

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4594085号
(P4594085)

(45) 発行日 平成22年12月8日(2010.12.8)

(24) 登録日 平成22年9月24日(2010.9.24)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K 31/7088
A 6 1 K	35/76	(2006.01)	A 6 1 K 35/76
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 D

請求項の数 16 (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-511343 (P2004-511343)	(73) 特許権者	502240113 オンコセラピー・サイエンス株式会社 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1
(86) (22) 出願日	平成15年6月3日(2003.6.3)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(65) 公表番号	特表2006-507802 (P2006-507802A)	(72) 発明者	中村 祐輔 神奈川県横浜市青葉区あざみ野1丁目17番33号
(43) 公表日	平成18年3月9日(2006.3.9)	(72) 発明者	古川 洋一 神奈川県川崎市宮前区宮崎3丁目10番40
(86) 国際出願番号	PCT/JP2003/007006	(72) 発明者	田原 秀晃 東京都豊島区雑司が谷1-34-15-402
(87) 国際公開番号	W02003/104275		
(87) 国際公開日	平成15年12月18日(2003.12.18)		
審査請求日	平成17年12月19日(2005.12.19)		
(31) 優先権主張番号	60/386, 985		
(32) 優先日	平成14年6月6日(2002.6.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/415, 209		
(32) 優先日	平成14年9月30日(2002.9.30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト結腸癌に関連する遺伝子およびポリペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の段階を含む、対象から採取された標本中の結腸直腸癌、肺癌、胃癌、および肝臓癌からなる群から選択されるいずれかの癌細胞の検出方法：

(a) 標本の生物試料における、配列番号：6のアミノ酸配列をコードする遺伝子の発現レベルを検出する段階；および

(b) その発現レベルの上昇を前記癌細胞と関連づける段階。

【請求項2】

発現レベルが、以下の段階からなる群より選択される方法のいずれか1つによって検出される、請求項1記載の方法：

(a) 配列番号：6のアミノ酸配列をコードするmRNAを検出する段階；および

(b) 配列番号：6のアミノ酸配列を含むタンパク質を検出する段階。

【請求項3】

以下の成分の少なくとも一つを含む、結腸直腸癌、肺癌、胃癌、および肝臓癌からなる群から選択されるいずれかの癌の診断薬；

(a) 配列番号：6のアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合する抗体、および

(b) 配列番号：5の塩基配列またはその相補鎖からなるポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド。

【請求項4】

以下の段階を含む、細胞増殖性疾患を治療するための化合物のスクリーニング方法：

10

20

- (a) 被験化合物を、
- (1) 配列番号：6のアミノ酸配列を含むポリペプチド、
- (2) 配列番号：6のアミノ酸配列からなるタンパク質と同等な細胞増殖活性を有する、1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加された配列番号：6のアミノ酸配列を含むポリペプチド、および
- (3) 配列番号：6のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な細胞増殖活性を有する、配列番号：5のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、からなる群より選択されるポリペプチドと接触させる段階；
- (b) ポリペプチドと被験化合物との結合活性を検出する段階；ならびに
- (c) ポリペプチドと結合する化合物を選択する段階。

10

【請求項5】

以下の段階を含む、細胞増殖性疾患を治療するための化合物のスクリーニング方法：

- (a) 候補化合物を、配列番号：5のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを発現する細胞と接触させる段階；および
- (b) 配列番号：5のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの発現レベルを、被験化合物の非存在下で検出される発現レベルと比較して低下させる化合物を選択する段階。

【請求項6】

以下の段階を含む、細胞増殖性疾患を治療するための化合物のスクリーニング方法：

- (a) 被験化合物を、
- (1) 配列番号：6のアミノ酸配列を含むポリペプチド、
- (2) 配列番号：6のアミノ酸配列からなるタンパク質と同等な細胞増殖活性を有する、1つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加された配列番号：6のアミノ酸配列を含むポリペプチド、および
- (3) 配列番号：6のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な細胞増殖活性を有する、配列番号：5のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、からなる群より選択されるポリペプチドと接触させる段階；
- (b) 段階(a)のポリペプチドの細胞増殖活性を検出する段階；ならびに
- (c) 被験化合物の非存在下で検出される細胞増殖活性と比較してポリペプチドの細胞増殖活性を抑制する化合物を選択する段階。

20

30

【請求項7】

細胞増殖性疾患が癌である、請求項4 - 6のいずれか一項記載の方法。

【請求項8】

癌が、胃癌、結腸直腸癌、肺癌、もしくは肝臓癌のいずれかである請求項7に記載の方法。

【請求項9】

配列番号：5のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチドまたは低分子干渉RNAの薬学的有効量を有効成分として含み、かつ薬学的に許容される担体を含む、癌を治療するための組成物。

40

【請求項10】

癌が、胃癌、結腸直腸癌、肺癌、もしくは肝臓癌のいずれかである請求項9に記載の組成物。

【請求項11】

配列番号：80、97、または108のアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの薬学的有効量を含む、癌の治療または予防のための組成物。

【請求項12】

配列番号：80、97、または108のアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはそのポリヌクレオチドを含むベク

50

ターを含む、抗腫瘍免疫を誘導するための組成物。

【請求項 1 3】

配列番号：80、97、または108のアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの薬学的有効量を有効成分として含み、かつ薬学的に許容される担体を含む、癌の治療または予防のための薬学的組成物。

【請求項 1 4】

ポリヌクレオチドが発現ベクター中に組み入れられている、請求項 1 1 - 1 3 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 1 5】

癌が、胃癌、結腸直腸癌、肺癌、もしくは肝臓癌のいずれかである請求項 1 1 および 1 3 のいずれかに記載の組成物。

10

【請求項 1 6】

配列番号：80、97、および108の群より選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2002年6月6日に提出された米国特許出願第60/386,985号、2002年9月30日に提出された米国特許出願第60/415,209号、および2003年2月28日に提出された米国特許出願第60/451,013号（これらは参照として本明細書に組み入れられる）に関する。

20

【0002】

技術分野

本発明は生物科学の分野に関し、より具体的には癌研究の分野に関する。特に、本発明は、細胞の増殖機構に関与する新規遺伝子RNF43、CXADR1、およびGCUD1、ならびにこれらの遺伝子によってコードされるポリペプチドに関する。本発明の遺伝子およびポリペプチドは、例えば、細胞増殖性疾患の診断に、および、疾患に対する薬剤を開発するための標的分子として、用いることができる。

【背景技術】

【0003】

背景技術

胃癌および結腸直腸癌（colorectal cancer）は世界的に癌による死亡の主な原因である。診断および治療の戦略の最近の進歩にもかかわらず、進行癌の患者の予後は依然として極めて悪い。腫瘍抑制遺伝子および/または癌遺伝子の変化が発癌に関与することが分子的な研究によって明らかになってきたが、その厳密な機序は依然として不明である。

30

【0004】

cDNAマイクロアレイ技術により、正常細胞および悪性細胞における遺伝子発現の包括的プロファイルを得ること、ならびに悪性細胞および対応する正常細胞における遺伝子発現を比較することが可能になった（Okabeら、Cancer Res 61: 2129-37 (2001)；Kitaharaら、Cancer Res 61: 3544-9 (2001)；Linら、Oncogene 21: 4120-8 (2002)；Hasegawaら、Cancer Res 62: 7012-7 (2002)）。このアプローチは癌細胞の複雑な性質を明らかにすることを可能にし、発癌の機序を解明する一助となる。腫瘍において脱制御される遺伝子の同定は、個々の癌のより正確で間違いのない診断、および新規な治療標的の開発につながる可能性がある（BienzおよびClevers、Cell 103: 311-20 (2000)）。腫瘍の基礎をなす機序を全ゲノムの観点から解明するため、ならびに診断および新規治療薬の開発のための標的分子を探索するために、本発明者らは、23040種の遺伝子を含むcDNAマイクロアレイを用いて腫瘍細胞の発現プロファイルを分析してきた（Okabeら、Cancer Res 61: 2129-37 (2001)；Kitaharaら、Cancer Res 61: 3544-9 (2001)；Linら、Oncogene 21: 4120-8 (2002)；Hasegawaら、Cancer Res 62: 7012-7 (2002)）。

40

【0005】

発癌の機序を明らかにする目的で設計された研究により、抗腫瘍薬の分子標的を同定す

50

ることは既に容易である。例えば、Ras (その活性化は翻訳後ファルネシル化に依存する) が関係する増殖シグナル伝達経路を阻害するために当初開発されたファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤 (FTI) は、動物モデルにおけるRas依存性腫瘍の治療に有効であった (Heら、Cell 99: 335-45 (1999))。抗癌薬と抗HER2モノクローナル抗体トラスツズマブ (trastuzumab) を併用したヒトに対する臨床試験がプロト癌遺伝子受容体HER2/neuの拮抗を目的として実施されており、乳癌患者の臨床効果および全般的な生存率の改善が達成されている (Linら、Cancer Res 61: 6345-9 (2001))。bcr-abl融合タンパク質を選択的に不活性化するチロシンキナーゼ阻害剤STI-571は、bcr-ablチロシンキナーゼの構成的活性化が白血球のトランスフォーメーションに決定的な役割を果たす、慢性骨髄性白血病の治療を目的として開発された。これらの種類の薬剤は、特定の遺伝子産物の発癌活性を抑制する目的で設計されている (Fujitaら、Cancer Res 61: 7722-6 (2001))。このため、癌細胞で高頻度に上方制御される遺伝子産物は、新規抗癌薬を開発するための標的候補として役立つ可能性がある。

【 0 0 0 6 】

CD8+細胞障害性Tリンパ球 (CTL) は、MHCクラスI分子上に提示された腫瘍関連抗原 (TAA) に由来するエピトープペプチドを認識して、腫瘍細胞を溶解することが示されている。TAAの最初の例としてMAGEファミリーが発見されて以来、他の多くのTAAが免疫学的アプローチを用いて発見されている (Boon、Int J Cancer 54: 177-80 (1993) ; Boonおよびvan der Bruggen、J Exp Med 183: 725-9 (1996) ; van der Bruggenら、Science 254: 1643-7 (1991) ; Brichardら、J Exp Med 178: 489-95 (1993) ; Kawakamiら、J Exp Med 180: 347-52 (1994))。発見されたTAAのいくつかは現在、免疫療法の標的として臨床開発の段階にある。これまでに発見されたTAAには、MAGE (van der Bruggenら、Science 254: 1643-7 (1991))、gp100 (Kawakamiら、J Exp Med 180: 347-52 (1994))、SART (Shichijoら、J Exp Med 187: 277-88 (1998)) およびNY-ESO-1 (Chenら、Proc Natl Acad Sci USA 94: 1914-8 (1997)) が含まれる。一方、腫瘍細胞において特異的に過剰発現されることが示された遺伝子産物は、細胞性免疫応答を誘導する標的として認識されることが示されている。このような遺伝子産物には、p53 (Umamoraら、Brit J Cancer 84: 1052-7 (2001))、HER2/neu (Tanakaら、Brit J Cancer 84: 94-9 (2001))、CEA (Nukayaら、Int J Cancer 80: 92-7 (1999)) などが含まれる。

【 0 0 0 7 】

TAAに関する基礎研究および臨床研究の著しい進歩にもかかわらず (Rosenbegら、Nature Med 4: 321-7 (1998) ; Mukherjiら、Proc Natl Acad Sci USA 92: 8078-82 (1995) ; Hurら、Cancer Res 56: 2479-83 (1996))、結腸直腸癌を含む腺癌の治療のための候補となるTAAの数は非常に限られている。癌細胞で大量に発現されると同時にその発現が癌細胞に限定されるTAAは、免疫療法の標的として有望な候補になると考えられる。さらに、強力かつ特異的な抗腫瘍免疫応答を誘発する新たなTAAの同定は、様々な種類の癌におけるペプチドワクチン接種の臨床使用を促すと考えられる (Boonおよびvan der Bruggen、J Exp Med 183: 725-9 (1996) ; van der Bruggenら、Science 254: 1643-7 (1991) ; Brichardら、J Exp Med 178: 489-95 (1993) ; Kawakamiら、J Exp Med 180: 347-52 (1994) ; Shichijoら、J Exp Med 187: 277-88 (1998) ; Chenら、Proc Natl Acad Sci USA 94: 1914-8 (1997) ; Harris、J Natl Cancer Inst 88: 1442-5 (1996) ; Butterfieldら、Cancer Res 59: 3134-42 (1999) ; Vissersら、Cancer Res 59: 5554-9 (1999) ; van der Burgら、J Immunol 156: 3308-14 (1996) ; Tanakaら、Cancer Res 57: 4465-8 (1997) ; Fujieら、Int J Cancer 80: 169-72 (1999) ; Kikuchiら、Int J Cancer 81: 459-66 (1999) ; Oisoら、Int J Cancer 81: 387-94 (1999))。

【 0 0 0 8 】

ある一定の健常ドナー由来の末梢血単核細胞 (PBMC) がペプチド刺激を受けると、ペプチドに反応して著しいレベルのIFN- γ を産生するが、 ^{51}Cr 放出アッセイでHLA-A24またはHLA-A0201拘束的な様式で腫瘍細胞に対して細胞障害性を及ぼすことはほとんどないと繰り返し報告されている (Kawanoら、Cancer Res 60: 3550-8 (2000) ; Nishizakaら、Cancer R

10

20

30

40

50

es 60: 4830-7 (2000); Tamuraら、Jpn J Cancer Res 92: 762-7 (2001))。しかし、HLA-A24およびHLA-A0201はどちらも日本人に多いHLAアレルであり、白人でも同様である (Dateら、Tissue Antigens 47: 93-101 (1996); Kondoら、J Immunol 155: 4307-12 (1995); Kuboら、J Immunol 152: 3913-24 (1994); Imanishiら、Proceeding of the eleventh International Hictocompatibility Workshop and Conference Oxford University Press、Oxford、1065 (1992); Williamsら、Tissue Antigens 49: 129 (1997))。このため、これらのHLAによって提示される癌の抗原ペプチドは、日本人および白人の癌の治療に特に有用な可能性がある。さらに、インビトロでの低親和性CTLの誘導は通常、ペプチドを高濃度で用いて、抗原提示細胞 (APC) の表面に、これらのCTLを効果的に活性化すると考えられる特異的ペプチド/MHC複合体を高レベルに生じさせることによって起こることが知られている (Alexander-Millerら、Proc Natl Acad Sci USA 93: 4102-7 (1996))。

10

【発明の開示】

【0009】

発明の概要

本発明の目的は、胃癌細胞または結腸直腸癌細胞の増殖機構に關与する新規タンパク質、これらのタンパク質をコードする遺伝子、さらにはこれらを産生して胃癌または結腸直腸癌の診断および治療に用いるための方法を提供することである。

【0010】

胃癌および結腸直腸癌の発症機序を解明するため、ならびにこれらの腫瘍の治療のための新規診断マーカーおよび/または薬剤標的を同定するために、本発明者らは、23040種の遺伝子を含むゲノム全域のcDNAマイクロアレイを用いて、胃癌および結腸直腸癌の発症における遺伝子の発現プロファイルを分析した。薬理的な観点からは、発癌シグナルを抑制する方が腫瘍抑制効果の活性化を行うよりも現実的には容易である。このため、本発明者らは、胃癌および結腸直腸癌の発症時に上方制御される遺伝子を探索した。

20

【0011】

胃癌において高頻度に上方制御される転写物の中から、新規ヒト遺伝子CXADRL1 (coxsa ckie and adenovirus receptor like 1) およびGCUD1 (up-regulated in gastric cancer) がそれぞれ染色体バンド3q13および7p14上に同定された。CXADRL1またはGCUD1の遺伝子導入は細胞の増殖を促進した。さらに、特異的なアンチセンスS-オリゴヌクレオチドまたは低分子干渉RNA (small interfering RNA) のトランスフェクションによるCXADRL1またはGCUD1の発現低下は胃癌細胞の増殖を阻害した。DNAおよび/またはRNA合成の阻害剤、代謝抑制物質ならびにDNAインターカレーターといった多くの抗癌薬は、癌細胞のみならず、正常に増殖している細胞に対しても有害である。しかし、CXADRL1の発現を抑制する薬剤は、この遺伝子の通常の発現が精巣および卵巣に限局しているため、他の臓器には有害な影響を及ぼさないと考えられ、このため、癌の治療に非常に重要である可能性がある。

30

【0012】

さらに、結腸直腸癌において高頻度に上方制御される転写物の中から、染色体バンド17pter-p13.1に指定された遺伝子RNF43 (Ring finger protein 43) が同定された。その上、酵母2-ハイブリッドスクリーニングアッセイにより、RNF43タンパク質がNOTCH2またはSTRINと会合することが示された。

40

【0013】

NOTCH2は、進化上保存されてきた細胞間シグナル伝達機構の構成要素である、大型の膜貫通受容体タンパク質である。NOTCH2はNotchシグナル伝達経路のタンパク質要素であり、腎臓における糸球体形成ならびに心臓および眼の血管構造の発達に關与することが報告されている (McCrightら、Development 128: 491-502 (2001))。3種類のDelta/Serrate/Lag-2 (DSL) タンパク質、Delta1、Jaggaed1およびJaggaed2は、NOTCH2に対する機能性リガンドであることが報告されている (Shimizuら、Mol Cell Biol 20: 6913-22 (2000))。Notchシグナル伝達経路においてリガンド結合によって誘導されたシグナルは、この受容体のタンパク質分解およびNOTCHタンパク質の細胞内ドメインの核内移行を伴う過程によって細胞内に伝達される (以下の総説、Artavanis-Tsakonasら、Annu Rev Cell Biol 7

50

: 427-52 (1999) ; Weinmaster, Curr Opin Genet Dev 10: 363-9 (2000)を参照のこと)。
さらに、RNF43に対応する特異的アンチセンスS-オリゴヌクレオチドまたは低分子干渉RNAのトランスフェクションによるRNF43の発現低下は結腸直腸癌細胞の増殖を阻害した。既述の通り、多くの抗癌薬は癌細胞のみならず正常に増殖している細胞に対しても有害である。しかし、RNF43の発現を抑制する薬剤も、この遺伝子の通常の発現が胎児、より具体的には胎児肺および胎児腎臓に限局しているため、他の臓器には有害な影響を及ぼさないと考えられ、このため癌の治療に非常に重要である可能性がある。

【 0 0 1 4 】

したがって、本発明は、癌の診断マーカーの候補であるとともに、診断のための新たな戦略および有効な抗癌薬を開発するための有望な標的候補でもある、単離された新規遺伝子CXADRL1、GCUD1、およびRNF43を提供する。さらに、本発明は、これらの遺伝子によってコードされるポリペプチドのほか、その産生および使用も提供する。より具体的に述べると、本発明は以下を提供する。

10

【 0 0 1 5 】

本出願は、新規ヒトポリペプチドCXADRL1、GCUD1、およびRNF43、または細胞増殖を促進し、胃癌および結腸直腸癌などの細胞増殖性疾患において上方制御されるそれらの機能的同等物を提供する。

【 0 0 1 6 】

1つの好ましい態様において、CXADRL1ポリペプチドは、CXADR (coxsackie and adenovirus receptor) との同一性が約37%である推定431アミノ酸のタンパク質を含む。CXADRL1は配列番号：1のオープンリーディングフレームによってコードされ、コドン29~124および158~232に2つの免疫グロブリンドメインを含むほか、コドン246~268に膜貫通ドメインを含む。CXADRL1ポリペプチドは、好ましくは、配列番号：2に示されたアミノ酸配列を含む。本出願はまた、CXADRL1ポリヌクレオチド配列の少なくとも一部により、または配列番号：1に示された配列に対して少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%相補的なポリヌクレオチド配列によりコードされる、単離されたタンパク質も提供する。

20

【 0 0 1 7 】

一方、1つの好ましい態様において、GCUD1ポリペプチドは、配列番号：3のオープンリーディングフレームによってコードされる推定414アミノ酸のタンパク質を含む。GCUD1ポリペプチドは、好ましくは、配列番号：4に示されたアミノ酸配列を含む。本出願はまた、GCUD1ポリヌクレオチド配列の少なくとも一部により、または配列番号：3に示された配列に対して少なくとも15%、より好ましくは少なくとも25%相補的なポリヌクレオチド配列によりコードされる、単離されたタンパク質も提供する。

