

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6170613号
(P6170613)

(45) 発行日 平成29年7月26日 (2017. 7. 26)

(24) 登録日 平成29年7月7日 (2017. 7. 7)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 31/4245 (2006. 01)

A 6 1 K 31/4245

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/02 (2006. 01)

A 6 1 P 35/02

A 6 1 P 35/04 (2006. 01)

A 6 1 P 35/04

A 6 1 P 43/00 (2006. 01)

A 6 1 P 43/00

1 1 1

請求項の数 8 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-505402 (P2016-505402)
 (86) (22) 出願日 平成26年3月27日 (2014. 3. 27)
 (65) 公表番号 特表2016-522162 (P2016-522162A)
 (43) 公表日 平成28年7月28日 (2016. 7. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2014/002617
 (87) 国際公開番号 W02014/157965
 (87) 国際公開日 平成26年10月2日 (2014. 10. 2)
 審査請求日 平成27年12月18日 (2015. 12. 18)
 (31) 優先権主張番号 10-2013-0032957
 (32) 優先日 平成25年3月27日 (2013. 3. 27)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(73) 特許権者 515267910
 ジ アサン ファウンデーション
 大韓民国 1 3 8 - 7 3 6 ソウル ソン
 パーグ オリンピッケーロ 4 3 - ギル
 8 8
 (73) 特許権者 515268928
 ユニバーシティー オブ ウルサン ファ
 ウンデーション フォー インダストリー
 コーポレーション
 大韓民国 6 8 0 - 7 4 9 ウルサン ナ
 ムーグ テハクロー 9 3
 (74) 代理人 110000796
 特許業務法人三枝国際特許事務所

最終頁に続く

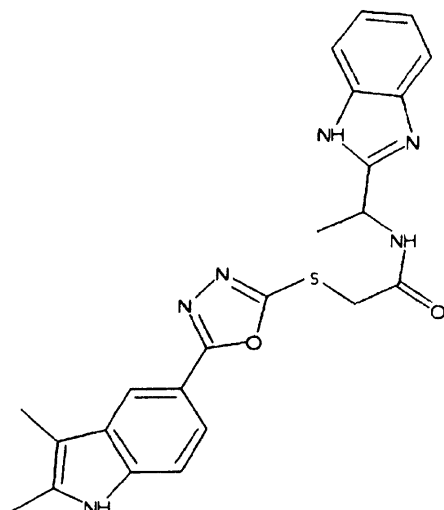
(54) 【発明の名称】 p 3 4 の発現抑制剤または活性抑制剤を有効成分で含む癌の治療または転移抑制用組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記化学式 1 で表示される化合物またはその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含むことを特徴とする、癌の予防または治療用薬学的組成物。

【化 1】



(化学式 1)

【請求項 2】

前記癌は、口腔癌、肝臓癌、胃癌、結腸癌、乳癌、肺癌、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、頭部癌、頸部癌、子宮頸部癌、卵巣癌、大腸癌、小腸癌、直腸癌、喇叭管癌腫、肛門付近癌、子宮内膜癌腫、腔癌腫、外陰癌腫、ホジキン病(Hodgkin's disease)、食道癌、リンパ腺癌、膀胱癌、胆嚢癌、内分泌腺癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、前立腺癌、慢性白血病、急性白血病、リンパ球リンパ腫、腎臓癌、輸尿管癌、腎臓細胞癌腫、腎臓骨盤癌腫、中枢神経系腫瘍、1次中枢神経系リンパ腫、脊髄腫瘍、脳幹神経膠腫及び脳下垂体腺腫のうち選択された1種以上であることを特徴とする、請求項1に記載の癌の予防または治療用薬学的組成物。

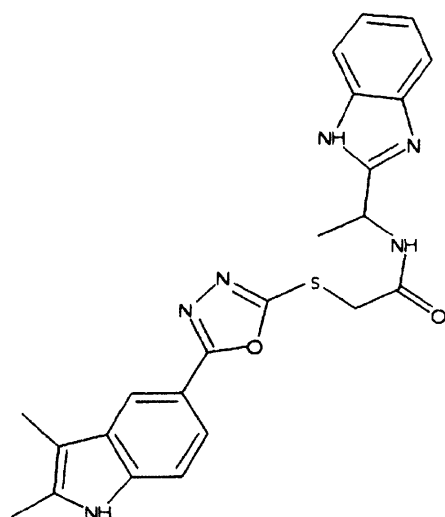
【請求項3】

前記癌は、p34及びNEDD4-1(Neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4-1)を同時に発現する癌であることを特徴とする、請求項1に記載の癌の予防または治療用薬学的組成物。

【請求項4】

下記化学式1で表示される化合物またはその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含むことを特徴とする、癌の予防または改善用食品組成物。

【化2】

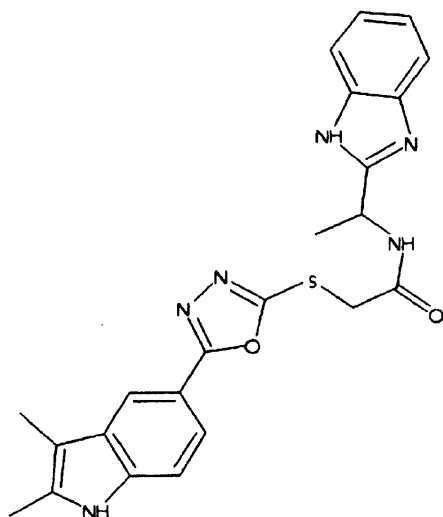


(化学式1)

【請求項5】

下記化学式1で表示される化合物またはその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含むことを特徴とする、癌の転移抑制用薬学的組成物。

【化3】



(化学式1)

【請求項6】

1)生物学的試料にN E D D 4-1(N e u r o n a l p r e c u r s o r c e l l-e x p r e s s e d d e v e l o p m e n t a l l y d o w n-r e g u l a t e d 4-1)の発現抑制剤または活性抑制剤を処理する段階と、

2)前記生物学的試料で癌細胞の増殖可否を測定する段階と、を含むことを特徴とする p 3 4 遺伝子の発現抑制剤または p 3 4 タンパク質の活性抑制剤の癌に対する治療効果予測方法。

【請求項 7】

前記 1)段階の生物学的試料は、癌にかかった個体の血液、小便、唾液及び組織からなる群より選択された 1 種以上であることを特徴とする請求項 6 に記載の p 3 4 遺伝子の発現抑制剤または p 3 4 タンパク質の活性抑制剤の癌に対する治療効果予測方法。

10

【請求項 8】

前記方法は、3)生物学的試料の癌細胞が増殖されると、p 3 4 の発現抑制剤または活性抑制剤の癌に対する治療効果が存在しないで、生物学的試料の癌細胞が増殖されないと、p 3 4 遺伝子の発現抑制剤または p 3 4 タンパク質の活性抑制剤の治療効果が存在すると予測する段階を含むことを特徴とする請求項 6 に記載の p 3 4 遺伝子の発現抑制剤または p 3 4 タンパク質の活性抑制剤の癌に対する治療効果予測方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、p 3 4 の発現抑制剤または活性抑制剤を有効成分で含む癌の治療または転移抑制用薬学的組成物に関する。

20

【背景技術】

【0002】

癌は、人類の健康を脅威する最大の疾病の中で一つとして、細胞が一連の突然変異過程を経て、無制限的で非調節的な方式で増殖して不死化されて発生する疾病である。癌発生の原因としては、化学物質、ウイルス、細菌、電離放射線などの環境的または外的要因と、先天性遺伝子変異などの内的要因と、を挙げることができる(K l a u n i g & K a m e n d u l i s, A n n u R e v P h a r m a c o l T o x i c o l., 44:239-267, 2004)。初期に発見された癌の場合、手術、放射線治療、化学的療法などの治療法があるが、その副作用が大きい問題になっており、末期癌や転移された癌の場合、特別な治療法なしに時限付き人生で生を終える状況である。

30

【0003】

最近、癌と関連された多様な生化学的機序が糾明され、それによる治療剤が開発されているが、今まで癌に対する根本的な治療方法は提示されていない。これによって、癌と関連された多様な生体内分子を同定し、これを標的とする薬物を開発しようとする研究が活発に進行されている。このような薬物のうち一部を組み合わせる癌治療の効果を増進させようとする努力も試みされている。したがって、癌と関連された標的分子を追加的に掘り出す努力は非常に重要であるといえる。

【0004】

P I 3 K (P h o s p h a t i d y l i n o s i t o l - 3 - k i n a s e) 信号伝達段階の中心的な陰性調節因子である P T E N (P h o s p h a t a s e a n d t e n s i n h o m o l o g) 腫瘍抑制子は、ヒトの癌において一番頻繁に変異または欠失される遺伝子で知られている。最近の研究によれば、腫瘍抑制子である P T E N の機能の調節においてユビキチン化と関連された重要な疑問が提起され、P T E N のユビキチン化に必要な調節機序に対して続いて研究が進行されている。

40

【0005】

本発明者らは、P T E N のユビキチン化と関連された機序に関して研究するうち、N E D D 4-1 (N e u r o n a l p r e c u r s o r c e l l - e x p r e s s e d d e v e l o p m e n t a l l y d o w n - r e g u l a t e d 4-1) の結合パートナーである p 3 4 タンパク質が N E D D 4-1 タンパク質の安全性を調節し、これを通じて P

50

PTENのモノユビキチン化及びポリユビキチン化の転換を調節することを確認した。

【0006】

より具体的には、p34の発現増加は、E3ユビキチンリガーゼであるNEDD4-1のWW1ドメインと相互作用してそのタンパク質の安全性を向上させる結果、PTENのポリユビキチン化及びPTENタンパク質の分解をもたらした一方、p34のノックダウン(knock-down)は、PTENのモノユビキチン化を起こしてPTENの核局在化(nuclear localization)を促進させる結果、腫瘍の生存、増殖、浸湿性乃至は転移性と関連されたAkt経路を抑制した。

【0007】

したがって、本発明者らは、p34は、NEDD4-1タンパク質の安全性を調節することで、PTENユビキチン化経路で重要な調節子として作用し、特に、NEDD4-1及びPTENと関連された癌の治療において効果的なターゲットになることを確認し、本発明を完成した。

【発明の開示】

【0008】

技術的解決課題

本発明は、p34遺伝子の発現抑制剤またはp34タンパク質の活性抑制剤を有効成分で含む癌の予防または治療用組成物を提供することを目的とする。

【0009】

また、本発明は、p34遺伝子の発現抑制剤またはp34タンパク質の活性抑制剤を有効成分で含む癌の転移抑制用組成物を提供することを目的とする。

【0010】

また、本発明は、p34遺伝子の発現抑制剤またはp34タンパク質の活性抑制剤を個体に投与する段階を含む癌の治療または転移抑制方法を提供することを目的とする。

【0011】

また、本発明は、p34を利用した癌の治療または転移抑制用候補物質のスクリーニング方法を提供することを目的とする。

【0012】

また、本発明は、生物学的試料にNEDD4-1の発現抑制剤または活性抑制剤を処理する段階を含むp34遺伝子の発現抑制剤またはp34タンパク質の活性抑制剤の癌に対する治療効果予測方法を提供することを目的とする。

【技術的解決方法】

【0013】

前記課題を解決するために、本発明は、p34遺伝子の発現抑制剤またはp34タンパク質の活性抑制剤を有効成分で含む癌の予防または治療用薬学的組成物を提供する。

【0014】

また、本発明は、p34遺伝子の発現抑制剤またはp34タンパク質の活性抑制剤を有効成分で含む癌の予防または改善用食品組成物を提供する。

【0015】

また、本発明は、p34遺伝子の発現抑制剤またはp34タンパク質の活性抑制剤を有効成分で含む癌の転移抑制用薬学的組成物を提供する。

【0016】

また、本発明は、p34遺伝子の発現抑制剤またはp34タンパク質の活性抑制剤を個体に投与する段階を含む癌の治療または転移抑制方法を提供する。

【0017】

また、本発明は、下記の段階を含む癌治療または転移抑制用候補物質のスクリーニング方法を提供する：

1) p34タンパク質の発現細胞株に被検物質を処理する段階；

2) 前記細胞株でp34遺伝子の発現程度またはp34タンパク質の活性程度を測定する段階；及び

10

20

30

40

50

3)前記p34遺伝子の発現程度またはp34タンパク質の活性程度が被検物質を処理しない対照群に比べて減少した被検物質を選別する段階。

【0018】

また、本発明は、下記の段階を含むp34遺伝子の発現抑制剤またはp34タンパク質の活性抑制剤の癌に対する治療効果予測方法を提供する：

1)生物学的試料にNEDD4-1(Neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4-1)の発現抑制剤または活性抑制剤を処理する段階；及び

2)前記生物学的試料で癌細胞の増殖可否を測定する段階。

発明の効果

10

【0019】

本発明によれば、p34タンパク質のノックダウン(knock-down)は、PTENのモノユビキチン化を起こしてPTENの核局在化(nuclear localization)を促進させる結果、腫瘍の生存、増殖、浸湿性及び転移性と関連されたAkt経路を抑制することで、PTEN及びNEDD4-1を同時発現する多様な癌細胞の腫瘍発生性及び集落形成能を顕著に減少させる効果がある。したがって、本発明のp34遺伝子の発現抑制剤またはp34タンパク質の活性抑制剤は、癌の治療剤または転移抑制剤として有用に使用されることができる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

20

【図1】図1は、293、DU145及びMCF-7細胞でNEDD-1を利用した免疫沈降反応の結果を示した図である。

【図2】図2は、293、DU145及びMCF-7細胞でp34、NEDD4-1及びPTENタンパク質の発現程度をウエスタンブロットを通じて分析した結果を示した図である。

【図3】図3は、DU145及びMCF-7細胞の免疫沈降物でp34及びNEDD4-1の発現程度をウエスタンブロットを通じて分析した結果を示した図である。

【図4】図4は、LS1034及びMDA-MB231細胞でNEDD4-1タンパク質に対する免疫沈降反応の結果を示した図である。

【図5】図5は、多様な結腸癌及び乳癌細胞株でp34、NEDD4-1及びPTENタンパク質の発現程度をウエスタンブロットを通じて分析した結果を示した図である。

30

【図6】図6は、293細胞でp34及びNEDD4-1に対する免疫沈降反応の結果を示した図である。

【図7】図7は、GSTプルダウン分析及びウエスタンブロットを通じたp34及びNEDD4-1の発現程度を分析した結果を示した図である。

【図8】図8は、GSTプルダウン分析及びウエスタンブロットを通じたp34、PTEN及びNEDD4-1の発現程度を分析した結果を示した図である。

【図9】図9は、NEDD4-1変異体の地図及びGSTプルダウン分析を通じたp34及びNEDD4-1タンパク質の相互作用分析結果を示した図である。

【図10】図10は、WW1ドメインが欠失されたNEDD4-1タンパク質でGSTプルダウン分析結果を示した図である。

40

【図11】図11は、GSTプルダウン分析を通じたp34、NEDD4-1及びPTENタンパク質の相互作用分析結果を示した図である。

【図12】図12は、p34の発現及びMG132処理条件によるNEDD4-1の自己ユビキチン化を免疫沈降反応を通じて示した図である。

【図13】図13は、p34の発現によるNEDD4-1の自己ユビキチン化をGSTプルダウン分析を通じて示した図である。

【図14】図14は、p34またはNEDD4-1の発現及びCHX処理条件によるNEDD4-1の発現程度をウエスタンブロットを通じて分析した結果を示した図である。

【図15】図15は、p34のノックダウンによるNEDD4-1及びp34タンパク質

50

の発現程度をウエスタンブロットを通じて分析した結果を示した図である。

【図16】図16は、p34のノックダウンによるPTENタンパク質の発現程度をウエスタンブロットを通じて分析した結果を示した図である。

【図17】図17は、p34の発現によるPTENタンパク質の発現程度をウエスタンブロットを通じて分析した結果を示した図である。

【図18】図18は、p34のノックダウン及びCHX処理条件によるPTENタンパク質の発現程度をウエスタンブロットを通じて分析した結果を示した図である。

【図19】図19は、293細胞でp34にトランスフェクション及びMG132処理によるPTENタンパク質の発現程度をウエスタンブロットを通じて分析した結果を示した図である。

