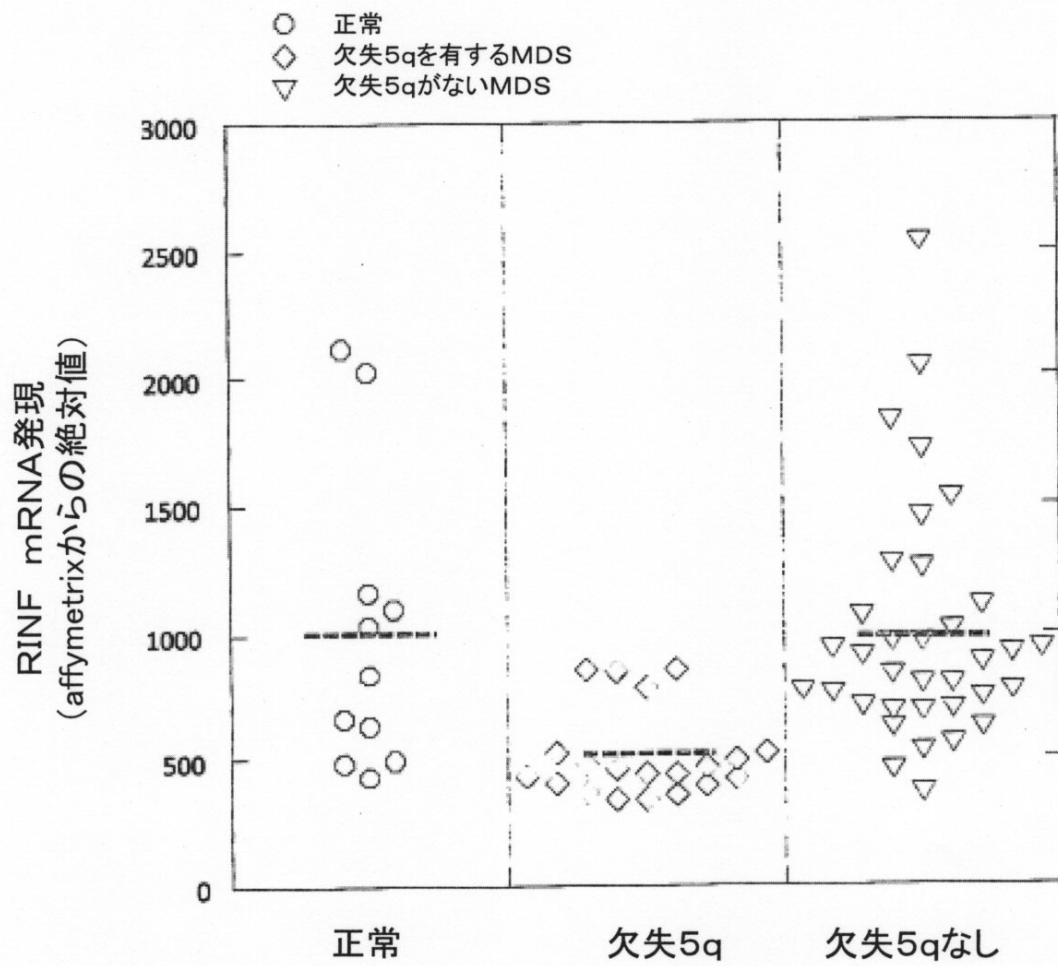
【図9】



【図10】

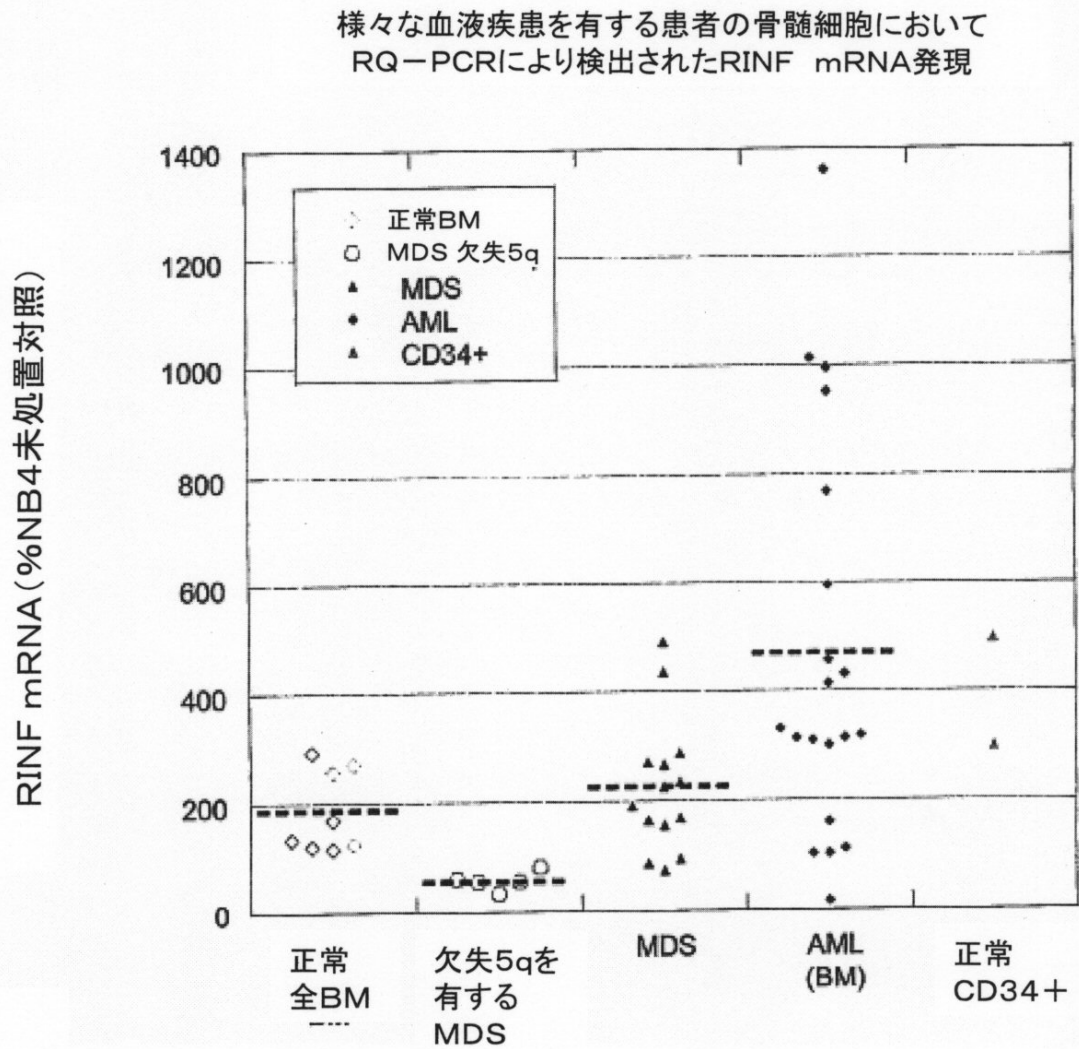