30

【 0 0 1 8 】

さらに、1つの好ましい態様において、RNF43ポリペプチドは、配列番号：5のオープンリーディングフレームによってコードされる推定783アミノ酸のタンパク質を含む。RNF43ポリペプチドは、好ましくは、配列番号：6に示されたアミノ酸配列を含み、コドン272~312にリングフィンガーモチーフを含む。RNF43ポリペプチドは、リングフィンガータンパク質相同体であるDKFZp566H073.1 (GenBankアクセッション番号：T08729) に対して38%の相同性を示した。本出願はまた、RNF43ポリヌクレオチド配列の少なくとも一部により、配列番号：5に示された配列に対して少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%相補的なポリヌクレオチド配列によりコードされる、単離されたタンパク質も提供する。

40

【 0 0 1 9 】

本発明はさらに、対応する非癌粘膜と比較して胃癌の大半でその発現が顕著に上昇している新規ヒト遺伝子CXADRL1およびGCUD1を提供する。胃癌以外に、CXADRL1およびGCUD1は結腸直腸癌および肝臓癌でも高発現した。単離されたCXADRL1遺伝子は、配列番号：1に記載されたポリヌクレオチド配列を含む。具体的には、CXADRL1 cDNAは、1296ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを含む3423ヌクレオチドを含む(配列番号：1)。本発明はさらに、配列番号：1に示されたポリヌクレオチド配列とハイブリダイズし、CXADRL1タンパク質またはその機能的同等物をコードする範囲でそれに対して少なくとも30%、よ

50

り好ましくは少なくとも40%相補的なポリヌクレオチドも含む。このようなポリヌクレオチドの例は、配列番号：1の縮重物および対立遺伝子変異体である。一方、単離されたGCUD1遺伝子は、配列番号：3に記載されたポリヌクレオチド配列を含む。具体的には、GCUD1 cDNAは、1245ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを含む4987ヌクレオチドを含む（配列番号：3）。本発明はさらに、配列番号：3に示されたポリヌクレオチド配列とハイブリダイズし、GCUD1タンパク質またはその機能的同等物をコードする範囲でそれに対して少なくとも15%、より好ましくは少なくとも25%相補的なポリヌクレオチドも含む。このようなポリヌクレオチドの例は、配列番号：3の縮重物および対立遺伝子変異体である。

【0020】

さらに、本発明は、対応する非癌粘膜と比較して結腸直腸癌の大半でその発現が顕著に上昇している新規ヒト遺伝子RNF43を提供する。結腸直腸癌以外に、RNF43は肺癌、胃癌、および肝臓癌でも高発現した。単離されたRNF43遺伝子は、配列番号：5に記載されたポリヌクレオチド配列を含む。具体的には、RNF43 cDNAは、2352ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを含む5345ヌクレオチドを含む（配列番号：5）。本発明はさらに、配列番号：5に示されたポリヌクレオチド配列とハイブリダイズし、RNF43タンパク質またはその機能的同等物をコードする範囲でそれに対して少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%相補的なポリヌクレオチドも含む。このようなポリヌクレオチドの例は、配列番号：5の縮重物および対立遺伝子変異体である。

【0021】

本明細書で用いる場合、単離された遺伝子とは、その構造が、どの天然のポリヌクレオチドの構造とも同一でなく、別個の遺伝子3つを上回る範囲の天然のゲノムポリヌクレオチドのいかなる断片の構造とも同一でない、ポリヌクレオチドのことである。このため、この用語には、例えば（a）自然下で生物のゲノム中に存在し、天然のゲノムDNA分子の部分の配列を有するDNA、（b）結果として生じる分子がどの天然のベクターまたはゲノムDNAとも同一でないような様式で、ベクター中または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNA中に組み入れられたポリヌクレオチド、（c）cDNA、ゲノム断片、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって生じた断片または制限断片などの独立した分子、および（d）ハイブリッド遺伝子の部分である組換えヌクレオチド配列、すなわち融合ポリペプチドをコードする遺伝子、が含まれる。

【0022】

したがって、1つの局面において、本発明は、本明細書に記載のポリペプチドまたはその断片をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。単離されたポリヌクレオチドは、配列番号：1、3、または5に示されたヌクレオチド配列と少なくとも60%同一なヌクレオチド配列を含むことが好ましい。単離された核酸分子は、配列番号：1、3、または5に示されたヌクレオチド配列と少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上同一であることがより好ましい。参照配列、例えば配列番号：1、3、または5よりも長い長さの等しい単離されたポリヌクレオチドの場合には、参照配列の完全長との比較が行われる。単離されたポリヌクレオチドが参照配列よりも短い、例えば配列番号：1、3、または5よりも短い場合には、同じ長さ（相同性の算出に必要なループは除外して）の参照配列のセグメントとの比較が行われる。

【0023】

本発明はまた、CXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を用いて宿主細胞のトランスフェクションまたは形質転換を行うこと、およびそのポリヌクレオチド配列を発現させることによる、タンパク質の産生方法も提供する。加えて、本発明は、CXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むベクター、およびCXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質をコードするポリヌクレオチドを保有する宿主細胞も提供する。このようなベクターおよび宿主細胞は、CXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質の産生のために用いることができる。

10

20

30

40

50

【0024】

CXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質を認識する抗体も、本出願によって提供される。一部には、CXADRL1、GCUD1、またはRNF43遺伝子のアンチセンスポリヌクレオチド（例えば、アンチセンスDNA）、リボザイムおよびsiRNA（低分子干渉RNA）も提供される。

【0025】

本発明はさらに、標本の生物試料における遺伝子の発現レベルを決定する段階、CXADRL1、GCUD1、またはRNF43遺伝子の発現レベルを正常試料におけるものと比較する段階、および、試料におけるCXADRL1、GCUD1、またはRNF43遺伝子の高い発現レベルを癌などの細胞増殖性疾患を有するものとして定義する段階を含む、細胞増殖性疾患の診断のための方法を提供する。CXADRL1またはGCUD1の発現レベルによって診断される疾患は好適には胃癌、結腸直腸癌および肝臓癌である；RNF43の発現レベルによって検出される疾患には結腸直腸癌、肺癌、胃癌、および肝臓癌がある。

10

【0026】

さらに、細胞増殖性疾患を治療するための化合物のスクリーニング方法も提供される。本方法は、CXADRL1、GCUD1、またはRNF43ポリペプチドを被験化合物と接触させる段階、およびCXADRL1、GCUD1、またはRNF43ポリペプチドと結合する被験化合物を選択する段階を含む。

【0027】

本発明はさらに、細胞増殖性疾患を治療するための化合物のスクリーニング方法であって、CXADRL1、GCUD1、またはRNF43ポリペプチドを被験化合物と接触させる段階、およびCXADRL1、GCUD1、またはRNF43ポリペプチドの発現レベルまたは生物学的活性を抑制する被験化合物を選択する段階を含む方法も提供する。

20

【0028】

または、本発明は、細胞増殖性疾患を治療するための化合物のスクリーニング方法であって、CXADRL1とAIP1とを被験化合物の存在下で接触させる段階、およびCXADRL1とAIP1との結合を阻害する被験化合物を選択する段階を含む方法を提供する。

【0029】

さらに、本発明は、細胞増殖性疾患を治療するための化合物のスクリーニング方法であって、RNF43とNOTCH2またはSTRINとを被験化合物の存在下で接触させる段階、およびRNF43とNOTCH2またはSTRINとの結合を阻害する被験化合物を選択する段階を含む方法を提供する。

30

【0030】

本出願はまた、癌などの細胞増殖性疾患を治療するための薬学的組成物も提供する。薬学的組成物は、例えば抗癌薬であってよい。薬学的組成物は、それぞれ配列番号：1、3、または5に提示および記載されたCXADRL1、GCUD1、またはRNF43ポリヌクレオチド配列のアンチセンスS-オリゴヌクレオチドまたはsiRNAの少なくとも一部として記載することができる。適したアンチセンスS-オリゴヌクレオチドは、配列番号：23、25、27、29または31の群より選択されるヌクレオチド配列を有する。配列番号：23または25のヌクレオチド配列を有するものを含む、CXADRL1のアンチセンスS-オリゴヌクレオチドは、胃癌、結腸直腸癌、または肝臓癌の治療に好適に用いうる；配列番号：27または29のヌクレオチド配列を有するものを含む、GCUD1のアンチセンスS-オリゴヌクレオチドは、胃癌、結腸直腸癌、または肝臓癌の治療に好適に用いうる；ならびに、配列番号：31のヌクレオチド配列を有するものを含む、RNF43のアンチセンスS-オリゴヌクレオチドは、結腸直腸癌、肺癌、胃癌、または肝臓癌の治療に好適に用いうる。適したsiRNAは、配列番号：40および41、42および43、または62および63の群より選択されるヌクレオチド配列を有するヌクレオチドのセットからなる。配列番号：40および41、または42および43のヌクレオチド配列を有するヌクレオチドのセットからなるCXADRL1のsiRNAは、胃癌、結腸直腸癌、または肝臓癌の治療に好適に用いうる；ならびに、配列番号：62および63のヌクレオチド配列を有するヌクレオチドのセットからなるRNF43のsiRNAは、結腸直腸癌、肺癌、胃癌、または肝臓癌に対して好適である。薬学的組成物は、細胞増殖性疾患の治療のための化合物に関する本

40

50

スクリーニング方法によって選択された化合物を含むものであってもよい。

【0031】

薬学的組成物の作用経路は癌細胞の増殖を阻害するものであることが望ましい。薬学的組成物は、ヒトおよび家畜を含む、哺乳動物に対して適用しうる。

【0032】

本発明はさらに、本発明によって提供される薬学的組成物を用いて細胞増殖性疾患を治療するための方法を提供する。

【0033】

さらに、本発明は、CXADRL1、GCUD1、またはRNF43ポリペプチドを投与する段階を含む、癌の治療または予防のための方法も提供する。CXADRL1、GCUD1、またはRNF43ポリペプチドの投与により、抗腫瘍免疫が誘導されると考えられる。したがって、本発明は、CXADRL1、GCUD1、またはRNF43ポリペプチドを投与する段階を含む、抗腫瘍免疫を誘導するための方法、ならびにCXADRL1、GCUD1、またはRNF43ポリペプチドを含む、癌の治療または予防のための薬学的組成物も提供する。

【0034】

本発明の前記の概要および以下の詳細な説明はいずれも好ましい態様のものであって、本発明または本発明のその他の代替的な態様を制限するものではないことが理解される。

【0035】

発明の詳細な説明

本明細書で用いる「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」という用語は、別に特記する場合を除き、「少なくとも1つの」を意味する。

【0036】

本出願は、対応する非癌組織と比較して胃癌でその発現が顕著に上昇している新規ヒト遺伝子CXADRL1およびGCUD1を同定する。CXADRL1 cDNAは、配列番号：1に示すように1296ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを含む3423ヌクレオチドからなる。このオープンリーディングフレームは、推定431アミノ酸のタンパク質をコードする。CXADRL1はAIP1と会合する。AIP1(atrophin interacting protein 1)は、遺伝病の一つである歯核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症の原因となる遺伝子atrophin-1と会合するタンパク質である。AIP1は、グアニル酸キナーゼ様ドメイン、2つのWWドメイン、および5つのPDZドメインを含む推定1455アミノ酸のタンパク質をコードする。AIP1のマウス相同体はアクチビンIIA型と相互作用することが示された。しかし、AIP1の機能はまだ解明されていない。予想されるアミノ酸配列は、CXADR(coxsackie and adenovirus receptor)に対して約37%の同一性を示した。このため、このタンパク質はCXADRL1(coxsackie and adenovirus receptor like 1)と命名された。一方、GCUD1 cDNAは、配列番号：3に示すように1245ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを含む4987ヌクレオチドからなる。このオープンリーディングフレームは推定414アミノ酸のタンパク質をコードする。このタンパク質の発現は胃癌において上方制御されるため、このタンパク質はGCUD1(up-regulated in gastric cancer)と命名された。

【0037】

さらに、本発明は、対応する非癌組織と比較して結腸直腸癌でその発現が顕著に上昇している新規ヒト遺伝子RNF43も含む。RNF43 cDNAは、配列番号：5に示すように2352ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを含む5345ヌクレオチドからなる。このオープンリーディングフレームは推定783アミノ酸のタンパク質をコードする。RNF43はNOTCH2およびSTRINと会合する。NOTCH2は、進化的に保存された細胞間シグナル伝達機構の構成要素である大型の膜貫通受容体タンパク質であると報告されている。NOTCH2はNotchシグナル伝達経路のタンパク質要素であり、腎臓における糸球体形成ならびに心臓および眼の血管構造の発達に関与することが報告されている。さらに、3種類のDelta/Serrate/Lag-2(DSL)タンパク質、Delta1、Jaggaed1およびJaggaed2は、NOTCH2に対する機能性リガンドであることが報告されている。STRINは、マウスTrifとの同一性が79%であるタンパク質をコードすると推定される。STRINまたはTrifの機能はまだ明らかでない。

10

20

30

40

50

【0038】

細胞におけるCXADRL1、GCUD1、またはRNF43の外因性発現は常に細胞増殖の亢進をもたらす、一方、アンチセンスS-オリゴヌクレオチドまたは低分子干渉RNA (siRNA) によるその発現の抑制は癌細胞の顕著な増殖阻害をもたらした。これらの所見は、CXADRL1、GCUD1、およびRNF43が癌細胞に発癌活性を与えること、およびこれらのタンパク質の活性の阻害が癌の治療のための有望な戦略となりうることを示唆する。

【0039】

本発明は、配列番号：1に記載されたポリヌクレオチド配列を含む新規ヒト遺伝子CXADRL1のほか、その縮重物および変異体も、それらが配列番号：2に示されたアミノ酸配列を含むCXADRL1タンパク質またはその機能的同等物をコードする範囲で含む。CXADRL1と機能的に同等なポリペプチドの例には、例えば、ヒトCXADRL1タンパク質に対応する他の生物の相同タンパク質のほか、ヒトCXADRL1タンパク質の変異体が含まれる。

10

【0040】

本発明はまた、配列番号：3に記載されたポリヌクレオチド配列を含む新規ヒト遺伝子GCUD1のほか、その縮重物および変異体も、それらが配列番号：4に示されたアミノ酸配列を含むGCUD1タンパク質またはその機能的同等物をコードする範囲で含む。GCUD1と機能的に同等なポリペプチドの例には、例えば、ヒトGCUD1タンパク質に対応する他の生物の相同タンパク質のほか、ヒトGCUD1タンパク質の変異体が含まれる。

【0041】

さらに、本発明は、配列番号：5に記載されたポリヌクレオチド配列を含む新規ヒト遺伝子RNF43のほか、その縮重物および変異体も、それらが配列番号：6に示されたアミノ酸配列を含むRNF43タンパク質またはその機能的同等物をコードする範囲で含む。RNF43と機能的に同等なポリペプチドの例には、例えば、ヒトRNF43タンパク質に対応する他の生物の相同タンパク質のほか、ヒトRNF43タンパク質の変異体が含まれる。

20

【0042】

本発明において、「機能的に同等な」という用語は、対象ポリペプチドが、CXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質のように細胞増殖を促進するとともに癌細胞に発癌活性を付与する活性を有することを意味する。対象ポリペプチドが細胞増殖活性を有するか否かは、対象ポリペプチドをコードするDNAをそれぞれのポリペプチドを発現する細胞に導入し、細胞の増殖の促進またはコロニー形成活性の上昇を検出することによって判定される。このような細胞には、例えば、CXADRL1およびGCUD1に対してはNIH3T3細胞；ならびに、RNF43に対してはNIH3T3細胞、SW480細胞、およびCOS7細胞が含まれる。または、対象ポリペプチドが、CXADRL1と機能的に同等であるか否かを、そのAIP1との結合能を検出することによって判定することもできる。さらに、対象ポリペプチドがRNF43と機能的に同等であるか否かを、そのNOTCH2またはSTRINとの結合能を検出することによって判定することもできる。

30

【0043】

所定のタンパク質と機能的に同等なポリペプチドを作製するための方法は当業者に周知であり、これにはタンパク質に変異を導入する既知の方法が含まれる。例えば、当業者は、ヒトCXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質と機能的に同等なポリペプチドを、これらのタンパク質のいずれかのアミノ酸配列に部位特異的突然変異誘発法によって適切な変異を導入することによって作製することができる (Hashimoto-Gotohら、Gene 152: 271-5 (1995) ; ZollerおよびSmith、Methods Enzymol 100: 468-500 (1983) ; Kramerら、Nucleic Acids Res. 12: 9441-9456 (1984) ; KramerおよびFritz、Methods Enzymol 154: 350-67 (1987) ; Kunkel、Proc Natl Acad Sci USA 82: 488-92 (1985) ; Kunkel、Methods Enzymol 85: 2763-6 (1988)) 。アミノ酸変異は自然下でも起こりうる。その結果生じる変異ポリペプチドがヒトCXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質と機能的に同等であるという前提で、1つまたは複数のアミノ酸が変異したヒトCXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質のアミノ酸配列を有するタンパク質が本発明のポリペプチドに含まれる。このような変異体において変異させるアミノ酸の数は一般に10アミノ酸またはそれ未満、好ましくは

40

50

6アミノ酸またはそれ未満、より好ましくは3アミノ酸またはそれ未満である。

【0044】

変異タンパク質、またはある特定のアミノ酸配列の1つもしくは複数のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および/もしくは付加によって改変されたアミノ酸配列を有するタンパク質である改変タンパク質は、元の生物学的活性を保つことが知られている (Markら、Proc Natl Acad Sci USA 81: 5662-6 (1984); ZollerおよびSmith、Nucleic Acids Res 10: 6487-500 (1982); Dalbadie-McFarlandら、Proc Natl Acad Sci USA 79: 6409-13 (1982))。

【0045】

変異させるアミノ酸残基は、アミノ酸側鎖の特性が保存される別のアミノ酸に変異させることが好ましい (保存的アミノ酸置換として知られる方法)。アミノ酸側鎖の特性の例には、疎水性アミノ酸 (A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸 (R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、および、以下の官能基または特徴を共通して有する側鎖がある: 脂肪族側鎖 (G、A、V、L、I、P); 水酸基含有側鎖 (S、T、Y); 硫黄原子含有側鎖 (C、M); カルボン酸およびアミド含有側鎖 (D、N、E、Q); 塩基含有側鎖 (R、K、H); および芳香族含有側鎖 (H、F、Y、W)。括弧内の文字はアミノ酸の一文字略号を示すことに注意されたい。

【0046】

ヒトCXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質のアミノ酸配列に1つまたは複数のアミノ酸残基が付加されたポリペプチドの一例は、ヒトCXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質を含む融合タンパク質である。融合タンパク質とは、ヒトCXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質と他のペプチドまたはタンパク質との融合物のことであり、これは本発明に含まれる。融合タンパク質は、本発明のヒトCXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質をコードするDNAを他のペプチドまたはタンパク質をコードするDNAとフレームが合致するように連結し、この融合DNAを発現ベクターに挿入して、それを宿主において発現させるといった当業者に周知の技法によって作製しうる。本発明のタンパク質と融合させるペプチドまたはタンパク質には制限はない。

【0047】

本発明のタンパク質と融合させるペプチドとして用いられる既知のペプチドには、例えば、FLAG (Hoppら、Biotechnology 6: 1204-10 (1988))、6個のHis (ヒスチジン) 残基を含む6xHis、10xHis、インフルエンザ凝集素 (HA)、ヒトc-myc断片、VSP-GP断片、p18HIV断片、T7タグ、HSVタグ、Eタグ、SV40T抗原断片、Ickタグ、 α -チューブリン断片、Bタグ、プロテインC断片などが含まれる。本発明のタンパク質と融合させうるタンパク質の例には、GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)、インフルエンザ凝集素 (HA)、免疫グロブリン定常領域、 α -ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合タンパク質) などが含まれる。

【0048】

融合タンパク質は、上に考察したように融合ペプチドまたはタンパク質をコードする市販のDNAと、本発明のポリペプチドをコードするDNAとを融合させ、作製された融合DNAを発現させることによって作製しうる。

【0049】

機能的に同等なポリペプチドを単離するための当技術分野で知られた代替的な方法には、例えば、ハイブリダイゼーション法を用いる方法がある (Sambrookら、「Molecular Cloning」第2版、9.47-9.58、Cold Spring Harbor Lab. Press (1989))。当業者は、ヒトCXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質をコードするDNA配列 (すなわち、配列番号: 1、3、または5) の全体または部分に対して高い相同性を有するDNAを容易に単離して、単離されたDNAからヒトCXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質と機能的に同等なポリペプチドを単離することができる。本発明のポリペプチドには、ヒトCXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質をコードするDNA配列の全体または部分とハイブリダイズするDNAによってコードされ、そしてヒトCXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質と機能的に同等なポリ