10

【図20】図20は、各細胞でp34にトランスフェクション及びMG132処理によるPTENタンパク質のユビキチン化程度を示した図である。

【図21】図21は、各細胞内でp34ノックダウンによるPTENタンパク質のポリユビキチン化程度を示した図である。

【図22】図22は、293細胞でp34の発現によるPTEN脂質リン酸分解酵素活性を示した図である。

【図23】図23は、NEDD4-1 siRNA/shRNA及びp34をトランスフェクションさせた細胞でPTENの発現程度及びAktリン酸化をウエスタンブロットを通じて分析した結果を示した図である。

【図24】図24は、p34、NEDD4-1 siRNA及びCHX処理によるPTENの発現程度をウエスタンブロットを通じて分析した結果を示した図である。

20

【図25】図25は、NEDD4-1 siRNA/shRNA、p34のトランスフェクション及びMG132処理によるPTENタンパク質のユビキチン化程度を示した図である。

【図26】図26は、p34の発現及びNEDD4-1のノックダウンによるPTEN脂質リン酸分解酵素活性を示した図である。

【図27】図27は、XIAPをノックアウトさせたMEF細胞でのXIAPの発現程度をウエスタンブロットを通じて分析した結果を示した図である。

【図28】図28は、XIAPノックアウトMEF細胞でp34のトランスフェクション結果によるPTENタンパク質発現程度をウエスタンブロットを通じて分析した結果を示した図である。

30

【図29】図29は、XIAPノックアウトMEF細胞でp34のトランスフェクション結果によるPTENタンパク質発現程度を免疫沈降及びウエスタンブロットを通じて分析した結果を示した図である。

【図30】図30は、p34ノックダウンMCF-7、MDA-MB-231、DU145及びLS1034細胞でのモノユビキチン化されたPTENの発現程度を示した図である。

【図31】図31は、p34ノックダウンMEF細胞でモノユビキチン化されたPTENの発現程度を核分画物/細胞質(cytosol)の位置別に示した図である。

【図32】図32は、p34またはNEDD4-1ノックアウトによるMCF-7細胞でモノユビキチン化PTENの発現程度を示した図である。

40

【図33】図33は、NEDD4-1またはp34の発現によるポリユビキチン化PTENの発現程度を示した図である。

【図34】図34は、NEDD4-1またはp34の発現によるポリユビキチン化PTENの発現程度を示した図である。

【図35】図35は、E2酵素の存在及びp34、NEDD4-1の発現によるPTENのユビキチン化程度を示した図である。

【図36】図36は、p34ノックアウト可否によるLS1035及びMCF7細胞の成長率を示した図である。

【図37】図37は、p34ノックアウト可否によるLS1035及びMCF7細胞の集

50

落形成能を示した図である。

【図38】図38は、p34ノックアウト可否によるLS1035及びMCF7細胞の集落の大きさを示した図である。

【図39】図39は、p34ノックアウト可否によるLS1035及びMCF7細胞でのp34、サイクリンE2及びcdc6遺伝子の発現程度を示した図である。

【図40】図40は、テトラサイクリン誘導性p34-shRNAベクターを発現するDU145及びMDA-MB-231変異株の確立をTetRの発現有無確認を通じて示した図である。

【図41】図41は、テトラサイクリン誘導性DU145及びMDA-MB-231変異株にテトラサイクリン処理後、p34、PTEN及びリン酸化Aktの発現程度を示した図である。

10

【図42】図42は、テトラサイクリン誘導性DU145及びMDA-MB-231変異株にテトラサイクリン処理後、PTENリン酸分解酵素活性程度を示した図である。

【図43】図43は、テトラサイクリン誘導性DU145及びMDA-MB-231変異株にテトラサイクリン処理後、集落形成能を示した図である。

【図44】図44は、テトラサイクリン誘導性DU145及びMDA-MB-231変異株にテトラサイクリン処理後、細胞成長率を示した図である。

【図45】図45は、テトラサイクリン誘導性DU145及びMDA-MB-231変異株にテトラサイクリン処理後、BrdU混成程度を示した図である。

【図46】図46は、p34発現Hs578T細胞株でPTENの発現及び集落形成能を示した図である。

20

【図47】図47は、マウスにテトラサイクリン誘導性DU145変異株を注入して腫瘍を形成させた後、テトラサイクリンの投与によるPTEN、p34及びNEDD4-1の発現程度を示した図である。

【図48】図48は、マウスにテトラサイクリン誘導性MDA-MB-231変異株を注入して腫瘍を形成させた後、テトラサイクリンの投与によるPTEN、p34及びNEDD4-1の発現程度を示した図である。

【図49】図49は、マウスにテトラサイクリン誘導性DU145変異株を注入して腫瘍を形成させた後、テトラサイクリンの投与による腫瘍の体積変化を示した図である。

【図50】図50は、マウスにテトラサイクリン誘導性MDA-MB-231変異株を注入して腫瘍を形成させた後、テトラサイクリンの投与による腫瘍の体積変化を示した図である。

30

【図51】図51は、マウスにテトラサイクリン誘導性DU145変異株を注入して腫瘍を形成させた後、テトラサイクリンの投与によるPTENタンパク質の核局在化(nuclear localization)を示した図である。

【図52】図52は、マウスにテトラサイクリン誘導性MDA-MB-231変異株を注入して腫瘍を形成させた後、テトラサイクリンの投与によるPTENタンパク質の核局在化(nuclear localization)を示した図である。

【図53】図53は、p53^{-/-}/MEF細胞でPTEN及びNEDD4-1タンパク質の発現程度を示した図である。

40

【図54】図54は、p53^{-/-}/MEF細胞でRas、p34及びNEDD4-1の発現による集落形成能を示した図である。

【図55】図55は、NEDD4-1ノックダウン-p53^{-/-}/MEF細胞でPTEN及びNEDD4-1タンパク質の発現程度を示した図である。

【図56】図56は、NEDD4-1ノックダウン-p53^{-/-}/MEF細胞でRas、p34及びNEDD4-1の発現による集落形成能を示した図である。

【図57】図57は、NEDD4-1ノックダウン-p53^{-/-}/MEF細胞でPTENのポリユビキチン化程度を示した図である。

【図58】図58は、p53^{-/-}/MEF細胞でRas活性を示した図である。

【図59】図59は、多様な乳癌及び結腸癌細胞でのNEDD4-1/p34の発現によ

50

る P T E N タンパク質の発現割合を示した図である。

【図 6 0】図 6 0 は、多様な乳癌及び結腸癌細胞での N E D D 4 - 1 / p 3 4 の発現による P T E N タンパク質の発現割合を示した図である。

【図 6 1】図 6 1 は、p 3 4 と N E D D 4 - 1 及び P T E N 間の総合的な相互作用を図式的に示した図である。

【図 6 2】図 6 2 は、ヒト乳癌細胞及び大腸癌細胞で p 3 4 活性抑制剤処理による P T E N ユビキチン化抑制程度を示した図である。

【図 6 3】図 6 3 は、p 3 4 活性抑制剤処理による p 3 4 及び N E D D 4 - 1 タンパク質の結合抑制効果を示した図である。

【図 6 4】図 6 4 は、ヒト乳癌細胞株で p 3 4 活性抑制剤処理が細胞死滅及びタンパク質発現に及ぶ影響を示した図である。 10

【図 6 5】図 6 5 は、ヒト乳癌細胞株で p 3 4 活性抑制剤処理が P T E N 脂質リン酸分解酵素活性に及ぶ影響を示した図である。

【図 6 6】図 6 6 は、ヒト大腸癌細胞株で p 3 4 活性抑制剤処理が細胞死滅及びタンパク質発現に及ぶ影響を示した図である。

【図 6 7】図 6 7 は、ヒト大腸癌細胞株で p 3 4 活性抑制剤処理が P T E N 脂質リン酸分解酵素活性に及ぶ影響を示した図である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

以下、本発明を詳しく説明する。 20

【0022】

本発明は、p 3 4 遺伝子の発現抑制剤または p 3 4 タンパク質の活性抑制剤を有効成分で含む癌の予防または治療用組成物を提供する。

【0023】

また、本発明は、p 3 4 遺伝子の発現抑制剤または p 3 4 タンパク質の活性抑制剤を有効成分で含む癌の転移抑制用組成物を提供する。

【0024】

前記組成物は、薬学的組成物または食品組成物を含む。

【0025】

本発明による p 3 4 遺伝子の発現抑制剤は、p 3 4 遺伝子の mRNA に相補的に結合するアンチセンスヌクレオチド、短ヘアピン RNA (small hairpin RNA : shRNA)、低分子干渉 RNA (small interfering RNA : siRNA) 及びリボザイム (ribozyme) で構成された群から選択された 1 種以上であることができるが、これに限定されるものではない。 30

【0026】

本発明による p 3 4 タンパク質の活性抑制剤は、p 3 4 タンパク質に特異的に結合する化合物、ペプチド、ペプチド模倣体、気質類似体、アプタマー及び抗体で構成された群から選択された 1 種以上であることができるが、これに限定されるものではない。

【0027】

前記アンチセンスヌクレオチドは、ワトソン-クリック (Watson-Crick) 塩基対に定義されたことによって、DNA、未成熟 mRNA または成熟された mRNA の相補的塩基配列に結合 (混成化) して DNA においてタンパク質として遺伝情報の流れを妨害する。 40

【0028】

前記 siRNA は、p 3 4 タンパク質を暗号化する遺伝子の mRNA の塩基配列内で選択される 15 ~ 30 mer のセンス配列及び前記センス配列に相補的に結合するアンチセンス配列で構成され、この時、前記センス配列は、特別にこれに限定されるものではないが、25 個の塩基で構成されることが好ましい。

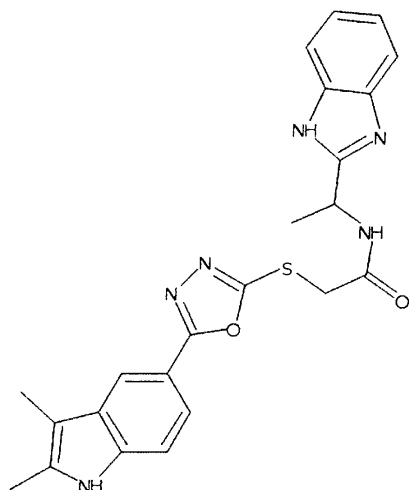
【0029】

前記化合物は、p 3 4 タンパク質に特異的に結合してその活性を抑制することができる 50

任意の化合物を全て含み、好ましくは、p 3 4 と N E D D 4 - 1 タンパク質の結合を抑制する活性を有するものであるが、これに限定されない。本発明の一実施例では、前記 p 3 4 タンパク質に特異的に結合する化合物の一例として、下記化学式 1 で表示される化合物またはその薬学的に許容可能な塩を提示する。

【0030】

【化 1】



10

20

本発明で「薬学的に許容可能な塩」は、個体に比較的非毒性で且つ無害な有効作用を有する濃度として、この塩に起因した副作用が化学式 1 で表示される化合物のよい効能を低下させない前記化合物の任意の全ての有機または無機付加塩を意味する。前記化学式 1 で表示される化合物の薬学的に許容可能な塩は、特定しない限り、化学式 1 で表示される化合物に存在することができる酸性または塩基性基の塩を全て含む。

【0031】

前記ペプチド模倣体(Peptide mimetics)は、p 3 4 タンパク質の結合ドメインを抑制して p 3 4 タンパク質の活性を抑制する。ペプチド模倣体は、ペプチドまたは非ペプチドであることができ、psi 結合のような非ペプチド結合によって結合されたアミノ酸で構成されることができる。また、「構造的に強制された(conformationally constrained)」ペプチド、環状模倣体(cyclic mimetics)、少なくとも一つのエキソサイクリックドメイン(exocyclic domain)、結合部分(結合アミノ酸)及び活性部位を含む環状模倣対であることができる。ペプチド模倣体は、p 3 4 タンパク質の二次構造特性と類似に構造化され、抗体または水溶性受容体のような巨大な分子の抑制特性を模倣することができ、天然の拮抗剤と同等な効果で作用できる新規した小分子であることができる。

30

【0032】

前記アプタマー(aptamer)は、単一鎖 DNA または RNA 分子として、SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)と呼ばれるオリゴヌクレオチド(oligonucleotide)ライブラリーを利用した進化的な方法によって特定化学分子や生物学的分子に高い親和力と選別力を有して結合するオリゴマーを分離して収得することができる。アプタマーは、標的に特異的に結合して標的の活性を調整することができ、例えば、結合を通じて標的の機能を遮断することができる。

40

【0033】

前記抗体は、p 3 4 タンパク質に特異的で直接的に結合して p 3 4 タンパク質の活性を効果的に抑制することができる。前記 p 3 4 タンパク質に特異的に結合する抗体としては、ポリクローナル(polyclonal)抗体またはモノクローナル(monoclonal)抗体を使用することが好ましい。前記 p 3 4 タンパク質に特異的に結合する抗体は、当業者において知られた公知の方法で製作するか、商業的に知られた p 3 4 抗体を購入し

50

て使用することができる。前記抗体は、当業者において知られた従来方法によって免疫原である p 3 4 タンパク質を外部宿主に注射することで製造することができる。外部宿主は、マウス、ラット、羊、兎のような哺乳動物を含む。免疫原は、筋肉内、腹腔内または皮下注射方法により注射され、一般的に抗原性を増加させるための補助剤 (a d j u v a n t) と一緒に投与することができる。外部宿主から定期的に血液を採取して形成された力価及び抗原に対する特異性を示す血清を収去して抗体を分離することができる。

【0034】

本発明によれば、p 3 4 を抑制する場合、P T E N のモノユビキチン化を起こして P T E N の核局在化 (n u c l e a r l o c a l i z a t i o n) を促進させる結果、腫瘍の生存、増殖、浸湿性及び転移性と関連された A k t 経路を抑制することで、P T E N 及び N E D D 4 - 1 を同時発現する多様な癌細胞の腫瘍発生性及び集落形成能を顕著に減少させる効果がある。したがって、p 3 4 遺伝子の発現抑制剤または p 3 4 タンパク質の活性抑制剤は、癌の治療または転移抑制剤として有用に使用されることができる。

【0035】

前記癌は、口腔癌、肝臓癌、胃癌、結腸癌、乳癌、肺癌、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、頭部癌、頸部癌、子宮頸部癌、卵巣癌、大腸癌、小腸癌、直腸癌、喇叭管癌腫、肛門付近癌、子宮内膜癌腫、膣癌腫、外陰癌腫、ホジキン病 (H o d g k i n ' s d i s e a s e) 、食道癌、リンパ腺癌、膀胱癌、胆嚢癌、内分泌腺癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、前立腺癌、慢性白血病、急性白血病、リンパ球リンパ種、腎臓癌、輸尿管癌、腎臓細胞癌腫、腎臓骨盤癌腫、中枢神経系腫瘍、1 次中枢神経系リンパ種、脊髄腫瘍、脳幹神経膠腫及び脳下垂体腺腫などを含み、好ましくは、乳癌、結腸癌、胃癌、肝臓癌、肺癌、前立腺癌などを含むが、これに限定されない。

