

(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 1

|              |           |
|--------------|-----------|
| C 12 N 15/09 | (2006.01) |
| C 12 Q 1/68  | (2006.01) |
| G 01 N 33/53 | (2006.01) |

|        |       |         |
|--------|-------|---------|
| C 12 N | 15/00 | Z N A A |
| C 12 Q | 1/68  | A       |
| G 01 N | 33/53 | D       |

請求項の数 2 (全 54 頁)

|               |                               |
|---------------|-------------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2011-513442 (P2011-513442)  |
| (86) (22) 出願日 | 平成21年6月9日 (2009.6.9)          |
| (65) 公表番号     | 特表2011-525352 (P2011-525352A) |
| (43) 公表日      | 平成23年9月22日 (2011.9.22)        |
| (86) 國際出願番号   | PCT/N02009/000214             |
| (87) 國際公開番号   | W02009/151337                 |
| (87) 國際公開日    | 平成21年12月17日 (2009.12.17)      |
| 審査請求日         | 平成24年5月29日 (2012.5.29)        |
| (31) 優先権主張番号  | 20082550                      |
| (32) 優先日      | 平成20年6月9日 (2008.6.9)          |
| (33) 優先権主張国   | ノルウェー(N0)                     |
| (31) 優先権主張番号  | 20090358                      |
| (32) 優先日      | 平成21年1月23日 (2009.1.23)        |
| (33) 優先権主張国   | ノルウェー(N0)                     |

|           |   |
|-----------|---|
| (73) 特許権者 | 509338400<br>ベルゲン・テクノロジオーヴァーフォリン<br>グ・アクティーゼルスカブ<br>ノルウェー国 5006 ベルゲン, トル<br>モーレンズゲート 51 |
| (74) 代理人  | 100117787<br>弁理士 勝沼 宏仁  |
| (74) 代理人  | 100091487<br>弁理士 中村 行孝  |
| (74) 代理人  | 100120617<br>弁理士 浅野 真理  |
| (74) 代理人  | 100126099<br>弁理士 反町 洋   |

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)、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（R A R、R X R、P M L - R A R）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そ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R I N F（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、C X X C 5を同定した。

#### 【0003】

R I N F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、R I N F発現が白血病細胞のレチノイド誘導性分化や正常C D 3 4 + 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（s h RNA）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、R I N F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、R I N F遺伝子は骨髓性白血病（急性骨髓性白血病 [ A M L ] / 骨髓異形成 [ M D S ] ）では欠失していることが多い小領域5 q 3 1 . 3に局在する。

#### 【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髓性白血病（AML）の一因となり得る。

#### 【0005】

急性前骨髓球性白血病（A P L）としても知られるA M L - M 3サブタイプ(the French-American-British (F A B) 分類による)は、顆粒球への分化の前骨髓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（A T R A）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、A T R Aは、A P L細胞においてレチノイン酸受容体（R A R 、P M L - R A R . . . ）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、N B 4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髓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。

#### 【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、N B 4細胞においてレチノイド類により早期に誘導され、A T R Aによる最終分化の回復に関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R I N F（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R I N F無効化は、レチノイド耐性表現型を強化することによりN B 4細胞におけるA T R Aの分化作用を排除し、正常C D 3 4 + 骨髓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R I N Fの重要で一般的な調節的役割が示される。

#### 【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。

10

20

30

40

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、骨髓細胞、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髓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 ) 、急性リンパ性白血病 ( A L L ) 、骨髓増殖性症候群 ( M P S ) 、慢性骨髓性白血病 ( 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 ) 、急性リンパ性白血病 ( A L L ) 、骨髓増殖性症候群 ( M P S ) 、慢性骨髓性白血病 ( 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 】**

40

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。

**【 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、または骨髓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、急性前骨髓球性白血病 ( 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 ( 骨髓異形成 ) 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ッ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) :

10

造血(Hematopoiesis)(古代ギリシャ語：「*haima*」血液；「*poiesis*」作ること)(hemopoiesisと呼ばれることがある)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】

20

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(platellet))も含むように用いられる。

【0026】

急性骨髓性白血病(Acute myeloid leukemia)(AML) :

急性骨髓性白血病(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)。

30

【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。

40

【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】

50

レチノイド応答性の予後：

レチノイド類による療法に応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

10

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)および骨髄細胞(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ペニシリングおよび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%CO<sub>2</sub>/加湿霧囲気中暗所にて37℃でインキュベートした。ヒト骨髄一次CD34+細胞(StemCell technologies)のin vitro増加のため、本発明者らは、上記培地に20ng/mlのインターロイキン3(IL3)、20ng/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)50ng/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<sub>0</sub>) / Log 2 (式中、Nは計数した細胞数であり、N<sub>0</sub>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を一緒に集め、Trizol(Invitrogen)またはRNasey mini kit(Qiagen)を用いるRNA調製のためにそのまま-80℃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。

20

## 【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2µg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(50~70µg)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。20µg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

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、A B 1 7 0 0 C h e m i l u m i n e s c e n t M i c r o a r r a y A n a l y s e r s o f t w a r e v 1 . 0 3 ( P N 4 3 3 6 3 9 1 ) 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NB 4 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、欧洲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A r r a y E x p r e s s に受託番号E - B A S E - 7 で寄託されている。10

## 【 0 0 3 3 】

マイクロアレイデータ解析および遺伝子分類

A p p l i e d B i o s y s t e m s E x p r e s s i o n S y s t e m s o f t w a r e を使用してシグナルおよびシグナル対ノイズ比( S I H )を抽出した。研究には 5 , 0 0 0 を超える平均正規化シグナル強度と 6 0 0 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D y s v i k B, J o n a s s e n I. J-E x p r e s s に従ってJ - E x p r e s s P r o V 2 . 7 ソフトウェア(MoIMine, Bergen, Norway)にインポートし : Java. B i o i n f o r m a t i c s . 2 0 0 1 ; 1 7 : 3 6 9 - 3 7 0 . 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、P A N T H E R (商標)(Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships)およびG e n e O n t o l o g y (商標)( G O )を用いて分類した。20

## 【 0 0 3 4 】

定量R T - P C R

オリゴdT プライマーをT r a n s c r i p t o r R e v e r s e T r a n s c r i p t a s e (Roche)とともに用い製造業者の使用説明書に従って 2 0 -  $\mu$  l 容量において全RNA( 0 , 1 ~ 1  $\mu$  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(Roche)においてS Y B R g r e e n 検出キットを用い製造業者の使用説明書に従って定量P C Rを行った。各遺伝子( c x x c 5 、 c d 3 4 、 g c s f r および c d 1 1 b )について、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 ' および 5 ' - c a c a c g a g c a g t g a c a t t g c - 3 ' ) 、 r p P 2 ( 5 ' - a t g c g c t a c g t c g c c - 3 ' および 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 ' ) 、 c d 3 4 ( 5 ' - c a g c t g g a g c c c c a c a g - 3 ' および 5 ' - g a g g t c c c a g g t c c t g a g c - 3 ' ) 、 g c s f r ( 5 ' - g t g c c c a a t c a t g g a g g a g - 3 ' および 5 ' - c a t c c t c c t c c a g c a c t g t g - 3 ' ) 、 および c d 1 1 b ( 5 ' - c t g c t c t g g c c c t c a t c - 3 ' および 5 ' - g a c c c c t t c a c t c a t c a t g t c - 3 ' ) の検出用プライマーは総て、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： 9 5 で 1 0 秒の変性； 5 8 で 1 0 秒のアニーリング； 7 2 で 1 2 秒の伸長。30

## 【 0 0 3 5 】

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

様々な血液疾患に罹患している 9 4 名の患者および 1 3 名の健康ドナーから一連の 1 0 5 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( F A B . Bennet et al. 1982 ) およびW H O 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 5 q 欠失を有するM D S 、 1 4 染色体 5 q 欠失が ないM D S 、 2 0 A M L (骨髄サンプル) および 3 7 A M L (血液サンプル) 、 1 4 A L L B (血液) および 2 A L L 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。40

## 【 0 0 3 6 】

### 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dT プライマーおよびランダムヘキサマープライマーを Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche - 05 531 287 001) とともに用い製造業者の使用説明書に従って 20 -  $\mu$ l 容量において全 RNA (0, 1 ~ 1  $\mu$ 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 CX 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 Lightcycler (登録商標) 480 Probes Master (04 707 494 001) の製造業者の使用説明書に従って定量 PCR を行った。相対 mRNA 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'-tccgctgctggagaag-3'、5'-cacacgagcagtgcattgc-3' および 6FAM-AACCCAAAGCTgCC CTCTCC-BBQ) 、 r p P 2 (5'-atgcgtacgtcgcc-3'、5'-ttaatcaaaaaggccaaatccat-3' および Cy5-AgCTgAATggAAAAAACATTgAAgACgTC-BBQ) の検出用プライマーは総て、95 で 5 分間の最初の変性後に同じリアルタイム PCR 増幅条件で用いられるように設計した。よって、次のとおり 44 サイクルの間処理される：変性 95 で 10 秒間；および伸長 55 で 20 秒間。

#### 【 0 0 3 7 】

#### C X X C 5 の配列決定

配列決定の前に PCR 産物を ExoSAP-IT キット (GE healthcare - 78201) を用いて製品の使用説明書により精製に付した。BigDye (登録商標) v3.1 cycle sequencing Kit (ABI - 4337456) を特異的なフォワード (5'-gcacaaaaagtggtgctgtg-3') およびリバース - (5'-gcgtggtgaggagcat-3') 配列決定プライマーとともに用いて全容量 10  $\mu$ l で次の反応条件により配列決定を行った：変性 96 、 10 秒； 50 で 5 秒のアニーリング； 60 で 4 分の伸長、 25 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 35 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 40 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対の両方を含む 28 の甲状腺癌サンプルにおける R I N F mRNA 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

2000 万の NB 4 細胞を RPMI 培地 (Invitrogen) 中でホルムアルデヒド (1% v / v) により 37 で 10 分間架橋し、氷冷 PBS で 2 回洗い流し、低張細胞溶解バッファー - (0.25% Triton X-100、10 mM Na-EDTA、0.5 mM Na-EGTA、10 mM Tris-HCl、pH 8.0、およびプロテアーゼ阻害剤カクテル) に再懸濁した。Dounce (20 ストローク) を使用して原形質膜を破壊し、集めた核 (650 g、4 で 5 分の遠心分離) を 1200  $\mu$ l の ChIP バッファー (0.1% SDS、0.1% デオキシコール酸 Na、1% Triton x-100、1 mM EDTA、140 mM NaCl、10 mM Tris pH 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 500 ~ 1000 bp 長の DNA 断片を得た。各 IP では、200  $\mu$ l の超音波処理産物を回収し、希釈バッファー (20 mM Tris pH 8、2 mM EDTA、150 mM NaCl、1% Triton x-100) で 10 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 70  $\mu$ l のサケ精子 DNA / プロテイン A アガロース 50% スラリー (Upstate) 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 (IP) では断片化したクロマチン混合物に 4  $\mu$ g の抗 RAR 抗体 (Abcam - H1920)、または抗 PML 抗体 (Santa Cruz、sc-966) 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 70  $\mu$ l のサケ精子 DNA / プロテイン A アガロース 50% スラリー (Upstate) 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 NaHCO<sub>3</sub>）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 度で一晩加熱した。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 度で 2 時間処理した。各 IP から結果として得られた DNA をエタノール/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、前清浄工程後に 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 RARb2 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'-gcagtctgagatggttcccagg-3'/5'-tgcatgtaccattccctctgcc-3' および RARb2 プロモーターのプライマー（247 bp）5'-tcctggagtttgtatgtcag-3'/5'-aaaccctgctcgatcgctc-3'。

#### 【0040】

##### 細胞質および核の画分の調製

細胞分画を 4 度行った。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、4 × サンプルバッファー（Laemmli 1970）で 100 度 8 分間抽出した。

#### 【0041】

##### ウエスタンプロット

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プロット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プ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、プロットを 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プロットは 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 度行った。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、1,000gでの遠心分離により回収し、4×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