10

20

30

40

50

ペプチドが含まれる。これらのポリペプチドには、ヒト由来のタンパク質に対応する哺乳動物相同体（例えば、サル、ラット、ウサギ、およびウシの遺伝子によってコードされるポリペプチド）が含まれる。ヒトCXADRL1タンパク質をコードするDNAに対して高度に相同なcDNAを動物から単離する際には、精巣または卵巣からの組織を用いることが特に好ましい。また、ヒトGCUD1をコードするDNAに対して高度に相同なcDNAを動物から単離する際には、精巣、卵巣、または脳からの組織を用いることが特に好ましい。さらに、ヒトRNF43タンパク質をコードするDNAに対して高度に相同なcDNAを単離する際には、胎児肺または胎児腎臓からの組織を用いることが特に好ましい。

【0050】

ヒトCXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質と機能的に同等なポリペプチドをコードするDNAを単離するためのハイブリダイゼーションの条件は、当業者によって慣行的に選択されうる。例えば、30分間またはそれ以上にわたる68 °Cでのプレハイブリダイゼーションを「Rapid-hyb緩衝液」（アマシャムライフサイエンス（Amersham LIFE SCIENCE））を用いて行い、標識したプローブを添加した上で、1時間またはそれ以上にわたって68 °Cで加温することによって、ハイブリダイゼーションを行ってもよい。それに続く洗浄段階は、例えば、低ストリンジェント条件下で行い、低ストリンジェント条件とは、例えば、42 °C、2X SSC、0.1% SDS、または好ましくは50 °C、2X SSC、0.1% SDSのことである。より好ましくは、高ストリンジェント条件を用いる。高ストリンジェント条件とは、例えば、室温の2X SSC、0.01% SDS中での20分間の洗浄を3回行った後に、37 °Cの1x SSC、0.1% SDS中での20分間の洗浄を3回行い、50 °Cの1x SSC、0.1% SDS中での20分間の洗浄を2回行うことである。しかし、温度および塩濃度などのいくつかの要因はハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を及ぼすと考えられ、当業者は必要なストリンジェンシーを得るためにこれらの要因を適切に選択することができる。

【0051】

ハイブリダイゼーションの代わりに、遺伝子増幅法、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を、ヒトCXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質と機能的に同等なポリペプチドをコードするDNAを、タンパク質をコードするDNAの配列情報（配列番号：1、3、または5）に基づいて合成したプライマーを用いて単離するために用いることもできる。

【0052】

以上のハイブリダイゼーション法または遺伝子増幅法によって単離されたDNAによってコードされる、ヒトCXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質と機能的に同等なポリペプチドは、通常、ヒトCXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質のアミノ酸配列に対して高い相同性を有する。「高い相同性」とは一般に、40%またはそれ以上、好ましくは60%またはそれ以上、より好ましくは80%またはそれ以上、さらにより好ましくは95%またはそれ以上の相同性を指す。ポリペプチドの相同性は、「WilburおよびLipman、Proc Natl Acad Sci USA 80: 726-30 (1983)」中のアルゴリズムに従って決定することができる。

【0053】

本発明のポリペプチドは、その産生のために用いる細胞もしくは宿主または用いる精製方法に応じて、アミノ酸配列、分子量、等電点、糖鎖の有無、または形態に関して差異があってもよい。しかし、それが本発明のヒトCXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質のポリペプチドと同等な機能を有する限り、それは本発明の範囲に含まれる。

【0054】

本発明のポリペプチドは、当業者に周知の方法により、組換えタンパク質として調製することもでき、または天然タンパク質として調製することもできる。組換えタンパク質は、本発明のポリペプチドをコードするDNA（例えば、配列番号：1、3、または5のヌクレオチド配列を含むDNA）を適切な発現ベクターに挿入し、そのベクターを適切な宿主細胞に導入して抽出物を入手した上で、抽出物をクロマトグラフィー、例えばイオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲル濾過、もしくは本発明のタンパク質に対する抗体を固定したカラムを用いるアフィニティークロマトグラフィーにかけることによって、または上述のカラムの複数を組み合わせることによってポリペプチドを精製すること

10

20

30

40

50

により、調製することができる。

【0055】

同様に、本発明のポリペプチドを宿主細胞（例えば、動物細胞および大腸菌）の内部でグルタチオン-S-トランスフェラーゼタンパク質との融合タンパク質として、または多数のヒスチジンを追加した組換えタンパク質として発現させる場合には、発現した組換えタンパク質をグルタチオンカラムまたはニッケルカラムを用いて精製することができる。また、本発明のポリペプチドをc-myc、多数のヒスチジン、またはFLAGで標識したタンパク質として発現させる場合には、それぞれc-myc、His、またはFLAGに対する抗体を用いてそれを検出して精製することができる。

【0056】

融合タンパク質を精製した後に、必要に応じてトロンピンまたは第Xa因子で切断することにより、目的のポリペプチド以外の領域を除外することも可能である。

【0057】

天然のタンパク質は、当業者に知られた方法によって、例えば、下記のCXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質と結合する抗体を結合させたアフィニティーカラムを、本発明のポリペプチドを発現する組織または細胞の抽出物と接触させることによって単離することができる。抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。

【0058】

本発明はまた、本発明のポリペプチドの部分（partial）ペプチドも含む。部分ペプチドは、本発明のポリペプチドに対して特異的なアミノ酸配列を有し、少なくとも7アミノ酸、好ましくは8アミノ酸またはそれ以上、より好ましくは9アミノ酸またはそれ以上からなる。部分ペプチドは、例えば、本発明のポリペプチドに対する抗体を作製するために、本発明のポリペプチドと結合する化合物をスクリーニングするために、および本発明のポリペプチドの阻害物質をスクリーニングするために、用いることができる。

【0059】

本発明の部分ペプチドは、遺伝子操作により、既知のペプチド合成方法により、または本発明のポリペプチドを適切なペプチダーゼで消化することにより、作製可能である。ペプチド合成のためには、例えば、固相合成または液相合成を用いる。

【0060】

さらに、本発明は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも提供する。本発明のポリヌクレオチドは、上記のように本発明のポリペプチドのインビボもしくはインビトロでの産生のために用いることができ、または本発明のタンパク質をコードする遺伝子の遺伝的異常に起因する疾患に対する遺伝子治療のために用いることもできる。mRNA、RNA、cDNA、ゲノムDNA、化学合成されたポリヌクレオチドを含む、本発明のポリヌクレオチドのいかなる形態を、それが本発明のポリペプチドをコードする限りは、用いることができる。本発明のポリヌクレオチドには、所定のヌクレオチド配列を含むDNAのほかに、その縮重配列も、結果として生じるDNAが本発明のポリペプチドをコードする限りは、含まれる。

【0061】

本発明のポリヌクレオチドは、当業者に知られた方法によって作製することができる。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドを発現する細胞からcDNAライブラリーを作製し、本発明のDNA（例えば、配列番号：1、3、または5）の部分配列をプローブとして用いてハイブリダイゼーションを行うことによって作製することができる。cDNAライブラリーは、例えば、Sambrookら、「Molecular Cloning」、Cold Spring Harbor Laboratory Press（1989）に記載された方法によって作製しうる；または、市販のcDNAライブラリーを用いてもよい。cDNAライブラリーは、本発明のポリペプチドを発現する細胞からRNAを抽出し、本発明のDNA（例えば、配列番号：1、3、または5）の配列に基づいてオリゴDNAを合成し、オリゴDNAをプライマーとして用いてPCRを行い、そして本発明のタンパク質をコードするcDNAを増幅することによって作製することもできる。

【0062】

さらに、得られたcDNAのヌクレオチドのシーケンシングを行うことにより、cDNAによりコードされる翻訳領域を慣行的に決定し、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列を容易に得ることができる。その上、得られたcDNAまたはその部分を用いてゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、ゲノムDNAを単離することができる。

【0063】

より具体的に述べると、mRNAをまず、本発明の対象ポリペプチドが発現される細胞、組織、または臓器（例えば、CXADRL1の場合は精巣または卵巣；GCUD1の場合は精巣、卵巣、または脳；RNF43の場合は胎児肺または胎児腎臓）から調製する。mRNAの単離には既知の方法を用いる；例えば、全RNAはグアニジン超遠心（Chirgwinら、Biochemistry 18: 52 94-9 (1979)）またはAGPC法（ChomczynskiおよびSacchi、Anal Biochem 162: 156-9 (1987)）によって調製する。さらに、mRNAをmRNA精製キット（ファルマシア（Pharmacia））などを用いて全RNAから精製してもよく、または、mRNAをQuickPrep mRNA精製キット（ファルマシア）によって直接精製してもよい。

【0064】

得られたmRNAは、逆転写酵素を用いてcDNAを合成するために用いられる。cDNAは、AMV逆転写酵素第一鎖cDNA合成キット（生化学工業（Seikagaku Kogyo））などの市販のキットを用いて精製する。または、本明細書に記載のプライマー等、5'-Ampli FINDER RACEキット（クロンテック（Clontech））、およびポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いる5'-RACE法（Frohmanら、Proc Natl Acad Sci USA 85: 8998-9002 (1988)；Belyavskyら、Nucleic Acids Res 17: 2919-32 (1989)）に従って、cDNAの合成および増幅を行うこともできる。

【0065】

所望のDNA断片をPCR産物から調製し、ベクターDNAと連結する。この組換えベクターを大腸菌などの形質転換に用い、選択したコロニーから所望の組換えベクターを調製する。所望のDNAのヌクレオチド配列を、ジデオキシヌクレオチド鎖終結法（dideoxynucleotide chain termination）などの従来の方法によって検証する。

【0066】

本発明のポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を、発現のために用いる宿主におけるコドン使用頻度を考慮に入れることにより、より効率的に発現されるように設計することもできる（Granthamら、Nucleic Acids Res 9: 43-74 (1981)）。本発明のポリヌクレオチドの配列を、市販のキットまたは従来の方法によって改変することもできる。例えば、制限酵素による消化、合成オリゴヌクレオチドもしくは適切なポリヌクレオチド断片の挿入、リンカーの付加、または開始コドン（ATG）および/もしくは終止コドン（TAA、TGAまたはTAG）の挿入によって配列を改変することができる。

【0067】

具体的には、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号：1、3、または5のヌクレオチド配列を含むDNAを含む。

【0068】

さらに、本発明は、配列番号：1、3、または5のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ上記の本発明のCXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質と機能的に同等なポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドを提供する。当業者はストリンジェントな条件を適切に選択してよい。例えば、低ストリンジェント条件を用いることができる。より好ましくは、高ストリンジェント条件を用いる。これらの条件は上記のものと同じである。上記のハイブリダイズさせるDNAはcDNAまたは染色体DNAであることが好ましい。

【0069】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドが内部に挿入されたベクターも提供する。本発明のベクターは、宿主細胞において本発明のポリヌクレオチド、特にDNAに本発明のポリペプチドを発現させるために有用である。

【0070】

大腸菌が宿主細胞であって、ベクターを大腸菌（例えば、JM109、DH5、HB101、またはXL1Blue）の内部で大量に増幅および産生させる場合には、ベクターは、大腸菌内で増幅させるための「ori」、および、形質転換された大腸菌を選択するためのマーカー遺伝子（例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコールなどの薬剤によって選択される薬剤抵抗性遺伝子）を有する必要がある。例えば、M13シリーズのベクター、pUCシリーズのベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどを用いることができる。さらに、上記のベクター同様、pGEM-T、pDIRECT、およびpT7も、cDNAのサブクローニングおよび抽出のために用いることができる。本発明のタンパク質の産生のためにベクターを用いる場合には、発現ベクターが特に有用である。例えば、大腸菌内で発現させようとする発現ベクターは、大腸菌内で増幅させるための上記の特徴を有する必要がある。JM109、DH5、HB101、またはXL1Blueなどの大腸菌を宿主細胞として用いる場合には、ベクターは、大腸菌内で所望の遺伝子を効率的に発現しうるプロモーター、例えば、lacZプロモーター（Wardら、Nature 341: 544-6 (1989) ; FASEB J 6: 2422-7 (1992)）、araBプロモーター（Betterら、Science 240: 1041-3 (1988)）、またはT7プロモーターなどを有する必要がある。その点に関しては、例えば、pGEX-5X-1（ファルマシア）、「QIAexpressシステム」（キアゲン（Qiagen））、pEGFPおよびpET（この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現するBL21であることが好ましい）を上記のベクターの代わりに用いてもよい。さらに、ベクターは、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列をも含む。大腸菌の周辺質（periplasm）へのポリペプチド分泌を指令するシグナル配列の一例は、pelBシグナル配列（Leiら、J Bacteriol 169: 4379 (1987)）である。ベクターを標的宿主細胞に導入するための手段には、例えば、塩化カルシウム法および電気穿孔法が含まれる。

10

20

【0071】

大腸菌以外に、例えば、哺乳動物由来の発現ベクター（例えば、pcDNA3（インビトロジェン（Invitrogen））およびpEGF-BOS（Nucleic Acids Res 18(17): 5322 (1990)）、pEF、pCDM8）、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば、「Bac-to-BACバキュロウイルス発現系」（ギブコBRL（GIBCO BRL））、pBacPAK8）、植物由来の発現ベクター（例えば、pMH1、pMH2）、動物ウイルス由来の発現ベクター（例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw）、レトロウイルス由来の発現ベクター（例えば、pZipneo）、酵母由来の発現ベクター（例えば、「Pichia発現キット」（インビトロジェン）、pNV11、SP-Q01）、および枯草菌（*Bacillus subtilis*）由来の発現ベクター（例えば、pPL608、pKTH50）を、本発明のポリペプチドの産生のために用いることもできる。

30

【0072】

ベクターをCHO細胞、COS細胞またはNIH3T3細胞などの動物細胞内で発現させるためには、ベクターは、この種の細胞における発現のために必要なプロモーター、例えば、SV40プロモーター（Mulliganら、Nature 277: 108 (1979)）、MMLV-LTRプロモーター、EF1プロモーター（Mizushimaら、Nucleic Acids Res 18: 5322 (1990)）、CMVプロモーターなどを有する必要があるほか、形質転換体を選択するためのマーカー遺伝子（例えば、薬剤（例えば、ネオマイシン、G418）によって選択される薬剤抵抗性遺伝子）を有することが好ましい。これらの特徴を備えた既知のベクターの例には、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RS V、pBK-CMV、pOPRSV、およびpOP13が含まれる。

40

【0073】

さらに、本方法を、遺伝子を安定的に発現させるため、およびそれと同時に、細胞内の遺伝子のコピー数を増幅するために用いることもできる。例えば、相補的DHFR遺伝子を含むベクター（例えば、pCHO1）を、核酸合成経路が欠失したCHO細胞に導入した後に、メトトレキサート（MTX）によって増幅することができる。さらに、遺伝子の一過性発現の場合には、SV40の複製起点を含むベクター（pcDなど）を、SV40T抗原を発現する遺伝子を染色体上に含むCOS細胞に形質転換導入する方法を用いることができる。

【0074】

以上のようにして得られた本発明のポリペプチドは、宿主細胞の内部または外部（培地

50

など)から単離して、実質的に純粋な均一なポリペプチドとして精製することができる。所定のポリペプチドに言及して本明細書で用いられる「実質的に純粋な」とは、そのポリペプチドが他の生体高分子から実質的に遊離していることを意味する。実質的に純粋なポリペプチドは、乾燥重量にして純度が少なくとも75% (例えば、少なくとも80、85、95または99%)である。純度は任意の適切な標準的方法により、例えばカラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはHPLC分析によって測定しうる。ポリペプチドの単離および精製のための方法は何らかの特定の方法には限定されない;実際には任意の標準的な方法を用いうる。

【0075】

例えば、カラムクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動、透析、および再結晶化を適切に選択し、組み合わせて、ポリペプチドの単離および精製を行ってもよい。

10

【0076】

クロマトグラフィーの例には、例えば、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィーなどが含まれる(「Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual」、Daniel R. Marshakら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。これらのクロマトグラフィーを、HPLCおよびPLCなどの液体クロマトグラフィーによって行ってもよい。したがって、本発明は、以上

20

の方法によって調製された高純度のポリペプチドを提供する。

【0077】

本発明のポリペプチドを、精製の前または後に適切なタンパク質修飾酵素でそれを処理することにより、随意に改変すること、または部分的に欠失させることも可能である。有用なタンパク質修飾酵素には、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、タンパク質キナーゼ、グルコシダーゼなどが非制限的に含まれる。

【0078】

本発明は、本発明のポリペプチドと結合する抗体を提供する。本発明の抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体などの任意の形態で用いることができ、これにはウサギなどの動物を本発明のポリペプチドで免疫することによって得られる抗血清、すべてのクラスのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、ヒト抗体、ならびに遺伝子組換えによって作製されたヒト化抗体が含まれる。

30

【0079】

抗体を得るための抗原として用いられる本発明のポリペプチドは、任意の動物種に由来するものでよいが、好ましくはヒト、マウス、またはラットなどの哺乳動物、より好ましくはヒトに由来する。ヒト由来のポリペプチドは、本明細書に開示するヌクレオチドまたはアミノ酸配列から入手しうる。

【0080】

本発明によれば、免疫化抗原として用いるポリペプチドは、完全タンパク質でもよく、またはタンパク質の部分ペプチドでもよい。部分ペプチドは、例えば、本発明のポリペプチドのアミノ(N)末端またはカルボキシ(C)末端断片を含みうる。より具体的には、CXADRL1のコドン、235位から276位まで、493位から537位まで、または70位から111位までを含むポリペプチドを、本発明のCXADRL1に対する抗体を作製するための部分ペプチドとして用いることができる。

40

【0081】

または、本発明のポリペプチドに対する抗体の作製のために、以下のアミノ酸配列のいずれか1つを含むペプチドを用いてもよい。

RNF43; 配列番号: 80、97、または108

CXADRL1; 配列番号: 124

GCUD1; 配列番号: 164

50

【0082】

本明細書において、抗体は、本発明のポリペプチドの完全長または断片のいずれかと反応するタンパク質として定義される。

【0083】

本発明のポリペプチドまたはその断片をコードする遺伝子を既知の発現ベクターに挿入し、その後本明細書に記載したような宿主細胞の形質転換に用いてもよい。所望のポリペプチドまたはその断片を、任意の標準的な方法によって宿主細胞の内部または外部から回収し、後に抗原として用いることができる。または、ポリペプチドを発現する細胞全体もしくはその可溶化物、または化学合成したポリペプチドを抗原として用いてもよい。

【0084】

いかなる哺乳動物も抗原で免疫することができるが、細胞融合に用いる親細胞との適合性を考慮に入れることが好ましい。一般に、齧歯類 (Rodentia)、ウサギ目 (Lagomorpha)、または霊長類 (Primate) の動物が用いられる。齧歯類の動物には、例えば、マウス、ラット、およびハムスターが含まれる。ウサギ目の動物には、例えばウサギが含まれる。霊長類の動物には、例えば、狭鼻猿類 (Catarrhini) (旧世界サル) のサル、カニクイザル (*Macaca fascicularis*)、アカゲザル、マントヒヒ (sacred baboon) およびチンパンジーが含まれる。

【0085】

動物を抗原で免疫するための方法は当技術分野で周知である。抗原の腹腔内注射または皮下注射は、哺乳動物の免疫化のための標準的な方法である。より具体的に述べると、抗原を希釈して適切な量のリン酸緩衝食塩水 (PBS)、生理食塩水などの中に懸濁させる。必要に応じて、抗原懸濁液を、フロイント完全アジュバントなどの適切な量の標準的アジュバントと混合して乳濁液とした上で哺乳動物に対して投与してもよい。その後、適切な量のフロイント不完全アジュバントと混合した抗原の投与を4~21日毎に数回行うことが好ましい。適切な担体を免疫化のために用いてもよい。上記のような免疫化の後に、血清を、所望の抗体の量の増加に関して標準的方法によって検討する。

【0086】

本発明のポリペプチドに対するポリクローナル抗体を、血清中の所望の抗体の増加に関して検討した免疫後の哺乳動物から血液を採取し、従来の任意の方法によって血液から血清を分離することによって調製することもできる。ポリクローナル抗体にはポリクローナル抗体を含む血清が含まれ、ポリクローナル抗体を含む画分を血清から単離することもできる。免疫グロブリンGまたはMは、本発明のポリペプチドのみを認識する画分から、例えば、本発明のポリペプチドを結合させたアフィニティーカラムを用いた上で、この画分をプロテインAカラムまたはプロテインGカラムを用いてさらに精製して、調製することができる。

【0087】

モノクローナル抗体を調製するためには、抗原で免疫した哺乳動物から免疫細胞を収集し、上記の通りに血清中の所望の抗体のレベル上昇について確かめた上で、細胞融合に供する。細胞融合に用いる免疫細胞は脾臓から入手することが好ましい。上記の免疫細胞と融合させるためのその他の好ましい親細胞には、例えば、哺乳動物の骨髄腫細胞、より好ましくは、薬剤による融合細胞の選択のための獲得特性を有する骨髄腫細胞が含まれる。