【図 1 1】

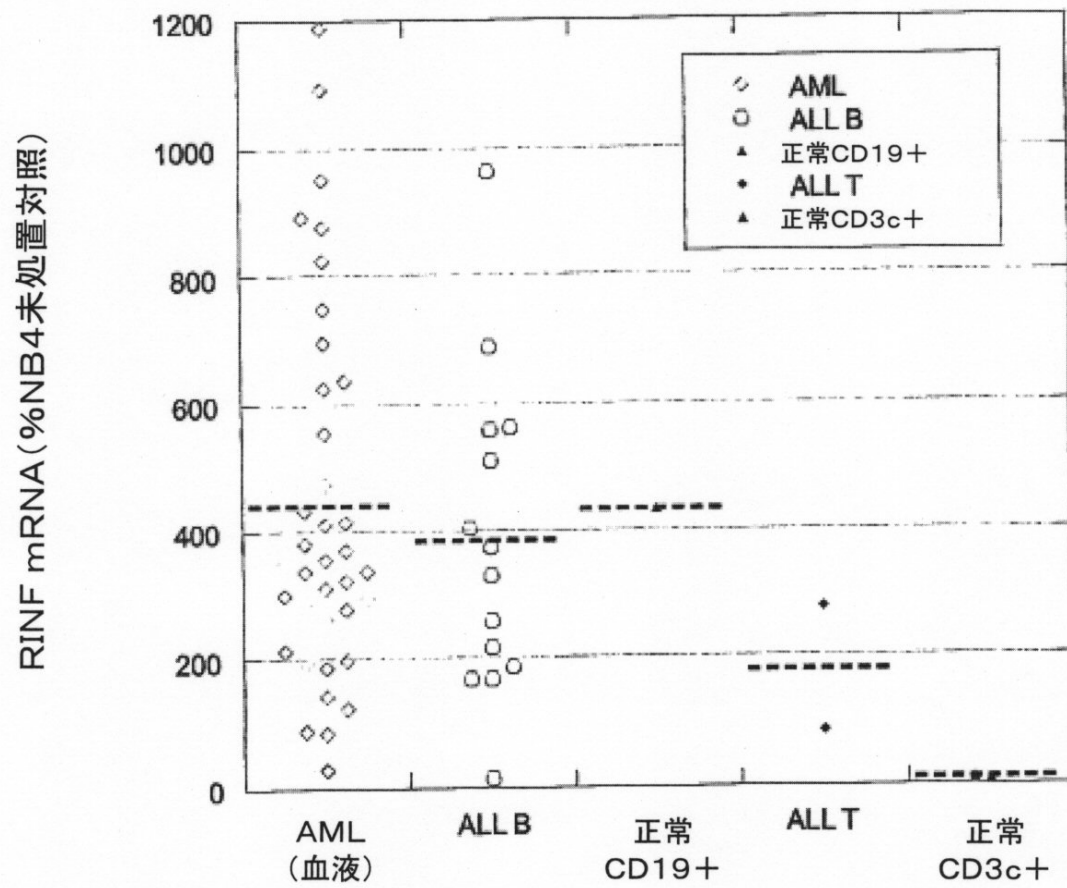


(Pellagatti et al. 2006のマイクロアレイデータ)