FLAGタグ付きRINFをコードするプラスミドをNB4細胞cDNAから構築した。PCR産物をpFLAG-CMV-4発現ベクター(Sigma)に挿入した。MCF7細胞をカバースリップ上で増殖させ、Fugene HD製造業者のプロトコール(Roche)によりFLAGタグ付きRINF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PBS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PBSで3回洗浄し、0.1%Triton X-100で10分間透過処理した後、ブロッキングバッファー(PBS、2%BSA)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(PBS、2%BSA)で1:3,000希釈した一次抗体(ウサギポリクローナル抗Flag M2、Sigma)とともに一晩インキュベートし、PBSで2回洗浄し、1:1,000希釈(PBS、2%BSA)した二次抗体(Molecular ProbesのAllexa-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PBSで3回洗浄し、Vectashield封入剤4',6-ジアミニジン-2-フェニルインドール(DAPI、Vector Laboratories)で封入して核を対比染色した。Plan Apochromat 63X N.A.1.4油浸対物レンズを搭載したZeiss LSM510 META共焦点レーザー顕微鏡において共焦点顕微鏡によりLSM510ソフトウェアv4.0(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

RINF発現を標的とするレンチウイルスプラスミド(pLKO.1/shRNA/RINF)は、Sigmaから購入し(MISSION(登録商標)shRNA大腸菌グリセロールストック)、対照ベクター(pLKO.1/TRCおよびpLKO.1/shRNA/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(Addgene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、HEK 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pSPAX2およびエンベローププラスミドpMD2.G)(Addgene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(Fugene HD、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、スピノ感染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NB4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

脳心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(GFP)を含むネズミ幹細胞ウイルスレトロウイルスベクターMig-R1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(LTR)プロモーターがRINFの発現を駆動できるようにMig-R1にRINFを挿入した。Mig-R1構築物(Mig-R1/エンプティおよびMig-R1/RINF)をPhoenix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(VSV-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GFP蛍光について

て選別した。

【0047】

U R L

C x x c 5 遺伝子のエキソン - イントロン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;33:427 6-4284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](http://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/](http://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 μM) により短時間 (90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 35 個の遺伝子を同定でき、それらの遺伝子は、処置90分の時点において一貫してアップリギュレートされ、未処置対照と比べて少なくとも2倍の誘導があり、3時間後もアップリギュレートされたままであった(表1)。これらの35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26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

| NB 4細胞<br>処置 | 対照<br>ATRA<br>(1μM) | プローブ数          |                           |                               | 遺伝子                          |   | 既知または潜在的<br>核因子 |
|--------------|---------------------|----------------|---------------------------|-------------------------------|------------------------------|---|-----------------|
|              |                     | 検出された<br>プローブ* | アップレギュレー<br>トされた<br>プローブ† | 共通してアップレ<br>ギュレートされた<br>プローブ‡ | 共通してアップレ<br>ギュレートされた<br>遺伝子§ |   |                 |
| 90分          | 15853               | 16299          | 96                        |                               |                              |   |                 |
| 3時間          | 16062               | 14464          | 313                       |                               |                              |   |                 |
| 3時間          | 16869               | 16166          | 240                       |                               |                              |   |                 |
|              |                     |                |                           | 40                            | 35                           | 9 |                 |

\*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90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重で行った）。§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く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

## 【0051】

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××c 5に関する。

## 【0052】

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1A）により、C××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30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N B 4細胞の前

処置は、 A T R A による C X X C 5 m R N A アップレギュレーションを阻止しなかった（図 1 A）。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 1 B ）により確認された。

#### 【 0 0 5 3 】

##### 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 2 A ）。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 2 B ）。この遺伝子の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 に開始コドンを有する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 2 C ）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 X \_ 2 C X \_ 2 C X \_ 4 - 5 C X \_ 2 C X \_ 2 C \_ 9 - 1 5 C X \_ 2 C X \_ 4 C ) が示された。 2 個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 2 D 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。

#### 【 0 0 5 4 】

##### 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ィール

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 m R N A 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 9 0 分に 2 倍の誘導が示された（図 3 A ）。 C x x c 5 の転写レベルは、処置 1 2 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 4 8 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 3 A ）。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 3 B ）、 A T R A 処置開始後 4 時間以内に予想分子量 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 m R N A 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。

#### 【 0 0 5 5 】

##### 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プロット解析により、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 3 C ）。この増加した発現レベルは少なくとも 4 8 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つたた

10

20

30

40

50

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)と少しほ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】

##### 異なる骨髄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、他の骨髄細胞系統(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 $\alpha$ 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発現が骨髄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プ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発現は前骨髄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プ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变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

10

20

30

40

50

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。

#### 【 0 0 5 9 】

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学的用量の 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 1 2 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）。

#### 【 0 0 6 0 】

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。

#### 【 0 0 6 1 】

次に、薬理学的用量の 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 1 2 日以内に死滅した。

#### 【 0 0 6 2 】

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 1 0 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 1 1 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。

#### 【 0 0 6 3 】

#### 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、薬理学的濃度の 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であるが、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。

#### 【 0 0 6 4 】

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

10

20

30

40

50

34+細胞のサイトカイン誘導性顆粒球分化時のRINF発現を検証した。形態学的变化(図5A)と、RINFとの比較によるCD34、CD11bおよびG-CSFRの発現の解析(図5B)により分化を評価した。RINF mRNAレベルの経時的発現プロファイルを定量RT-PCR解析により決定した。RINF mRNA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、RINF mRNA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5A-B)。サイトカインによる分化時のCD34+前駆細胞および正常造血細胞におけるRINF mRNAの検出により、その発現がAPL細胞に限定されない(それゆえPML-RAR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ATRAの薬理学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。

#### 【0065】

正常骨髄造血時のRINF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CD34+前駆細胞をレンチウイルスshRNA構築物に感染させて、RINF発現をノックダウンした。非感染細胞同様に、対照ベクター(shRNA/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5A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存在しなかった。重要なことには、shRNA/RINF-3およびshRNA/RINF-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shRNAで観察された顆粒球成熟におけるこの違いは、ATRAにより処置した白血病細胞系統NB4およびHL60に関して得た結果を見事に映し、正常骨髄造血時のRINFの同様の役割を示唆している。

#### 【0066】

考察

造血細胞分化の多段プロセスは、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。

#### 【0067】

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CXCC5(RINF)を同定し特徴付け、骨髄球性白血病細胞のレ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、DNA、RNA、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。CXCC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(MLL、MLL2)、ヒストンデメチラーゼ(FBXL-10、-11、-19)、DNA-メチル-トランスフェラーゼ(DNMT1)、またはCpG結合(CGBP、MBD1)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)。MLL、CGBP、およびMBD1のCXCCドメインは、非メチル化CpGと結合することがわかっており、この

10

20

30

40

50

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

#### 【 0 0 6 8 】

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 ターゲッ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

#### 【 0 0 6 9 】

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 2 0 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ってきた。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るに至った。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

#### 【 0 0 7 0 】

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40

、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学的に誘導できる 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

&lt;110&gt; AS Bergen Teknologioverforing AS

10

&lt;120&gt; Novel reinoid inducible factor, and uses thereof

&lt;130&gt; P11828N001

&lt;160&gt; 37

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

20

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2778

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

gtttgccgg cagccccgg gcagcggtca tagctccgtc ccgggcgggc gcgccggcggc 60

ggcggcagag gcggctgagc ctgagcgggg atgttagaggc ggccgcagca gaggcggcac 120

30

tggcggcaag agcagacgccc cgagccgagc gagaagagcg gcagagcctt atcccctgaa 180

gccggggcccc gcgtcccagc cctgcccagc ccgcgcggcag ccatgcgcgc cgcctgctga 240

gtccgggcgc cgacgctga gccctccgccc cgccggccgc gtcagctcg ggggtgatata 300

gttgcttttt gtgtttttt aattttggcc gcggggaggg ggaggagggg caggtgctgc 360

aggctcccccc ccctccccgc ctggggccag ccgcggccgc gcgactcggt ctccggaccc 420

40

gggcactgct ggccgttggc gcggagcgca ccgcggcggt ggtgccaga gcggagcgca 480

gctccctgcc ccgcggccct ccctcggtcc cgccggcgcacg gcggccgtgg cggcttggac 540

gactcggttgc gcccgttgc tgccggccg gggccggagt tcgctgcaag tcggcggaaa 600

gtttggctgc gcgggttccc ccgaagttca gagtgaagac atttccacct ggacacctga 660

ccatgtgcct gccctgagca gcgaggccca ccaggcatct ctgttgtgg cagcaggccc 720

50

|   |      |
|---|------|
| aggtcctggt ctgtggaccc tcggcagttg gcaggctccc tctgcagttt ggtctggcc    | 780  |
| tcggccccac catgtcgagc ctcggcggtg gctcccaagga tgccggcgcc agtagcagca  | 840  |
| gcagcaccaa tggcagcggt ggcagtggca gcagtgccc aaaggcagga gcagcagaca    | 900  |
| agagtgcagt ggtggctgcc gccgcaccag cctcagttgc agatgacaca ccacccccc    | 960  |
| agcgtcgaa caagagcggt atcatcagtg agccctcaa caagagcctg cgccgctccc     | 1020 |
| gccccgtctc ccactactt tctttttggca gcagtggtt tagtggcggt ggcagcatga    | 1080 |
| tggcggaga gtctgctgac aaggccactg cggctgcagc cgctgcctcc ctgttggcca    | 1140 |
| atgggcatga cctggcgccg gccatggcgg tggacaaaag caaccctacc tcaaagcaca   | 1200 |
| aaagtggtgc tgtggccagc ctgctgagca aggtagagcg ggccacggag ctggcagccg   | 1260 |
| agggacagct gacgctgcag cagttgcgc agtccacaga gatgtgaag cgcgtggtgc     | 1320 |
| aggagcatct cccgctgatg agcgaggcgg gtgctggct gcctgacatg gaggctgtgg    | 1380 |
| caggtgccga agccctcaat ggccagtcgg acttcccta cctggcgct ttccccatca     | 1440 |
| acccaggcct cttcattatg accccggcag gtgtgttcct ggccgagagc ggcgtgcaca   | 1500 |
| tggcggccct ggctgagttac cccatgcagg gagagctggc ctctgccatc agctccggca  | 1560 |
| agaagaagcg gaaacgctgc ggcattgtcg cgcctgccc gcccgcatac aactgcgagc    | 1620 |
| agtgcagcag ttgttagaat cgaaaagactg gccatcagat ttgcaaaattt agaaaatgtt | 1680 |
| aggaactcaa aaagaagcct tccgctgctc tggagaaggt gatgtttccg acgggagccg   | 1740 |
| ccttccggtg gttttagtga cggcgccgaa acccaaagct gcccctccg tgcaatgtca    | 1800 |
| ctgctcggtt ggtctccagc aaggattcg ggcgaagaca aacggatgca cccgtttta     | 1860 |
| gaaccaaaaa tattctctca cagatttcat tcctgtttt atatatataat ttttgttgt    | 1920 |
| cgttttaaca tctccacgtc cctagcataa aaagaaaaag aaaaaatttt aaactgcttt   | 1980 |
| ttcggaaagaa caacaacaaa aaagaggtaa agacgaatct ataaagtacc gagacttcc   | 2040 |
| ggccaaagaa tggacaatca gtttccttcc tttgtcgatg tcgtgttgtt ctgtgcagga   | 2100 |
| gatgcagttt ttgtgttagag aatgtaaatt ttctgttaacc ttttgaatc tagttactaa  | 2160 |
| taagcactac tggaaatttttag cacagttaa ctccaccctc attaaactt ctttgattc   | 2220 |

|  |      |    |
|--|------|----|
| tttccgacca taaaatagtgcatagtttgc ctggagaatc cactcacgtt cataaagaga   | 2280 |    |
| atgttgatgg cgccgtgttag aagccgctct gtatccatcc acgcgtgcag agctgccagc | 2340 |    |
| agggagctca cagaagggga gggagcacca ggccagctga gctgcaccca cagtcccag   | 2400 |    |
| actgggatcc cccacccaa cagtgattt ggaaaaaaaa atgaaagttc tgttcgitt     | 2460 |    |
| tccattgcga tctgggagc cccatctcgatattccaat cctggctact ttcttagag      | 2520 |    |
| aaaataagtc cttttttctt ggccttgcta atggcaacag aagaaaggc ttcttgct     | 2580 | 10 |
| ggtccccctgc tggtgggggt gggccccag gggccccct gcggcctggg ccccccgtcc   | 2640 |    |
| cacggccagc ttccctgctga tgaacatgct gttgtattt ttttagaaaa ccaggctgtt  | 2700 |    |
| tttgtaataa aacgaatgca ttttgtgtc acgaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa  | 2760 |    |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa  | 2778 |    |
|  |      | 20 |