【0036】

また、前記癌は、p 3 4 及び N E D D 4 - 1 を同時に発現する癌を全て含むが、これに限定されない。

【0037】

本発明の組成物は、抗癌効果を有する公知の有効成分を 1 種以上さらに含むことができる。

【0038】

本発明の組成物は、薬学的に許容される担体と一緒に適当な形態で剤型化されることができる。薬学的に許容される担体としては、例えば、ラクトース、澱粉、セルロース誘導体、マグネシウムステアレート、ステアリン酸などのような経口投与用担体及び水、適当なオイル、食塩水、水性グルコース及びグリコールなどのような非経口投与用担体などがあり、ここに安定化剤及び保存剤をさらに含むことができる。適当な安定化剤としては、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウムまたはアスコルビン酸のような抗酸化剤がある。適当な保存剤としては、塩化ベンザコニウム、メチルーまたはプロピルパラベン及びクロロブタノールがある。その他の薬学的に許容される担体としては、次の文献に記載されているものを参照することができる (R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s , 1 9 t h e d . , M a c k P u b l i s h i n g C o m p a n y , E a s t o n , P A , 1 9 9 5) 。

【0039】

本発明の薬学的組成物は、目的する方法によって経口投与するか非経口投与 (例えば、静脈内、皮下、腹腔内または局所に適用) することができる。投与量は、個体の体重、年齢、性別、健康状態、食餌、投与時間、投与方法、投与期間または間隔、排泄率、体質特異性、製剤の性質などによってその範囲が多様である。本発明の薬学的組成物の一日投与量は、約 0.001 ~ 1000 mg / k g であるか、臨床実験結果によって加減されることができ、一日一回 ~ 数回に分けて投与することが好ましい。

【0040】

本発明の薬学的組成物は、投薬単位形態で剤型化されることができる。例えば、前記剤型化された投薬単位は、前記有効化合物の 1 日個別投薬量の 1、2、3 または 4 倍の単位

【 0 0 4 1 】

【 0 0 4 2 】

10

【 0 0 4 3 】

20

【 0 0 4 4 】

30

【 0 0 4 5 】

40

【 0 0 4 6 】

【 0 0 4 7 】

50

用候補物質のスクリーニング方法を提供する。

【0048】

前記方法において、1)段階の細胞株は、癌細胞株を全て含み、好ましくは、p34及びNEDD4-1を同時に発現する癌細胞株を含むが、これに限定されない。

【0049】

前記方法において、2)段階で遺伝子の発現程度は、RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)、ノーザンブロット(Northern blot)、cDNAマイクロアレイ混成化反応及びin situ混成化反応などの方法を通じて測定することができ、当業者において知られた遺伝子の量を測定する全ての方法を使用することができるが、これに限定されない。

10

【0050】

前記方法において、2)段階でタンパク質の活性程度は、免疫沈降法(immunoprecipitation)、放射能免疫分析法(RIA)、酵素免疫分析法(ELISA)、免疫組職化学、ウェスタンブロット(Western Blotting)及びプロモサイトメトリー分析法(FACS)などの方法を通じて測定することができ、当業者において知られたタンパク質の量を測定する全ての方法を使用することができるが、これに限定されない。

【0051】

また、本発明は、1)生物学的試料にNEDD4-1(Neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4-1)の発現抑制剤または活性抑制剤を処理する段階；及び2)前記生物学的試料で癌細胞の増殖可否を測定する段階；を含むp34遺伝子の発現抑制剤またはp34タンパク質の活性抑制剤の癌に対する治療効果予測方法を提供する。

20

【0052】

前記方法において、1)段階の生物学的試料は、癌にかかった個体の血液、小便、唾液及び組織などを含むが、これに限定されない。

【0053】

前記方法は、3)生物学的試料の癌細胞が増殖されると、p34の発現抑制剤または活性抑制剤の癌に対する治療効果が存在しないで、生物学的試料の癌細胞が増殖されないと、p34遺伝子の発現抑制剤またはp34タンパク質の活性抑制剤の治療効果が存在すると予測する段階；をさらに含むことを特徴とする。

30

【0054】

NEDD4-1及びPTENのみを発現する癌及びPTENのみを発現する癌では、p34遺伝子の発現抑制剤またはp34タンパク質の活性抑制剤の処理による治療効果がなく、NEDD4-1、PTEN及びp34が同時に発現する癌では、p34遺伝子の発現抑制剤またはp34タンパク質の活性抑制剤の処理による抗癌効果を有することができる。

【0055】

以下、本発明の好ましい実施例を提示する。しかし、下記実施例は、本発明をより容易に理解するために提供されたものに過ぎず、下記実施例によって本発明の内容が限定されるものではない。

40

【0056】

実施例1. p34及びNEDD4-1の間の生体内及び試験管内の相互作用及びp34がNEDD4-1タンパク質の安全性に及ぶ影響の分析

1-1. 内因性p34及びNEDD4-1の間の相互作用の分析

(1)NEDD4-1に相互作用するタンパク質を同定するため、細胞溶解液からNEDD4-1タンパク質に対する抗体を利用して免疫沈降法、タンデム親和性精製及び質量分析を実行した。まず、免疫沈降法を実行するために、293(HEK293)細胞、前立腺癌細胞であるDU145及び乳癌細胞であるMCF7の溶解液を抗-NEDD4-1抗体と各々混合した後、4℃で12時間の間培養した。その後、20µlのタンパク質A/G

50

Plus-Sepharose beads (Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA、USA)を前記培養物に加えて混合した後、2時間の間追加培養した。収得された免疫沈降物を溶解緩衝液(nonidet P-40 lysis buffer)で5回洗浄した後、20 μ lの2xSDSサンプル緩衝液を処理し加熱した。

【0057】

また、ウエスタンブロットを実行するために、各細胞から分離したタンパク質をSDS-PAGEを通じて分離した後、これをメンブレインPolyScreenmembranes(New England Nuclear、Boston、MA、USA)に移した後、多様な抗体(anti-PTEN(Cell Signaling、Beverly、CA、USA)、anti-p34(Enzo Life Sciences、Beverly、MA、USA)、anti-NEDD4-1及び γ -tubulin(Santa Cruz Biotechnology))を利用して従来公知された方法によって実験を実行した。

10

【0058】

その結果を図1及び図2に示した。

【0059】

図1に示したように、NEDD4-1と相互作用する多様なタンパク質のうちp34が存在することを確認した(赤色矢印で表示)。図2に示したように、3個の細胞株のうち2個の癌細胞株(DU145及びMCF7細胞)でp34が発現されることを確認した。p34は、CDK4(cyclin-dependent kinase 4)及びXIAP(X-linked inhibitor of apoptosis protein)に結合することで知られている。

20

【0060】

(2)前記結果を検証するために、本発明者らは、DU145、MCF7及びLS1034細胞内で内因性p34とNEDD4-1の相互作用を免疫沈降法及びウエスタンブロットを通じて観察した。その結果を図3及び図4に示した。

【0061】

図3及び図4に示したように、DU145、MCF7及びLS1034細胞で全てp34-結合NEDD4-1及びNEDD4-1結合p34を確認した。

30

【0062】

(3)前記実験結果を他の癌細胞株で確認するために、本発明者らは、多様な結腸癌及び乳癌細胞株(HT-29、HCT-116、LS174T、DLD1、Colo201、LS1034、BT-20、MDA-MB-231、Hs578Tなど)でp34及びNEDD4-1の発現を分析した。その結果を図5に示した。

【0063】

図5に示したように、p34及びNEDD4-1の相互作用は、p34及びNEDD4-1タンパク質を同時発現するLS1034細胞株とMDA-MB231細胞株でも観察された。

【0064】

40

1-2. 外因性p34及びNEDD4-1の間の相互作用の分析

外因性に発現されるp34とNEDD4-1の間の相互作用を調査するために、内因性ではp34を発現しない293細胞をGFP-tagged p34及び/またはmyc-tagged NEDD4-1を発現する構造物(construct)でトランスフェクションさせた。以後、293細胞の溶解物を免疫ブロットを通じて分析した。その結果を図6に示した。

【0065】

図6に示したように、GFP-tagged p34は、前記293細胞のmyc-tagged NEDD4-1免疫沈降物から検出された。したがって、外因性に発現されるp34とNEDD4-1の間にも相互作用が起きることを確認することができた。

50

【0066】

1-3. p34、NEDD4-1及びPTENの間の相互作用の分析

p34とNEDD4-1、PTENの間の相互作用を観察するために、下記のようにGSTプルダウン分析(GST Pull-down analysis)を実行した。まず、E.coli BL-21(DE3)株から発現されて精製された500ngのGST-p34タンパク質またはGSTタンパク質(対照群)を準備した後、これをNEDD4-1が欠失された変異細胞株と反応緩衝液(20mM Tris-HCl pH7.5、120mM NaCl)で混合した後、30℃で1時間の間培養した。次に、GSTプルダウン緩衝液(20mM Tris-HCl pH8.0、500mM NaCl、1% Triton X-100、0.02% BSA、5mMメルカプトエタノール)を加えて反応を停止させた。その後、GST及び関連タンパク質をグルタチオン-Sepharose beadsを利用して4℃で1時間の間プルダウンさせた。タンパク質複合体をGSTプルダウン緩衝液で6回洗浄して2x SDSサンプル緩衝液を加えた。免疫沈降物内のp34及びNEDD4-1の存在は、抗-GST、抗-T7抗体を利用した免疫ブロットを通じて各々分析した。その結果を図7及び図8に示した。

10

【0067】

図7に示したように、免疫沈降物内でp34が結合されたNEDD4-1タンパク質が検出されることを確認した。

【0068】

また、図8に示したように、精製された組換えGST-PTENをMyc-NEDD4-1と培養してp34とPTENとの結合を分析した結果、PTENが結合されたp34タンパク質は検出されなかった。これを通じて、p34がNEDD4-1と異なりPTENには結合しないことを確認した。

20

【0069】

前記実験結果から、p34がNEDD4-1と直接的に相互作用するが、PTENとは相互作用しないことが分かった。

【0070】

1-4. p34と相互作用するNEDD4-1ドメインの分析

(1)前記実施例1-3を通じて、p34と相互作用すると確認されたNEDD4-1タンパク質のドメインを分析した。このために、NEDD4-1 cDNAを発現するプラスミドからT7-taggedベクターを利用してT7-tagged野生型(wild-type)NEDD4-1とNEDD4-1の一部ドメインが欠失されたNEDD4-1変異体を製造した。精製されたGST-p34タンパク質を、T7-tagged野生型NEDD4-1またはNEDD4-1変異体(C2、WWs及びHECT(homologous to the E6-AP carboxyl terminus)ドメイン欠失(N1)、WWs及びHECTドメイン欠失(N2)、C2、WW3、WW4及びHECTドメイン欠失(N3)、C2、WW1、WW2及びHECTドメイン欠失(N4)、C2及びWWsドメイン欠失(N5))を発現する293細胞の溶解液と一緒に培養した。以後、GSTプルダウンアッセイを通じてp34が結合するNEDD4-1のドメインを分析した。その結果を図9に示した。

30

40

【0071】

図9に示したように、GST-p34は、NEDD4-1-野生型及びNEDD4-1-N3から検出された。これは、p34がNEDD4-1のWW1及びWW2を含むドメインと相互作用することを意味した。

【0072】

前記実験結果に基づいて、p34との直接的な結合に関連されたドメインがNEDD4-1のWW1またはWW2ドメインのうちどれかを確認した。このために、WW1またはWW2ドメインのみを各々有するNEDD4-1の2種の変異体構造物(N6、N7)を製造した。精製されたGST-p34タンパク質を、前記NEDD4-1の変異体を発現する細胞の溶解液と一緒に培養した後、GSTプルダウンアッセイを実行した。その結果を

50

図9に示した。

【0073】

図9に示したように、GST-34は、NEDD4-1のWW1ドメインから明確に検出された。これを通じて、p34が直接的にNEDD4-1のWW1ドメインに結合することを確認した。

【0074】

(2)前記結果を検証するために、GST-taggedされてWW1ドメインが欠失された野生型NEDD4-1の変異体(GST-delWW1)を含むプラスミドを製作した。前記NEDD4-1の変異体タンパク質をHis-p34を発現する細胞から分離した細胞溶解液と培養した後、GSTプルダウンアッセイを実行した。その結果を図10に示した。

10

【0075】

図10に示したように、p34タンパク質は、野生型NEDD4-1タンパク質と相互作用したが、WW1ドメインが欠失されたNEDD4-1タンパク質とは相互作用しなかった。これを通じて、NEDD4-1のWW1ドメインにp34が直接的に結合することを確認した。

【0076】

1-5. p34がPTENとNEDD4-1の結合に及ぶ影響の分析

p34がPTENとNEDD4-1の結合に影響を及ぼすか否かを調査するために、GST-PTEN融合タンパク質をMyc-NEDD4-1及びHis-p34を発現する細胞の融解液と培養した後、GSTプルダウンアッセイを実行した。対照群としては、GSTタンパク質を利用した。その結果を図11に示した。

20

【0077】

図11に示したように、PTENは、p34の存在/不在下でNEDD4-1と相互作用したが、p34がない時よりはp34が存在する時に強く相互作用した。これは、p34がNEDD4-1とPTENの結合親和性に影響を及ぼすことができることを暗示する。

【0078】

前記実験結果から、p34がNEDD4-1のWW1ドメインと相互作用するが、PTENとは相互作用しないで、NEDD4-1とPTENの相互作用を妨害しないことを確認した。また、前記実験結果から、p34によるNEDD4-1タンパク質の向上された安全性がPTENのポリユビキチン化(poly-ubiquitination)に影響を及ぼすことが分かる。

30

【0079】

1-6. p34がNEDD4-1の細胞内の自己ユビキチン化に及ぶ影響分析

(1)NEDD4-1が細胞内で自己ユビキチン化(auto-ubiquitination)されると以前から報告されたので、p34がNEDD4-1の自己ユビキチン化に及ぶ影響を分析した。293細胞をNEDD4-1及び/またはp34でトランスフェクションした後、前記細胞にMG132(25mM)を処理し、6時間の間培養した。細胞培養物を取得してその抗-Myc免疫沈降物を分析した。その結果を図12に示した。

40

【0080】

図12に示したように、MG132で処理された細胞内で、NEDD4-1の自己ユビキチン化はp34の存在によって顕著に減少した。

【0081】

(2)前記結果を検証するために、精製されたタンパク質を利用した細胞フリーシステムでNEDD4-1のユビキチン化を分析した。まず、His-taggedベクターを使用してp34 cDNA発現プラスミドからHis-tagged p34を製造した。精製されたGST-NEDD4-1タンパク質をE1、Ub cH5c及び前記His-tagged p34を発現する293細胞抽出物と一緒に培養した後、自己ユビキチン化を測定した。その結果を図13に示した。

50

【0082】

図13に示したように、GST-NEDD4-1 ユビキチン化は、p34の発現によって漸次的に減少した。これを通じて、p34が完全な細胞(intact cell)及び細胞フリーシステムで全てNEDD4-1の自己ユビキチン化を抑制することを確認した。

【0083】

(3)293及びMCF7細胞を各々p34を発現するプラスミドで24時間の間トランスフェクションするか、p34に対するsiRNA(small interfering RNA)で48時間の間トランスフェクションした。前記細胞にCHX(cycloheximide、50mg/ml)を各時間帯別に処理して、NEDD4-1タンパク質を確認するためにウエスタンブロットを実行した。その結果を図14及図15に示した。

10

【0084】

図14に示したように、GFP-tagged p34とmyc-tagged NEDD4-1で同時トランスフェクションされた細胞内でのNEDD4-1タンパク質の水準は、myc-tagged NEDD4-1のみで処理された細胞内でより一層増加され且つ高い状態で維持された。