【0088】

上記の免疫細胞および骨髄腫細胞は、既知の方法、例えば、Milsteinら (GalfreおよびMilstein, *Methods Enzymol* 73: 3-46 (1981)) の方法に従って融合させることができる。

【0089】

細胞融合によって結果として得られたハイブリドーマは、それらをHAT培地 (ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含む培地) などの標準的な選択培地中で培養することによって選択しうる。細胞培養は通常、HAT培地中で、所望のハイブリドーマを除く他のすべての細胞 (非融合細胞) が死滅するのに十分な期間である、数日間から数週

10

20

30

40

50

間にわたって続けられる。その後、所望の抗体を産生するハイブリドーマ細胞のスクリーニングおよびクローニングのために標準的な限界希釈を行う。

【0090】

ハイブリドーマ調製用に非ヒト動物を抗原で免疫する上記の方法に加えて、EBウイルスに感染したリンパ球などのヒトリンパ球を、ポリペプチド、ポリペプチド発現細胞、またはそれらの可溶化物によりインビトロで免疫することもできる。続いて、免疫後のリンパ球を、無限に分裂しうるU266などのヒト由来の骨髄腫細胞と融合させ、ポリペプチドと結合しうる所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる（特開昭63-17688号）。

【0091】

得られたハイブリドーマを続いてマウスの腹腔内に移植し、腹水を抽出する。得られたモノクローナル抗体は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、プロテインAもしくはプロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、または本発明のポリペプチドを結合させたアフィニティーカラムによって精製しうる。本発明の抗体は、本発明のポリペプチドの精製および検出のためだけでなく、本発明のポリペプチドのアンタゴニストの候補としても用いることができる。さらに、この抗体を、本発明のポリペプチドと関連のある疾患に対する抗体療法に適用することもできる。得られた抗体を人体に対して投与する場合には（抗体療法）、免疫原性を抑えるためにヒト抗体またはヒト化抗体が好ましい。

【0092】

例えば、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物は、ポリペプチド、ポリペプチド発現細胞、またはそれらの可溶化物から選択される抗原で免疫することができる。続いて、抗体産生細胞を動物から採取し、骨髄腫細胞と融合させてハイブリドーマを得、そのハイブリドーマからポリペプチドに対するヒト抗体を調製することができる（国際公開公報第92-03918号、国際公開公報第93-2227号、国際公開公報第94-02602号、国際公開公報第94-25585号、国際公開公報第96-33735号、および国際公開公報第96-34096号を参照のこと）。

【0093】

または、免疫したリンパ球のような、抗体を産生する免疫細胞を、癌遺伝子によって不死化させ、モノクローナル抗体の調製に用いることもできる。

【0094】

このようにして得られるモノクローナル抗体は、遺伝子操作技術を用いて組換えにより調製してもよい（例えば、BorrebaeckおよびLarrick、「Therapeutic Monoclonal Antibodies」、MacMillan Publishers LTD（英国）より刊行（1990）、を参照）。例えば、抗体をコードするDNAを、抗体を産生するハイブリドーマまたは免疫リンパ球などの免疫細胞からクローニングして適切なベクターに挿入した上で、宿主細胞に導入し、組換え抗体を調製することができる。本発明はまた、上記のようにして調製した組換え抗体も提供する。

【0095】

さらに、本発明の抗体は、本発明のポリペプチドの1つまたは複数と結合する限り、抗体の断片または修飾抗体であってもよい。例えば、抗体断片は、Fab、F(ab')₂、Fv、またはH鎖およびL鎖由来のFv断片を適切なリンカーによって連結した一本鎖Fv（scFv）であってもよい（Hustonら、Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83（1988））。より具体的に述べると、パインまたはペプシンなどの酵素で抗体を処理することによって抗体断片を作製することもできる。または、抗体断片をコードする遺伝子を構築して発現ベクターに挿入した上で、適切な宿主細胞において発現させてもよい（例えば、Coら、J Immunol 152: 2968-76（1994）；BetterおよびHorwitz、Methods Enzymol 178: 476-96（1989）；PluckthunおよびSkerra、Methods Enzymol 178: 497-515（1989）；Lamoyi、Methods Enzymol 121: 652-63（1986）；Rousseauxら、Methods Enzymol 121: 663-9（1986）；BirdおよびWalker、Trends Biotechnol 9: 132-7（1991）を参照されたい）。

【0096】

抗体を、ポリエチレングリコール（PEG）などの種々の分子と結合させることによって

10

20

30

40

50

修飾することもできる。本発明は、このような修飾抗体を提供する。修飾抗体は抗体を化学的に修飾することによって得ることができる。これらの修飾方法は当技術分野で慣例的である。

【0097】

または、本発明の抗体を、非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体の定常領域とのキメラ抗体として、または、非ヒト抗体由来の相補性決定領域(CDR)、ヒト抗体由来のフレームワーク領域(FR)および定常領域を含むヒト化抗体として入手することもできる。このような抗体は、既知の技術を用いて調製可能である。

【0098】

以上のようにして得られた抗体を均一になるまで精製してもよい。例えば、抗体を、一般的なタンパク質に対して用いられる分離法および精製法に従って分離および精製することができる。例えば、アフィニティークロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動など(しかし、これらには限定されない)を適切に選択・組み合わせることにより、抗体を分離および単離することができる(「A Laboratory Manual」、HarlowおよびDavid Lane編、Cold Spring Harbor Laboratory (1988))。プロテインAカラムおよびプロテインGカラムはアフィニティークラムとして用いられる。用いられるプロテインAカラムの例には、例えば、ハイパー-D、POROSおよびセファロースF.F.(ファルマシア)が含まれる。

【0099】

クロマトグラフィーの例には、アフィニティークロマトグラフィーを除いて、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィーなどが含まれる(「Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual」、Daniel R. Marshakら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。クロマトグラフィーの手順を、HPLCおよびFPLCなどの液相クロマトグラフィーによって行うこともできる。

【0100】

本発明の抗体の抗原結合活性を測定するには、例えば、吸光度、酵素結合免疫吸着アッセイ法(ELISA)、酵素免疫アッセイ法(EIA)、放射免疫アッセイ法(RIA)および/または免疫蛍光検査法を用いられる。ELISAの場合には、本発明の抗体をプレート上に固定化し、本発明のポリペプチドをプレートに対して添加した後に、抗体産生細胞の培養上清または精製抗体といった所望の抗体を含む試料を添加する。続いて、一次抗体を認識し、アルカリホスファターゼなどの酵素で標識された二次抗体を添加し、プレートをインキュベートする。次に、洗浄の後に、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質をプレートに添加して、試料の抗原結合活性を評価するために吸光度を測定する。C末端断片またはN末端断片といったポリペプチドの断片を、抗体の結合活性を評価するための抗原として用いてもよい。BIAcore(ファルマシア)を、本発明による抗体の活性の評価に用いてもよい。

【0101】

以上の方法は、本発明の抗体を本発明のポリペプチドを含むと想定される試料に対して曝露させ、抗体およびポリペプチドによって形成された免疫複合体を検出または測定することにより、本発明のポリペプチドの検出または測定を可能にする。

【0102】

本発明によるポリペプチドの検出または測定の方法はポリペプチドを特異的に検出または測定することが可能であるため、本方法はポリペプチドが用いられる種々の実験に有用と思われる。

【0103】

本発明はまた、ヒトCXADR1、GCUD1、またはRNF43タンパク質をコードするポリヌクレオチド(配列番号:1、3、または5)またはその相補鎖とハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドも提供する。本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするDNAと特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドであ

10

20

30

40

50

ることが好ましい。本明細書で用いる「特異的にハイブリダイズする」という用語は、他のタンパク質のコードするDNAとのクロスハイブリダイゼーションが、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、顕著には起こらないことを意味する。このようなポリヌクレオチドには、本発明のポリペプチドをコードするDNAまたはその相補鎖と特異的にハイブリダイズする、プローブ、プライマー、ヌクレオチド、およびヌクレオチド誘導体（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびリボザイム）が含まれる。さらに、このようなポリヌクレオチドをDNAチップの調製のために利用することもできる。

【0104】

本発明は、配列番号：1、3、または5のヌクレオチド配列の内部のいずれかの部位とハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号：1、3、または5のヌクレオチド配列のうち少なくとも15個の連続したヌクレオチドに対するものであることが好ましい。上記の少なくとも15個の連続したヌクレオチド中に1つの開始コドンを含む、上記のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、さらに好ましい。より具体的に述べると、このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドには、CXADRL1の発現を抑制する目的で配列番号：23または25のヌクレオチド配列を；GCUD1の場合には配列番号：27または29のヌクレオチド配列を；RNF43の場合には配列番号：31のヌクレオチド配列を含むものが含まれる。

10

【0105】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの誘導体または修飾産物をアンチセンスオリゴヌクレオチドとして用いることもできる。このような修飾産物の例には、メチルホスホネート型またはエチルホスホネート型などの低級アルキルホスホネート修飾物、ホスホロチオエート修飾物、およびホスホロアミデート修飾物が含まれる。

20

【0106】

本明細書で用いる「アンチセンスオリゴヌクレオチド」という用語は、DNAまたはmRNAの特定領域を構成するものに対応するヌクレオチドが完全に相補的であるものだけでなく、1つまたは複数のヌクレオチドにミスマッチがあるものも、そのDNAまたはmRNAおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドが配列番号：1、3、または5のヌクレオチド配列と特異的にハイブリダイズしうる限りは含まれる。

【0107】

このようなポリヌクレオチドは、「少なくとも15個の連続したヌクレオチド配列の領域」内に、少なくとも70%またはそれ以上、好ましくは80%またはそれ以上、より好ましくは90%またはそれ以上、さらにより好ましくは95%またはそれ以上の相同性を有するものとして含まれる。相同性の決定には本明細書に述べるアルゴリズムを用いる。このようなポリヌクレオチドは、以下の実施例の項で述べるように、本発明のポリペプチドをコードするDNAの単離もしくは検出のためのプローブとして、または増幅用のプライマーとして有用である。

30

【0108】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、ポリペプチドをコードするDNAまたはmRNAと結合し、その転写または翻訳を阻害して、mRNAの分解を促進し、本発明のポリペプチドの発現を阻害して、それによってポリペプチドの機能を阻害することにより、本発明のポリペプチドを産生する細胞に対して作用する。

40

【0109】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、誘導体に対して活性のない適した基材と混合することにより、リニメント剤または湿布剤などの外用製剤の形にすることができる。

【0110】

同様に、必要に応じて、誘導体を、賦形剤、等張剤、溶解補助剤、安定剤、保存料、鎮痛薬などを添加することにより、錠剤、粉剤、顆粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻薬および凍結乾燥製剤として製剤化することもできる。これらは

50

通常の方法に従って調製可能である。

【0111】

アンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、罹患部位に対して直接外用することにより、またはそれが罹患部位に到達するように血管内に注入することにより、患者に対して投与される。持続性および膜透過性を高めるためにアンチセンス用マウント培地を用いることもできる。その例には、リボソーム、ポリ-L-リジン、脂質、コレステロール、リポフェクチンまたはこれらの誘導体がある。

【0112】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の投与量は、患者の状態に従って適切に調整した上で、望ましい量を用いることができる。例えば、0.1~100mg/kg、好ましくは0.1~50mg/kgの範囲の用量を投与することができる。

10

【0113】

本発明はまた、配列番号：1、3、または5のヌクレオチド配列のセンス鎖核酸およびアンチセンス鎖核酸の組み合わせを含む、低分子干渉RNA (siRNA) も含む。より具体的に述べると、RNF43の発現を抑制するためのこの種のsiRNAには、センス鎖に配列番号：40、41、42、または43のヌクレオチド配列を含むものが含まれる。また、CXADRL1の発現を抑制するためのsiRNAには、センス鎖に配列番号：62または63のヌクレオチド配列を含むものが含まれる。

【0114】

「siRNA」という用語は、標的mRNAの翻訳を妨げる二本鎖RNA分子を指す。siRNAを細胞に導入するためには、RNAを転写するための鋳型としてDNAを用いることを含む、標準的な技法が用いられる。siRNAは、ヒトCXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質をコードするポリヌクレオチド (配列番号：1、3、または5) のセンス核酸配列およびアンチセンス核酸配列を含む。siRNAは、例えばヘアピンのように、単一の転写物 (二本鎖RNA) が標的遺伝子由来のセンス配列および相補的アンチセンス配列の両方を有するように構築される。

20

【0115】

本方法は、細胞の遺伝子発現、すなわち、例えば細胞の悪性転移の結果として、上方制御されているCXADRL1、GCUD1、またはRNF43の発現を変化させるために用いられる。標的細胞におけるsiRNAとCXADRL1、GCUD1、またはRNF43転写物との結合は、細胞によるタンパク質産生の減少を引き起こす。オリゴヌクレオチドの長さは少なくとも10ヌクレオチドであり、天然の転写物程度の長さであってもよい。オリゴヌクレオチドが19~25ヌクレオチド長であることが好ましい。最も好ましくは、オリゴヌクレオチドは75、50、25ヌクレオチド長である。哺乳動物細胞における発現を阻害するCXADRL1、GCUD1、またはRNF43 siRNAオリゴヌクレオチドの例には、配列番号：112~114のいずれかを含むオリゴヌクレオチドが含まれる。これらの配列はそれぞれ、以下のsiRNA配列の標的配列である：

30

配列番号：112、配列番号：40、41 (RNF43)；

配列番号：113、配列番号：42、43 (RNF43)；および

配列番号：114、配列番号：62、63 (CXADRL1)。

【0116】

siRNAのヌクレオチド配列は、アンピオン社 (Ambion) のウェブサイト (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) から入手しうるsiRNA設計用のコンピュータプログラムを用いて設計することができる。siRNAに関するヌクレオチド配列は、コンピュータプログラムにより、以下のプロトコールに基づいて選択される。

40

【0117】

siRNA標的部位の選択：

1. 目的の転写物のAUG開始コドンから開始して、AAジヌクレオチド配列に関して下流へとスキャンする。各AAおよび3'側に隣接した19ヌクレオチドの出現率をsiRNA標的の可能性のある部位として記録する。Tuschlらは、siRNAを5'および3'非翻訳領域 (UTR) ならびに開始コドン付近 (75塩基内) の領域に対しては設計しないように推奨しており、これは、

50

これらの領域には調節タンパク質の結合部位が多く含まれる可能性があるためである。UTR結合タンパク質および/または翻訳開始複合体は、siRNAエンドヌクレアーゼ複合体の結合を妨げる可能性がある。

2. 標的の可能性のある部位をヒトゲノムデータベースと比較し、他のコード配列と明らかな相同性を有するなどの標的領域も検討から除外する。相同性検索はBLASTを用いて行うことができ、これはNCBIのサーバー：www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/上にある。

3. 合成用の適格な標的配列を選択する。アンピオン社では、遺伝子の全長に沿っていくつかの標的配列を評価用に選択することができる。

【0118】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAは本発明のポリペプチドの発現を阻害し、そのため、本発明のポリペプチドの生物学的活性を抑制するのに有用である。同様に、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAを含む発現阻害物質も、それらが本発明のポリペプチドの生物学的活性を阻害するという点で有用である。このため、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAを含む組成物は癌などの細胞増殖性疾患の治療に有用である。

10

【0119】

さらに、本発明は、本発明のポリペプチドの発現レベルを診断マーカーとして利用して、細胞増殖性疾患を診断するための方法も提供する。

【0120】

この診断方法は、(a)本発明のCXADRL1、GCUD1、またはRNF43遺伝子の発現レベルを検出する段階、および(b)発現レベルの上昇を癌などの細胞増殖性疾患と関連づける段階を含む。

20

【0121】

個々の標本におけるCXADRL1、GCUD1、またはRNF43遺伝子の発現レベルは、CXADRL1、GCUD1もしくはRNF43遺伝子に対応するmRNA、またはCXADRL1、GCUD1もしくはRNF43遺伝子によってコードされるタンパク質を定量することによって評価することができる。mRNAの定量法は当業者に周知である。例えば、CXADRL1、GCUD1、またはRNF43遺伝子に対応するmRNAのレベルは、ノーザンプロット分析またはRT-PCRによって評価しうる。CXADRL1、GCUD1、またはRNF43遺伝子の完全長ヌクレオチド配列は配列番号：1、3、または5に示されているため、当業者はいずれも、CXADRL1、GCUD1、またはRNF43遺伝子を定量するためのプロ

30

【0122】

CXADRL1、GCUD1、またはRNF43遺伝子の発現レベルも、遺伝子によってコードされるタンパク質の活性または量に基づいて分析することができる。CXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質の量を決定するための方法は以下に示されている。例えば、免疫アッセイ法は、生物材料におけるタンパク質の決定に有用である。いかなる生物材料も、タンパク質またはその活性の決定に有用な可能性がある。例えば、血液試料は、血清マーカーによってコードされるタンパク質の評価を目的として分析される。一方、CXADRL1、GCUD1、またはRNF43遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を決定するためには、分析しようとする各タンパク質の活性に応じて適した方法が選択されうる。

40

【0123】

標本(被験試料)におけるCXADRL1、GCUD1、またはRNF43遺伝子の発現レベルを評価し、正常試料における発現レベルと比較する。このような比較によって標的遺伝子の発現レベルが正常試料における発現レベルよりも高いことが示された場合には、その対象は細胞増殖性疾患に罹患していると判断される。正常試料由来および対象由来の標本におけるCXADRL1、GCUD1、またはRNF43遺伝子の発現レベルは同時に決定してもよい。または、あらかじめ対照群から採取しておいた標本の遺伝子発現レベルを分析することで得た結果に基づく統計学的方法によって、発現レベルの正常範囲を決定することもできる。対象の試料と比較して得た結果をその正常範囲と比較する；その結果が正常範囲内に収まらない場合には、対象は細胞増殖性疾患に罹患していると判断される。本発明において、診断しよう

50

とする細胞増殖性疾患は、好ましくは癌である。より好ましくは、CXADR1またはGCUD1遺伝子の発現レベルを評価し、正常試料におけるものと比較する場合、診断しようとする細胞増殖性疾患は胃癌、結腸直腸癌、または肝臓癌である；ならびに、RNF43遺伝子とその発現レベルに関して評価する場合には、診断しようとする疾患は結腸直腸癌、肺癌、胃癌、または肝臓癌である。

【0124】

本発明においては、胃癌、結腸直腸癌、肺癌および肝臓癌を含む癌などの細胞増殖性疾患を診断するための診断薬も提供される。本発明の診断薬は、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドと結合する化合物を含む。本発明のポリヌクレオチドとハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、または本発明のポリペプチドと結合する抗体をこのような化合物として用いることが好ましい。

10

【0125】

さらに、本発明は、本発明のポリペプチドを用いる、細胞増殖性疾患を治療するための化合物のスクリーニング方法を提供する。このスクリーニング方法の1つの態様には、(a) 被験化合物を本発明のポリペプチドと接触させる段階、(b) 本発明のポリペプチドと被験化合物との結合活性を検出する段階、および(c) 本発明のポリペプチドと結合する化合物を選択する段階が含まれる。

【0126】

スクリーニングに用いる本発明のポリペプチドは、組換えポリペプチドでも天然のタンパク質でもよく、またはそれらの部分ペプチドでもよい。任意の被験化合物、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵性微生物の産物、海洋生物からの抽出物、植物抽出物、精製タンパク質または粗タンパク質、ペプチド、非ペプチド化合物、合成マイクロ分子化合物 (synthetic micromolecular compound)、および天然化合物を用いることができる。被験化合物と接触させる本発明のポリペプチドは、例えば、精製ポリペプチド、可溶性タンパク質、担体と結合した形態、または他のポリペプチドと融合した融合タンパク質でありうる。