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

|  |     |    |
|--|-----|----|
| <400> 2  |     |    |
| atgtcgagcc tcggcggtgg ctcccaggat gccggcgca gtagcagcag cagcaccaat   | 60  |    |
| ggcagcggtg gcagtggcag cagtggccaa aaggcaggag cagcagacaa gagtgcagtg  | 120 | 30 |
| gtggctgccg ccgcaccaggc ctcatggca gatgacacac caccccccga gcgtcgaaac  | 180 |    |
| aagagcggta tcatcagtga gcccctaacc aagagcctgc gccgcctccg cccgctctcc  | 240 |    |
| cactactctt ctgtggcag cagtgggtt agtggcggtg gcagcatgat gggcggagag    | 300 |    |
| tctgctgaca aggccactgc ggctgcagcc gctgcctccc tgtggccaa tggcatgac    | 360 |    |
| ctggcggcgg ccatggcggt ggacaaaagc aaccctaccc caaagcacaa aagtggtgct  | 420 | 40 |
| gtggccagcc tgctgagcaa ggcagagcgg gccacggagc tggcagccga gggacagctg  | 480 |    |
| acgctgcagc agtttgcgcgtt gtcacagag atgctgaagc gcgtggtgca ggagcatctc | 540 |    |
| ccgctgatga gcgaggcggg tgctggctg cctgacatgg aggctgtggc aggtgccaa    | 600 |    |
| gccctcaatg gccagtcga ctccccctac ctgggcgtt tcccatcaa cccaggcctc     | 660 |    |
| ttcattatga cccggcagg tggttccctg gccgagagcg cgctgcacat ggccggcctg   | 720 | 50 |

|  |     |    |
|--|-----|----|
| gctgagtacc ccatgcaggg agagctggcc tctgccatca gctccggcaa gaagaaggcg  | 780 |    |
| aaacgctgcg gcatgtgcgc gccctgccgg cggcgcatca actgcgagca gtgcagcagt  | 840 |    |
| tgttaggaatc gaaagactgg ccatcagatt tgcaaattca gaaaatgtga ggaactcaaa | 900 |    |
| aagaaggcctt ccgctgctct ggagaaggtg atgcttccga cgggagccgc cttccggtgg | 960 |    |
| tttcagtgta   | 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 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 Ser Met | 85 | 90 | 95 |  |
|---|----|----|----|--|

40

|   |     |     |     |  |
|---|-----|-----|-----|--|
| Met Gly Gly Glu Ser Ala Asp Lys Ala Thr 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 10  
 165 170 175

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 30  
 245 250 255

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 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 |     |    |
| <br>  |              |     |    |
| <400>   | 4            |     |    |
| cgagttcatg aggtgagc   |              | 18  | 10 |
| <br>  |              |     |    |
| <210>   | 5            |     |    |
| <211>   | 5000         |     |    |
| <212>   | DNA          |     |    |
| <213>   | Homo sapiens |     |    |
| <br>  |              |     |    |
| <400>   | 5            |     |    |
| ccccaaggcac tgtctgagca ccccatcct tggagtcgtga aggaaaggc agagtagggg   |              | 60  |    |
| gtggtagctg gggcttggg gcccccaggc tgaagagaaa gaggctggc catttcgga      |              | 120 | 20 |
| agtctcagtg cggccatctt ctgaccctgc actgcccctcc aggaccagat ttgttagagag |              | 180 |    |
| gaggctgagc cccaccctgc ctccctccaggc aggcctcccc cacaccacca caccctagcc |              | 240 |    |
| ttcaggcttt gggtcgggca gggcacttcc agggcaggct ggcttctcct gcccaggcga   |              | 300 |    |
| cccccctcc aggtgcaggg ctccagattt ggacactgtg cctctgcctc ccctaaggcc    |              | 360 |    |
| ccattcagtt acctccccac ctctcagcaa tgctctccct ccctttccct gaagtgtggc   |              | 420 | 30 |
| aggaggctg gagccacagc tttggcctct gggagcactc agtcccactc ccataggaca    |              | 480 |    |
| gagttgaacc atgatttgtt ctagagaagc caagggttat tgtcagggc acaacagccc    |              | 540 |    |
| ccaaactgtc cctctccccca tcaatatccc atatacaggc tgagttccct gtgcctcact  |              | 600 |    |
| gagaacaggg ctgtatctgg ttgtctatgg cgtgtatgtt gctgtgcctg ggcaatggga   |              | 660 |    |
| aatatacgctt gcttcctgct ttctctcagc ctctgtcccc agagtcattt tgttctggga  |              | 720 | 40 |
| ctggagtcctt ccttctgtcc tcatcccttc ccctctgttt acacaggta aggccaggca   |              | 780 |    |
| ttggccacca aactgacttc tcaggaatgg gcaaggctgg gttacttgag agacttggct   |              | 840 |    |
| tttgaattt tcatttcaca gctctctgct ccttcagacg tcatgggggt ggggtgggga    |              | 900 |    |
| ggacctaag tccagtggtc agtgcgtgag ggcccagacc caaaggccccg gggccacagt   |              | 960 |    |
|   |              |     | 50 |

|  |      |
|--|------|
| ctggtgccgt taggctcctc cctgcctctg cccgtgtttg cacccccagg cctgccctgg  | 1020 |
| gattttggct gaggtcacag tccagcatga ccccactgaa cactatcctg tgccctgcc   | 1080 |
| cagcaggcag gtttcaaatt gccttgcctc ccatttcattt tgatacaggt gacagaactg | 1140 |
| gggcccuaag aaggtaaac cttagactga gttccaaatt gccatctt attggagatc     | 1200 |
| ctaactccca cactcctctc catgtggcca ttccagtc ctggatgtt aatcaatgac     | 1260 |
| agatattagc agataaatgg cagtcatgga aaatgcctca gacaaggcat ggattgaaat  | 1320 |
| cctggtttttgc ctacttgta acctcacaca ggtgtccaag cctgtggatt taataaggct | 1380 |
| atgttcaaaa agcaattagc atggccctg acaagcaaga gctcagaaag attctggcta   | 1440 |
| caattgttat tactggtacc tcttggagg ccaagctcg ggcccaaggc aggttagggga   | 1500 |
| ctccctccta ccttcaaaga attttcatgg cgggagggtgg tggcgagggg acaagtagtg | 1560 |
| agatgagcaa ataaaagcta ttctgtca ttgtggtac tggccata ggaggggtcc       | 1620 |
| caaagccaga tgaaggaccc aaagccaggc cacagagtac atctgcctg tgcattgcact  | 1680 |
| gcaaaaaggc accttagcaa gggagctagg aagctgaaag gcagtctgtg acctccttca  | 1740 |
| tgtttccctg tatctgcca aagtgggtac cttttctga ttgcacaaa ggctagtggt     | 1800 |
| ggccctgttag gtatggcca aactcaggct ggaagtggca gtctgagatg gttccaggt   | 1860 |
| gatatgtgct cctggcttc catgaggagt tcatgagggtg agcttcatgt ggcctatctt  | 1920 |
| ggcagagggaa atggtaatg caaagctctg gaaatctgaa gaggagtctt ggggtgtcag  | 1980 |
| aggaaactgc cagtgttaga tggcatggc cagcaggcc tggcagggaa gagagtca      | 2040 |
| taggaaagcc aggctgagta gggtagtctg tgaggaacca ctgcaggatg tgaaggcagat | 2100 |
| gagcctcact ggaggctgtg gaaagcctcc ctggatagc acatggccctc aggggtttga  | 2160 |
| gaacagctct gatgccaatc tcatttca ttcctcatct gaataatggg gatgacat      | 2220 |
| ttgcaggggc tgctataagg gctaaataag ataatgtacc ttaactgttt agcacaatgc  | 2280 |
| cctgctcagg gtaaggctg cacaatacc agccatgggt attatcagca ggatccagga    | 2340 |
| gagcacactc cagggtcccg ggtggacgca cccctcccta gaagacaagg ctggtgatgc  | 2400 |
| agggccatc tccccagcg gtgtggaga ctgaaggagc ttcttcgtt cttgaaggct      | 2460 |

|             |             |             |             |             |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| gattggttca  | aaaaacttag  | caaaaagtta  | aatagcaagg  | tgagacttca  | atttccttt   | 2520 |
| ttgaggttagg | cagagggtgg  | agaatagtga  | accaagctc   | ccttcttctt  | gggaaagggg  | 2580 |
| gctgtggtgg  | ggacagtctc  | acccaagggc  | agagatcctc  | accccatcct  | tcctggatgt  | 2640 |
| cccccgcttgc | tctcatggc   | atctgtggtgc | gagagtctt   | tgtggatggc  | ttgcacatga  | 2700 |
| cattttctgt  | ttctgtaaca  | cttctgtgt   | ggacaattct  | gtcctttcc   | tctgtggctc  | 2760 |
| ccatatgggt  | tggataggtg  | acagictagg  | tctccccc    | aagggttaa   | tttccagcaa  | 2820 |
| gggaaaactc  | caagatccac  | cccctaaact  | gggccagaca  | agtcaacacc  | cttccctga   | 2880 |
| ggaagccatc  | accactggga  | ccacctggcc  | ttccctccatt | gcagcctgtg  | gatccctggc  | 2940 |
| ctcccgccctg | agttgggggt  | gggggtggag  | gcataagtct  | aaaaaaaag   | tggtaatag   | 3000 |
| tcagcagttc  | cctaaagtag  | aattactacc  | caccctctgc  | catggacccc  | agcataaagc  | 3060 |
| tttttgtggg  | gcgtgcatga  | cctgactctg  | tactggcggt  | aggcttcagg  | agatctgtgg  | 3120 |
| aatagagttt  | gacttcatgg  | atccctaacc  | tctgagacct  | gctgctgact  | cccagggagc  | 3180 |
| aggtccccc   | tcacagtctg  | tgccctagct  | tccccagaaa  | aggttagatgg | aggtgagtt   | 3240 |
| aatgcttgg   | gatcctacac  | ctgggctttt  | gcttcctttt  | tccttgcacg  | gtcagtgcc   | 3300 |
| aacacagtgc  | ctgacattca  | cactgaggcc  | cagcataacct | atcttaagc   | agtttggaa   | 3360 |
| tgatcttctg  | gggggtgtgg  | gcgtctaaa   | acggtttcca  | tagcaagcac  | cttacttttta | 3420 |
| ctcacatggg  | atgtttgttt  | ggaggggggc  | attaaaagga  | ctgctggcaa  | ggaggagaga  | 3480 |
| gactaaacgc  | ctcccccaagg | gagccatttc  | ttggcatagt  | agtttggaa   | gaccacttct  | 3540 |
| cagcattcgg  | aaggaactgg  | ttgggagcag  | gtgtccacga  | tgtctggga   | ggggtcactt  | 3600 |
| cgtgtggtct  | tggatatcag  | gagtggcaga  | gaggcaacac  | attccagatg  | agctctgcc   | 3660 |
| tttgacacct  | ccccccaccc  | cacccggct   | gggtcaaggc  | cccaaggcca  | catatagaag  | 3720 |
| gcgtggaagg  | tgggcaccag  | ctgctgctgc  | caggagatcc  | atgctccata  | agccctcgcg  | 3780 |
| ccagcctcgg  | agacagccag  | gctgcgcaga  | gcagaggaga  | ggaagcagcg  | aggtgggaga  | 3840 |
| cagtttcgct  | tctcccaccc  | aggccgcgcc  | tgtggctgca  | ggcgccccga  | tcgccacagt  | 3900 |
| taactccctg  | ttatctggc   | cccaatcgat  | ctcaggctgt  | aacgttaac   | cctaggctga  | 3960 |