【0085】

また、図15に示したように、p34に対するsiRNAを使用してp34をノックダウンさせた細胞内でのNEDD4-1タンパク質の水準は、スクランブル(scrambled) siRNAで処理された細胞と比較してよほど減少した。これを通じて、p34

20

がNEDD4-1タンパク質を安定化させることを確認した。

【0086】

このような結果は、p34は、NEDD4-1の自己ユビキチン化を抑制してNEDD4-1タンパク質を安定化させるという事実を強く暗示する。

【0087】

実施例2. p34がNEDD4-1により媒介されるPTENのポリユビキチン化調節に及ぶ影響の分析

(1) p34のsiRNAを使用して、p34の発現抑制による沈黙効果を分析した(p34-siRNA: I: 5'-GCAAGG GUCUGAAGCGGAA-3、II: 5'-GGAAACGGGAGGAGGAGGA-3'、III: 5'-CCGAAUUGG ACUACCUCAU-3')。MDA-MB-231及びMCF7細胞をp34-siRNAでトランスフェクションした後、各タンパク質の発現程度をウエスタンブロットを通じて分析した。その結果を図16に示した。

30

【0088】

図16に示したように、p34-siRNAは、濃度依存的にPTENの発現増加及びp-Aktの発現減少を誘導することを確認した。

【0089】

また、293及びMEF(mouse embryonic fibroblasts)細胞をGFP-tagged p34でトランスフェクションした後、各タンパク質の発現程度をウエスタンブロットを通じて分析した。その結果を図17に示した。

40

【0090】

図17に示したように、GFP-tagged p34の発現は、内因性p34を発現しない293またはMEF細胞でPTENタンパク質の水準を減少させた。また、Aktのリン酸化水準は、p34発現水準によって増加し、PTENの発現水準と反比例した。

【0091】

これを通じて、p34がNEDD4-1に結合することでPTENタンパク質の水準に影響を与えることができることを確認した。

【0092】

(2)前記実験結果に基づいて、本発明者らは、MCF7細胞をp34-siRNAでトランスフェクションした後、タンパク質合成阻害剤であるCHX(cyclohexim

50

ide)で処理し、時間によって内因性に発現される p 3 4 タンパク質水準の変化を測定することで、P T E N のターナーオーバーの調節においての p 3 4 の役目を調査した。その結果を図 1 8 に示した。

【0093】

図 1 8 に示したように、内因性で p 3 4 を発現する M C F 7 細胞を p 3 4 - s i R N A を利用して p 3 4 をノックダウンさせた場合、P T E N タンパク質の水準が実質的に変わらなかったが、対照群 s i R N A (スクランブル s i R N A) でトランスフェクションした細胞の場合、P T E N の発現が減少した。このような結果は、p 3 4 が P T E N タンパク質の安全性を減少させることで P I 3 K 信号経路を陽的に調節することを意味する。

【0094】

(3) p 3 4 がタンパク質の分解経路を通じて P T E N タンパク質の安全性を調節するかどうかを確認するために、内因性で p 3 4 を発現しない 2 9 3 細胞を G F P - t a g g e d p 3 4 でトランスフェクションさせた後、プロテアソーム阻害剤である M G 1 3 2 を処理した。各タンパク質の発現程度をウェスタンブロットを通じて分析した。その結果を図 1 9 に示した。

【0095】

図 1 9 に示したように、外因性で p 3 4 を発現し、M G 1 3 2 に処理された細胞の P T E N タンパク質水準は、対照群ベクター (e m p t y v e c t o r) でトランスフェクションした細胞と比較してよほど減少した。

【0096】

(4) p 3 4 が P T E N のポリユビキチン化に影響を及ぼすかどうかをさらに確認するために、ユビキチン化分析 (i n t r a c e l l u l a r u b i q u i t i n a t i o n a s s a y) を実行した。

【0097】

まず、2 9 3 または M E F 細胞に G F P - p 3 4 をトランスフェクションした後、M G 1 3 2 と一緒に培養し、P T E N のユビキチン化を分析した。その結果を図 2 0 に示した。

【0098】

図 2 0 に示したように、p 3 4 を離巢性発現させた後に M G 1 3 2 を処理した 2 9 3 細胞または M E F 細胞でポリユビキチン化された形態の P T E N が検出された。

【0099】

また、M C F 7、M D A - M B - 2 3 1 及び D U 1 4 5 細胞に p 3 4 - s i R N A を 2 4 時間の間トランスフェクションした後、M G 1 3 2 と一緒に培養し、P T E N のユビキチン化を分析した。その結果を図 2 1 に示した。

【0100】

図 2 1 に示したように、p 3 4 をノックダウンした M C F 7、M D A - M B 2 3 1 及び D U 1 4 5 細胞で P T E N のポリユビキチン化が漸次的に減少した。

【0101】

また、2 9 3 細胞を野生型 P T E N 及び/または p 3 4 で 2 4 時間の間トランスフェクションした後、P T E N 脂質リン酸分解酵素活性を測定した。より具体的には、前記細胞を 5 0 m M H E P E S (p H 7.5)、1 5 0 m M N a C l、1 m M E D T A、1 0 % g l y c e r o l 及びプロテアーゼ抑制剤を含む 1 % T r i t o n X - 1 0 0 緩衝液でとかけた後、抗 - P T E N 抗体を利用して P T E N を免疫沈降した。前記免疫沈降物を洗浄した後、1 0 0 m M T r i s - H C l (p H 8.0) 内の水溶性の d i C 8 - p h o s p h a t i d y l i n o s i t o l 3,4,5 - t r i s p h o s p h a t e 及び 1 0 m M D T T と一緒に 3 7 ° C で 4 0 分間培養した。その後、上層液を集めて、B i o m o l G r e e n R e a g e n t (E n z o L i f e S c i e n c e s) と一緒に常温で 3 0 分間培養した。P T E N の活性は、6 5 0 n m での O D 値を測定してリン酸塩の放出を計算することで測定された。陰性対照群として、1 2 3 番目アミノ酸のシステイン (C y s t e i n) がセリン (S e r i n e) に変異された脂質リン酸分解酵素 - 欠乏 P T E N C 1 2 4

10

20

30

40

50

S変異株を使用した。その結果を図22に示した。

【0102】

図22に示したように、PTENの脂質リン酸分解酵素活性は、対照群に比べてp34を離巢性に発現する細胞で顕著に減少した。

【0103】

このような結果は、p34がPTENのポリユビキチン化及びプロテアソーム性の分解を媒介することを示す。

【0104】

(5)最近、PTENのユビキチン化及びプロテアソーム性の分解がNEDD4-1により部分的に調節され、NEDD4-1がE3ユビキチンリカーゼとして機能すると報告された(Wang et al., 2007)。前記実施例1で本発明者らは、p34が直接的にNEDD4-1と相互作用することを明かしたので、NEDD4-1がPTENのユビキチン化及びプロテアソーム性の分解に及ぶ影響がp34の発現水準に依存的であるか否かを調査した。

10

【0105】

まず、内因性NEDD4-1を発現するが、p34は発現しない293細胞またはMEF細胞をGFP-tagged p34プラスミド(またはGFP対照群ベクター)及びNEDD4-1-siRNA/shRNA(またはスクランブルsiRNA)と共トランスフェクションさせた(NEDD4-1-siRNA: 5'-TGGCGATTGTAAACCGAA-3')。各タンパク質の発現程度をウェスタンブロットを通じて分析した。その結果を図23に示した。

20

【0106】

図23に示したように、NEDD4-1-siRNA/shRNA及びGFP-tagged p34を共トランスフェクションさせた細胞では、PTENタンパク質の水準が実質的にほとんど変わらなかったが、GFP-tagged p34のみをトランスフェクションさせた細胞では、PTENタンパク質の水準が顕著に減少した。一貫的に、Aktのリン酸化は、PTENタンパク質水準に反比例した。

【0107】

(6)タンパク質合成阻害剤であるCHX(cycloheximide)の存在下で、p34の離巢性発現及びNEDD4-1ノックダウンによってPTENのターンオーバーが影響を受けるか否かを調査した。このために、293細胞をp34発現プラスミド及びNEDD4-1-siRNAをトランスフェクションした後、PTENタンパク質の半減期を分析した。その結果を図24に示した。

30

【0108】

図24に示したように、PTENの水準は、NEDD4-1ノックダウン293細胞で外因性p34の発現によって減少したが、CHXの処理後には漸進的な増加を示した。これを通じて、p34がNEDD4-1依存的にPTENのプロテアソーム性の分解を媒介することを確認した。

【0109】

(7)p34がNEDD4-1に依存的にPTENのポリユビキチン化を媒介するか否かを確認するために、p34発現プラスミドで野生型(293またはMEF細胞)及びNEDD4-1ノックダウン細胞をトランスフェクションした後、MG132を処理し、Intact-cell ubiquitination assayを実行した。その結果を図25に示した。

40

【0110】

図25に示したように、ポリユビキチン化されたPTENは、p34発現プラスミドでトランスフェクションした野生型細胞で明確に検出されたが、p34発現プラスミドでトランスフェクションしたNEDD4-1ノックダウン細胞では検出されなかった。

【0111】

また、前記293細胞のPTEN脂質リン酸分解酵素活性を分析した。その結果を図26

50

に示した。

【0112】

図26に示したように、PTENの脂質リン酸分解酵素活性は、p34を離巢性に発現する293細胞のNEDD4-1ノックダウン時に維持されたが、前記細胞をスクランブルsiRNAで処理した場合、このような活性が喪失されることを確認した。

【0113】

このような結果は、NEDD4-1がp34に依存的にPTENのポリユビキチン化を誘導することを示す。

【0114】

(8)最近、XIAPがPTENのポリユビキチン化を誘導すると報告された(Van Themsche et al., 2009)。したがって、p34がXIAPにより誘導されたPTENポリユビキチン化に影響を与えるか否かを評価するために、XIAPノックアウトMEF細胞でポリユビキチン化実験を実行した。XIAPノックアウトMEF細胞は、Dr. Duckett (University of Michigan Medical School)から提供を受けた。その結果を図27～図29に示した。

【0115】

図27に示したように、ウエスタンブロットを通じてXIAPノックアウトMEF細胞でXIAPの発現がないことを確認した。

【0116】

また、図28に示したように、XIAPノックアウトMEF細胞をGFP-tagged p34でトランスフェクションさせる場合、PTENタンパク質の水準が顕著に減少されることを確認した。

【0117】

また、図29に示したように、GFP-tagged p34でトランスフェクションさせたXIAPノックアウトMEF細胞でPTENが強くポリユビキチン化されることを確認した。

【0118】

前記結果から、p34は、XIAPに独立的にNEDD4-1を通じてPTENのポリユビキチン化を調節することを確認した。

【0119】

実施例3. p34のNEDD4-1を通じたPTENのモノユビキチン化及びポリユビキチン化調節の分析

(1)最近、NEDD4-1がPTENの試験管内及び細胞内のポリユビキチン化だけではなく、モノユビキチン化を媒介し、PTENのモノユビキチン化は、PTENの核膜孔を通じた核移動(nuclear import)を媒介することで報告された(Wang et al., 2007)。前記実施例2に示したように、p34は、NEDD4-1を通じてPTENポリユビキチン化を調節することを確認した。前記結果に基づいて、本発明者らは、p34がPTENのモノユビキチン化に影響を及ぼすか否かを分析した。

【0120】

まず、内因性でp34及びNEDD4-1を発現する4個の癌細胞株(MCF7、MDA-MB231、DU145及びLS1034)をp34-siRNAでトランスフェクションさせて、Intact-cell ubiquitination assayを通じてPTENのユビキチン化状態を調査した。その結果を図30に示した。

【0121】

図30に示したように、p34のノックダウンは、全ての癌細胞株でPTENのモノユビキチン化を増加させた。

【0122】

また、MCF7細胞をp34-siRNAで24時間の間トランスフェクションさせた後、核とサイトゾル区画を分画した。ウエスタンブロットを利用してPTENの発現を分析した。その結果を図31に示した。

10

20

30

40

50

【0123】

図31に示したように、PTENタンパク質は、p34-ノックダウンMCF7細胞の核分画物で強く検出されたが、スクランブルsiRNAで処理された細胞では、PTENの核局在化がほとんど現われなかった。さらに、モノユビキチン化されたPTENは、p34-ノックダウンMCF7細胞の核分画物でのみ検出された。これは、p34の発現は、PTENのモノユビキチン化及び核局在化(nuclear localization)に影響を与えることを示す。

【0124】

(2)NEDD4-1がp34の発現によってPTENのモノユビキチン化に影響を及ぼすか否かを調査するために、MCF7細胞をNEDD4-1-siRNA、p34-siRNA及び/またはGFP-tagged p34で24時間の間トランスフェクションさせた後、PTENのユビキチン化を分析した。その結果を図32に示した。

10

【0125】

図32に示したように、モノユビキチン化されたPTENは、p34-ノックダウン細胞では観察されたが、NEDD4-1-siRNA及びp34-siRNAで共トランスフェクションした細胞では観察されなかった。

【0126】

(3)これを検証するために、本発明者らは、E1及びE2酵素の存在下で、精製されたGST-PTENタンパク質をFlag-tagged NEDD4-1を発現する293細胞から分離したタンパク質抽出物及び/またはHis-tagged p34と培養した。その後、GST-PTENのCell-free ubiquitination assayを実行した。その結果を図33及び図34に示した。

20

【0127】

図33に示したように、PTENは、NEDD4-1のみが存在する場合、モノユビキチン化されたが、NEDD4-1及びp34が全て存在する場合、強くポリユビキチン化された。

【0128】

また、図34に示したように、PTENのポリユビキチン化は、p34に依存的にますます減少した。これは、NEDD4-1により媒介されるPTENのモノ及びポリユビキチン化がp34の発現に依存的であることを意味する。

30

【0129】

(4)p34がNEDD4-1-媒介PTENユビキチン化過程でE2-類似酵素の役目をするか否かを調査した。E1及びE2の存在または不在下で、GST-PTENをp34及びNEDD4-1と培養した後、Cell-free ubiquitination assayを通じてPTENのユビキチン化を分析した。その結果を図35に示した。

【0130】

図35に示したように、精製されたGST-PTENは、Flag-tagged NEDD4-1及びHis-tagged p34を発現する293細胞から得た抽出物でE2酵素の存在下でユビキチン化されたが、E2酵素がない場合は、ユビキチン化されなかった。これを通じて、p34がE2-類似酵素としての役目をしないことを確認した。したがって、前記結果から、p34は、NEDD4-1により媒介されるPTENのモノユビキチン化及びポリユビキチン化を調節することが分かる。

40

【0131】

実施例4. p34と癌細胞増殖との関係分析

前記実施例1～実施例3の実験結果を通じて、p34は、NEDD4-1の自己ユビキチン化を阻害することでNEDD4-1タンパク質の安定性を陽的に調節するので、p34のノックダウンは、PTENポリユビキチン化を減少させて、NEDD4-1により媒介されるPTENのモノユビキチン化を通じてPTENタンパク質水準を増加させることを確認した。

50

【0132】

(1) p34がNEDD4-1/PTEEN経路で強い原腫瘍遺伝子として機能することができかどうかを確認するために、p34-siRNAを発現するMCF7及びLS1034細胞の増殖を検査した。集落形成アッセイ(Colony-forming assay)及びソフトアガーアッセイを実行した。

【0133】

集落形成アッセイを実行するために、6ウェルプレート当たり300個の濃度で細胞を植えた後、クローン原生容量(clonogenic capacity)を測定した。プレートイングをして10~14日が経過後、細胞を固定し、0.01%クリスタルバイオレット溶液で染色した。