20

【0127】

本発明のポリペプチドを用いて、タンパク質、例えば本発明のポリペプチドと結合するタンパク質をスクリーニングする方法としては、当業者に周知の多くの方法を用いることができる。このようなスクリーニングは、例えば、免疫沈降方法により、具体的には以下の様式で行うことができる。pSV2neo、pcDNA 1およびpCD8といった外来遺伝子用の発現ベクターに対して遺伝子を挿入することにより、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子を動物細胞などで発現させる。発現のために用いるプロモーターは一般に用いられる任意のプロモーターでよく、これには例えば、SV40初期プロモーター (Rigby, Williamson (編)、「Genetic Engineering」第3巻、Academic Press、London、83-141 (1982))、EF-1プロモーター (Kimら、Gene 91: 217-23 (1990))、CAGプロモーター (Niwaら、Gene 108: 193-200 (1991))、RSV LTRプロモーター (Cullen、Methods in Enzymology 152: 684-704 (1987))、SRプロモーター (Takebeら、Mol Cell Biol 8: 466 (1988))、CMV最初期プロモーター (SeedおよびAruffo、Proc Natl Acad Sci USA 84: 3365-9 (1987))、SV40後期プロモーター (GheysenおよびFiers、J Mol Appl Genet 1: 385-94 (1982))、アデノウイルス後期プロモーター (Kaufmanら、Mol Cell Biol 9: 946 (1989))、HSV TKプロモーターなどが含まれる。外来遺伝子を発現させるための動物細胞への遺伝子の導入は任意の方法に従って行うことができ、これには例えば、電気穿孔法 (Chuら、Nucleic Acids Res 15: 1311-26 (1987))、リン酸カルシウム法 (ChenおよびOkayama、Mol Cell Biol 7: 2745-52 (1987))、DEAEデキストラン法 (Lopataら、Nucleic Acids Res 12: 5707-17 (1984) ; SussmanおよびMilman、Mol Cell Biol 4: 1642-3 (1985))、リポフェクション法 (Derijard、B Cell 7: 1025-37 (1994) ; Lambら、Nature Genetics 5: 22-30 (1993)) ; Rabindranら、Science 259: 230-4 (1993)) などがある。本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドのN末端またはC末端に対する特異性が判明しているモノクローナル抗体のエピトープを導入することにより、モノクローナル抗体の認識部位 (エピトープ)

30

40

50

を含む融合タンパク質として発現させることができる。市販のエピトープ-抗体系を用いることもできる (Experimental Medicine 13: 85-90 (1995))。例えば -ガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質 (GFP) などとの融合タンパク質を、マルチクローニングサイトを用いることによって発現せうるベクターが市販されている。

【0128】

融合によって本発明のポリペプチドの性質を変えないように数個～十数個のアミノ酸からなる小さなエピトープのみを導入することによって作製された融合タンパク質も報告されている。ポリヒスチジン (Hisタグ)、インフルエンザ凝集素HA、ヒトc-myc、FLAG、水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質 (VSV-GP)、T7遺伝子10タンパク質 (T7タグ)、ヒト単純ヘルペスウイルス糖タンパク質 (HSVタグ)、Eタグ (モノクローナルファージ上のエピトープ) などのエピトープ、およびそれらを認識するモノクローナル抗体を、本発明のポリペプチドと結合するタンパク質のスクリーニングのためのエピトープ-抗体系として用いることができる (Experimental Medicine 13: 85-90 (1995))。

10

【0129】

免疫沈降の場合には、適切な界面活性剤を用いて調製した細胞可溶化物にこれらの抗体を添加することにより、免疫複合体を形成させる。免疫複合体は、本発明のポリペプチド、そのポリペプチドとの結合能があるポリペプチド、および抗体からなる。以上のエピトープに対する抗体を用いることに加えて、免疫沈降を本発明のポリペプチドに対する抗体を用いて行うこともでき、これらの抗体は上記の通りに調製することができる。

20

【0130】

免疫複合体は、抗体がマウスIgG抗体であれば、例えばプロテインAセファロースまたはプロテインGセファロースによって沈降させることができる。本発明のポリペプチドをGSTなどのエピトープとの融合蛋白質として作製する場合には、これらのエピトープと特異的に結合する基質、例えばグルタチオン-セファロース4Bを用いて、本発明のポリペプチドに対する抗体を用いる時と同じ様式で免疫複合体を形成させることができる。

【0131】

免疫沈降は、例えば、文献中に記載された方法に倣ってまたは従って行うことができる (HarlowおよびLane、*「Antibodies」*、511-52、Cold Spring Harbor Laboratory publications、New York (1988))。

30

【0132】

SDS-PAGEは免疫沈降したタンパク質の分析に一般に用いられており、結合したタンパク質はゲルを適切な濃度で用いてタンパク質の分子量によって分析することができる。本発明のポリペプチドと結合したタンパク質をクーマシー染色または銀染色などの一般的な染色法によって検出することは困難であるため、タンパク質に関する検出感度は、放射性同位体である³⁵S-メチオニンまたは³⁵S-システインを含む培養液中で細胞を培養し、細胞内のタンパク質を標識した上でタンパク質を検出することによって改善することができる。タンパク質の分子量がわかっている場合には、標的タンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲルから直接精製して、その配列を決定することができる。

【0133】

ポリペプチドを用いる、本発明のポリペプチドと結合するタンパク質のスクリーニングのための方法として、例えば、ウエスト-ウエスタンプロット分析 (Skolnikら、Cell 65: 83-90 (1991)) を用いることができる。具体的には、本発明のポリペプチドと結合するタンパク質は、細胞、組織、臓器 (例えば、CXADR11にと結合するタンパク質のスクリーニングのためには精巣および卵巣; GCUD1と結合するタンパク質のスクリーニングのためには精巣、卵巣、および脳; ならびに、RNF43と結合するタンパク質のスクリーニングのためには胎児肺および胎児腎臓などの組織)、または本発明のポリペプチドと結合するタンパク質を発現すると予想される培養細胞から、ファージベクター (例えば、ZAP) を用いてcDNAライブラリーを作製し、タンパク質をLB-アガロース上で発現させ、発現したタンパク質をフィルター上に固定し、精製および標識がなされた本発明のポリペプチドを上

40

50

記のフィルターと反応させ、かつ本発明のポリペプチドと結合したタンパク質を発現するプラークを標識によって検出することによって得ることができる。本発明のポリペプチドは、ビオチンとアビジンとの結合を利用することにより、または本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体、もしくは本発明のポリペプチドと融合したペプチドもしくはポリペプチド（例えば、GST）を利用することにより、標識しうる。放射性同位体または蛍光などを用いる方法を用いてもよい。

【0134】

または、本発明のスクリーニング方法のもう1つの態様において、細胞を利用する2-ハイブリッド系を用いることもできる（「MATCHMAKER 2-ハイブリッド系（MATCHMAKER Two-Hybrid system）」、「哺乳動物MATCHMAKER 2-ハイブリッドアッセイキット（Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit）」、「MATCHMAKER 1-ハイブリッド系（MATCHMAKER one-Hybrid system）」（クロンテック）；「HybriZAP 2-ハイブリッドベクター系（HybriZAP Two-Hybrid Vector System）」（ストラタジーン（Stratagene））；参考文献「DaltonおよびTreisman、Cell 68: 597-612 (1992)」、「FieldsおよびSternglanz、Trends Genet 10: 286-92 (1994)」）。

【0135】

2-ハイブリッド系では、本発明のポリペプチドをSRF結合領域またはGAL4結合領域と融合させて、酵母細胞で発現させる。本発明のポリペプチドと結合するタンパク質を発現すると予想される細胞から、ライブラリーが発現した場合にVP16またはGAL4転写活性化領域と融合させるように、cDNAライブラリーを作成する。続いてcDNAライブラリーを上記の酵母細胞に導入し、検出された陽性クローンからライブラリーに由来するcDNAを単離する（本発明のポリペプチドと結合するタンパク質を酵母細胞で発現させる場合には、この2つの結合によってレポーター遺伝子が活性化され、陽性クローンが検出されるようになる）。cDNAによってコードされるタンパク質は、以上のようにして単離したcDNAを大腸菌に導入してタンパク質を発現させることによって調製しうる。

【0136】

レポーター遺伝子としては、HIS3遺伝子のほかに、例えば、Ade2遺伝子、lacZ遺伝子、CAT遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子などを用いることができる。

【0137】

本発明のポリペプチドと結合する化合物を、アフィニティークロマトグラフィーを用いてスクリーニングすることもできる。例えば、本発明のポリペプチドをアフィニティークラムの担体上に固定化し、本発明のポリペプチドと結合しうるタンパク質を含む被験化合物をカラムに対して適用してもよい。本明細書における被験化合物は、例えば、細胞抽出物、細胞可溶化物などであってよい。被験化合物のローディング後に、カラムを洗浄し、本発明のポリペプチドと結合した化合物を調製することができる。

【0138】

被験化合物がタンパク質である場合には、得られたタンパク質のアミノ酸配列を分析して、その配列に基づいてオリゴDNAを合成し、そのオリゴDNAを、タンパク質をコードするDNAを得るためのプローブとして用いて、cDNAライブラリーをスクリーニングする。

【0139】

表面プラスモン共鳴現象を利用するバイオセンサーを、結合した化合物の検出または定量のための手段として本発明に用いることもできる。このようなバイオセンサーを用いると、ごく微量のポリペプチドのみを用いて、標識を行わずに、本発明のポリペプチドと被験化合物との相互作用を表面プラスモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することができる（例えば、BIAcore、ファルマシア）。このため、BIAcoreなどのバイオセンサーを用いて、本発明のポリペプチドと被験化合物との結合を評価することが可能である。

【0140】

本発明の固定化されたポリペプチドを合成化合物、または天然物バンク、またはランダムなファージペプチドディスプレイライブラリーに対して曝露させた場合に結合する分子をスクリーニングする方法、および、本発明のタンパク質と結合するタンパク質だけな

10

20

30

40

50

く化合物（アンタゴニストを含む）も単離するための、コンビナトリアル化学に基づくハイスループット技法を用いたスクリーニング方法（Wrightonら、Science 273: 458-64 (1996)；Verdine、Nature 384: 11-13 (1996)；Hogan、Nature 384: 17-9 (1996)）は当業者に周知である。

【0141】

または、本発明のスクリーニング方法は、

a) 候補化合物を、1つまたは複数のマーカー遺伝子の転写調節領域および転写調節領域の制御下で発現されるレポーター遺伝子を含むベクターが導入された細胞と接触させる段階（この際、1つまたは複数のマーカー遺伝子はCXADRL1、GCUD1、およびRNF43からなる群より選択される）；

b) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する段階；および

c) 前記レポーター遺伝子の発現レベルを対照と比較して低下させる化合物を選択する段階を含むうる。

【0142】

適したレポーター遺伝子および宿主細胞は当技術分野で周知である。スクリーニングのために必要なレポーター構築物は、マーカー遺伝子の転写調節領域を用いることによって作製しうる。マーカー遺伝子の転写調節領域が当業者に知られている場合には、事前の配列情報を用いることによってレポーター構築物を作製することができる。マーカー遺伝子の転写調節領域がまだ同定されていない場合には、転写調節領域を含むヌクレオチドセグメントを、マーカー遺伝子のヌクレオチド配列情報に基づいてゲノムライブラリーから単離することができる。

【0143】

このスクリーニングによって単離される化合物は、例えば、癌などの細胞増殖性疾患に起因する疾患の治療または予防を目的として、本発明のポリペプチドの活性を阻害する薬剤の候補である。本発明のポリペプチドに対する結合活性を有する、本スクリーニング方法によって得られた化合物の構造の一部が、付加、欠失、および/または置換によって変換された化合物は、本発明のスクリーニング方法によって得られる化合物に含まれる。

【0144】

さらにもう1つの態様において、本発明は、細胞増殖性疾患の治療において標的となる可能性のある候補物質をスクリーニングするための方法を提供する。以上に詳細に考察したように、CXADRL1、GCUD1、またはRNF43の発現レベルを制御することにより、胃癌、または結腸直腸癌、肺癌、胃癌、もしくは肝臓癌のいずれかの発症または進行を制御することが可能である。このため、細胞増殖性疾患の治療における標的の可能性のある候補物質を、CXADRL1、GCUD1、またはRNF43の発現レベルおよび活性を指標として用いるスクリーニングによって同定することができる。本発明の状況において、このようなスクリーニングには、例えば、

a) 候補化合物を、CXADRL1、GCUD1、またはRNF43を発現する細胞と接触させる段階；および

b) CXADRL1、GCUD1、またはRNF43の発現レベルを、被験化合物の非存在下で検出される発現レベルと比較して低下させる化合物を選択する段階が含まれていてもよい。

【0145】

CXADRL1、GCUD1、またはRNF43のうち少なくとも1つを発現する細胞には、例えば、胃癌、結腸直腸癌、肺癌、または肝臓癌から樹立された細胞株が含まれる；このような細胞は本発明の上記のスクリーニングのために用いることができる。発現レベルは当業者に周知の方法によって評価しうる。このスクリーニング方法では、CXADRL1、GCUD1、またはRNF43のうち少なくとも1つの発現レベルを低下させる化合物を候補薬剤として選択することができる。

【0146】

本発明の細胞増殖性疾患を治療するための化合物のスクリーニング方法のもう1つの態様において、本方法は、本発明のポリペプチドの生物学的活性を指標として用いる。本発

10

20

30

40

50

明のCXADRL1、GCUD1、およびRNF43タンパク質は細胞増殖を促進する活性を有するため、本発明のこれらのタンパク質のいずれかのこの活性を阻害する化合物を、この活性を指標として用いてスクリーニングすることができる。このスクリーニング方法は、(a)被験化合物を本発明のポリペプチドと接触させる段階、(b)段階(a)のポリペプチドの生物学的活性を検出する段階、および(c)被験化合物の非存在下で検出される生物学的活性と比較してポリペプチドの生物学的活性を抑制する化合物を選択する段階を含む。

【0147】

いかなるポリペプチドも、それらがCXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質の生物学的活性を有する限り、スクリーニングに用いることができる。このような生物学的活性には、ヒトCXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質の細胞増殖活性、RNF43のNOTCH2またはSTRINと結合する活性が含まれる。例えば、ヒトCXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質を用いることができ、これらのタンパク質と機能的に同等なポリペプチドを用いることもできる。このようなポリペプチドは細胞によって内因性に発現させても外因性に発現させてもよい。

10

【0148】

任意の被験化合物、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵性微生物の産物、海洋生物の抽出物、植物抽出物、精製タンパク質または粗タンパク質、ペプチド、非ペプチド化合物、合成マイクロ分子化合物、天然化合物を用いることができる。

【0149】

このスクリーニングによって単離される化合物は、本発明のポリペプチドのアンタゴニストの候補である。「アンタゴニスト」という用語は、本発明のポリペプチドとの結合によってそのポリペプチドの機能を阻害する分子を指す。さらに、このスクリーニングによって単離された化合物は、本発明のポリペプチドと分子(DNAおよびタンパク質を含む)とのインビボ相互作用を阻害する化合物の候補でもある。

20

【0150】

本方法において検出しようとする生物学的活性が細胞増殖である場合には、実施例の項に記載したように、例えば、本発明のポリペプチドを発現する細胞を作製し、細胞を被験化合物の存在下で培養して、細胞増殖の速度を評価し、細胞周期などを測定することにより、さらにはコロニー形成活性を測定することにより、生物学的活性を検出することができる。

30

【0151】

上記のスクリーニングによって単離される化合物は、本発明のポリペプチドの活性を阻害する薬剤の候補であり、本発明のポリペプチドと関連のある疾患、例えば、癌を含む細胞増殖性疾患の治療に応用することができる。より具体的に述べると、CXADRL1またはGCUD1タンパク質の生物学的活性を指標として用いる場合には、本方法によってスクリーニングされた化合物は胃癌、結腸直腸癌または肝臓癌の治療のための薬剤の候補としての役を果たす。一方、RNF43タンパク質の生物学的活性を指標として用いる場合には、本方法によってスクリーニングされた化合物は結腸直腸癌、肺癌、胃癌、または肝臓癌の治療のための薬剤の候補としての役を果たす。

【0152】

さらに、CXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質の活性を阻害する化合物の構造の一部が、付加、欠失、および/または置換によって変換された化合物も、本発明のスクリーニング方法によって得られる化合物に含まれる。

40

【0153】

本発明の細胞増殖性疾患を治療するための化合物のスクリーニング方法のさらにもう一つの態様において、本方法は、RNF43のNOTCH2またはSTRINとの結合能を利用する。本発明のRNF43タンパク質はNOTCH2およびSTRINと会合することが判明した。これらの所見は、本発明のRNF43タンパク質がNOTCH2およびSTRINなどの分子との結合を介して細胞増殖の機能を発揮することを示唆する。このため、RNF43タンパク質とNOTCH2またはSTRINとの結合を阻害することによって細胞増殖の阻害がもたらされ、この結合を阻害する化合物は癌など

50

の細胞増殖性疾患を治療するための調合薬として役立つことが予想される。本方法によってスクリーニングされた化合物によって治療される細胞増殖性疾患は、好ましくは結腸直腸癌、肺癌、胃癌、または肝臓癌である。

【0154】

このスクリーニング方法は、(a) 被験化合物の存在下で本発明のポリペプチドをNOTCH2またはSTRINと接触させる段階、(b) ポリペプチドとNOTCH2またはSTRINとの結合を検出する段階、および(c) ポリペプチドとNOTCH2またはSTRINとの結合を阻害する化合物を選択する段階を含む。

【0155】

このスクリーニングに用いられる本発明のRNF43ポリペプチド、およびNOTCH2またはSTRINは、組換えポリペプチドでも天然のタンパク質でもよく、または、相互の結合能を保っている限り、それらの部分ペプチドでもよい。スクリーニングに用いられるRNF43ポリペプチド、NOTCH2またはSTRINは、例えば、精製ポリペプチド、可溶性タンパク質、担体と結合した形態、または他のポリペプチドと融合した融合タンパク質でありうる。

【0156】

任意の被験化合物、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵性微生物の産物、海洋生物からの抽出物、植物抽出物、精製タンパク質または粗タンパク質、ペプチド、非ペプチド化合物、合成マイクロ分子化合物および天然化合物を用いることができる。

【0157】

RNF43タンパク質とNOTCH2またはSTRINとの結合を阻害する化合物のスクリーニング方法としては、当業者に周知の多くの方法を用いることができる。このようなスクリーニングは、インビトロアッセイ系、例えば細胞系において行うことができる。より具体的に述べると、まず、RNF43ポリペプチドまたはNOTCH2もしくはSTRINのいずれかを支持体に対して結合させ、それに対してもう一方のタンパク質を被験試料とともに添加する。次に、混合物をインキュベートし、洗浄した上で、支持体と結合したもう一方のタンパク質を検出および/または測定する。

【0158】

同じようにして、CXADRL1とAIP1との会合を妨げる化合物を本発明によって単離することができる。CXADRL1とAIP1との結合を阻害すると細胞増殖の抑制が生じることが予想され、この結合を阻害する化合物は、癌などの細胞増殖性疾患を治療するための調合薬として役立つ。

【0159】

タンパク質を結合させるために用いる支持体の例には、アガロース、セルロース、およびデキストランなどの不溶性多糖類、ならびにポリアクリルアミド、ポリスチレン、およびシリコンなどの合成樹脂が含まれる；以上の材料から作製された市販のビーズおよびプレート（例えば、マルチウェルプレート、バイオセンサーチップなど）を用いることが好ましい。ビーズを用いる場合には、それらをカラムに充填してもよい。

【0160】

タンパク質は、化学的結合および物理的吸着などの慣行の方法に従って支持体に結合させることができる。または、タンパク質は、タンパク質を特異的に認識する抗体を介して支持体に結合させてもよい。さらに、アビジンとビオチンの結合を利用して、タンパク質を支持体に結合させることもできる。

【0161】

タンパク質同士の結合は、緩衝液がタンパク質同士の結合を阻害しない限りは、例えばこれらに限定されないがリン酸緩衝液およびTris緩衝液の緩衝液中で行われる。

【0162】

本発明において、表面プラズモン共鳴現象を利用するバイオセンサーを、結合したタンパク質の検出または定量のための手段として用いることもできる。このようなバイオセンサーを用いると、ごく微量のポリペプチドのみを用いて、標識を行わずに、タンパク質同士の相互作用を表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することができる

10

20

30

40

50

(例えば、BIAcore、ファルマシア)。このため、BIAcoreなどのバイオセンサーを用いて、RNF43ポリペプチドとNOTCH2またはSTRINとの結合を評価することが可能である。

【0163】

または、RNF43ポリペプチドまたはNOTCH2もしくはSTRINのいずれかを標識し、結合したタンパク質の標識を、結合したタンパク質の検出または測定に用いることもできる。具体的には、タンパク質の一方をあらかじめ標識した後に、標識したタンパク質を被験化合物の存在下でもう一方のタンパク質と接触させ、洗浄後、結合したタンパク質を標識によって検出または測定する。