|             |             |             |             |             |            |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------|
| cttccccaac  | cgcctcccc   | ctctccctcc  | cctgcttggg  | tctggggact  | gcgtttctt  | 4020 |
| cgccctcgag  | aggaaggctcg | gccttgacaca | aatccgcccc  | cacgaatccc  | aaagaattgg | 4080 |
| agaaaacttc  | cactttggga  | ttatatgcag  | ttgggattat  | atgagcccg   | ggcttgacc  | 4140 |
| atgggtacgt  | gaggtgaaga  | catctgcagc  | agcaggatta  | attagcctaa  | gatggcata  | 4200 |
| tggaggccac  | tgtatggagt  | aaagcgggat  | atgcgggccc  | aactctgtcc  | ccactggcg  | 4260 |
| cctactctgg  | caaggctgag  | tttccttct   | gtctttcaat  | cagtacctat  | tgagcgctgc | 4320 |
| tgttccaagc  | attgttcgg   | gttttagtgc  | cgttaggcat  | ggtctcaggg  | caccaaatgt | 4380 |
| acgttagtcgt | tttagccccg  | ggactcaaga  | gttgaggctg  | atgcctgcct  | gagagataaa | 4440 |
| atatcccttc  | tcggatcagt  | ttcctcacct  | gagaaatggg  | aacgggaatc  | tccgcccctt | 4500 |
| ttctcccggg  | gccctagtgc  | ccactgaatc  | cattaaggag  | ctcttggaaag | ggtggggct  | 4560 |
| tggaacacgc  | gtctacctcc  | caggaccctc  | gacttaggaat | ctctggcccg  | ccgcgcacct | 4620 |
| gagctggggg  | gcgcggccaa  | attctccctc  | ccggtcctcg  | aagttctgg   | ccccgctcta | 4680 |
| gagggggcag  | aaagatagca  | gatttccccg  | gaggtgcgtc  | tctaaaccca  | gaccgcctca | 4740 |
| ccaaagcggg  | gaggtcgtcc  | ttttttttt   | ttttttgtaa  | agtgcggga   | aataggcgaa | 4800 |
| gacggggcgc  | gcaaggggagc | tgagcctggg  | tggaccgcgt  | cagggcgcgg  | ggagctcgag | 4860 |
| gcmcagcggc  | tgcagctccg  | gccctcagagc | ccgcggcgtc  | caagtggccc  | gagctgcgt  | 4920 |
| gggagggagg  | cggcgggagg  | agggagggga  | gccgagggtgg | agggggttgg  | ggggaggagg | 4980 |
| gagcggcgag  | tccggtccgg  |             |             |             |            | 5000 |

|       |                     |    |
|-------|---------------------|----|
| <210> | 6                   |    |
| <211> | 18                  |    |
| <212> | DNA                 |    |
| <213> | Artificial Sequence |    |
| <220> |                     |    |
| <223> | Synthetic primer    |    |
| <400> | 6                   |    |
|       | tccgctgctc tggagaag | 18 |
| <210> | 7                   | 50 |

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

<220>  
<223> Synthetic primer

<400> 7  
cacacgagca gtgacat tgc

20

10

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

<220>  
<223> Synthetic primer

<400> 8  
atgcgctacg tcgcc

20

15

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

<220>  
<223> synthetic primer

30

<400> 9  
ttaatcaaaa 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

gaggtccca g tccctgagc

19

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Synthetic 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

30

20

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic primer

40

<400> 14

ctgctccctgg ccctcatc

18

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

50

<220>  
<223> Synthetic primer

<400> 15  
gacccccc ttc actcatcatg tc

22

<210> 16  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

10

<220>  
<223> artificial sequence

<400> 16  
aacccaaagc 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

40

19

<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  
<213> Artificial Sequence

20

<220>  
<223> artificial sequence

<400> 21  
tgcatgtacc attccctctg cc

22

<210> 22  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

30

<220>  
<223> artificial sequence

<400> 22  
tccctggagat tggtgatgtc ag

22

40

<210> 23  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> artificial sequence

<400> 23

50

aaaccctgct cgatatcgctc 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

30  
 <210> 28  
 <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  
1 5 10 15

10

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

30

<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

40

Val Ala Ser Gly Leu Phe Cys Lys Cys Glu Arg Arg Arg Cys Leu Arg  
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  
1 5 10 15 30

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 10  
 35 40 45

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 10  
 50

<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】C X X C 5 (R INF) 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 μM)の4時間後に定量RT-PCRによりR INF mRNA発現レベルを測定した。10 μg/mlにて用いたシクロヘキシミド(CHX)による翻訳の阻害は、R INF 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、R inf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R INFプロモーターとのin vivo結合。1 μM 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R INFまたはRAR b 2 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、R INF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RAR b 2 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RAR E(gttcacccaaaggta)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。

【図2】C x x c 5 遺伝子構造とタンパク質産物(R INF)を示す図である。(A) C x x c 5 (R inf) 遺伝子は、染色体 5 q 3 1 . 3 に局在する。C x x c 5 遺伝子はpterの139, 008, 130 bpに始まり、pterの139, 043, 651 bpに終わる。C x x c 5 遺伝子はプラス鎖方向に配向され、35, 522 kb p長である。(B) C x x c 5 (R inf) 遺伝子のゲノム組織化。C x x c 5 遺伝子は4つのエキソンに組織化され、オープンリーディングフレームの95%はエキソン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、エキソン1転写開始部位の上流側-3116 bpに位置する。(C)一文字アミノ酸表示によるR INF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32.98 kDaである([www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://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) C X X C 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。R INFタンパク質のC X X C - 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。C X X C - モチーフの中で不变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。C X X C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。

【図3】NB4細胞と他の骨髄細胞系および組織におけるR INF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 μM)中のR INF mRNAレベルの相対発現(定量RT-PCRにより測定した)。(B) ATRA(1 μM)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R INFタンパク質の発現。33 kDa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

40

50

ナルウサギ抗体（方法参照）を用いて R I N F 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）A T R A ( $1 \mu M$ )により処置したN B 4 細胞または処置していないN B 4 細胞の核および細胞質の画分におけるR I N F タンパク質の発現。前記ポリクローナル抗体を用いて R I N F を検出した。この実験では、P A R P 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）F L A G タグ付き R I N F （緑色；A l e x a F l u o r 488 コンジュゲート抗 F L A G 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（D I C）顕微鏡法により解析したM C F 7 細胞の核に局在する（D A P I により青色に染色された）。スケールバー、 $10 \mu m$ 。（E）A T R A 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R T - P C R により測定した様々な骨髄細胞系におけるR I N F m R N A 発現（方法参照）。A T R A ( $1 \mu M$ 、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における（F）、および様々なヒト組織における（G）R I N F タンパク質の発現。骨髄細胞系 ( $20 \mu g$ ) およびヒト組織抽出物 ( $65 \mu g$ 、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】R i n f のs h R N A 媒介性サイレンシングがN B 4 細胞のA T R A 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s h R N A ベクターと、R i n f 発現をノックダウンするために用いたそれらのm R N A 標的配列。レンチウイルスベクター構築物を用いたN B 4 細胞の感染および選抜（方法参照）後に、基礎R I N F m R N A 発現レベルを測定する定量R T - P C R により基礎R i n f 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、p L K O . 1 / エンプティベクターに対する割合%で示した）。s h R N A / R I N F - 3 構築物およびs h R N A / R I N F - 4 構築物で最も有効なノックダウンを得た（それぞれ61%および85%、A T R A の不在下）。（B）A T R A ( $1 \mu M$ )の存在下でs h R N A 構築物を安定に発現するN B 4 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A T R A 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R T - P C R により評価したR I N F m R N A 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、 $25 \mu m$ ）とエンプティベクター、h R N A / スクランブルベクター、s h R N A / R I N F - 3 ベクターおよびs h R N A / R I N F - 4 ベクターに感染させたN B 4 細胞の第2日目に評価したN B T 還元解析（スケールバー、 $25 \mu m$ ）。細胞をA T R A ( $1 \mu M$ )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A T R A、第0日～第4日、左パネル）。さらに2週間のA T R A の不在下での培養後に、第1回目のA T R A を免れたs h R N A / R I N F - 3 細胞およびs h R N A / R I N F - 4 細胞をA T R A ( $1 \mu M$ )により4日間再処置した（第2回目のA T R A、第20日～第24日、右パネル）。

【図5】正常骨髄造血時のR I N F 発現を示す図である。（A）骨髄C D 3 4 + 細胞（健康ドナー由来）のサイトカイン誘導性 ( $20 ng / mL$  のI L 3 およびG - C S F、 $50 ng / mL$  のS C F) 顆粒球分化。細胞形態学（スケールバー、 $25 \mu m$ ）では、細胞をサイトスピニ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M a y - G r ? n w a l d - G i e m s a (M G G) 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）C D 3 4 + 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m R N A 発現（定量R T - P C R により測定した）(+/-s.e.m.)。

【図6】正常骨髄造血時のR I N F 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C D 3 4 + 骨髄前駆体を、R I N F 発現を標的とするレンチウイルスs h R N A 構築物（s h R N A / R I N F - 3 および- 4）または対照ベクター（エンプティおよびs h R N A / スクランブル）に感染させ、サイトカイン ( $20 ng / mL$  の

I L 3 および G - C S F 、 5 0 n g / m L の S C F ) 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ニおよび M G G 染色後の細胞形態学解析 (スケールバー、 2 5 μ m ) 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 1 4 日後、 3 0 日後、および 1 8 日後の細胞集団の形態を示している。留意すべきは、 s h R N A - R I N F - 3 構築物または s h R N A - R I N F - 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 (エンプ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 1 0 日まで) 、第 1 4 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。

【図 7】 A T R A ( 1 μ M ) により処置した、 N B 4 細胞、 N B 4 - L R 1 細胞および N B 4 - L R 2 細胞からの全抽出物における R I N F タンパク質の発現を示す図である。 3 3 k D a 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 R I N F を検出した。アクチンをローディング対照として用いた。 R I N F 発現は N B 4 細胞において、 2 つの耐性サブクローン N B 4 - L R 1 および N B 4 - L R 2 よりも顕著であった。

【図 8】 3 名の ( P M L - R A R a 陽性 ) A P L 患者に由来する芽球における C x x c 5 m R N A 発現を示す図である。細胞を A T R A ( 1 μ M ) 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 A r r a y e x p r e s s ( E - M E X P - 1 4 9 ) から抽出した。マイクロアレイ実験は、 Meani et al. により、 A f f y m e t r i x G e n e C h i p H u m a n G e n o m e H G - U 1 3 3 A および H G - U 1 3 3 B 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 a f f y m e t r i x : C H P S i g n a l である。 C x x c 5 発現を標的とする 3 つのプローブは、プローブ a ( 2 2 2 9 9 6 \_ s \_ a t ) 、 b ( 2 2 4 5 1 6 \_ s \_ a t ) および c ( 2 3 3 9 5 5 \_ x \_ a t ) であった。 2 箇所の点線は、未処置群および A T R A 処置群の平均を示している。本発明者らは、対応のあるスチュードント 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 . 0 5 ) ことを示した。

【図 9】 R i n f の s h R N A 媒介性サイレンシングが H L 6 0 細胞の A T R A 誘導性最終分化を遅延させることを示す図である。 H L 6 0 細胞を、エンプティレンチウイルスベクター、 s h R N A / スクランブルレンチウイルスベクター、 s h R N A / R I N F - 3 レンチウイルスベクターまたは s h R N A / R I N F - 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 A T R A ( 1 μ M ) により処置したまたは処置しなかった。 R I N F m R N A 発現を定量 R T - P C R 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 N B 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、 2 5 μ m ) により評価した。