10

【0134】

ソフトアガーアッセイは、下記のように実行した。1.6%アガロースを10%FBSを含む2X DMEMまたは2X RPMI-1640培地を利用して製造した後、これを6ウェルプレートに添加してソフトアガープレートを準備した。ここに、0.7%のアガロース及び10%のFBSを含む2X DMEMまた2X RPMI-1640培地に浮遊させた細胞(1×10^4)を植えた。これを2~3週間37℃の培養器で培養した後、顕微鏡集落を計算した。

【0135】

その結果を図36~図38に示した。

【0136】

20

図36に示したように、p34-siRNAを発現するMCF7及びLS1034細胞の成長は、スクランブルsiRNAを発現する細胞に比べて顕著に減少した。

【0137】

また、図37及び図38に示したように、p34-siRNAで処理された細胞の集落形成頻度は、対照群に比べて顕著に減少され(図37)、集落の大きさも減少された(図38)。

【0138】

(2) PTEENのターゲット遺伝子であるサイクリンE2とcdc6遺伝子の発現水準を下記のようにRT-qPCR分析を通じて確認した。細胞をp34-siRNAまたはスクランブルsiRNAでトランスフェクションさせた後、前記細胞から総RNAをTRIzol(Invitrogen)を利用して分離し、RTプライミクス(Bioneer、Daejeon、Korea)及びオリゴdT16-18プライマーを利用して相補的なDNA(cDNA)本を製造した。その後、下記表1のプライマーセットを利用してp34、cdc6、サイクリンE2遺伝子に対してRT-qPCRを実行した。その結果を図39に示した。

30

【0139】

【表 1】

p 3 4	F	5' - TGGCCTCTAGCTCCCTCTTT-3'
	R	5' - GCCAGTAAGTTGTCAGCCACA-3'
c d c 6	F	5' - CAGGTTCTGGACAATGCTGC-3'
	R	5' - CTGCTGAAGAGGGAAGGAATC-3'
c y c l i n E 2	F	5' - TGCTGCCTTGTGCCATTT-3'
	R	5' - GTGCTCTTCGGTGGTGTCTATA-3'
GAPDH	F	5' - AGAAGGCTGGGGCTCATTTTG-3'
	R	5' - AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'

10

図 3 9 に示したように、p 3 4 ノックダウン細胞で P T E N のターゲット遺伝子であるサイクリン E 2 及び c d c 6 遺伝子の発現水準が減少した。これを通じて、p 3 4 のノックダウンは、サイクリン E 2 及び c d c 6 遺伝子を下向き調節することで癌細胞の成長を抑制することを確認した。

20

【0 1 4 0】

(3) p 3 4 ノックダウンの癌細胞増殖に対する抑制効果をさらに調査するために、本発明者らは、安定的にテトラサイクリン誘導性 p 3 4 - s h R N A ベクターを発現する D U 1 4 5 及び M D A - M B 2 3 1 細胞株の変異株を確立した。まず、T e t R - 発現プラスミドである p c D N A 6 . 0 / T R (I n v i t r o g e n) を D U 1 4 5 及び M D A - M B 2 3 1 細胞でトランスフェクションさせた後、ブラストサイジン (b l a s t i c i d i n 10 μ g / m l) で 3 週の間選別した。T e t R を発現するクローン細胞は、抗 - T e t R 抗体で免疫ブロット分析を通じて確認された。二つの T e t R を過発現するクローンは、2 次選別のために H 1 - p 3 4 - s h R N A ベクター (5 ' - C C C T C T T T G A C C T C T C A G T - 3 ') で更にトランスフェクションさせた後、ゼオシン (z e o c i n 3 0 0 μ g / m l) で 3 週の間選別し、テトラサイクリン誘導性 (T e t - o n i n d u c i b l e) p 3 4 細胞株を確立した。これらをテトラサイクリンに露出させた後、T e t R を発現する D U 1 4 5 または M D A - M B 2 3 1 変異株のクローンを選別した。また、前記変異株にテトラサイクリンを処理した後、ウェスタンブロットを利用して各タンパク質の発現を分析した。また、前記変異株の P T E N 脂質リン酸分解酵素活性及び集落形成アッセイを実行した。その結果を図 4 0 ~ 図 4 3 に示した。

30

【0 1 4 1】

図 4 0 に示したように、D U 1 4 5 または M D A - M B 2 3 1 変異株で T e t R の発現を確認した。図 4 1 に示したように、D U 1 4 5 または M D A - M B 2 3 1 変異株にテトラサイクリン (T e t ; 1 m g / m l) を処理する場合、p 3 4 の発現が阻害され、P T E N 発現が増加することを確認した。リン酸化 A k t は、P T E N 水準に反比例した。

40

【0 1 4 2】

また、図 4 2 に示したように、D U 1 4 5 または M D A - M B 2 3 1 変異株でテトラサイクリン処理により P T E N 脂質リン酸分解酵素活性が増加した。

【0 1 4 3】

また、図 4 3 に示したように、D U 1 4 5 または M D A - M B 2 3 1 変異株でテトラサイクリン処理により集落形成が顕著に減少されることを確認した。

【0 1 4 4】

50

追加的に、前記DU145またはMDA-MB231変異株の細胞成長を観察し、BrdUアッセイを実行した。その結果を図44及び図45に示した。

【0145】

図44に示したように、テトラサイクリンで処理された細胞は、テトラサイクリンで処理されない細胞に比べて成長が顕著に減少した。

【0146】

また、図45に示したように、テトラサイクリンで処理された細胞は、BrdU(Bromodeoxyuridine)の混成が顕著に減少された。

【0147】

(4) p34が安定的に過発現される細胞を製造するために、p34が検出されないHs578T細胞をレトロウイルス性ベクターであるpBabe-puro(対照群)またはpBabe-puro-p34でトランスフェクションさせた後、ピューロマイシン(puromycin 2 µg/ml)で2週の間選別した。p34の発現は、抗-p34抗体を利用したウエスタンブロットを通じて確認した。前記方法で製造した細胞のタンパク質の分析のためにウエスタンブロットを実行し、集落形成を観察した。その結果を図46に示した。

【0148】

図46に示したように、対照群ベクターを発現する細胞よりp34を安定的に発現するHs578T細胞でPTENの発現が減少し、集落形成が顕著に上昇した。

【0149】

このような結果から、p34がPTENを通じた癌細胞増殖を抑制することを確認した。

【0150】

実施例5. p34の腫瘍発生性(tumorigenicity)の強化

(1) p34の発現がNEDD4-1の原腫瘍性に影響を及ぼすか否かを確認するために、前記実施例4-(3)で確立したテトラサイクリンに誘導が可能であり、p34 shRNAを安定的に発現してp34の発現を枯らしたDU145変異株及びMDA-MB-231変異株を利用し、下記のように実験を実行した。確立された各細胞をBalb/cヌードマウスの皮下に注入して異種移植片(xenograft)腫瘍を形成させた。腫瘍の大きさを3日間隔で2週の間観察し、腫瘍の大きさが180 mm³に到達した時を0日として、10 mg/kgの濃度でテトラサイクリンを投与し(対照群はvehicleで水投与)、腫瘍の大きさを続いて観察した。全ての動物実験は、牙山メディカルセンター敷設動物管理及び利用に関する委員会の承認を受けたプロトコルによって進行された。その結果を図47～図52に示した。

【0151】

図47及び図48に示したように、p34-shRNA-トランスフェクションされたDU145変異株またはp34-shRNA-トランスフェクションされたMDA-MB-231変異株を注入し、テトラサイクリンを投与した群でPTENの発現が増加し、NEDD4-1の発現が減少した。

【0152】

また、図49及び図50に示したように、p34-shRNA-トランスフェクションされたDU145変異株またはp34-shRNA-トランスフェクションされたMDA-MB-231変異株の注入によって誘導された腫瘍の成長は、テトラサイクリンを投与した場合、対照群に比べて顕著に減少した。

【0153】

また、図51及び図52に示したように、各マウス腫瘍組織の免疫組織の化学分析結果、PTENタンパク質は、テトラサイクリン投与後、強い核局在化を示すことを確認した。

【0154】

このような結果から、p34がNEDD4-1の原腫瘍性の活性を強化することを確認

10

20

30

40

50

した。

【0155】

(2) p34がNEDD4-1の原腫瘍性活性に及ぶ効果を検証するために、本発明者らは、内因性p34を発現しないp53-null MEF(p53^{-/-}/MEF)細胞(Millipore、Billerica、MA、USA)を活用した。NEDD4-1は、単独で原腫瘍性を有しないが、NEDD4-1の過発現がRasにより媒介されるp53-null MEF細胞の変形を増進させるという研究結果が報告された(Wang et al., 2007)。前記研究結果に基づいて、本発明者らは、p34の発現がRasにより媒介されるp53-null MEF細胞の変形に及ぶ効果を最初に調査した。p53^{-/-}/MEF細胞のタンパク質発現及び集落形成分析を実行した。その結果を図53及び図

10

【0156】

図53に示したように、p53^{-/-}/MEF細胞でタンパク質の発現を分析した結果、p34の発現は、PTEN発現の減少及びNEDD4-1発現の増加を誘発した。

【0157】

また、図54に示したように、p53^{-/-}/MEF細胞で集落形成の分析を実行した結果、p34の発現は、Rasを発現するp53^{-/-}/MEF細胞に比べて細胞集落の面で増加を示した。

【0158】

(3) レトロウイルス基盤のshRNAベクターを利用して製造したNEDD4-1ノックダウン-p53-null(p53^{-/-})MEF細胞でp34の原腫瘍性の活性を観察した。NEDD4-1ノックダウン-p53-null(p53^{-/-})MEF細胞のタンパク質発現、集落形成及びユビキチン化を分析した。その結果を図55～図57に示した。

20

【0159】

図55に示したように、NEDD4-1ノックダウン-p53^{-/-}MEF細胞でp34の発現は、PTENの減少を誘発しなかった。

【0160】

また、図56に示したように、集落形成アッセイ結果、NEDD4-1ノックダウン-p53^{-/-}MEF細胞でp34の発現にもかかわらず細胞形成が抑制されることを確認した。

30

【0161】

また、図57に示したように、ユビキチン化アッセイ結果、p34の発現は、対照群shRNAを発現するp53-null MEF細胞でPTENのポリユビキチン化を誘導したが、NEDD4-1 shRNAを発現するNEDD4-1ノックダウン-p53^{-/-}MEF細胞では、PTENのポリユビキチン化を誘発しなかった。これは、p34がNEDD4-1に依存的に、Rasにより媒介されるp53-null MEF細胞の変形を向上させることを意味する。

【0162】

(4) p34のNEDD4-1の原腫瘍性の活性に及ぶ効果がPTENに依存的であるか否かを確認するために、PTEN shRNAを発現するp53-null MEF細胞を利用してウエスタンブロット及び集落形成の分析を実行した。その結果を図58に示した。

40

【0163】

図58に示したように、前記MEF細胞でp34の発現は、Rasの変形活性を向上させることに失敗した。これは、p34がNEDD4-1の原腫瘍性の活性をPTENに依存的に向上させることを意味する。

【0164】

(5) ヒトの癌組織でp34、NEDD4-1及び/またはPTENの臨床的な関連性を調査した。NEDD4-1を通じたPTENユビキチン化の陽性的調節子としてp34の

50

機能を考慮した時、ヒトの癌組織で p 3 4 の発現は、N E D D 4 - 1 により誘導される P T E N タンパク質水準の減少に影響を及ぼす可能性があった。これを検証するために、本発明者らは、p 3 4、N E D D 4 - 1 及び P T E N の発現を 1 3 5 個の分離された乳癌及び 1 9 1 個の結腸癌のパラフィン包埋サンプルを T M A (T i s s u e m i c r o a r r a y s) して評価した。

【 0 1 6 5 】

1 3 5 個の乳癌サンプルのうち 9 0 個 (6 6 . 7 %) が p 3 4 - 陽性であり、4 5 個 (3 3 . 3 %) が p 3 4 - 陰性であった。また、N E D D 4 - 1 の発現は、9 0 個の p 3 4 陽性サンプルのうち 8 5 個 (9 4 . 4 %) のサンプルから検出され、大多数 (5 8 / 8 5 ; 6 8 . 2 %) の N E D D 4 - 1 / p 3 4 陽性サンプルは、P T E N タンパク質を発現した。N E D D 4 - 1 は、p 3 4 陰性サンプル (4 5 / 4 5 ; 1 0 0 %) でも高く発現された。しかし、p 3 4 陽性サンプルでは、少数 (2 1 / 4 5 ; 4 6 . 6 7 %) のみが P T E N を発現した。

10

【 0 1 6 6 】

また、1 9 1 個の結腸癌組織のうち、1 7 7 個 (6 1 . 3 %) のサンプルで p 3 4 が陽性に検出され、7 4 個 (3 8 . 7 %) のサンプルで p 3 4 が陰性であることで現われた。また、P T E N の発現は、1 2 7 個の N E D D 4 - 1 / p 3 4 二重陽性 (d o u b l e - p o s i t i v e) サンプルのうち、少数 (1 1 . 8 %) でのみ検出された。一方、p 3 4 を発現しない 1 4 9 個の N E D D 4 - 1 陽性サンプルの中では、8 個のサンプルでのみ P T E N が発現された。

【 0 1 6 7 】

20

図 5 9 及び図 6 0 に示したように、乳癌及び結腸癌サンプルでは、p 3 4、N E D D 4 - 1 及び P T E N の発現水準の間に著しい反比例関係があったが、結腸癌サンプルでは、p 3 4 陰性、N E D D 4 - 1 陽性は、P T E N 水準に影響を及ぼさなかった。

【 0 1 6 8 】

したがって、前記結果から、ヒトの乳癌及び結腸癌での p 3 4 の発現は、N E D D 4 - 1 の原腫瘍性の活性に対して P T E N 依存的に寄与することを推論することができた。

【 0 1 6 9 】

p 3 4 と N E D D 4 - 1 及び P T E N の間の総合的な相互作用を図式的に表現すれば、図 6 1 の通りである。

【 0 1 7 0 】

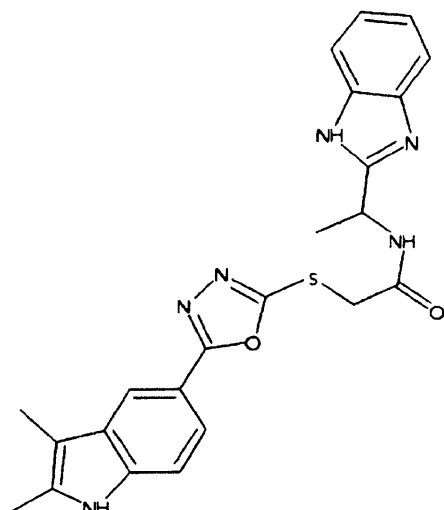
30

実施例 6 . p 3 4 活性抑制剤の抗癌活性の検証

前記実施例 1 ~ 実施例 5 を通じて確認したように、p 3 4 活性抑制剤が実際抗癌活性を有するかを検証するための実験を実行した。まず、市販中の化合物ライブラリスクリーニングを通じて p 3 4 タンパク質に結合して p 3 4 の活性を抑制する化合物を同定した。同定された化合物の化学式を下記に示し、以下では、化合物 2 7 (C o m p o u n d 2 7) で名付けた。

【 0 1 7 1 】

【化 2】



(化学式 1)

6-1. p34 活性抑制剤が PTEN ユビキチン化に及ぶ影響の検証

ヒト乳癌細胞株である MDA-MB-231 と大腸癌細胞株である LS1034 に p34 活性抑制剤である化合物 27 を 1 μ M の濃度で 24 時間の間処理した後、PTEN 抗体を利用して免疫沈降法を実行した。その後、ユビキチン抗体でウェスタンブロットを実行した。その結果を図 6 2 に示した。