【0164】

本方法におけるタンパク質の標識のためには、放射性同位体(例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、酵素(例えば、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ)、蛍光物質(例えば、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ローダミン)およびビオチン/アビジンなどの標識物質を用いることができる。タンパク質を放射性同位体で標識する場合には、検出または測定を液体シンチレーションによって行うことができる。または、酵素で標識したタンパク質は、呈色などの基質の酵素的変化を検出するために、酵素基質を添加して吸光光度計で検出または測定することもできる。さらに、蛍光物質を標識として用いる場合には、結合したタンパク質を蛍光光度計を用いて検出または測定することができる。

【0165】

さらに、RNF43ポリペプチドとNOTCH2またはSTRINとの結合を、RNF43ポリペプチドおよびNOTCH2またはSTRINに対する抗体を用いて検出または測定することもできる。例えば、支持体上に固定させたRNF43ポリペプチドを被験化合物およびNOTCH2またはSTRINと接触させた後に、混合物をインキュベートし、洗浄した上で、NOTCH2またはSTRINに対する抗体を用いて検出または測定を行うことができる。または、NOTCH2またはSTRINを支持体上に固定化し、RNF43に対する抗体を抗体として用いてもよい。

【0166】

抗体を本スクリーニングに用いる場合には、抗体を上記の標識物質のいずれかで標識し、標識物質に基づいて検出または測定を行うことが好ましい。または、標識物質で標識した二次抗体によって検出されるように、RNF43ポリペプチド、NOTCH2またはSTRINに対する抗体を一次抗体として用いてもよい。さらに、本発明のスクリーニングにおいてタンパク質と結合した抗体は、プロテインGまたはプロテインAカラムを用いて検出または測定することもできる。

【0167】

または、本発明のスクリーニング方法のもう1つの態様において、細胞を利用する2-ハイブリッド系を用いることもできる(「MATCHMAKER 2-ハイブリッド系」「哺乳動物MATCHMAKER 2-ハイブリッドアッセイキット」「MATCHMAKER 1-ハイブリッド系」(クロンテック);「HybriZAP 2-ハイブリッドベクター系」(ストラタジーン);参考文献「Dalton およびTreisman, Cell 68: 597-612 (1992)」「FieldsおよびSternglanz, Trends Genet 10: 286-92 (1994)」)。

【0168】

2-ハイブリッド系では、本発明のRNF43ポリペプチドをSRF結合領域またはGAL4結合領域と融合させて、酵母細胞において発現させる。本発明のRNF43ポリペプチドと結合するNOTCH2またはSTRINをVP16またはGAL4転写活性化領域と融合させ、被験化合物の存在下で酵母細胞において同様に発現させる。被験化合物がRNF43ポリペプチドとNOTCH2またはSTRINとの結合を阻害しなければ、この2つの結合によってレポーター遺伝子が活性化され、陽性クローンが検出されるようになる。

【0169】

レポーター遺伝子としては、HIS3遺伝子のほかに、例えば、Ade2遺伝子、lacZ遺伝子、CAT遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子などを用いることができる。

【0170】

10

20

30

40

50

本スクリーニングによって単離される化合物は、本発明のRNF43タンパク質の活性を阻害する薬剤の候補であり、RNF43タンパク質と関連のある疾患、例えば、癌などの細胞増殖性疾患、より具体的には結腸直腸癌、肺癌、胃癌、または肝臓癌の治療に応用することができる。さらに、RNF43タンパク質とNOTCH2またはSTRINとの結合を阻害する化合物の構造の一部が、付加、欠失、および/または置換によって変換された化合物も、本発明のスクリーニング方法によって得られる化合物に含まれる。

【0171】

本発明の方法によって単離された化合物を、細胞増殖性疾患（例えば、癌）を治療するために、ヒトおよび他の哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、ヒヒ、チンパンジーに対して調合薬として投与する場合には、単離された化合物を直接投与してもよく、または既知の薬剤調製法を用いて剤形に製剤化してもよい。例えば、必要に応じて、薬剤を糖衣錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、およびマイクロカプセルとして経口投与することもでき、または水もしくは他の任意の薬学的に許容される液体との滅菌溶液もしくは懸濁液である注射剤の形態として非経口的に投与することもできる。例えば、化合物を、一般に認められる薬剤の実現のために必要な単位用量の形で、薬理的に許容される担体または媒体、具体的には滅菌水、生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、媒質、保存料、結合剤などと混合することができる。これらの製剤における有効成分の量により、指定された範囲内にある適した投与量が得られる。

【0172】

錠剤およびカプセル剤に混合しうる添加剤の例には、ゼラチン、コーンスターチ、トラガントゴムおよびアラビアゴムなどの結合剤；結晶セルロースなどの媒質；コーンスターチ、ゼラチンおよびアルギン酸などの膨潤剤；ステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤；スクロース、ラクトースまたはサッカリンなどの甘味料；ペパーミント、冬緑油およびチェリーなどの香味剤がある。単位投与剤形がカプセル剤である場合には、油などの液体担体も上記の成分にさらに含めることができる。注射用の滅菌混合物は、通常の薬剤の実現に倣って、注射用の蒸留水などの媒体を用いて製剤化することができる。

【0173】

生理食塩水、グルコース、ならびにD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトールおよび塩化ナトリウムなどの佐剤を含むその他の等張液を、注射用の水溶液として用いることができる。これらは適した可溶化剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、プロピレングリコールおよびポリエチレングリコールなどの多価アルコール、Polysorbate 80（商標）およびHCO-50などの非イオン性界面活性剤などと組み合わせて用いることができる。

【0174】

ゴマ油またはダイズ油は油脂性液体として用いることができ、これらを可溶化剤としての安息香酸ベンジルまたはベンジルアルコールと組み合わせて用いることもでき、さらにこれらをリン酸緩衝液および酢酸ナトリウム緩衝液などの緩衝液；塩酸プロカインなどの鎮痛薬；ベンジルアルコール、フェノールなどの安定剤；および抗酸化剤とともに製剤化することもできる。調製された注射剤は適したアンプルに充填することができる。

【0175】

本発明の医薬化合物を、例えば動脈内注射、静脈内注射、皮下注射として、および同じく鼻腔内投与、経気管支投与、筋肉内投与または経口投与として患者に対して投与するためには、当業者によく知られた方法を用いることができる。投与量および投与方法は患者の体重および年齢ならびに投与方法に応じて異なる；しかし、当業者は慣行的にそれらを選択しうる。前記化合物がDNAによってコードされうる場合には、DNAを遺伝子治療用のベクターに挿入し、治療を行うためにそのベクターを投与することができる。投与量および投与方法は患者の体重、年齢および症状に応じて異なるが、当業者はそれらを適切に選択しうる。

【0176】

例えば、症状によって若干の違いはあるものの、本発明のポリペプチドと結合してその活性を調節する化合物の投与量は、標準的な成人（体重60kg）に対して経口投与する場合、約0.1mg～約100mg/日、好ましくは約1.0mg～約50mg/日、より好ましくは約1.0mg～約20mg/日である。

【0177】

標準的な成人（体重60kg）に対して注射剤の形態として非経口的に投与する場合には、患者、標的臓器、症状および投与方法に応じて若干の違いはあるものの、約0.01mg～約30mg/日、好ましくは約0.1～約20mg/日、より好ましくは約0.1～約10mg/日の用量を静脈注射することが好都合である。同じく、他の動物の場合にも、体重60kgに換算した量を投与することが可能である。

10

【0178】

さらに、本発明は、本発明のポリペプチドに対する抗体を用いる、癌などの細胞増殖性疾患の治療または予防のための方法を提供する。本方法によれば、本発明のポリペプチドに対する抗体の薬学的有効量を投与する。CXADRL1、GCUD1、およびRNF43タンパク質の発現は癌細胞で上方制御されている上に、これらのタンパク質の発現の抑制は細胞増殖活性の低下をもたらすため、抗体とこれらのタンパク質との結合により、細胞増殖性疾患の治療または予防が可能であると考えられる。このため、本発明のポリペプチドに対する抗体は、本発明のタンパク質の活性を低下させるのに十分な投与量（これは0.1～約250mg/kg/日の範囲にある）で投与される。成人に対する用量の範囲は一般に約5mg～約17.5g/日であり、好ましくは約5mg～約10g/日、最も好ましくは約100mg～約3g/日である。

20

【0179】

または、腫瘍細胞に特異的な細胞表面マーカーと結合する抗体を薬物送達のためのツールとして用いることもできる。例えば、細胞障害物質と結合させた抗体を、腫瘍細胞を損傷させるのに十分な用量として投与する。

【0180】

本発明はまた、抗腫瘍免疫を誘導する方法であって、CXADRL1、GCUD1もしくはRNF43タンパク質もしくはその免疫活性断片、またはタンパク質をコードするポリヌクレオチドもしくはその断片を投与する段階を含む方法にも関する。CXADRL1、GCUD1、またはRNF43タンパク質またはその免疫活性断片は、細胞増殖性疾患に対するワクチンとして有用である。場合によっては、タンパク質またはその断片を、T細胞受容体（TCR）と結合した形態、またはマクロファージ、樹状細胞（DC）もしくはB細胞などの抗原提示細胞（APC）によって提示された形態として投与することもできる。DCの抗原提示能力が高いことから、APCの中でDCを用いることが最も好ましい。

30

【0181】

本発明において、細胞増殖性疾患に対するワクチンとは、動物に接種した時に抗腫瘍免疫を誘導する機能を有する物質を指す。本発明によれば、配列番号：80、97または108のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、RNF43を発現する結腸直腸癌細胞、肺癌細胞、胃癌細胞、または肝臓癌細胞に対して強力かつ特異的な免疫応答を誘導しうるHLA-A24またはHLA-A*0201拘束的なエピトープペプチドであることが示唆された。本発明によれば、配列番号：124のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、CXADRL1を発現する結腸直腸癌細胞、胃癌細胞、または肝臓癌細胞に対して強力かつ特異的な免疫応答を誘導しうるHLA-A*0201拘束的なエピトープペプチドであることが示唆された。本発明によれば、配列番号：164のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、GCUD1を発現する結腸直腸癌細胞、胃癌細胞、または肝臓癌細胞に対して強力かつ特異的な免疫応答を誘導しうるHLA-A*0201拘束的なエピトープペプチドであることが示唆された。したがって、本発明は、配列番号：80、97、108、124、または164のアミノ酸配列を含むポリペプチドを用いて抗腫瘍免疫を誘導する方法も含む。一般に、抗腫瘍免疫には以下のような免疫応答が含まれる：

40

- 腫瘍に対する細胞障害性リンパ球の誘導
- 腫瘍を認識する抗体の誘導、および
- 抗腫瘍サイトカイン産生の誘導。

50

【0182】

このため、ある特定のタンパク質が、動物に接種した時にこれらの免疫応答を誘導する場合には、そのタンパク質は抗腫瘍免疫誘導作用を有すると判定される。タンパク質による抗腫瘍免疫の誘導は、宿主におけるタンパク質に対する免疫系の応答をインビボまたはインビトロで観察することによって検出する。

【0183】

例えば、細胞障害性Tリンパ球の誘導を検出するための方法はよく知られている。生体の内部に進入する外来物質は、抗原提示細胞（APC）の作用によってT細胞およびB細胞に対して提示される。APCにより提示された抗原に対して抗原特異的な様式で応答したT細胞は、抗原による刺激のために細胞障害性T細胞（または細胞障害性Tリンパ球；CTL）に分化した後に増殖する（これはT細胞の活性化と呼ばれる）。したがって、特定のペプチドによるCTL誘導は、そのペプチドをAPCによりT細胞に対して提示させ、CTLの誘導を検出することによって評価することができる。さらに、APCにはCD4+ T細胞、CD8+ T細胞、マクロファージ、好酸球およびNK細胞を活性化する作用もある。CD4+ T細胞およびCD8+ T細胞も抗腫瘍免疫において重要であるため、これらの細胞の活性化作用を指標として用いてペプチドの抗腫瘍免疫誘導作用を評価することができる。

10

【0184】

樹状細胞（DC）をAPCとして用いてCTLの誘導作用を評価するための方法は当技術分野で周知である。DCはAPCの中でも最も強いCTL誘導作用を有する代表的なAPCである。この方法では、まず被験ポリペプチドをDCと接触させ、続いてこのDCをT細胞と接触させる。DCとの接触後に目的の細胞に対する細胞障害作用を有するT細胞が検出されれば、被験ポリペプチドが細胞障害性T細胞を誘導する活性を持つことが示される。腫瘍に対するCTLの活性は、例えば、⁵¹Cr標識した腫瘍細胞の溶解を指標として用いて検出することができる。または、³H-チミジン取り込み活性またはLDH（ラクトースデヒドロゲナーゼ）放出を指標として用いて腫瘍細胞の損傷の程度を評価する方法もよく知られている。

20

【0185】

DC以外に、末梢血単核細胞（PBMC）をAPCとして用いてもよい。CTLの誘導は、PBMCをGM-CSFおよびIL-4の存在下で培養することによって増強されることが報告されている。同様に、CTLは、PBMCをキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）およびIL-7の存在下で培養することによっても誘導されることが示されている。

30

【0186】

これらの方法によってCTL誘導活性を有することが確認された被験ポリペプチドは、DC活性化作用とそれに続くCTL誘導活性とを有するポリペプチドである。このため、腫瘍細胞に対するCTLを誘導するポリペプチドは腫瘍に対するワクチンとして有用である。さらに、ポリペプチドとの接触によって腫瘍に対するCTLを誘導する能力を獲得したAPCも腫瘍に対するワクチンとして有用である。さらに、APCによるポリペプチド抗原の提示によって細胞障害性を獲得したCTLを腫瘍に対するワクチンとして用いることもできる。APCおよびCTLに起因する抗腫瘍免疫を用いた、腫瘍に対するこのような治療方法は、細胞免疫療法と呼ばれる。

【0187】

一般に、細胞免疫療法のためにポリペプチドを用いる場合には、構造の異なる複数のポリペプチドを併用し、それらをDCと接触させることによってCTL誘導の効率が高まることが知られている。このため、DCをタンパク質断片で刺激する場合には、多くの種類の断片の混合物を用いることが有利である。

40

【0188】

または、ポリペプチドによる抗腫瘍免疫の誘導を、腫瘍に対する抗体産生の誘導を観察することによって確認することもできる。例えば、ポリペプチドに対する抗体が、ポリペプチドで免疫した実験動物において誘導された場合、および腫瘍細胞の増殖がこのような抗体によって抑制された場合には、そのポリペプチドは抗腫瘍免疫を誘導する能力があると判定することができる。

50

【0189】

抗腫瘍免疫は本発明のワクチンを投与することによって誘導され、抗腫瘍免疫の誘導により、胃癌、結腸直腸癌、肺癌、および肝臓癌などの細胞増殖性疾患の治療および予防が可能になる。癌に対する治療法または癌の発症の予防は、癌細胞の増殖の阻害、癌の退縮、および癌の発症の抑制といった段階のいずれかを含む。癌を有する個体の死亡率の低下、血液中の腫瘍マーカーの減少、癌に付随する検出可能な症状の緩和なども癌の治療または予防に含まれる。このような治療効果および予防効果は統計学的に有意であることが好ましい。例えば、観測値で、細胞増殖性疾患に対するワクチンの治療効果または予防効果をワクチン投与を行わない対照と比較して、5%またはそれ未満は有意水準である。統計分析には、例えば、スチューデントのt検定、マン-ホイットニーのU検定またはANOVAを用いる。

10

【0190】

免疫学的活性を有する上記のタンパク質、またはタンパク質をコードするベクターを、アジュバントと併用してもよい。アジュバントとは、免疫学的活性を有するタンパク質と同時に（または連続して）投与した場合に、そのタンパク質に対する免疫応答を増強する化合物を指す。アジュバントの例には、コレラ毒素、サルモネラ毒素、ミョウバンなどが含まれるが、これらには限定されない。さらに、本発明のワクチンを薬学的に許容される担体と適宜配合してもよい。このような担体の例には、滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液などが含まれる。さらに、ワクチンが必要に応じて、安定剤、懸濁剤、保存料、界面活性剤などを含んでもよい。ワクチンは全身的または局所的に投与される。ワクチン投与は単回投与によって行ってもよく、または多回投与による追加刺激を行ってもよい。

20

【0191】

APCまたはCTLを本発明のワクチンとして用いる場合に、腫瘍を、例えばエキスピボの方法によって治療または予防することができる。より具体的に述べると、治療または予防を受ける対象のPBMCを採取し、細胞をエキスピボでポリペプチドと接触させ、APCまたはCTLの誘導後に、細胞を対象に対して投与することができる。ポリペプチドをコードするベクターをPBMC中にエキスピボで導入することによってAPCを誘導することもできる。インビトロで誘導されたAPCまたはCTLは投与前にクローニングすることができる。標的細胞を損傷させる活性の高い細胞のクローニングおよび増殖を行うことにより、細胞免疫療法をさらに効率的に行うことができる。さらに、このようにして単離されたAPCおよびCTLは、細胞が由来する個体における細胞免疫療法のみならず、他の個体の同様の種類の腫瘍にも用いる。

30

【0192】

さらに、本発明のポリペプチドの薬学的有効量を含む、癌などの細胞増殖性疾患の治療または予防のための薬学的組成物も提供する。本薬学的組成物は抗腫瘍免疫を生じさせるために用いる。CXADRL1の通常の発現は精巣および卵巣に局限している；GCUD1の通常の発現は精巣、卵巣、および脳に局限している；ならびに、RNF43の通常の発現は胎児、より具体的には胎児の肺および腎臓に局限している。このため、これらの遺伝子の抑制は他の臓器には有害な影響を及ぼさないと考えられる。したがって、CXADRL1およびGCUD1ポリペプチドは細胞増殖性疾患、特に胃癌、結腸直腸癌、または肝臓癌を治療するのに好ましい；RNF43ポリペプチドは細胞増殖性疾患、特に結腸直腸癌、肺癌、胃癌、および肝臓癌を治療するのに好ましい。さらに、配列番号：80、97および108のアミノ酸配列を含むRNF43のペプチド断片はそれぞれ、RNF43に対する免疫応答を誘導することが判明しているため、配列番号：80、97または108のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、細胞増殖性疾患、特に結腸直腸癌、肺癌、胃癌、および肝臓癌の治療または予防を目的とする薬学的組成物中に用いるポリペプチドの好ましい例である。さらに、配列番号：124のアミノ酸配列を含むCXADRL1のペプチド断片はそれぞれ、CXADRL1に対する免疫応答を誘導することが判明しているため、配列番号：124のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、細胞増殖性疾患、特に結腸直腸癌、肺癌、胃癌、および肝臓癌の治療または予防を目的とする薬学的組

40

50

成物中に用いるポリペプチドの好ましい例である。さらに、配列番号：164のアミノ酸配列を含むGCUD1のペプチド断片はそれぞれ、GCUD1に対する免疫応答を誘導することが判明しているため、配列番号：164のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、細胞増殖性疾患、特に結腸直腸癌、肺癌、胃癌、および肝臓癌の治療または予防を目的とする薬学的組成物中に用いるポリペプチドの好ましい例である。本発明において、ポリペプチドまたはその断片は抗腫瘍免疫を誘導するのに十分な投与量で投与され、これは0.1mg～10mg、好ましくは0.3mg～5mg、より好ましくは0.8mg～1.5mgの範囲である。投与は反復される。抗腫瘍免疫を誘導するには、例えば、1mgのペプチドまたはその断片を2週間毎に4回投与するとよい。

【0193】

以下の実施例は、本発明を例示するとともに、当業者によるその作成および使用を補助する目的で提示される。実施例はいかなる形でも本発明の範囲を限定することは意図していない。

【0194】

別に定義する場合を除き、本明細書で用いるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者が一般的に理解しているものと同じ意味を持つ。本発明の実施または検討においては本明細書に記載したものと同様または同等の方法および材料を用いることができるが、好ましい方法および材料は以下に説明するものである。本明細書中に引用するいかなる特許、特許出願および刊行物も参照として本明細書に組み入れられる。

【0195】

発明を実施するための最良の態様

本発明は以下の実施例によって詳細に例示されるが、これらの実施例には限定されない。

【0196】

1. 材料および方法

(1) 患者および組織標本

すべての胃癌および結腸直腸癌組織、さらには対応する非癌組織は、外科手術を受けた患者の手術標本からインフォームドコンセントを得た上で入手した。

【0197】

(2) ゲノム全域にわたるcDNAマイクロアレイ

この検討には、23040種の遺伝子を含む、ゲノム全域にわたるcDNAマイクロアレイ（施設内で作製した）を用いた。顕微解剖した組織から抽出した、DNase I処理した全RNAをAmpliscribe T7転写キット（Epicentre Technologies）を用いて増幅し、逆転写時にCy-dye（アマシャム）で（非癌組織由来のRNAはCy5により、腫瘍由来のRNAはCy3により）標識した。ハイブリダイゼーション、洗浄および検出を以前の記載の通りに行い（Onoら、Cancer Res. 60: 5007-11 (2000)）、各標的に関するCy5およびCy3の蛍光強度をArray Visionソフトウェア（アマシャムファルマシア（Amersham Pharmacia））を用いて測定した。バックグラウンドシグナルを差し引いた後に、各スポットについて2回ずつの値を平均した。続いて、各スライドについて、52種のハウスキーピング遺伝子の平均Cy5強度および平均Cy3強度が調整されるように、スライド上のすべての蛍光強度を標準化した。Cy3およびCy5の両方に関して強度が25,000蛍光単位未満であった遺伝子は以降の検討から除外し、Cy3/Cy5シグナル比が >2.0 であったものをさらなる評価のために選択した。