【図 1 0】 R I N F 過剰発現が N B 4 細胞系統および H L 6 0 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 ( M S C V ) 由來のレトロウイルス系を用いて、 2 つの細胞系統において R I N F を過剰発現させた。細胞を感染させ、感染の 9 日後に G F P 発現について選別した。(B) 2 つの細胞系統では、 R I N F m R N A 発現を定量 R T - P C R により測定し (ここでは第 1 0 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) 細胞をサイトスピニし、細胞形態学解析について M G G 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、 2 5 μ m )。 R I N F 過剰発現の 1 0 日後でも分化の徵候は認められなかった。 R I N F 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 1 0 %) が一貫して認められた。

【図 1 1】骨髄異形成 ( M D S ) に罹患している 5 5 名の患者に由来する C D 3 4 + 細胞における C x x c 5 m R N A 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 A r r a y e x p r e s s ( E - G E O - 4 6 1 9 ) および G e n e E x p r e s s i o n O m n i b u s ( G D S 2 1 1 8 ) から抽出した。マイクロアレイ実験は

、Pellagatti et al.により、GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 arrays (Affymetrix)により行った。各ポイントは、1名のMDSを有する患者または健康個体を表している。3箇所の点線は、正常な健康ドナー ( $n = 11$ )、欠失5qを有するMDS ( $n = 20$ ) または欠失5qがないMDS ( $n = 35$ )についての群平均 (998.1、512.2および985.9) を示している。ウイルコクソン2標本検定 ( $p < 0.003$ )によれば、正常と欠失(5q)を有するMDSについての値に有意差があった。URL: <http://www.ebi.ac.uk/Arrayexpress/> (ArrayExpress) および <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> (Gene Expression Omnibus)

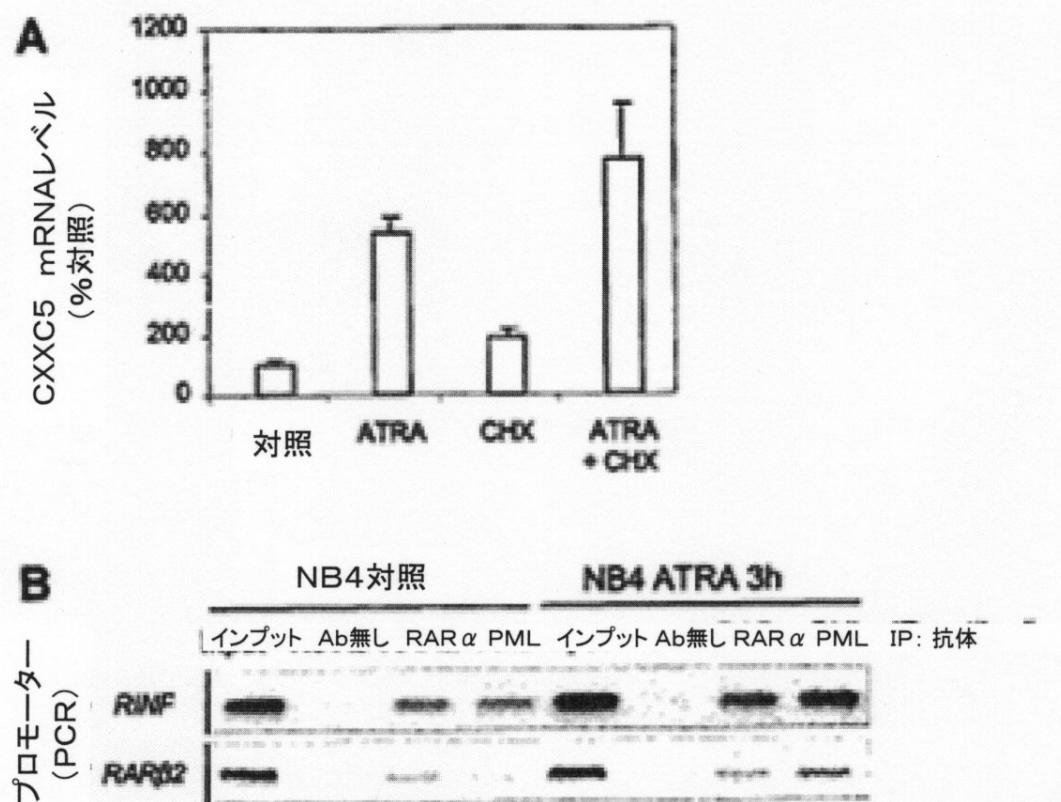
【図12】様々な血液疾患を有する患者の骨髄細胞においてRQ-PCRにより検出されたRINE mRNA発現を示す図である。

【図13】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mRNA発現を示す図である。

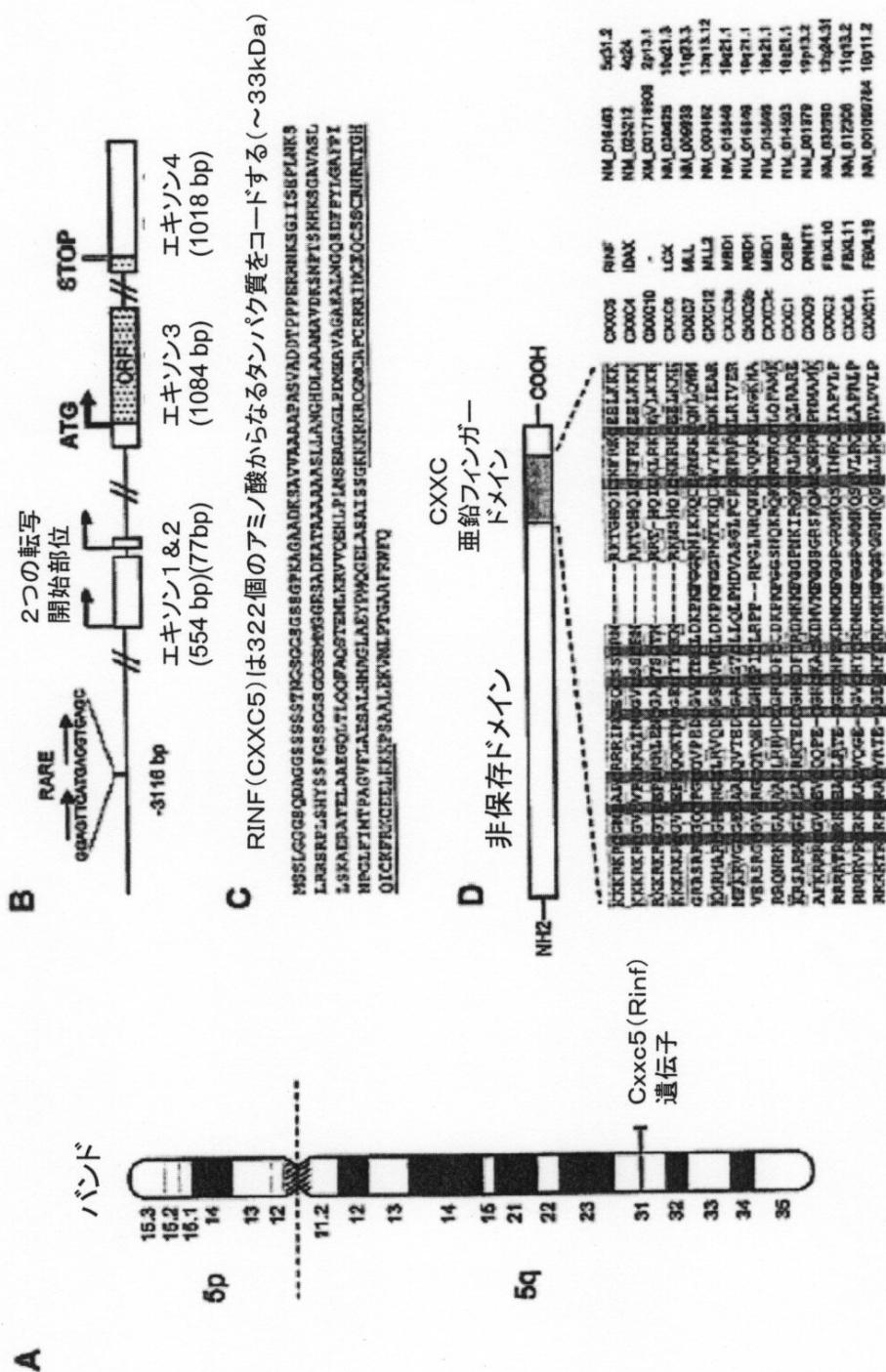
【図14】 固形腫瘍におけるRINE発現を示す図である。

【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RIN F発現を示す図である。

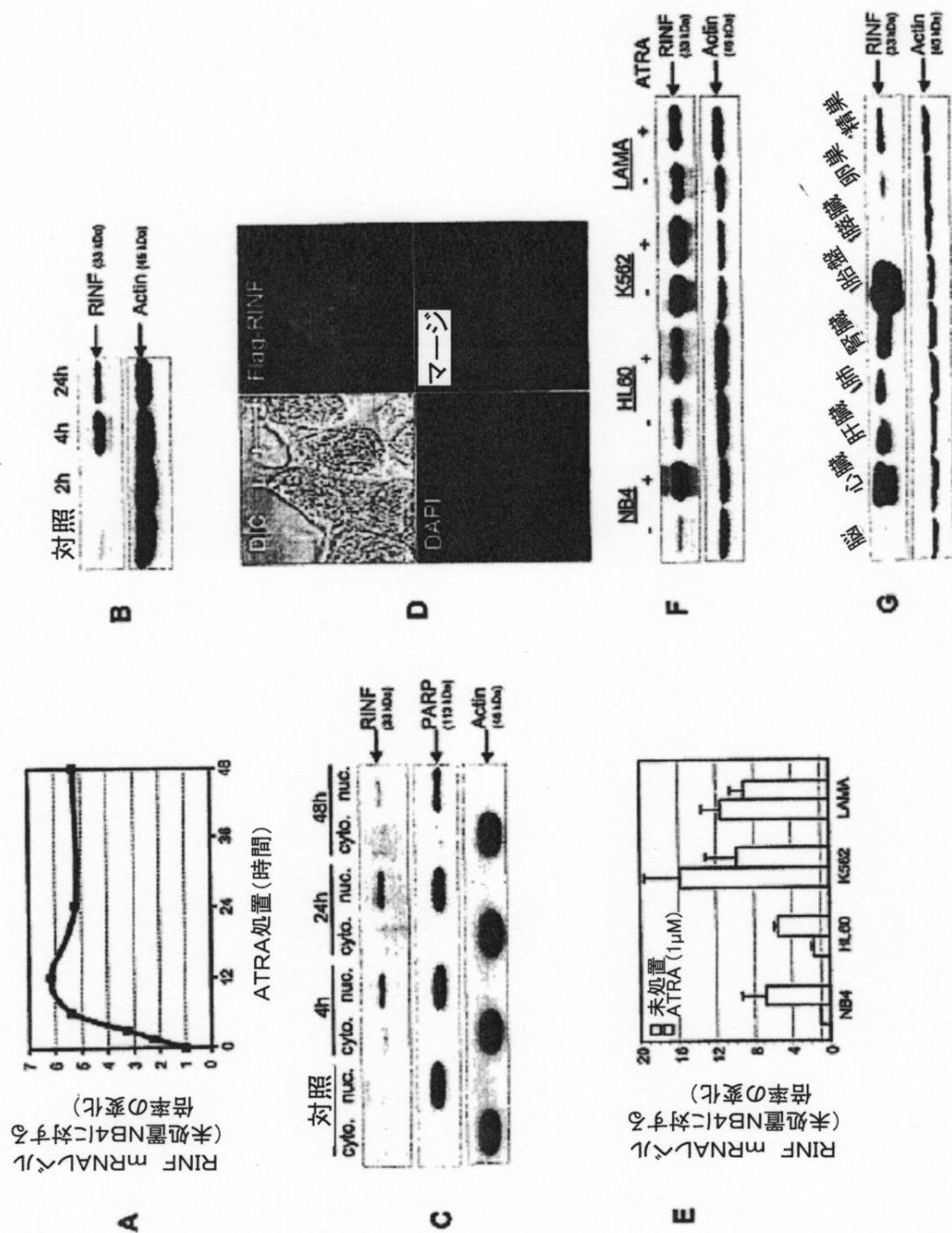
( 义 1 )