【0172】

図 6 2 に示したように、ヒト乳癌及び大腸癌細胞で p34 活性抑制剤である化合物 27 は、PTEN ユビキチン化を抑制する活性を有していることを確認した。

【0173】

6-2. p34 活性抑制剤が p34 と NEDD4-1 タンパク質の結合に及ぶ影響の検証

精製された NEDD4-1 タンパク質、p34 タンパク質に反応緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5、120 mM NaCl) 及び p34 活性抑制剤である化合物 27 を 1 mM または 3 mM の濃度で処理し、30 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。以後、GST プルダウン緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 8.0、500 mM NaCl、1% Triton X-100、0.02% BSA、5 mM メルカプトエタノール) を使用して反応を停止した後、グルタチオン-セファロースビーズを利用して 4 $^{\circ}$ C でプルダウンさせ、抗-His、抗-GST 抗体を利用してウェスタンブロットを実行した。その結果を図 6 3 に示した。

【0174】

図 6 3 に示したように、p34 活性抑制剤である化合物 27 の処理によって濃度依存的に p34 タンパク質と NEDD4-1 タンパク質の結合が阻害されることを確認した。

【0175】

6-3. p34 活性抑制剤の PTEN 再活性化誘導を通じた抗癌効果の検証

ヒト乳癌細胞株である MDA-MB-231 に p34 活性抑制剤である化合物 27 を濃度別に 48 時間の間処理した後、トリパンブルー染色及びウェスタンブロットを実行した。その結果を図 6 4 に示した。

【0176】

図 6 4 に示したように、乳癌細胞で p34 活性抑制剤である化合物 27 の濃度依存的に細胞死滅が誘導され、PTEN タンパク質が再活性化された。これによって、Akt の脱リン酸化が現われて、caspase 3 が活性化されることが確認された。これを通じて、p34 活性抑制剤の処理により p34-NEDD4-1 のタンパク質結合が抑制されて PTEN が再活性化されることで細胞死滅が誘導されることを確認した。

【0177】

また、ヒト乳癌細胞株である MDA-MB-231 に p34 活性抑制剤である化合物 2

10

20

30

40

50

7を濃度別に48時間の間処理した後、細胞液を収去してPTEN抗体で免疫沈降を実施した。その後、water-soluble diC8-phosphatidyl inositol 3,4,5 tri-phosphateが含まれた反応緩衝液(100mM Tris-HCl pH8.0、10mM DTT)と37℃で40分間反応させた後、上層液のみを収去してBiomol Green溶液と30分間常温で反応させ、OD 650nmでPTEN脂質リン酸分解酵素の活性を測定した。その結果を図65に示した。

【0178】

図65に示したように、乳癌細胞でp34活性抑制剤である化合物27の処理によってPTEN脂質リン酸分解酵素の活性が増加されることを確認した。

【0179】

上述の実験と同一な実験をヒト大腸癌細胞株であるLS1034を利用して実行した。その結果を図66及び図67に示した。

【0180】

図66に示したように、大腸癌細胞でp34活性抑制剤である化合物27の濃度依存的に細胞死滅が誘導され、PTENタンパク質が再活性化された。これによって、Aktの脱リン酸化が現われて、caspase3が活性化されることが確認された。

【0181】

また、図67に示したように、大腸癌細胞でp34活性抑制剤である化合物27の処理によってPTEN脂質リン酸分解酵素の活性が増加されることを確認した。

【0182】

以下、本発明の薬学的組成物及び食品組成物の製剤例を説明するが、これは、本発明を限定するものではなく、具体的に説明するためのことである。

【0183】

製剤例1. 薬学的製剤の製造

1-1. 散剤の製造

p34発現または活性抑制剤 2g

乳糖 1g

前記の成分を混合し気密包に充填して散剤を製造した。

【0184】

1-2. 錠剤の製造

p34の発現または活性抑制剤 100mg

コンスターチ 100mg

乳糖 100mg

ステアリン酸マグネシウム 2mg

前記の成分を混合した後、通常の錠剤の製造方法によって打錠して錠剤を製造した。

【0185】

1-3. カプセル剤の製造

p34発現または活性抑制剤 100g

コンスターチ 100mg

乳糖 100mg

ステアリン酸マグネシウム 2mg

前記の成分を混合した後、通常のカプセル剤の製造方法によってゼラチンカプセルに充填してカプセル剤を製造した。

【0186】

製剤例2. 食品製剤の製造

2-1. 健康食品の製造

p34発現または活性抑制剤 100mg

ビタミン混合物 適量

ビタミンA アセテート 70g

ビタミンE 1.0mg

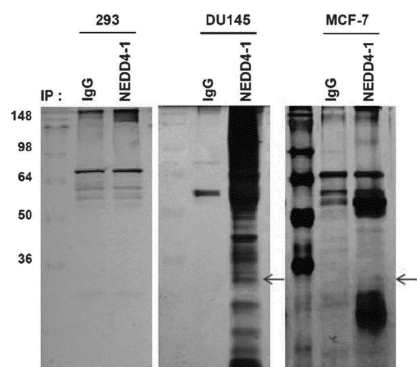
ビタミンB1 0.13mg
 ビタミンB2 0.15mg
 ビタミンB6 0.5mg
 ビタミンB12 0.2mg
 ビタミンC 10mg
 ビオチン 10g
 ニコチン酸アミド 1.7mg
 葉酸 50g
 パントテン酸カルシウム 0.5mg
 無機質混合物 適量
 硫酸第一鉄 1.75mg
 酸化亜鉛 0.82mg
 炭酸マグネシウム 25.3mg
 第1リン酸カリウム 15mg
 第2リン酸カルシウム 55mg
 枸橼酸カリウム 90mg
 炭酸カルシウム 100mg
 塩化マグネシウム 24.8mg

10

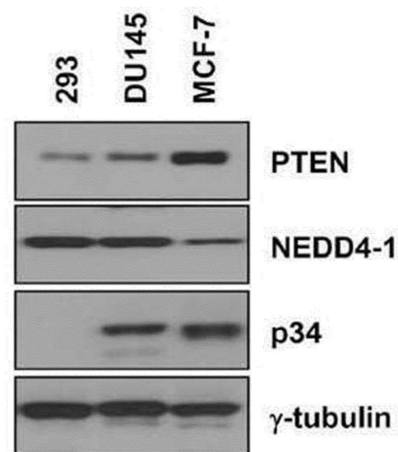
前記のビタミン及びミネラル混合物の組成比は、比較的健康食品に適合な成分を好ましい実施例で混合組成したが、その配合比を任意に変形実施しても関係なく、通常健康食品製造方法によって前記の成分を混合した後、顆粒を製造し、通常の方法によって健康食品組成物製造に使用することができる。