【0198】

(3) 細胞株

ヒト胚腎臓293（HEK293）はタカラ（TaKaRa）から入手した。COS7細胞、NIH3T3細胞、ヒト子宮頸癌細胞株HeLa、ヒト胃癌細胞株MKN-1およびMKN-28、ヒト肝臓癌細胞株Alexander、ならびにヒト結腸癌（colon cancer）細胞株LoVo、HCT116、DLD-1およびSW480は、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC、Rockville, MD）から入手した。ヒト肝臓癌細胞株SNU475ならびにヒト結腸癌細胞株SNUC4およびSNUC5は、韓国細胞バンク（Korean Cell Line Bank）から入手した。細胞はすべて適切な培地中で単層として増殖させた

10

20

30

40

50

: COS7、NIH3T3、HEK293、およびAlexanderにはダルベッコ変法イーグル培地；MKN-1、MKN-28、SNU475、SNUC4、DLD-1、およびSNUC5にはRPMI1640；HCT116にはマッコイ5A培地；SW480にはライボピッツL-15；LoVoにはハムF-12；ならびにHeLaにはイーグル最小必須培地（ライフテクノロジーズ（Life Technologies）、Grand Island、NY）。いずれの培地にも10%ウシ胎仔血清および1%抗生物質/抗真菌剤溶液（シグマ（Sigma））を加えた。ヒト胃癌細胞株St-4は癌研究所（日本）の鶴尾博士（Dr. Tsuruo）に寄贈いただいた。St-4細胞は、10%ウシ胎仔血清および1%抗生物質/抗真菌剤溶液（シグマ）を加えたRPMI1640中で単層として増殖させた。

【0199】

ヒトBリンパ芽球細胞株であるT2細胞（HLA-A*0201）およびEHM（HLA-A3/3）は珠玖教授（Prof. Shiku）（三重大学）に寄贈いただいた。HT29（結腸癌細胞株；HLA-A24/01）、WiDR（結腸癌細胞株；HLA-A24/01）、およびHCT116（結腸癌細胞株；HLA-A02/01）、DLD-1（結腸癌細胞株；HLA-A24/01）、SNU475（肝細胞癌細胞株；HLA-A*0201）、MKN45（胃癌細胞株；HLA-A2陰性）、MKN74（胃癌細胞株；HLA-A2陰性）はATCCから購入した。TIS1細胞（HLA-A24/24）は宝酒造（Takara Shuzo Co, Ltd.）（大津、日本）より寄贈いただいた。RT-PCR検査により、SNU475およびMKN74における強いCXADRL1発現が明らかになった。RT-PCR検査により、SNU475およびMKN45における強いGCUD1発現が明らかになった。

【0200】

（4）RNA調製およびRT-PCR

全RNAはキアゲンRNeasyキット（キアゲン）またはTrizol試薬（ライフテクノロジーズ）を製造者のプロトコールに従って用いて抽出した。ポリdT₁₂₋₁₈プライマー（アマシャムファルマシアバイオテック（Amersham Pharmacia Biotech））とともにSuperscript II逆転写酵素（ライフテクノロジーズ）を用いて、全RNAの10μgアリコート逆転写して一本鎖cDNAとした。それぞれの一本鎖cDNA調製物を、容積20μlのPCR緩衝液（タカラ）中で行う標準的なRT-PCR実験による次のPCR増幅のために希釈した。増幅は以下の条件下で行った：GeneAmp PCRシステム9700（パーキンエルマー（Perkin-Elmer）、Foster City、CA）において、94℃4分間の変性の後に、94℃30秒間、56℃30秒間および72℃45秒間を20サイクル（GAPDHの場合）、35サイクル（CXADRL1の場合）、30サイクル（GCUD1の場合）、30サイクル（RNF43の場合）。プライマー配列は以下の通りとした：GAPDHの場合、フォワード：5'-ACAACAGCCTCAAGATCATCAG（配列番号：7）およびリバース：5'-GGTCCACCACTGACACGTTG（配列番号：8）；CXADRL1の場合、フォワード：5'-AGCTGAGACATTTGTTCTCTTG（配列番号：9）およびリバース：5'-TATAAACAGCTGAGTCCAGAG（配列番号：10）；GCUD1の場合、フォワード：5'-TTCCGATATCAACATCTACCAG（配列番号：11）、リバース：5'-AGTGTGTGACCTCAATAAGGCAT（配列番号：12）、RNF43の場合、フォワード：5'-CAGGCTTTGGACGCACAGACTGGTAC-3'（配列番号：13）およびリバース：5'-CTTTGTGATCATCCTGGCTTCGGTGCT-3'（配列番号：14）。

【0201】

（5）ノーザンブロット分析

ヒト多組織ブロット（クロンテック、Palo Alto、CA）を、CXADRL1、GCUD1、またはRNF43の³²P標識PCR産物とハイブリダイズさせた。プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションおよび洗浄は供給元の推奨に従って行った。ブロットのオートラジオグラフィは増感スクリーンを-80℃で24~72時間用いて行った。

【0202】

（6）cDNA末端の5'迅速増幅（5'RACE）

5'RACE実験はMarathon cDNA増幅キット（クロンテック）を製造者の指示に従って用いて行った。CXADRL1の5'部分の増幅のためには、遺伝子特異的リバースプライマー（5'-GGTTGAGATTTAAGTTCTCAAA-3'（配列番号：15））およびキットとともに供給されているAP-1プライマーを用いた。cDNA鋳型はヒト精巣mRNA（クロンテック）から合成した。PCR産物をTAクローニングキット（インビトロジェン）を用いてクローニングし、その配列をABI PRISM 3700DNAシーケンサー（アプライドバイオシステムズ（Applied Biosystems））

10

20

30

40

50

を用いて決定した。

【0203】

(7) CXADRL1、GCUD1およびFLJ20315を発現するプラスミドの構築

CXADRL1、GCUD1、およびRNF43の全コード領域を、遺伝子特異的プライマーのセットを用いて行うRT-PCRによって増幅した。CXADRL1に関しては、5'-AGTTAAGCTTGCCGGGATGACTTC TCAGCGTCCCCTCTGG-3' (配列番号：16) および5'-ATCTCGAGTACCAAGGACCCGCCCCGACTCTG-3' (配列番号：17)、GCUD1に関しては、5'-GCGGATCCAGGATGGCTGCTGCAGCTCCTCCAAG-3' (配列番号：18) および5'-TAGAATTCTTAAAGAAGCTTAATCTCCGTGTCAACAC-3' (配列番号：19)、RNF43に関しては、5'-TGCAGATCTGCAGCTGGTAGCATGAGTGGTG-3' (配列番号：20) および5'-GAG GAGCTGTGTGAACAGGCTGTGTGAGATGT-3' (配列番号：21)。PCR産物はpcDNA3.1 (インビトロジェン) またはpcDNA3.1myc/His (インビトロジェン) ベクターの適切なクローニングサイトにクローニングした。

10

【0204】

(8) イムノプロット

pcDNA3.1myc/His-CXADRL1、pcDNA3.1myc/His-GCUD1、pcDNA3.1myc/His-RNF43、またはpcDNA3.1myc/His-LacZをトランスフェクトした細胞をPBSで2回洗浄し、可溶性緩衝液 (150 mM NaCl、1% Triton X-100、50mM Tris-HCl pH 7.4、1mM DTT、および1X complete Protease Inhibitor Cocktail (ペーリンガー (Boehringer))) で回収した。ホモジナイゼーション後に細胞を10,000 × gで30分間遠心し、Bradfordアッセイ (Bio-Rad) によって上清をタンパク質濃度に関して標準化した。タンパク質を10% SDS-PAGEによって分離し、マウス抗myc (サンタクルズ (SANTA CRUZ)) 抗体を用いてイムノプロットを行った。HRPを結合させたヤギ抗マウスIgG (アマシャム) をECL検出システム (アマシャム) 用の二次抗体として用いた。

20

【0205】

(9) 免疫組織化学染色

pcDNA3.1myc/His-CXADRL1、pcDNA3.1myc/His-GCUD1、pcDNA3.1myc/His-RNF43、またはpcDNA3.1myc/His-LacZをトランスフェクトした細胞を、4% パラホルムアルデヒドを含むPBSで15分間固定した後に、0.1% Triton X-100を含むPBSにより室温で2.5分間の透過化処理を行った。その後に、非特異的なハイブリダイゼーションをブロックするために細胞を2% BSA (PBS中) で覆い、4℃で24時間おいた。マウス抗mycモノクローナル抗体 (シグマ) を1:1000希釈で一次抗体として用い、ローダミン結合抗マウス二次抗体 (LeincoおよびICN) とのインキュベーション後に反応を可視化した。核は4',6'-ジアミジン-2'-フェニルインドール二塩酸 (DAPI) で対比染色した。蛍光画像はECLIPSE E800顕微鏡によって得た。

30

【0206】

(10) コロニー形成アッセイ

各遺伝子が発現するプラスミドまたは対照プラスミドをトランスフェクトした細胞を、適切な濃度のジェネティシンとともに10~21日インキュベートした。細胞を100% メタノールで固定し、ギムザ溶液により染色した。実験はすべて2回ずつ行った。

【0207】

(11) CXADRL1またはRNF43を過剰発現する細胞の樹立

pcDNA3.1myc/His-CXADRL1、pcDNA3.1myc/His-RNF43、pcDNA3.1myc/His-LacZ、または対照プラスミドをそれぞれトランスフェクトしたNIH3T3細胞、COS7細胞およびLoVo細胞を、適切な濃度のジェネティシンを含む培地中で維持した。トランスフェクションから2週後に、生存している単一のコロニーを選択し、各遺伝子の発現を半定量的RT-PCRによって調べた。

40

【0208】

(12) 細胞増殖に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの影響の検討

10cm培養皿 (2 × 10⁵ 個/枚) にプレATINGした細胞に対して、LIPOFECTIN試薬 (ギブコBRL) を用いて、CXADRL1、GCUD1もしくはRNF43の合成S-オリゴヌクレオチドをトラン

50

スフェクトした。続いて、適切な濃度のジェネティシンを添加した上で細胞を6~12日培養した。続いて細胞を100%メタノールで固定し、ギムザ溶液により染色した。S-オリゴヌクレオチドの配列は以下の通りとした：

CXADRL1-S4、5'-TCTGCACGGTGAGTAG-3' (配列番号：22)；
 CXADRL1-AS4、5'-CTACTCACCGTGCAGA-3' (配列番号：23)；
 CXADRL1-S5、5'-TTCTGTAGGTGTTGCA-3' (配列番号：24)；
 CXADRL1-AS5、5'-TGCAACACCTACAGAA-3' (配列番号：25)；
 GCUD1-S5、5'-CTTTTCAGGATGGCTG-3' (配列番号：26)；
 GCUD1-AS5、5'-CAGCCATCCTGAAAAG-3' (配列番号：27)；
 GCUD1-S8、5'-AGGTTGAGGTAAGCCG-3' (配列番号：28)；
 GCUD1-AS8、5'-CGGCTTACCTCAACCT-3' (配列番号：29)；
 RNF43-S1、5'-TGGTAGCATGAGTGGT-3' (配列番号：30)；および
 RNF43-AS1、5'-ACCACTCATGCTACCA-3' (配列番号：31)。

【0209】

(13) 臭化3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム (MTT) アッセイ

5 × 10⁵ 個/100mm培養皿の密度でプレーティングした細胞に対して、CXADRL1、GCUD1、またはRNF43の発現を抑制するように指定されたセンスまたはアンチセンスS-オリゴヌクレオチドによるトランスフェクションを3連ずつ行った。トランスフェクションから72時間後に、培地を500 μg/mlのMTT (臭化3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム) (シグマ) を含む新たな培地と交換し、プレートを37 °Cで4時間インキュベートした。その後、1mlの0.01N HCl/10%SDSの添加によって細胞を可溶化し、ELISAプレートリーダーを検査波長570nm (基準630nm) で用いて可溶化物の吸光度を測定した。細胞生存度は吸光度を対照細胞と比較して表した。

【0210】

(14) psiH1BX3.0の構築

H1RNA遺伝子はRNAポリメラーゼIIIによって転写され、ウリジンが3'末端にある短い転写物を生じることが報告されているため、そのプロモーター領域を含むH1RNA遺伝子のゲノム断片を、プライマーのセット [5'-TGGTAGCCAAGTGCAGTTATA-3' (配列番号：32)、および5'-CCAAAGGGTTTCTGCAGTTTCA-3' (配列番号：33)] および鑄型としてヒト胎盤DNAを用いて行うPCRにより増幅した。その産物を精製し、TAクローニングキット (インビトロジェン) を供給元のプロトコールに従って用い、pCR2.0プラスミドベクター中にクローニングした。pcDNA3.1(+)プラスミドをプライマーのセット、5'-TGCGGATCCAGAGCAGATTGTACTGAGAGT-3' (配列番号：34)、および5'-CTCTATCTCGAGTGAGGCGGAAAGAACCA-3' (配列番号：35) を用いて行うPCRによって増幅した後、BamHIおよびXhoIで消化処理を行い、この増幅・消化処理を行った断片の中のpcDNA3.1(+)プラスミドのヌクレオチド位置1257~56にH1RNA遺伝子を含むBamHIおよびXhoI断片を精製してクローニングした。連結されたDNAは、プライマー5'-TTTAAGCTTGAAGACATTTTTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAC-3' (配列番号：36) および5'-TTTAAGCTTGAAGACATGGGAAAGAGTGGTCTCA-3' (配列番号：37) を用いて行うPCRにおいて、鑄型として用いた。その産物をHindIIIで消化した後自己連結させてpsiH1BX3.0ベクタープラスミドを得た。対照として、5'-CACCGAAGCAGCAGACTTCTTCTTCAAGAGAGAAGAAGTCGTGCTGCTTC-3' (配列番号：38) および5'-AAAAGAAGCAGCAGACTTCTTCTTCTTGAAGAAGAAGTCGTGCTGCTTC-3' (配列番号：39) の二本鎖オリゴヌクレオチドをpsiH1BXベクターのBbsI部位にクローニングすることにより、psiH1BX-EGFPを調製した。

【0211】

(15) RNF43-siRNAまたはCXADRL1-siRNAの遺伝子サイレンシング作用の検討

RNF43-siRNAまたはCXADRL1-siRNAのいずれかを発現するプラスミドは、二本鎖オリゴヌクレオチドをpsiH1BX3.0ベクター中にクローニングすることによって調製した。RNF43 siRNAとして用いたオリゴヌクレオチドは以下の通りである：

siRNA16-4として5'-TCCCGTACCGGATCCAACCTCAGTTCAAGAGACTGAGTTGGATCCGGTGAC-3' (配列番

10

20

30

40

50

号：40) および

5'-AAAAGTCACCGGATCCAACCTCAGTCTCTTGAAGTGGATTGGATCCGGTGAC-3' (配列番号：41) ;
siRNA1834として5'-TCCCGCTATTGCACAGAACGCAGTTCAAGAGACTGCGTTCTGTGCAATAGC-3' (配列番号：42) および

5'-AAAAGCTATTGCACAGAACGCAGTCTCTTGAAGTGGTTCTGTGCAATAGC-3' (配列番号：43) ;
siRNA1として5'-TCCCAGAAAGCTGTTATCAGAGTTCAAGAGACTCTGATAACAGCTTTCTG-3' (配列番号：44) および

5'-AAAACAGAAAGCTGTTATCAGAGTCTCTTGAAGTCTGATAACAGCTTTCTG-3' (配列番号：45) ;
siRNA14として5'-TCCCTGAGCCACCTCCAATCCACTTCAAGAGAGTGGATTGGAGTGGCTCA-3' (配列番号：46) および

5'-AAAATGAGCCACCTCCAATCCACTCTCTTGAAGTGGATTGGAGTGGCTCA-3' (配列番号：47) ;
siRNA15として5'-TCCCCTGCACGGACATCAGCCTATTCAAGAGATAGGCTGATGTCGGTGACAG-3' (配列番号：48) および

5'-AAAAGTGCACGGACATCAGCCTATCTCTTGAATAGGCTGATGTCGGTGACAG-3' (配列番号：49)。

CXADRL1-siRNAとして用いたオリゴヌクレオチドは以下の通りである：

siRNA#1として5'-TCCCGTGCAGAGAGCCCTGGGATTCAAGAGATCCCAGGGCTCTCTGACAC-3' (配列番号：50) および

5'-AAAAGTGCAGAGAGCCCTGGGATCTCTTGAATCCCAGGGCTCTCTGACAC-3' (配列番号：51) ;
siRNA#2として5'-TCCCCTCAATGTCATTTGGATGTTCAAGAGACATCCAAATGCAATTGAGG-3' (配列番号：52) および

5'-AAAACCTCAATGTCATTTGGATGTCCTTGAACATCCAAATGCAATTGAGG-3' (配列番号：53) ;
siRNA#3として5'-TCCCTGTCATTTGGATGGTCACTTTCAAGAGAAGTGACCATCCAAATGACA-3' (配列番号：54) および

5'-AAAATGTCATTTGGATGGTCACTTCTCTTGAAGTGGATCCAAATGACA-3' (配列番号：55) ;
siRNA#4として5'-TCCCTGCCAACCAACCTGAACAGTTCAAGAGACTGTTTCAGGTTGGTTGGCA-3' (配列番号：56) および

5'-AAAATGCCAACCAACCTGAACAGTCTCTTGAAGTGGATCCAAATGACA-3' (配列番号：57) ;
siRNA#5として5'-TCCCCAACCTGAACAGGTCATCTTCAAGAGAGATGACCTGTTTCAGGTTGG-3' (配列番号：58) および

5'-AAAACCAACCTGAACAGGTCATCTCTTGAAGATGACCTGTTTCAGGTTGG-3' (配列番号：59) ;
siRNA#6として5'-TCCCCTGAACAGGTCATCTGTTTCAAGAGAACAGGATGACCTGTTTCAGG-3' (配列番号：60) および

5'-AAAACCTGAACAGGTCATCTGTTCTCTTGAACAGGATGACCTGTTTCAGG-3' (配列番号：61) ; ならびに

CXADRL-siRNA#7として5'-TCCCAGGTCATCCTGTATCAGGTTCAAGAGACCTGATACAGGATGACCTG-3' (配列番号：62)

および5'-AAAACAGGTCATCCTGTATCAGGTCCTTGAACCTGATACAGGATGACCTG-3' (配列番号：63)

。

FuGENE6試薬 (ロシュ (Roche)) を供給元の推奨に従って用いて、psiH1BX-RNF43、psiH1BX-CXADRL1、またはpsiH1BX-擬似プラスミドを、SNUC4細胞またはSt-4細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションから48時間後に全RNAを細胞から抽出した。

【 0 2 1 2 】

(16) RNF43タンパク質の組換えアミノ末端領域およびカルボキシル末端領域の構築

RNF43のアミノ末端領域およびカルボキシル末端領域を、以下のプライマーのセットを用いて行うRT-PCRによって増幅した：アミノ末端領域に関しては、5'-GAAGATCTGCAGCGGTGAGTCTGAAAG-3' (配列番号：64) および5'-GGAATTCGGACTGGGAAAATGAATCTCCCTC-3' (配列番号：65) ; ならびにカルボキシル末端領域に関しては、5'-GGAGATCTCCTGATCAGCAAGTCAC-3' (配列番号：66) および5'-GGAATTCACAGCTGTTTCACACAGCTCCTC-3' (配列番号：67) 。その産物をBamHI-EcoRIで消化し、pET-43.1a(+)ベクター (ノバジェン (Novagen)) のBamHI-EcoRI部位にクローニングした。このプラスミドを大腸菌BL21trxB (DE3) pLysS細