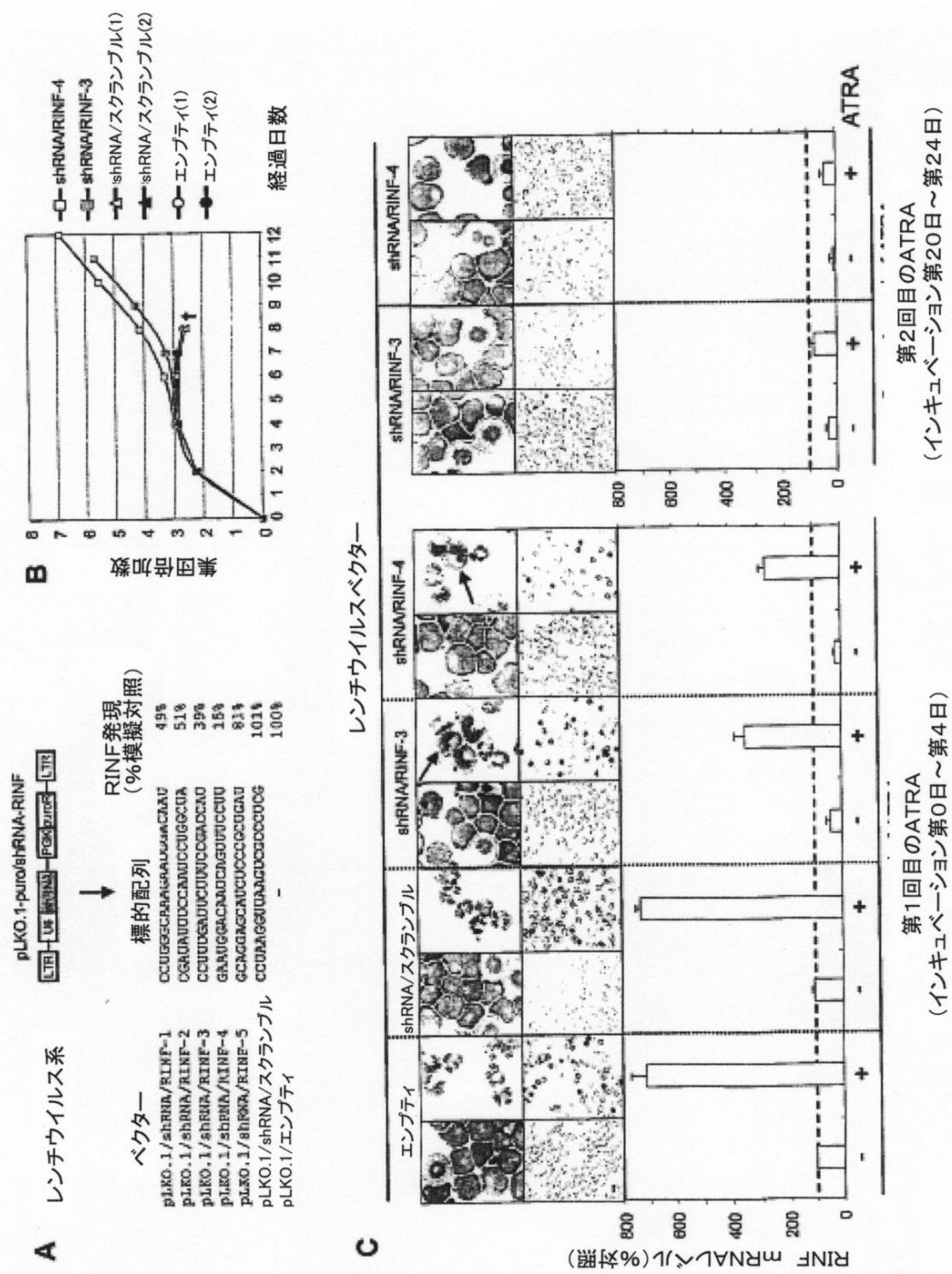
【図2】



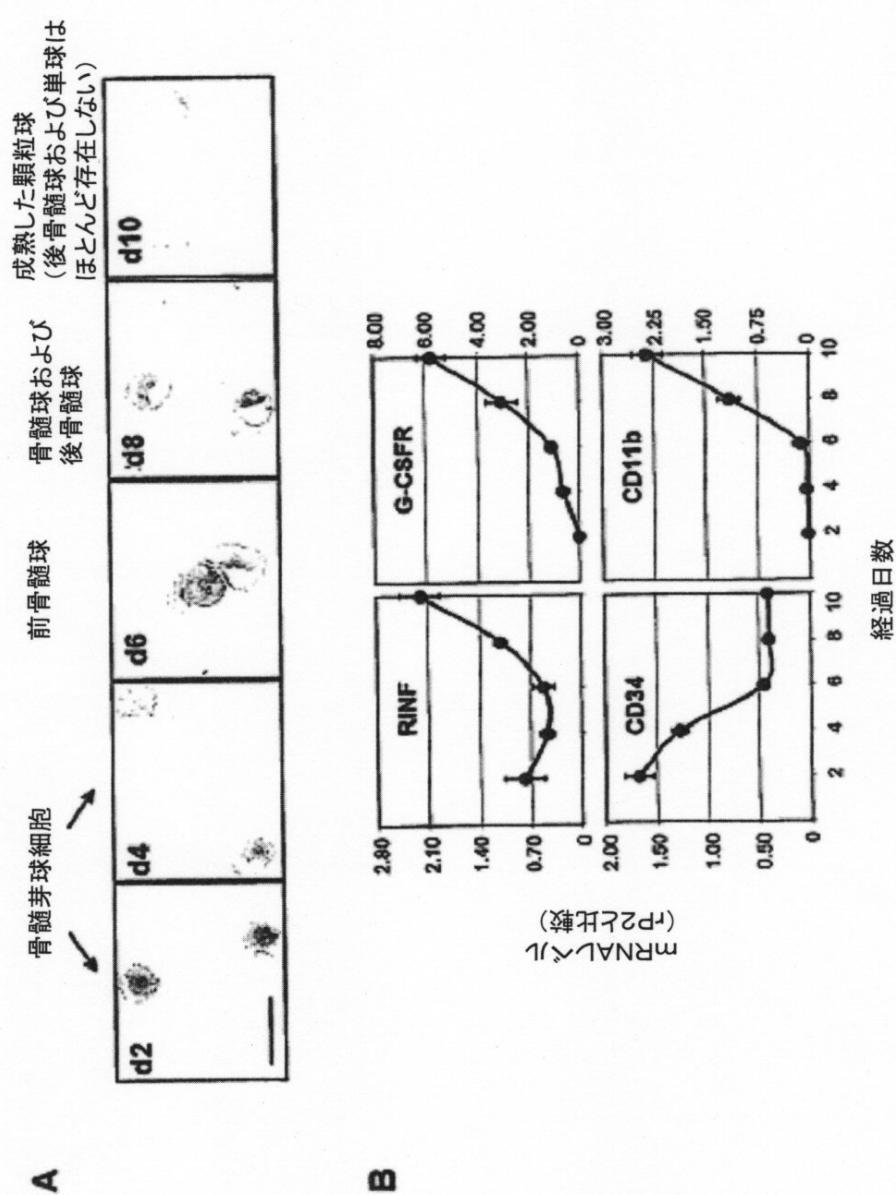
【図3】



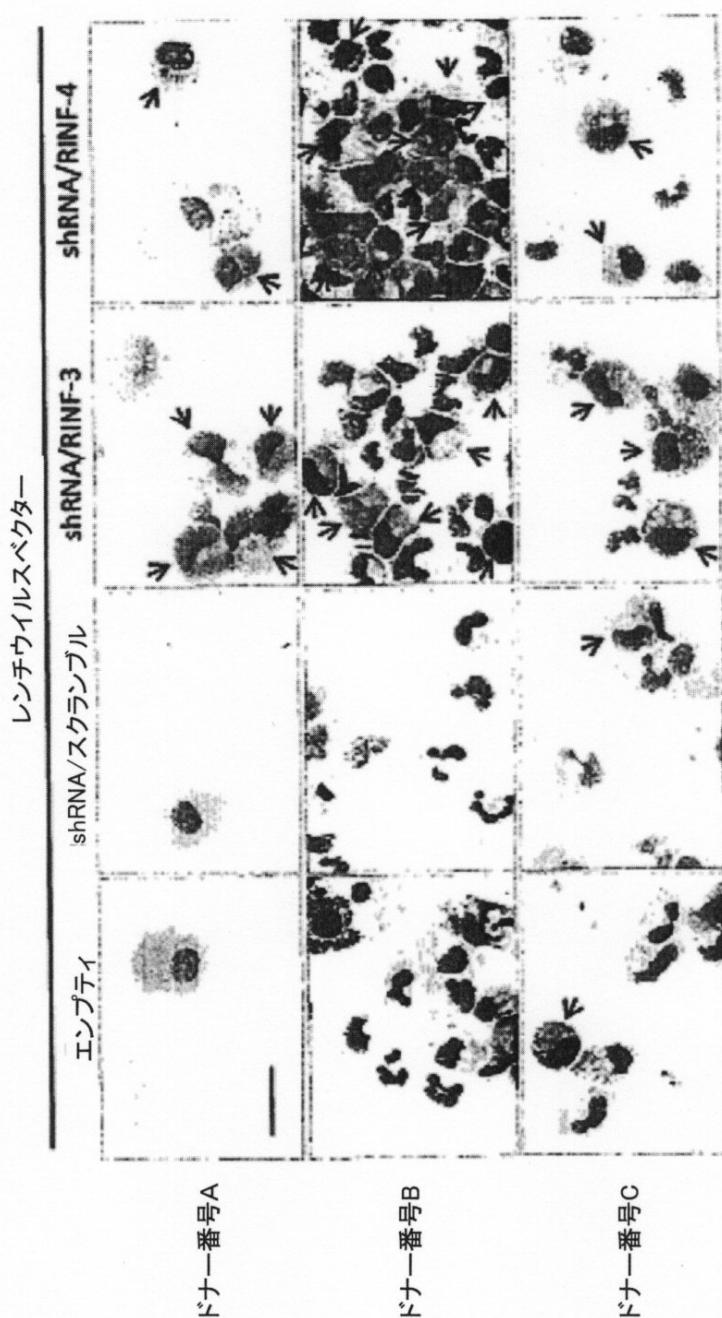
【図4】



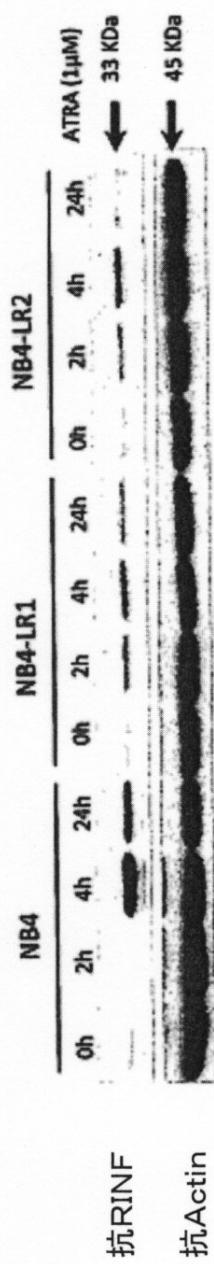