20

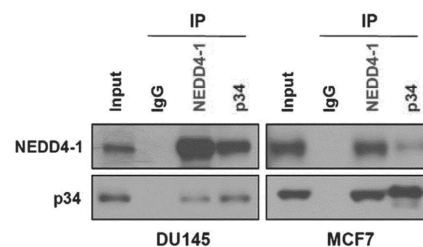
【図1】



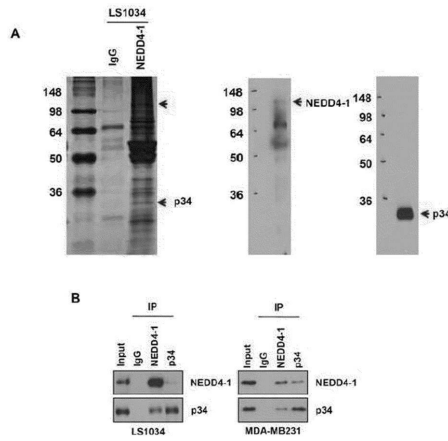
【図2】



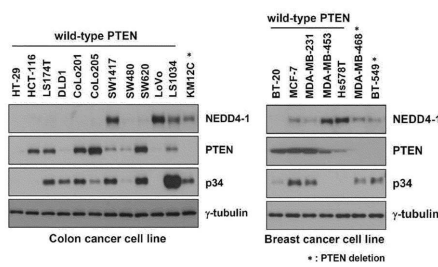
【図3】



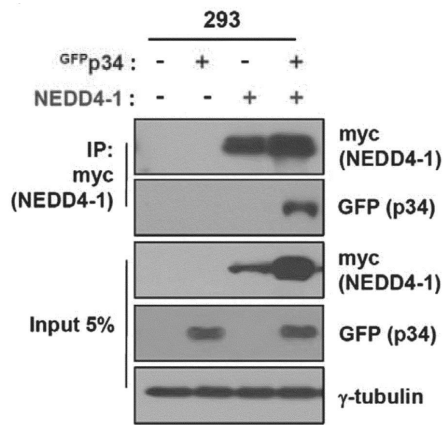
【図 4】



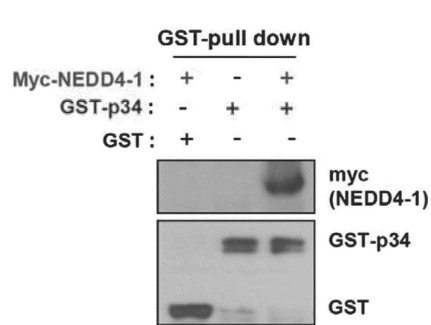
【図 5】



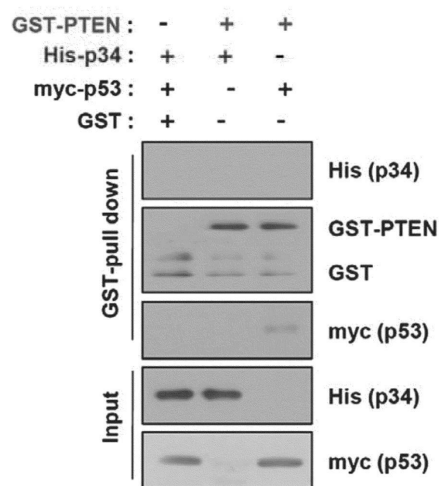
【図 6】



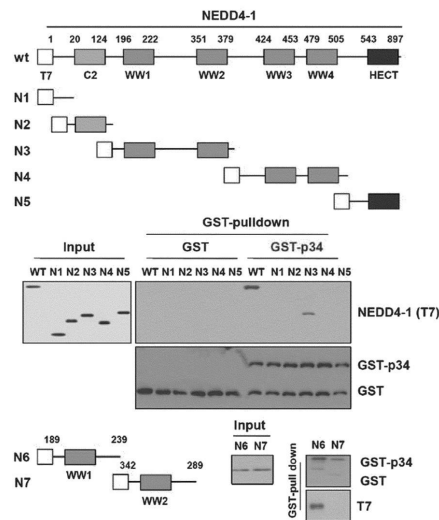
【図 7】



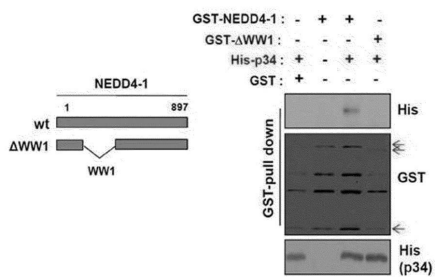
【図 8】



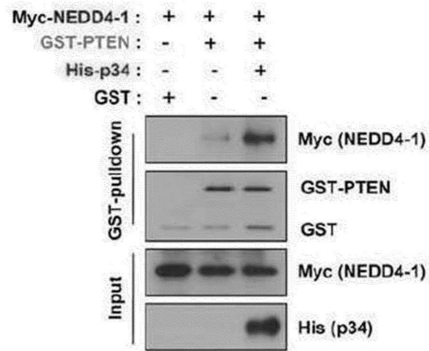
【図 9】



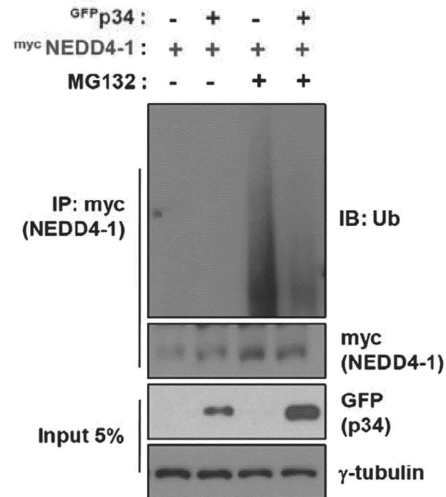
【図 10】



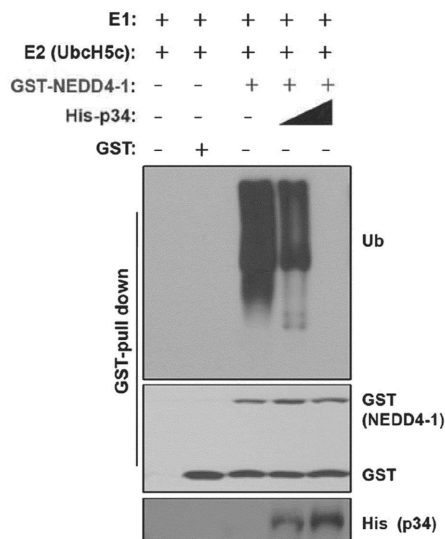
【図 1 1】



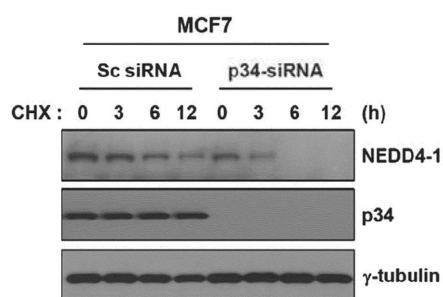
【図 1 2】



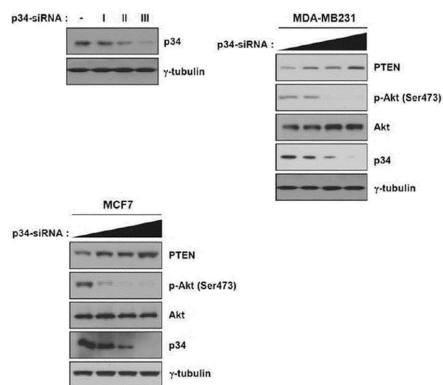
【図 1 3】



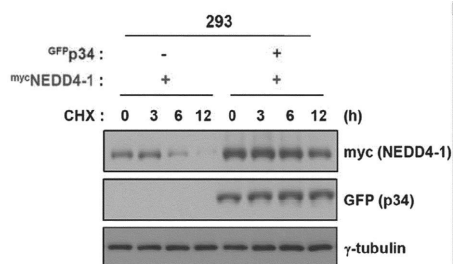
【図 1 5】



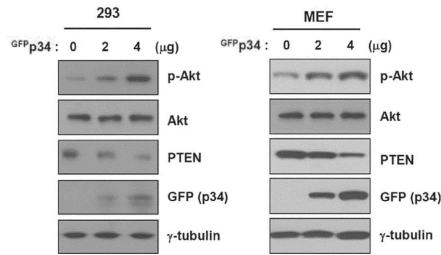
【図 1 6】



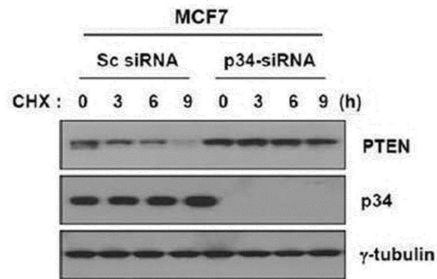
【図 1 4】



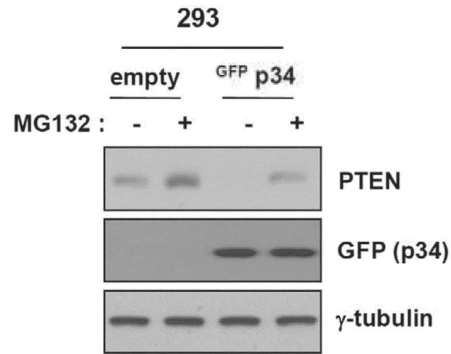
【図 17】



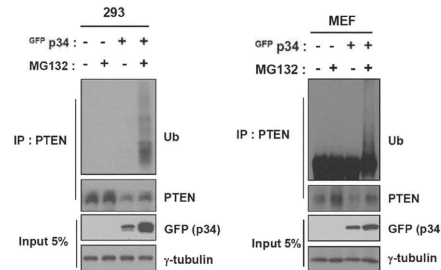
【図 18】



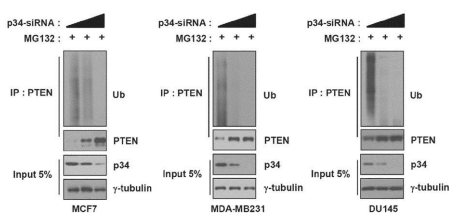
【図 19】



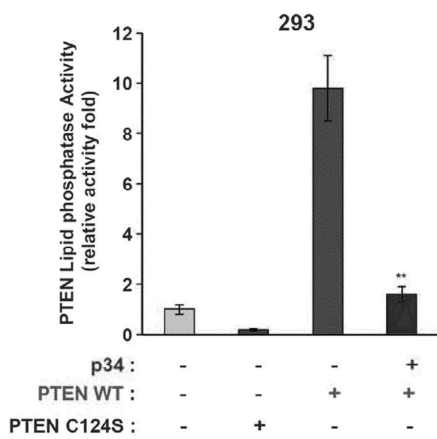
【図 20】



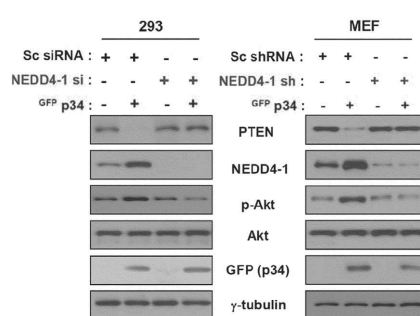
【図 21】



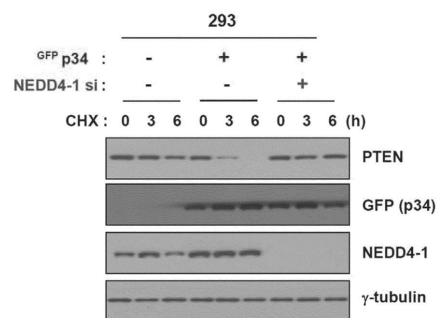
【図 22】



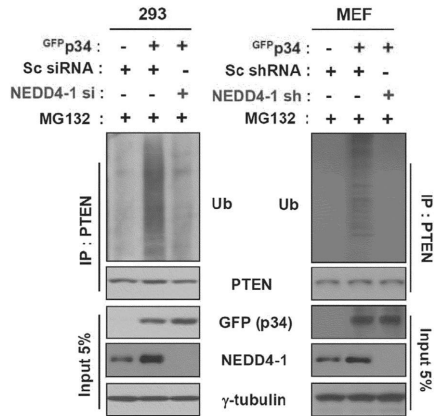
【図 23】



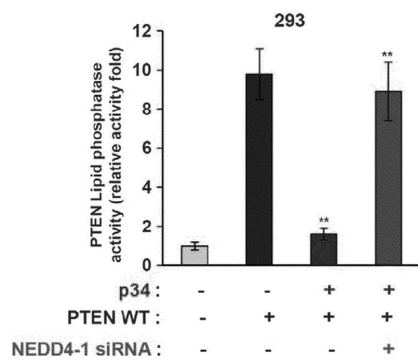
【図 24】



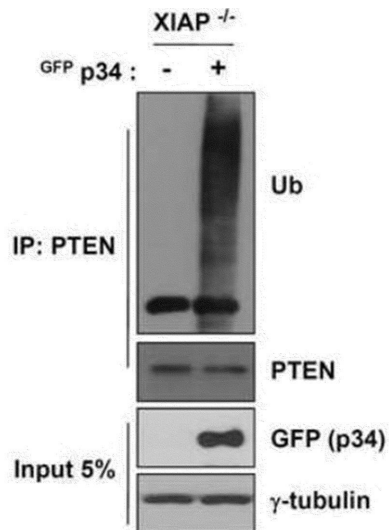
【図 2 5】



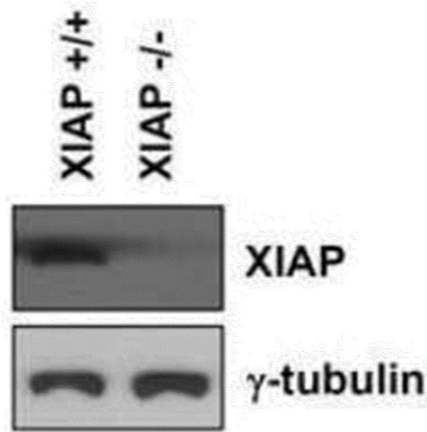
【図 2 6】



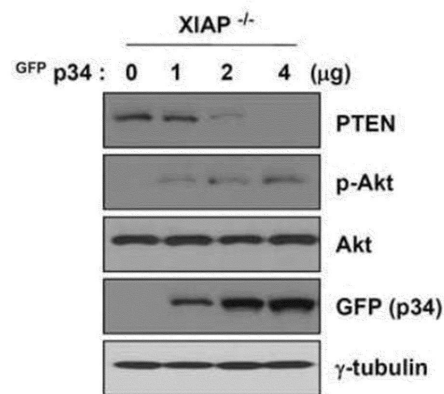
【図 2 9】



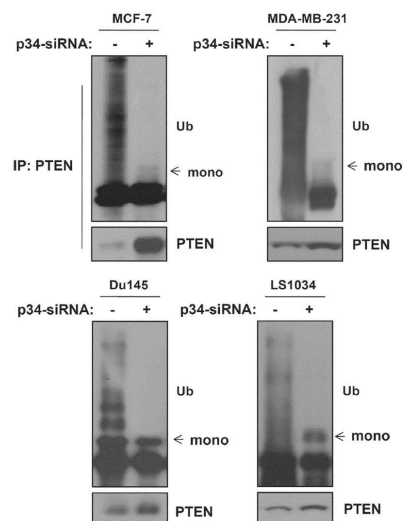
【図 2 7】



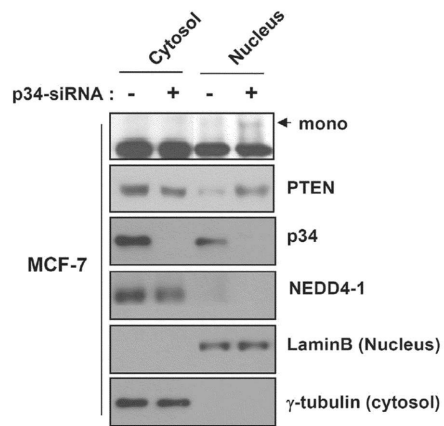
【図 2 8】



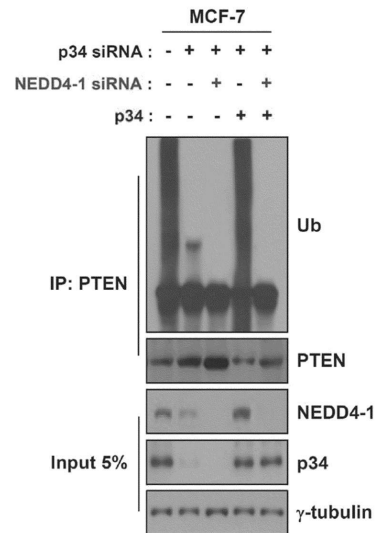
【図 3 0】



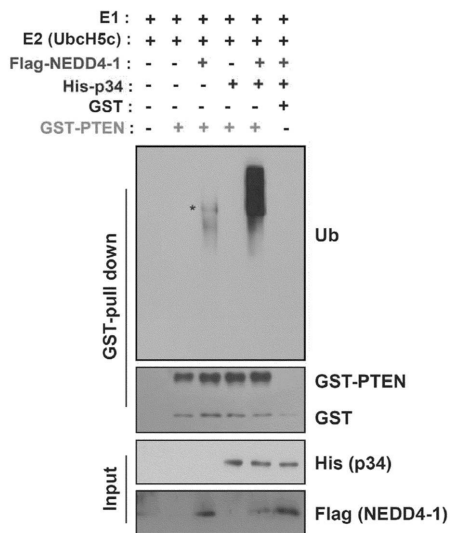
【図 3 1】



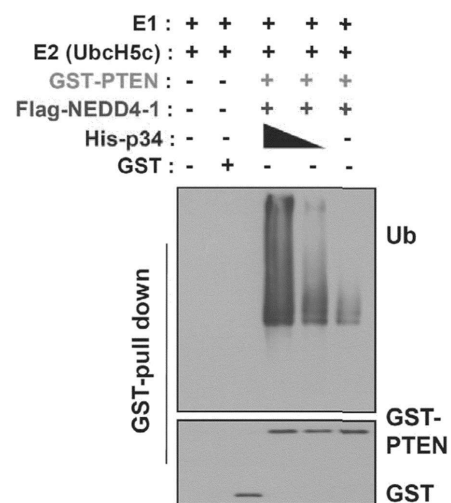
【図 3 2】



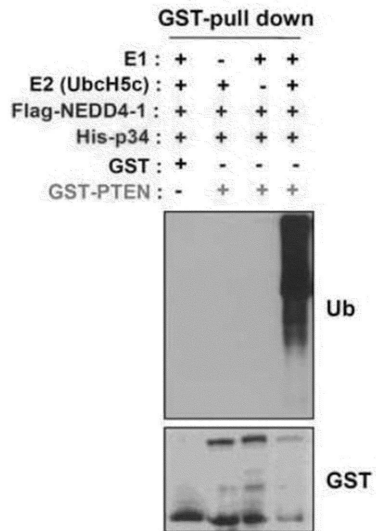
【図 3 3】



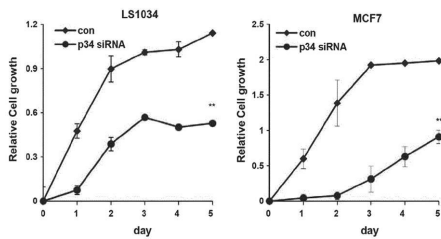
【図 3 4】



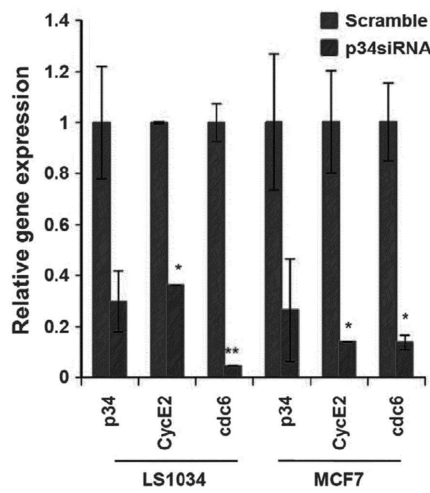
【図 3 5】



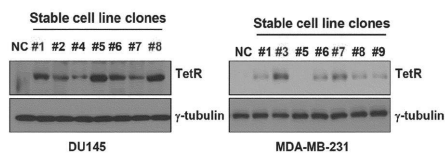
【図 3 6】



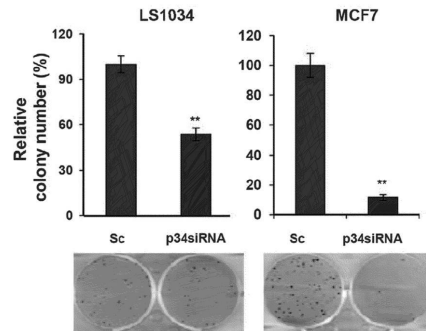
【図 3 9】



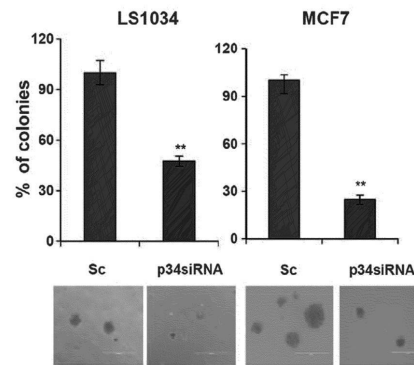
【図 4 0】



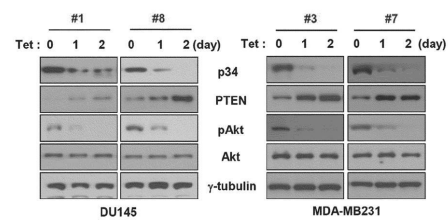
【図 3 7】



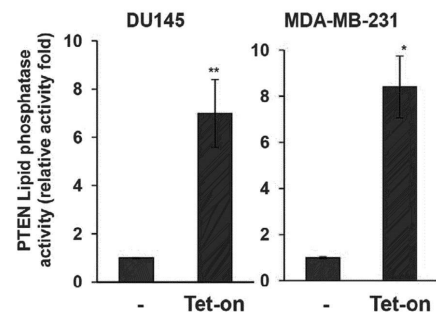
【図 3 8】



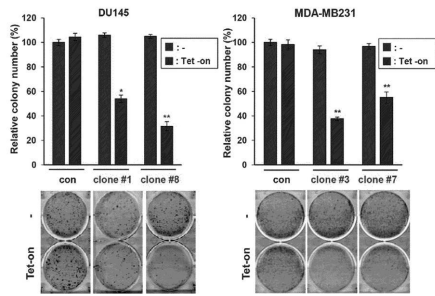
【図 4 1】



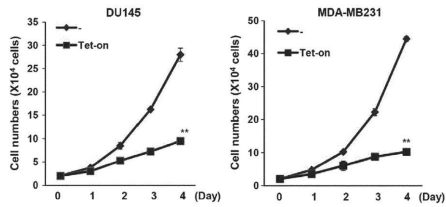
【図 4 2】



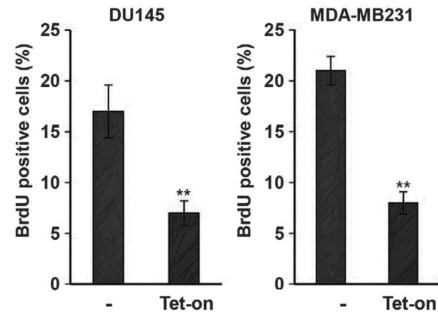
【図 4 3】



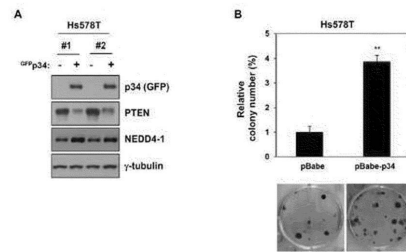
【図 4 4】



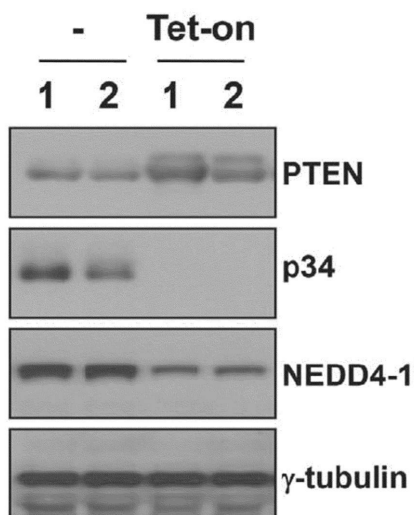
【図 4 5】



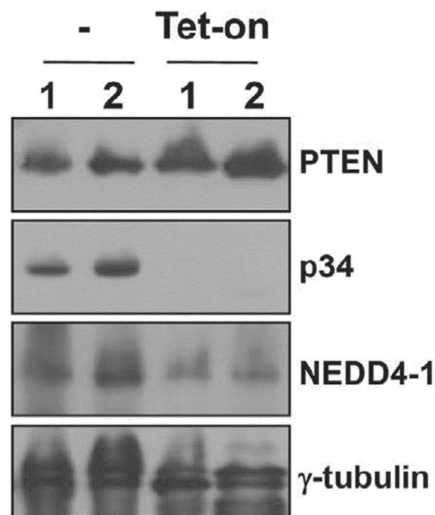
【図 4 6】



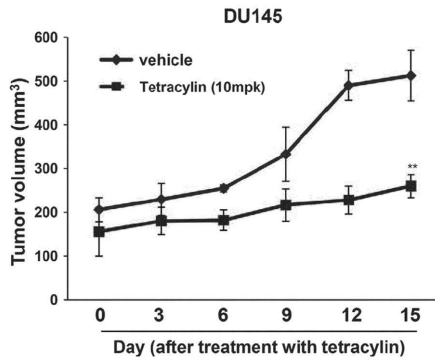
【図 4 7】



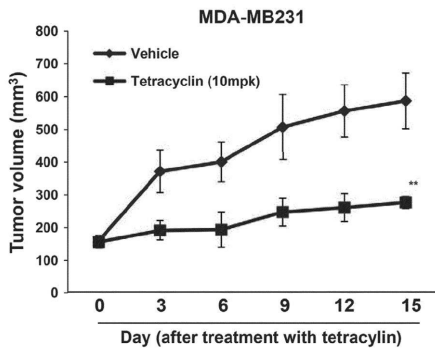
【図 4 8】



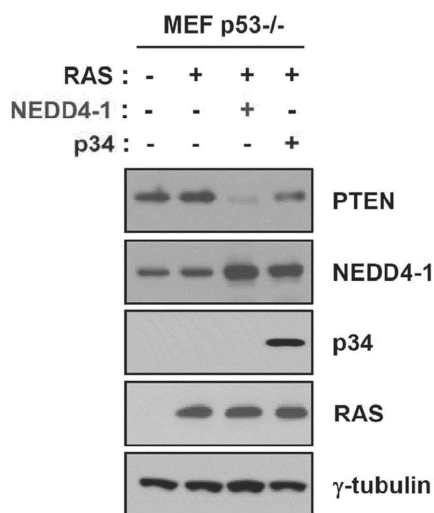
【図 4 9】



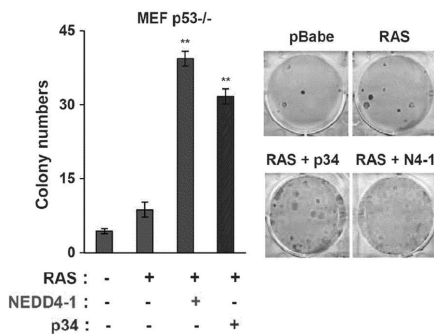
【図 5 0】



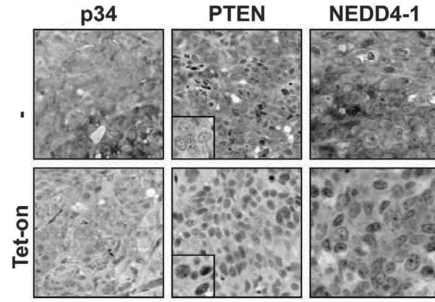
【図 5 3】



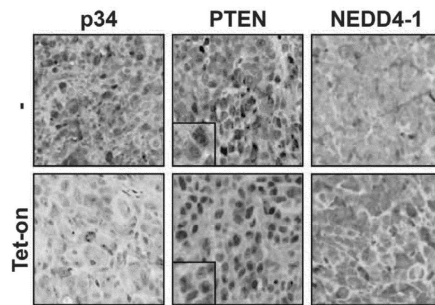
【図 5 4】



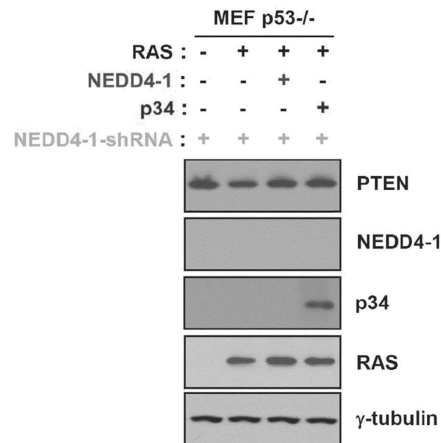
【図 5 1】



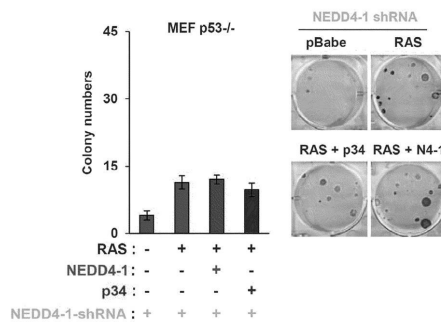
【図 5 2】



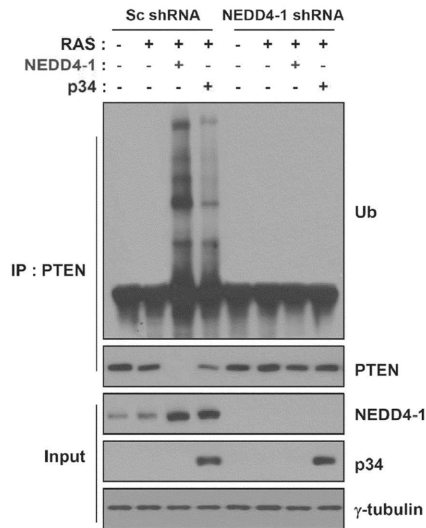
【図 5 5】



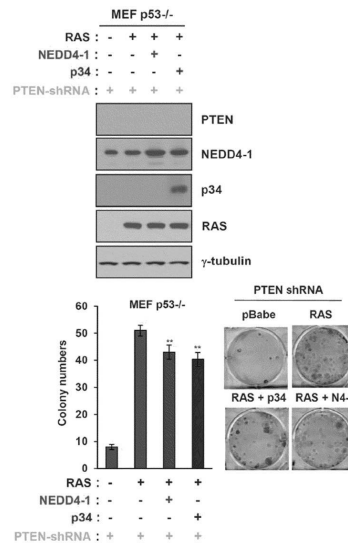