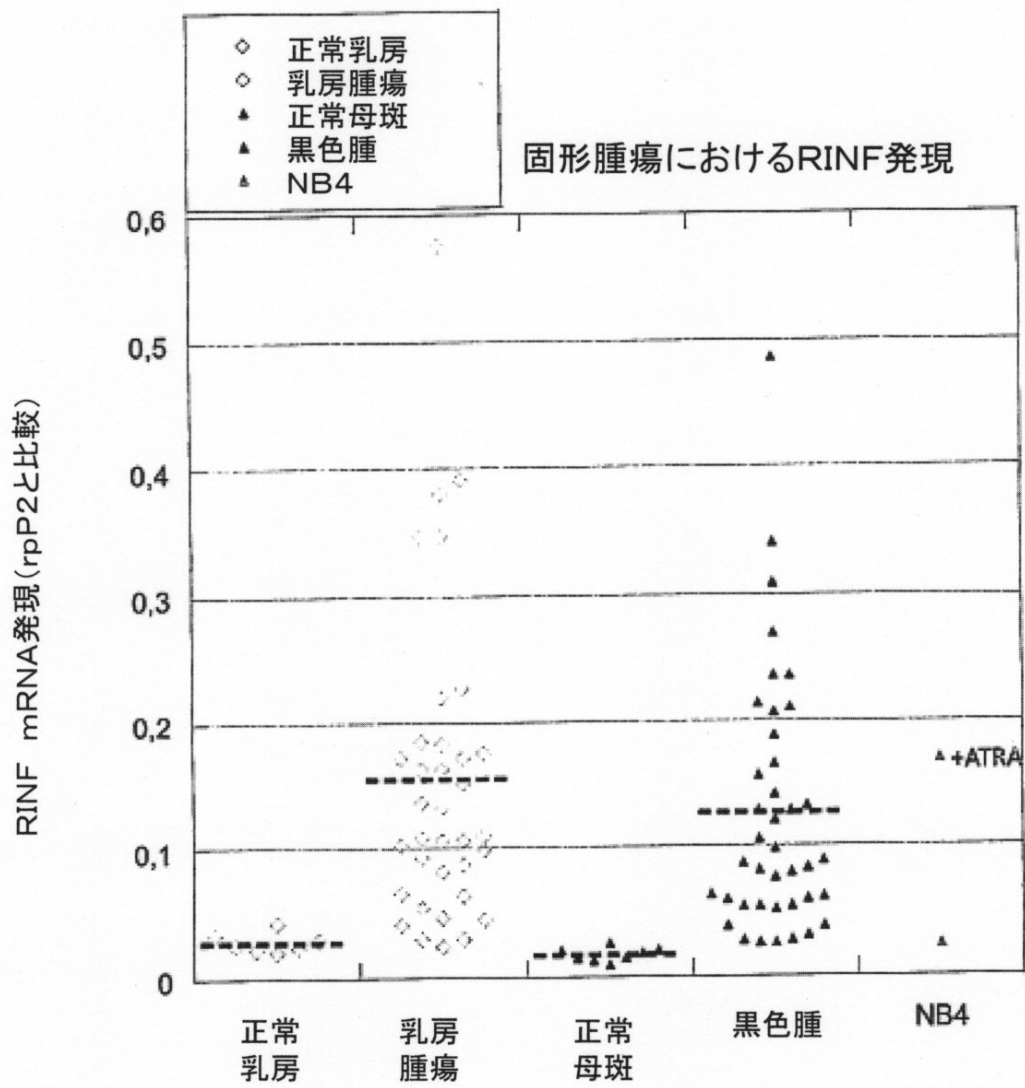
【図 1 2】



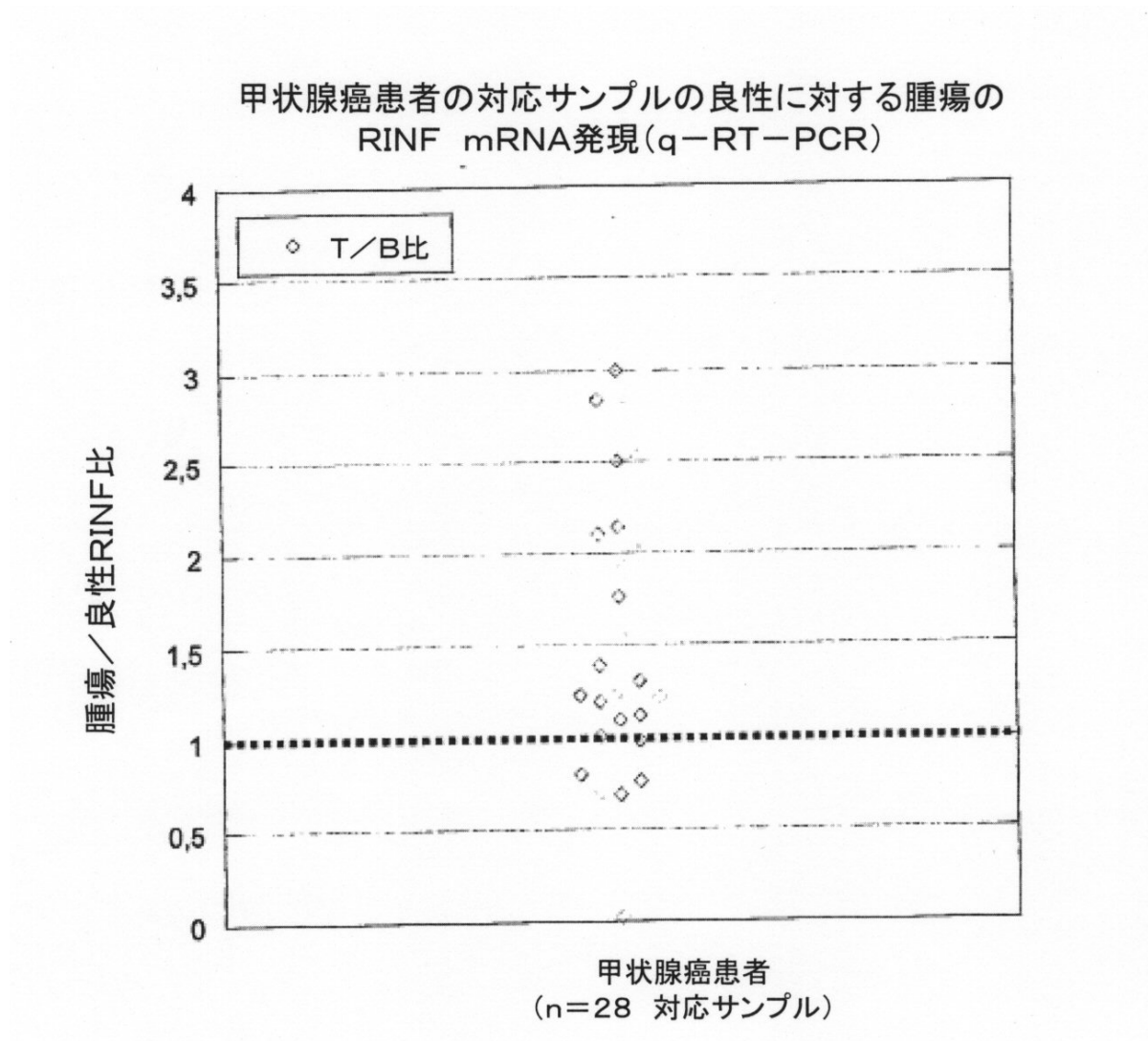
様々な血液疾患を有する患者の血液細胞において
RQ-PCRにより検出されたRINF mRNA発現



【図 1 4】



【図15】



【配列表】

[0005797554000001.xml](#)

フロントページの続き

- (72)発明者 ヨハン、アル・リレハウグ
ノルウェー国ベルゲン、イブセンスツ、89
(72)発明者 フレデリック、ペンディノ
フランス国バニユー、アブニユ、アンリ、ラベラ、79

審査官 北田 祐介

- (56)参考文献 STRAUSBERG RL et al., Database GenBank[online], Accession No.BC002490, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/33876754?sat=15&satkey=5955153>>, 19-MAR-2007 uploaded, 29-NOV-2013 retrieved, Title: Homo sapiens CXXC finger 5, mRNA (cDNA clone MGC:915 IMAGE:305046 5), complete cds
Int J Oncol., 2004年, 第25巻, 1193-1199ページ

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/09
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq
UniProt/GenSeq
PubMed