【図5】



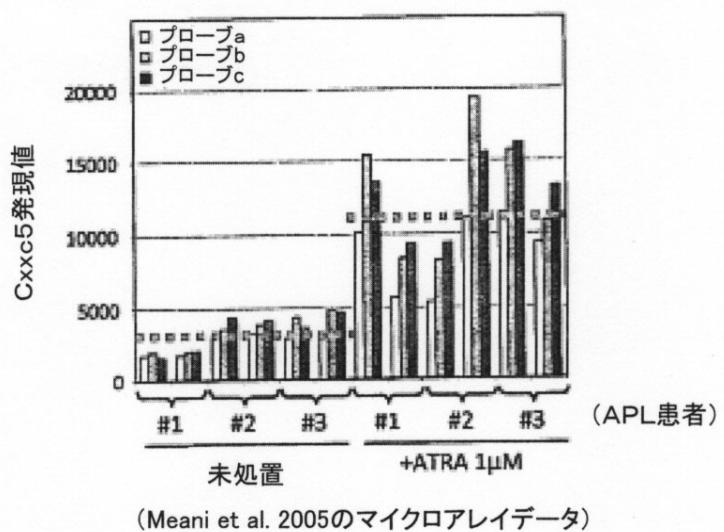
【図6】



【図7】

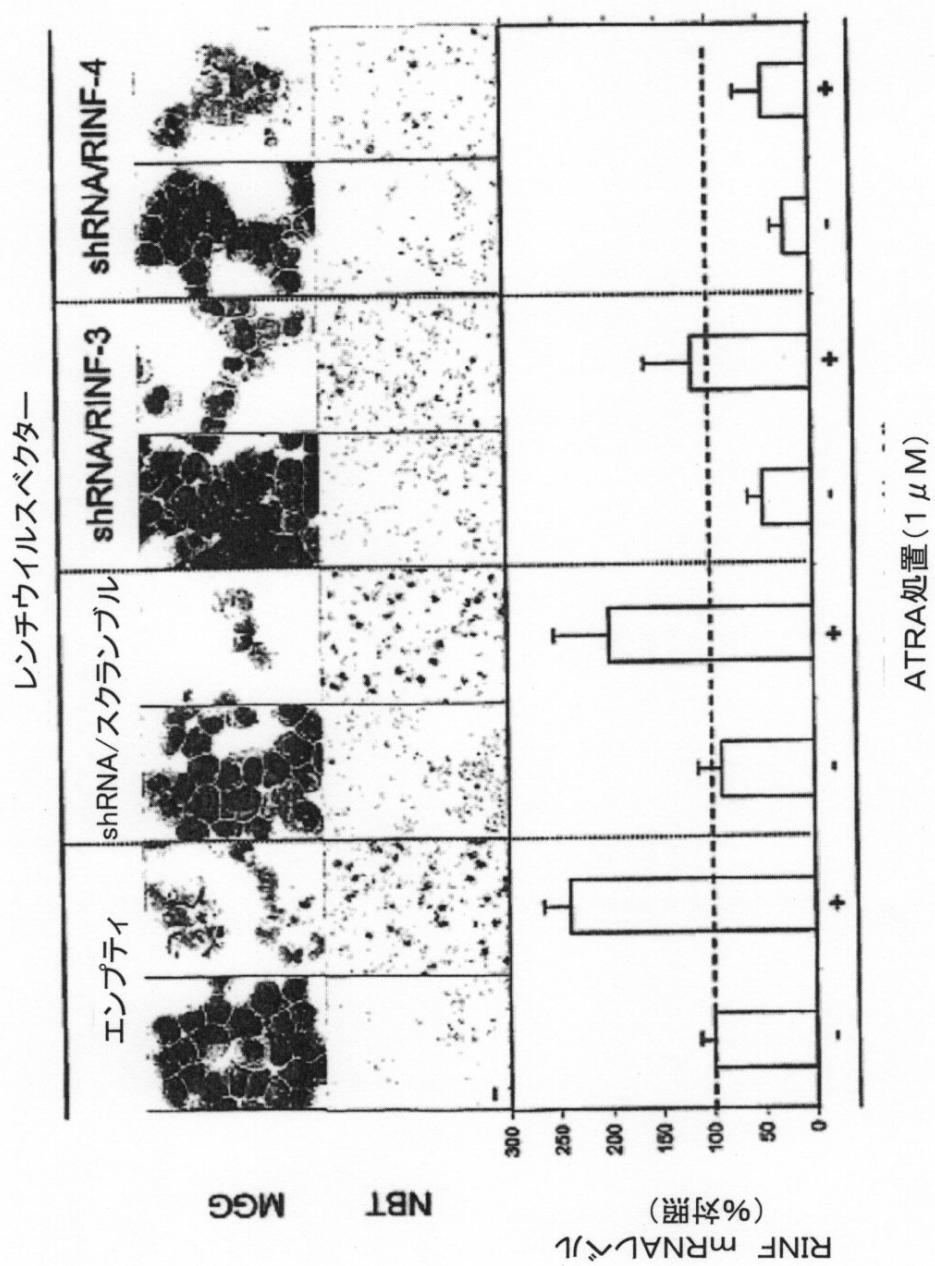


【図8】

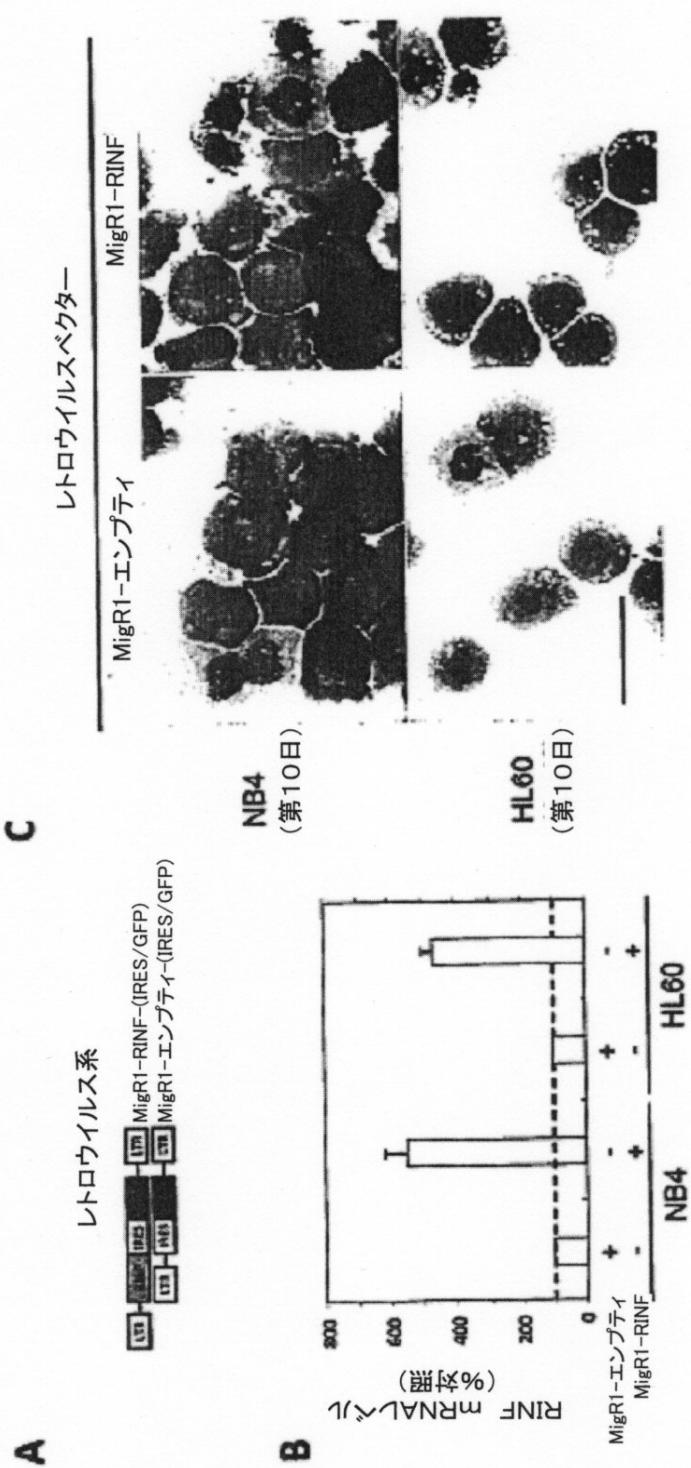


(Meani et al. 2005のマイクロアレイデータ)