【図 5 6】



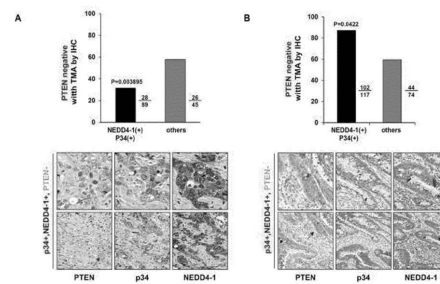
【図 5 7】



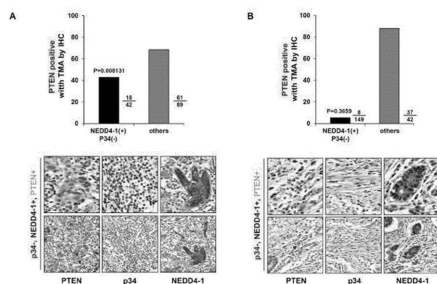
【図 5 8】



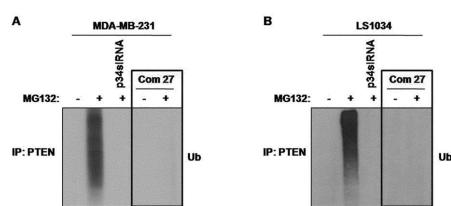
【図 5 9】



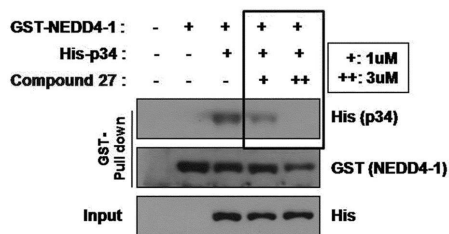
【図 6 0】



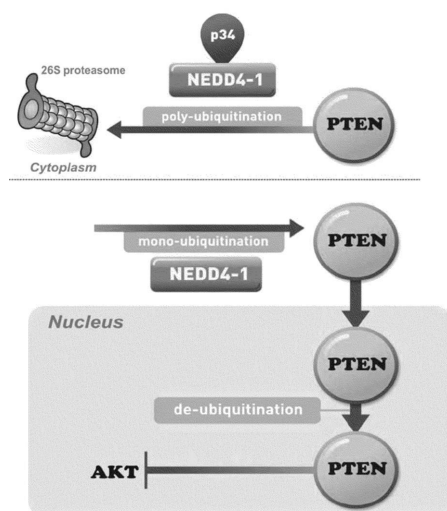
【図 6 2】



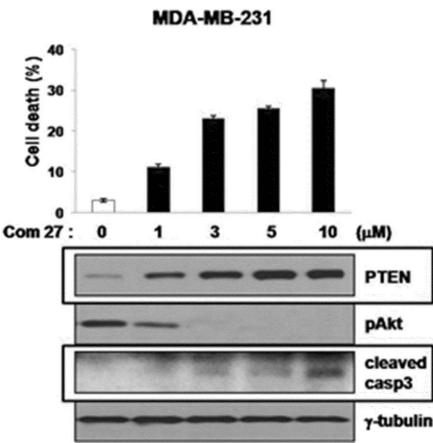
【図 6 3】



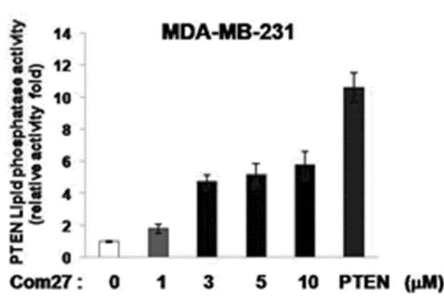
【図 6 1】



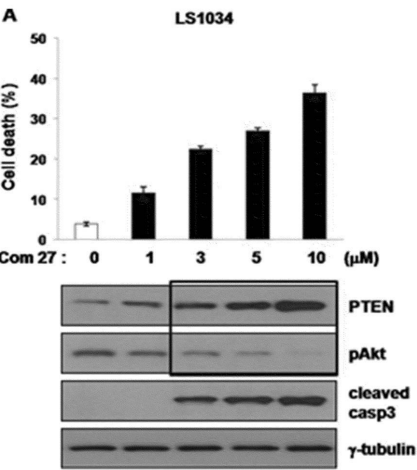
【図 6 4】



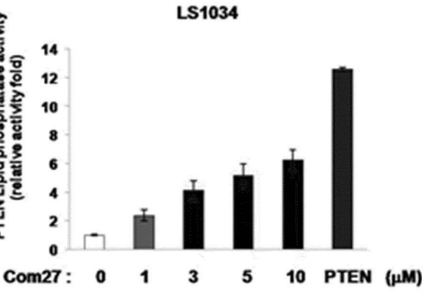
【図 6 5】



【図 6 6】



【図 6 7】



フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/15 (2006.01) G 0 1 N 33/15 Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01) G 0 1 N 33/50 Z
G 0 1 N 33/574 (2006.01) G 0 1 N 33/574 A
- (72)発明者 キム テウオン
 大韓民国 1 3 8-7 3 6 ソウル ソンパグ オリンピッケーロ 4 3-ギル 8 8 アサン
 メディカル センター ウエスト ビルディング 8 フロア
- (72)発明者 ジン ドンフン
 大韓民国 1 3 8-7 3 6 ソウル ソンパグ オリンピッケーロ 4 3-ギル 8 8 アサン
 メディカル センター アサン インスティテュート フォー ライフ サイエンスーズ コン
 バージェンスーイノベーション ビルディング 5 フロア
- (72)発明者 ホン スンウ
 大韓民国 1 3 8-7 3 6 ソウル ソンパグ オリンピッケーロ 4 3-ギル 8 8 アサン
 メディカル センター アサン インスティテュート フォー ライフ サイエンスーズ コン
 バージェンスーイノベーション ビルディング 5 フロア
- (72)発明者 ムン ジェヒ
 大韓民国 1 3 8-7 3 6 ソウル ソンパグ オリンピッケーロ 4 3-ギル 8 8 アサン
 メディカル センター アサン インスティテュート フォー ライフ サイエンスーズ コン
 バージェンスーイノベーション ビルディング 5 フロア
- (72)発明者 シン ジェシク
 大韓民国 1 3 8-7 3 6 ソウル ソンパグ オリンピッケーロ 4 3-ギル 8 8 アサン
 メディカル センター アサン インスティテュート フォー ライフ サイエンスーズ コン
 バージェンスーイノベーション ビルディング 5 フロア
- (72)発明者 キム ジンソン
 大韓民国 1 3 8-7 3 6 ソウル ソンパグ オリンピッケーロ 4 3-ギル 8 8 アサン
 メディカル センター アサン インスティテュート フォー ライフ サイエンスーズ コン
 バージェンスーイノベーション ビルディング 5 フロア
- (72)発明者 チョン キョンア
 大韓民国 1 3 8-7 3 6 ソウル ソンパグ オリンピッケーロ 4 3-ギル 8 8 アサン
 メディカル センター アサン インスティテュート フォー ライフ サイエンスーズ コン
 バージェンスーイノベーション ビルディング 5 フロア
- (72)発明者 イ ジョンシン
 大韓民国 1 3 8-7 3 6 ソウル ソンパグ オリンピッケーロ 4 3-ギル 8 8 アサン
 メディカル センター ウエスト ビルディング 7 フロア
- (72)発明者 チェ ウンギョン
 大韓民国 1 3 8-7 3 6 ソウル ソンパグ オリンピッケーロ 4 3-ギル 8 8 アサン
 メディカル センター ウエスト ビルディング 11 フロア
- (72)発明者 イ チェロン
 大韓民国 1 3 8-7 3 6 ソウル ソンパグ オリンピッケーロ 4 3-ギル 8 8 アサン
 メディカル センター ウエスト ビルディング 8 フロア
- (72)発明者 ホン ヨンサン
 大韓民国 1 3 8-7 3 6 ソウル ソンパグ オリンピッケーロ 4 3-ギル 8 8 アサン
 メディカル センター アサン インスティテュート フォー ライフ サイエンスーズ コン
 バージェンスーイノベーション ビルディング 13 フロア
- (72)発明者 キム キュピョ
 大韓民国 1 3 8-7 3 6 ソウル ソンパグ オリンピッケーロ 4 3-ギル 8 8 アサン
 メディカル センター アサン インスティテュート フォー ライフ サイエンスーズ エデ

- エデュケーションーリサーチ ビルディング 5 フロア
- (72)発明者 ナム キヨプ
- 大韓民国 138-736 ソウル ソンパグ オリンピッケーロ 43-ギル 88 アサン
メディカル センター アサン インスティテュート フォー ライフ サイエンシーズ エデ
ュケーションーリサーチ ビルディング 5 フロア
- (72)発明者 キム ボンチョル
- 大韓民国 138-736 ソウル ソンパグ オリンピッケーロ 43-ギル 88 アサン
メディカル センター アサン インスティテュート フォー ライフ サイエンシーズ エデ
ュケーションーリサーチ ビルディング 5 フロア

審査官 石井 裕美子

- (56)参考文献 特開平07-316196 (JP, A)
特表2010-521439 (JP, A)
Chin.J.Clin.Oncol., 2008年, Vol.5, pp.108-112

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- A61K 31/00-31/80
A61K 45/00-45/08
A61P 35/00
A61P 35/02
A61P 35/04
A61P 43/00
G01N 33/15
G01N 33/50
G01N 33/574
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)