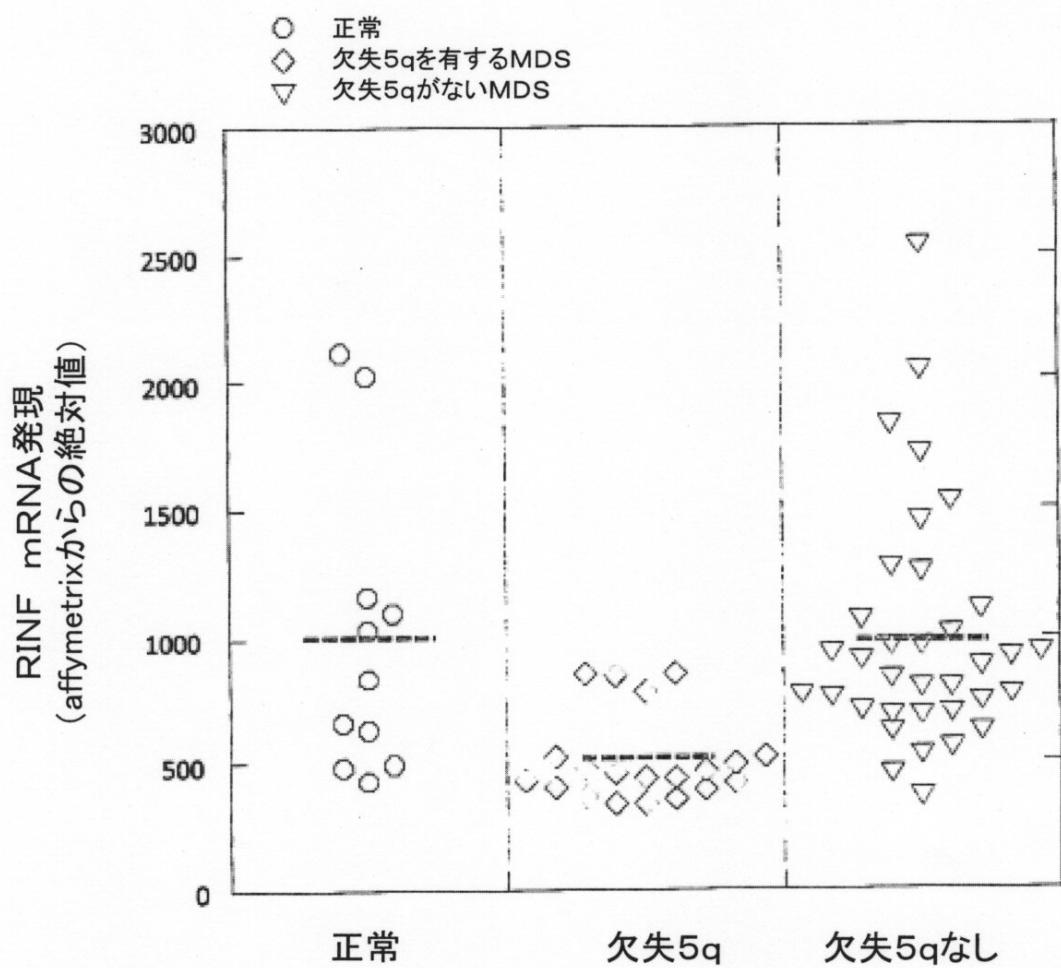
【図9】



【図10】

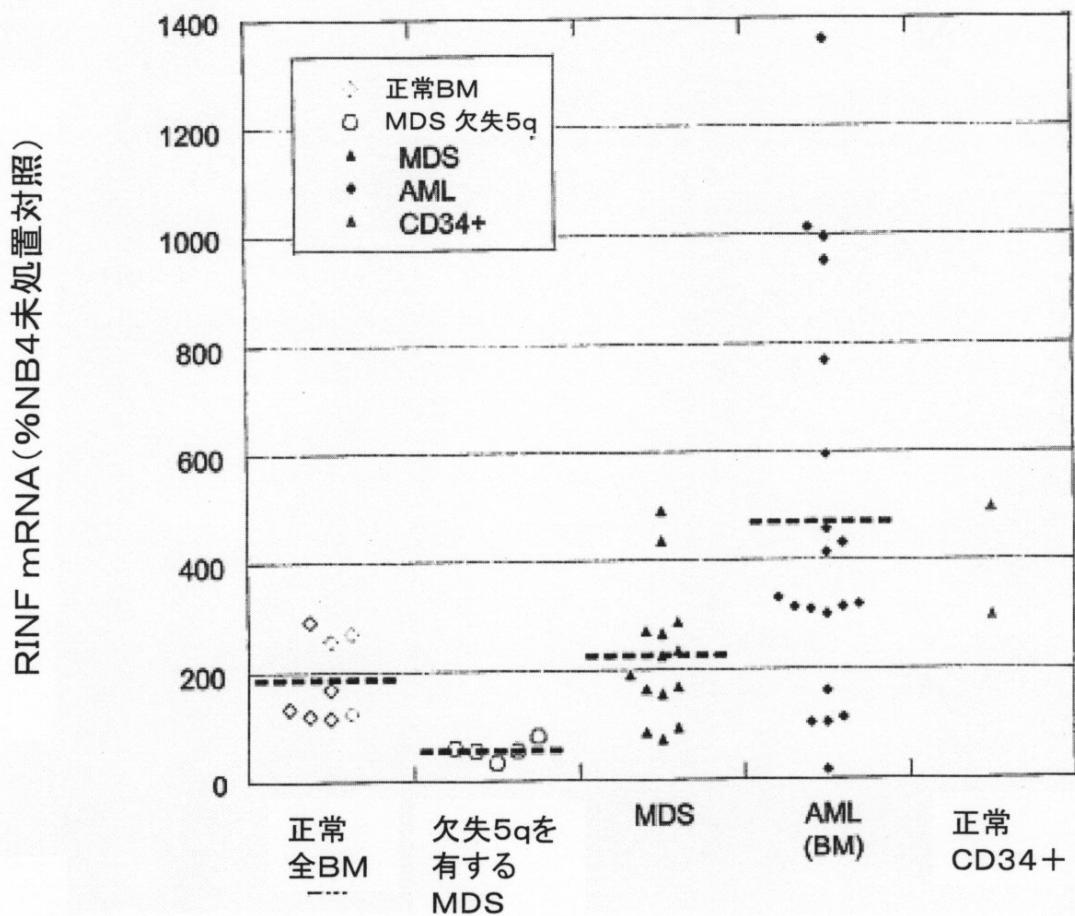


【図11】

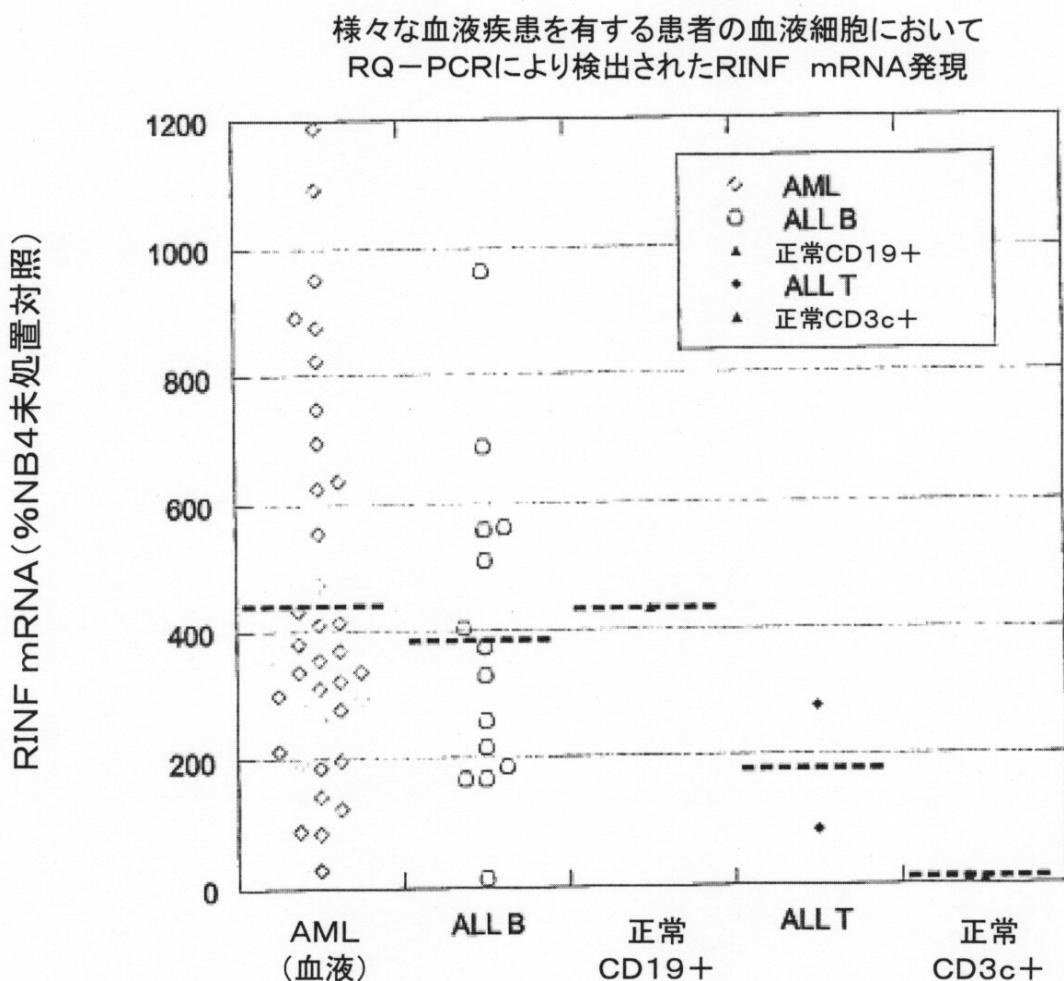


【図12】

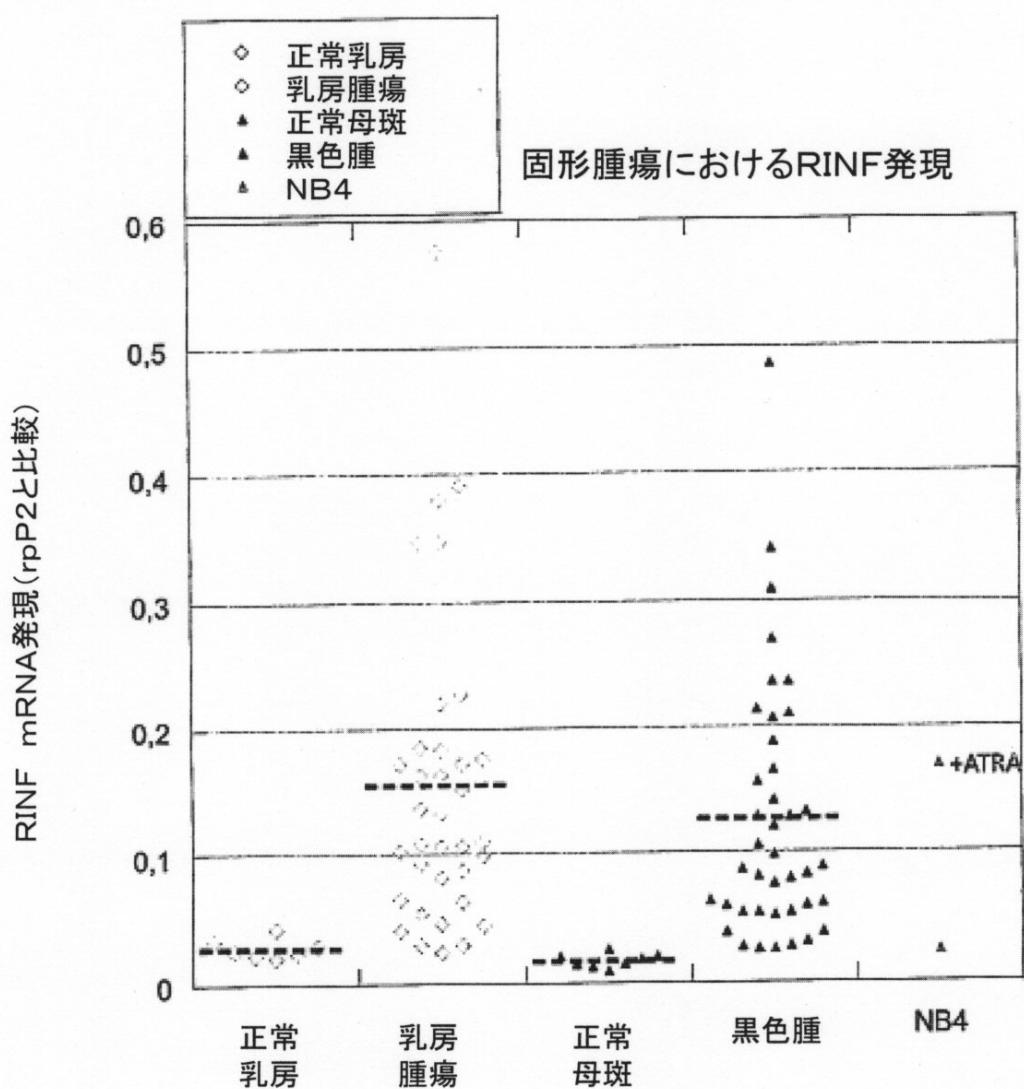
様々な血液疾患を有する患者の骨髄細胞において  
RQ-PCRにより検出されたRINF mRNA発現



【図13】

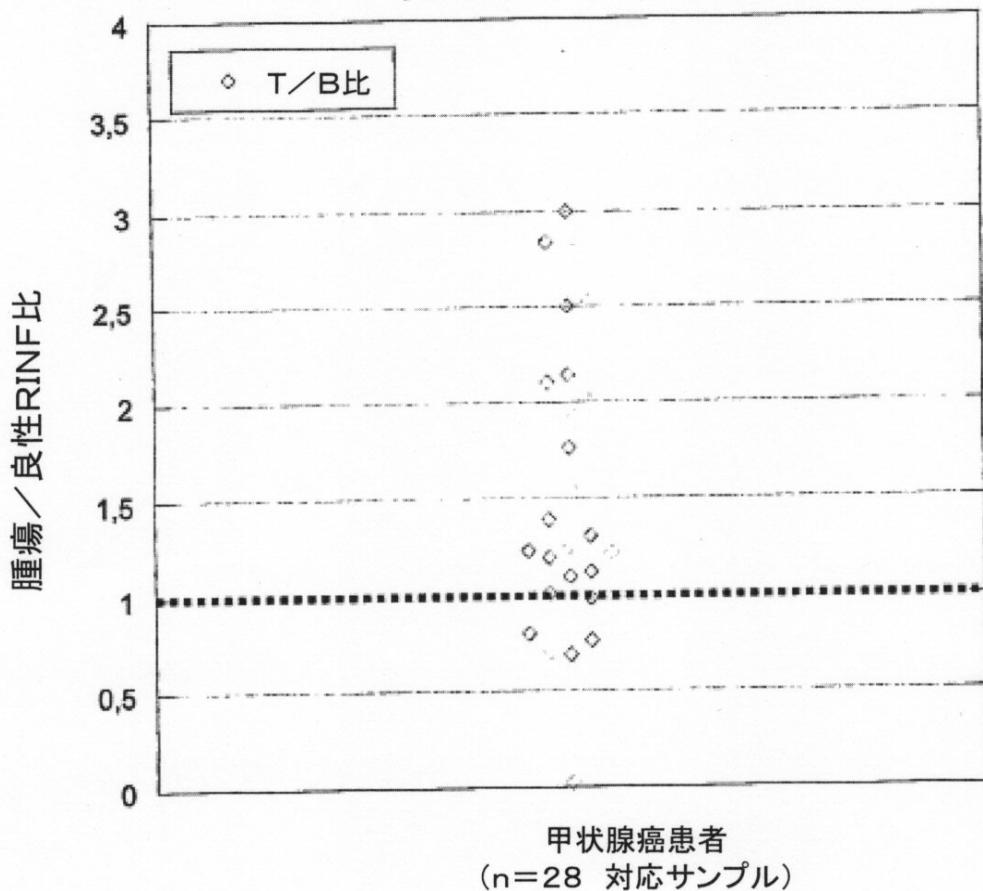


【図14】



【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  
RINF mRNA発現(q-RT-PCR)



【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、イプセンスツ、89  
(72)発明者 フレデリック、ベンディノ  
フランス国パニュー、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:3050465), 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)

C 12 N 15 / 09  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S ( S T N )  
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q  
U n i P r o t / G e n e S e q  
P u b M e d