10

20

30

40

50

胞（ストラタジーン）に対してトランスフェクトした。組換えRNF43タンパク質を、0.2mM IPTGを添加して25℃で培養した細胞から16時間後に抽出した。

【0213】

(17) 酵母2-ハイブリッド実験

酵母2-ハイブリッドアッセイは、MATCHMAKER GAL4 2-ハイブリッド系3（MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3）（クロンテック）を製造者のプロトコールに従って用いて行った。RNF43の全コード配列を、ヒト精巣cDNAライブラリー（クロンテック）のスクリーニングのためのベイト（bait）としてpAS2-1ベクターのEcoRI-BamHI部位にクローニングした。酵母における相互作用を確認するために、pAS2-RNF43をベイトベクターとして用い、pACT2-NOTCH2およびpACT2-STRINをプレイ（prey）ベクターとして用いた。

10

【0214】

本発明者らは、CXADRL1の細胞質領域を、ヒト精巣cDNAライブラリー（クロンテック）のスクリーニングのためのベイトとしてpAS2-1ベクターのEcoRI部位にクローニングした。酵母における相互作用を確認するために、本発明者らはベイトベクターにpAS2-CXADRL1を用い、プレイベクターにpACT2-AIP1を用いた。

【0215】

(18) CXADRL特異的抗体の調製

抗CXADRL抗血清は、Ab-1に関してはコドン235～276、Ab-2に関してはコドン493～537、またはAb-3に関してはコドン70～111を含む、CXADRL1の合成ポリペプチドを用いて免疫し、調製した。pET-CXADRLプラスミドをトランスフェクトした大腸菌にて組換えHis標識CXADRL1タンパク質を調製し、それを用いて血清を精製した。Flag標識CXADRL1を発現する細胞から抽出したタンパク質を、さらに10%SDS-PAGEによって分離し、抗CXADRL1血清または抗Flag抗体のいずれかを用いてイムノプロットを行った。HRP結合ヤギ抗ウサギIgG抗体またはHRP結合ヒツジ抗マウスIgG抗体をそれぞれ、ECL検出システム（アマシャムファルマシアバイオテック、Piscataway, NJ）用の二次抗体として用いた。FLAG標識されたCXADRL1の50kDバンドが、抗CXADRL抗血清を用いたイムノプロットにより示され、このパターンは抗FLAG抗体を用いて検出されたものと同であった。

20

【0216】

(19) 組換えGCUD1タンパク質の調製

GCUD1に対して特異的な抗体を作製するために、組換えGCUD1タンパク質を調製した。GCUD1の全コード領域を、プライマーのセット5'-GCGGATCCAGGATGGCTGCAGCTCCTCCAAG-3'（配列番号：68）および5'-CTGAATTCACCTAAAGAAGCTTAATCTCCGTGTCAACAC-3'（配列番号：69）を用いて行うRT-PCRによって増幅した。その産物を精製し、BamHIおよびEcoRIで消化した上で、pGEX6P-2の適切なクローニングサイトにクローニングした。その結果生じたプラスミドをpGEX-GCUD1と命名した。pGEX-GCUD1プラスミドを大腸菌DH10Bに形質転換導入した。組換えタンパク質の産生をIPTGの添加によって誘導し、グルタチオンSepharose（商標）4B（アマシャムファルマシア）を製造者のプロトコールに従って用いてタンパク質を精製した。

30

【0217】

(20) GCUD1特異的抗体の調製

GCUD1に対するポリクローナル抗体を血清から精製した。Flag標識GCUD1を発現するプラスミドを細胞にトランスフェクトし、得たタンパク質を10%SDS-PAGEによって分離し、抗GCUD1または抗Flag抗体によってイムノプロットを行った。HRP結合ヤギ抗ウサギIgG（Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA）またはHRP結合抗Flag抗体をそれぞれ、ECL検出システム（アマシャムファルマシアバイオテック、Piscataway, NJ）用の二次抗体として用いた。FLAG標識GCUD1の47kDバンドが、抗GCUD1抗体を用いたイムノプロットにより示され、このパターンは抗FLAG抗体を用いて検出されたものと同であった。

40

【0218】

(21) 統計分析

データに対しては分散分析（ANOVA）およびシェフェのF検定を行った。

50

【 0 2 1 9 】

(22) ペプチドの調製

HLA-A24分子またはHLA-A*0201分子と結合する、RNF43、CXADR1またはGCUD1の9アミノ酸長ペプチドおよび10アミノ酸長ペプチドを、結合予測ソフトを利用して予想した (http://bimas.dcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform)。ミモトープ (Mimotopes, San Diego, LA) が標準的固相合成法に従って合成したこれらのペプチドを、逆相HPLCによって精製した。ペプチドの純度 (>90%) および同定は、それぞれ分析用HPLCおよびマススペクトロメトリー分析によって決定した。ペプチドはジメチルスルホキシド (DM SO) 中に20mg/mlとなるように溶解し、-80 で保存した。

【 0 2 2 0 】

(23) インビトロCTL誘導

単球由来の樹状細胞 (DC) を、HLA上に提示されたペプチドに対するCTL応答を誘導するための抗原提示細胞 (APC) として用いた。DCは別の文献に記載された通りにインビトロで作製した (Nukayaら、Int J Cancer 80: 92-7 (1999); Tsaiら、J Immunol 158: 1796-802 (1997))。具体的には、末梢血単核細胞 (PBMC) をHLA-A*0201またはHLA-A24の健常志願者からFicoll-Plaque (ファルマシア) 溶液を用いて単離し、PBMCの単球画分をプラスチック製組織培養フラスコ (ベクトンディッキンソン (Beckton Dickinson)) に対する付着性によって分離した。この単球画分を、2% 熱非働化自己血清 (AS)、1000U/mlのGM-CSF (キリンビール株式会社 (Kirin Brewery Company) により供与) および1000U/mlのIL-4 (ジェンザイム (Genzyme)) を含むAIM-V培地 (インビトロジェン) 中で7日間培養して、DC画分を得た。DCを多く含むこの細胞集団に対して、20 のAIM-V中にて4時間にわたり、3 μg/mlの 2-ミクログロブリンの存在下、20 μg/mlの候補ペプチドで標識した。ペプチドで標識したこれらの抗原提示細胞に放射線を照射し (5500ラド)、これをDynabeads M-450CD8 (ダイナル (Dyna)) およびDetachabead (ダイナル) による陽性選択によって入手した自己CD8+ T細胞と1:20の比で混合した。これらの培養物を48ウェルプレート (コーニング (Corning)) に入れた; 各ウェルは、 1.5×10^4 個のペプチドで標識した抗原提示細胞、 3×10^5 個のCD8+ T細胞、および10ng/mlのIL-7 (ジェンザイム) を、2% ASを加えた0.5mlのAIM-V中に含む。3日後に、これらの培養物に対してIL-2 (CHIRON) を最終濃度20IU/mlとなるように添加した。さらに7日目および14日目に、各時点においてその都度、上記と同じ様式で自己ペプチドで標識して抗原提示細胞を調製し、その抗原提示細胞でT細胞を再刺激した。培養下にあるリンパ系細胞を21日目の時点で回収し、ペプチドで標識したT1SIまたはT2細胞に対する細胞障害性に関する試験を行った。

【 0 2 2 1 】

(24) CTLの増殖

ペプチドで標識したT1SIまたはT2に対して明らかな細胞障害性を有することが実証された培養リンパ系細胞を、Riddellらによって記載されたものと類似した方法を用いて培養下でさらに増殖させた (Walterら、N Engl J Med 333: 1038-1044, 1995; Riddellら、Nature Med. 2: 216-223, 1996)。 5×10^4 個のリンパ系細胞は、 25×10^6 個の放射線照射 (3300ラド) PBMC、 5×10^6 個の放射線照射 (8000ラド) EHM細胞、および40ng/mlの抗CD3モノクローナル抗体 (ファーマンジェン (Pharming)) を含む、5%ASを加えた25mlのAIM-V中に再懸濁した。培養を開始して1日後に120 IU/mlのIL-2を培養物に添加した。この培養物に、5%ASおよび30IU/mlのIL-2を加えた新たなAIM-Vを5日目、8日目、および11日目に与えた。

【 0 2 2 2 】

(25) CTLクローンの樹立

CTLクローンを得るために、強力な細胞障害性を有するリンパ系細胞を用いた。細胞浮遊液を、96ウェル丸底マイクロタイタープレート (ナルジェヌンクインターナショナル (Nalge Nunc International)) 中の各ウェルにつき0.3、1、および3 CTL/リンパ系細胞の密度となるように希釈した。これらの細胞を、 7×10^4 個/ウェルの同種PBMC、 1×10^4 個/ウェルのEHM、30ng/mlの抗CD3抗体、および125U/mlのIL-2を含む、5%ASを加えた150 μl /

10

20

30

40

50

ウェルのAIM-V中で培養した。10日後に、50 μ l/ウェルのIL-2を最終濃度125U/mlとなるように培地に添加した。培養CTLの細胞障害活性を14日目に調べ、CTLクローンを上記と同じ方法を用いて増殖させた。

【0223】

(26) 細胞障害性アッセイ

標的細胞を、CO₂ インキュベーター内で100 μ CiのNa₂⁵¹CrO₄ (パーキンエルマーライフサイエンス (Perkin Elmer Life Sciences)) により37 °Cで1時間にわたり標識した。ペプチドで標識した標的を用いる場合には、Na₂⁵¹CrO₄による標識の前に、標的細胞を20 μ g/mlのペプチドを添加した上で37 °Cで16時間インキュベートした。標的細胞をすすぎ、最終容積0.2mlとなるように丸底マイクロタイタープレート内でエフェクター細胞と混合した。細胞間の接触を増加させるためにプレートを遠心し(4分間、800 x g)、37 °CのCO₂ インキュベーターに入れた。4時間のインキュベーション後に、0.1mlの上清を各ウェルから回収し、放射能をカウンターを用いて測定した。RNF43またはCXADR1またはGCUD1を内因性に発現する標的細胞に対する細胞障害性を評価する場合には、NK様エフェクター細胞による非特異的溶解を減らすために、30倍過剰量の非標識K562細胞の存在下で細胞溶解活性を調べた。⁵¹Cr標識したHT29細胞またはSNU475細胞の認識について競合させるために、ペプチドによる標識(20 μ g/ml、37 °Cで16時間)を行った非標識TISI細胞またはT2細胞を用いて非放射性標的の阻害アッセイを行い、抗原特異性を確認した。MHC拘束に関しては、阻止アッセイにおいて、抗HLAクラスI (W6/32) 抗体および抗HLAクラスII抗体、抗CD4抗体および抗CD8抗体(DAKO)による細胞障害性の阻害を測定し検討した。

【0224】

特異的細胞障害性の比率は、特異的⁵¹Cr放出の比率を以下の式で算出することにより求めた： $\{ (\text{被験試料放出のcpm} - \text{自然放出のcpm}) / (\text{最大放出のcpm} - \text{自然放出のcpm}) \} \times 100$ 。自然放出は標的細胞のみをエフェクター細胞の非存在下でインキュベートすることによって測定し、最大放出は標的を1N HClとともにインキュベートすることによって測定した。すべての測定は2回ずつ行ったが、平均の標準誤差は常に平均値の10%未満であった。

【0225】

2. 結果

(1) 胃癌において高頻度に上方制御される2種類の新規ヒト遺伝子、CXADR1およびGCUD1の同定

23040種の遺伝子を含むゲノム全域にわたるcDNAマイクロアレイを用いて、胃癌の発現プロファイル20例を、対応する非癌粘膜と比較した。マイクロアレイ解析で検出された高頻度に上方制御される遺伝子のうち、UniGeneクラスター (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>) のEST、Hs.6658に対応する施設内アクセッション番号A5928の遺伝子が、4.09 ~ 48.60の範囲で過剰発現することが判明した(図1a)。この遺伝子のオープンリーディングフレームは、CXADR (coxsackie and adenovirus receptor) のものと約37%同一なタンパク質をコードするため、この遺伝子はCXADR1 (coxsackie and adenovirus receptor like 1) と命名された。CXADR1は6例の結腸直腸癌症例のうち6例、20例のHCC症例のうち12例で上方制御されていた。さらに、UniGeneクラスターのK1AA0913遺伝子産物(Hs.75137)に対応する施設内アクセッション番号C8121の遺伝子も、マイクロアレイによる対応する非癌胃粘膜との比較で、12例の胃癌組織のうち9例で発現が有意に増強していたために注目された(図1b)。施設内アクセッション番号がC8121であるこの遺伝子はGCUD1 (up-regulated in gastric cancer) と命名された。GCUD1は、6例の結腸直腸癌症例のうち5例、6例のHCC症例のうち1例、14例の肺癌(扁平細胞癌)症例のうち1例、13例の精巣腫瘍症例のうち1例でも上方制御されていた。cDNAマイクロアレイの結果を明らかにするために、胃癌におけるこれらの転写物の発現を半定量的RT-PCRによって調べたところ、10例の腫瘍のすべてでCXADR1の発現が上昇しており(図1c) 9例の癌のうち7例でGCUD1の発現が上昇していることが確かめられた(図1d)。

【0226】

(2) 新規遺伝子CXADRL1の単離および構造

CXADRL1のPCR産物をプローブとして用いる多組織ノーザンブロット分析により、精巢および卵巣における3.5kb転写物の発現が判明した(図2a)。A5928はノーザンブロット上に検出された遺伝子よりも小さかったため、CXADRL1遺伝子の全コード配列を決定するために5'RACE実験を行った。推定される完全長cDNAは3423ヌクレオチドからなり、オープンリーディングフレームは431アミノ酸のタンパク質(配列番号:2)をコードする1296ヌクレオチド(配列番号:1)である(GenBankアクセッション番号:AB071618)。最初のATGは、真核生物における翻訳開始のためのコンセンサス配列と一致する配列(CCCGGGATGA)(配列番号:70)に隣接しており、インフレームの終止コドンが上流にある。NCBI(the National Center for Biotechnology Information)データベースにおける相同性の検索のためにBLASTプログラムを用いたところ、染色体バンド3q13に指定されている配列であるGenBankアクセッション番号AC068984のゲノム配列が同定された。cDNAとゲノム配列と比較することにより、CXADRL1が7つのエクソンからなることが判明した(図2b)。

【0227】

Simple Modular Architecture Research Tool (SMART、<http://smart.embl-heidelberg.de>)を用いたタンパク質モチーフに関する検索により、予想されるタンパク質が2つの免疫グロブリンドメイン(コドン29~124および158~232)および1つの膜貫通ドメイン(コドン246~268)を含むことが判明し、このことから、CXADRL1が免疫グロブリンスーパーファミリーに属する可能性が示唆された。

【0228】

(3) 細胞増殖に対するCXADRL1の効果

CXADRL1を発現するプラスミド(pcDNA3.1myc/His-CXADRL1)をNIH3T3細胞にトランスフェクトすることにより、コロニー形成アッセイを行った。pcDNA3.1myc/His-CXADRL1をトランスフェクトした細胞は、擬似トランスフェクト細胞よりも著しく多くのコロニーを生じた(図3a)。さらに、CXADRL1のこの増殖促進作用をさらに検討するために、外因性CXADRL1を安定的に発現するNIH3T3細胞を樹立した(図3b)。10%FBSを含む培養液中でのNIH3T3-CXADRL1細胞の増殖速度は元のNIH3T3細胞のものよりも有意に大きかった(図3c)。

【0229】

(4) アンチセンスS-オリゴヌクレオチドによる、ヒト胃癌細胞におけるCXADRL1発現の抑制

6対の対照S-オリゴヌクレオチドおよびCXADRL1に対応するアンチセンスS-オリゴヌクレオチドを、検討した6種の胃癌細胞株の中でCXADRL1の発現レベルが最も高かったMKN-1胃癌細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションから6日後に、トランスフェクト細胞の生存度をMTTアッセイによって計測した。アンチセンスS-オリゴヌクレオチド(CXADRL1-AS4またはCXADRL1-AS5)をトランスフェクトした生細胞は、対照S-オリゴヌクレオチド(CXADRL1-S4またはCXADRL1-S5)をトランスフェクトしたものよりも顕著に少なかった(図4)。3回の独立した実験で一致する結果が得られた。

【0230】

(5) CXADRL1 siRNAを発現するプラスミドの構築、および胃癌細胞の増殖に対するその効果

様々なCXADRL1-siRNAを発現するプラスミドを構築し、CXADRL1の発現に対する効果について検討した。構築したsiRNAのうち、psiH1BX-CXADRL7はSt-4細胞におけるCXADRL1の発現を有意に抑制した(図5A)。CXADRL1の抑制が結腸癌細胞の増殖抑制をもたらすか否かを検証するために、St-4細胞にpsiH1BX-CXADRL7または擬似ベクターをトランスフェクトした。psiH1BX-CXADRL7をトランスフェクトした生細胞の数は対照生細胞の数よりも少なかった(図5Bおよび5C)。

【0231】

(6) 抗CXADRL1抗体の調製

CXADRL1の発現について検討し、その機能を解明するために、CXADRL1に対する抗血清を調製した。抗CXADRL1を用いたイムノブロットにより、FLAG標識CXADRL1の50kDバンドが検

10

20

30

40

50

出され、これは抗FLAG抗体を用いて検出されたものとサイズの点でほぼ同一であった(図6)。

【0232】

(7) 酵母2-ハイブリッドスクリーニング系によるCXADRL1相互作用性タンパク質の同定

CXADRL1の機能を明らかにするために、本発明者らは酵母2-ハイブリッドスクリーニング系を用いてCXADRL1相互作用性タンパク質を検索した。同定された陽性クローンのうち、核内AIP1(atrophin interacting protein 1)のC末端領域は、酵母細胞でpAS2.1-CXADRL1およびpACT2-AIP1(図7)を用いた同時形質転換により、CXADRL1と相互作用した。陽性クローンはコドン808~1008を含んでおり、このことはAIP1の相互作用に關与する領域がこの領域内にあることを示している。

【0233】

(8) CXADRL1由来の候補ペプチドの予測

表1は、候補ペプチド(配列番号:115~154)を結合親和性の高い順に示している。合計40種のペプチドを下記の通りに選択して検討した。

【0234】

(表1) CXADRL1由来の候補ペプチドの予測

HLA-A*0201 9 アミノ酸長				HLA-A*0201 10 アミノ酸長			
ランク	配列	スコア	位置	ランク	配列	スコア	位置
1	YLWEKLDNT	1314.7	176	1	YLWEkLDNTL	3344	176
2	LLLLSLHGV	1006.2	11	2	LINLnVIWMV	280.45	52
3	INLNM VM	49.262	53	3	ALSSgLYQCV	104.33	207
4	VM/TPLSNA	37.961	59	4	ALININVIWM	62.845	51
5	CLVNNLPDI	23.995	120	5	ILLCsSEEGI	32.155	162
6	SLHGVAASL	21.362	15	6	VLPCiFTTSA	32.093	41
7	VI I I FCI AL	18.975	252	7	LLLSIHGVAA	31.249	12
8	LI NLNM VM	14.69	52	8	SIYAnGTHLV	30.603	356
9	AVLPCTFTT	13.993	40	9	QLSDiGTyQC	20.369	111
10	ALSSGLYQC	11.426	207	10	GLYQcVASNA	15.898	211
11	VMSRSNGSV	11.101	384	11	PLLLISLHGV	13.022	10
12	SI FI NNTQL	10.868	104	12	IQVArgQPAV	11.988	32
13	KVHRNTDSV	10.437	327	13	FINNIQLSDT	10.841	106
14	RI GAVPVM	9.563	413	14	LVPGqHKTLV	10.346	364
15	NI GVTGLTV	9.563	132	15	NLPDiGGRNI	8.555	124
16	SI YANGTHL	9.399	356	16	VLVPpSAPHC	8.446	140
17	LLCSSEEG	8.691	163	17	AVIIIFCIAL	7.103	251
18	LLSLHGVA	8.446	13	18	VIIIfCIALI	5.609	252
19	I I FCI ALI L	7.575	254	19	ILGAFfYWRS	5.416	261
20	TMPATNvSI	7.535	97	20	GLTVIVPPSA	4.968	137

【0235】

(9) 候補ペプチドを用いたT細胞の刺激およびCTLクローンの樹立

「材料および方法」の項に記載した様式で、CXADRL1由来のこれらの候補ペプチドを用いてリンパ系細胞を培養した。その結果得られた、検出可能な細胞障害活性を示すリンパ系細胞を増やしてCTLクローンを樹立した。CTLクローンを上記のCTL系列から限界希釈法を用いて増殖させた。CXADRL1-207(ALSSGLYQC)(配列番号:124)によって誘導されたCTLクローンは、ペプチドで標識しなかった標的に対する細胞障害活性と比較して、ペプチドで標識した標的に対する細胞障害活性を、より高度に示した。このCTLクローンの細胞障害活性を図8に示した。このCTLクローンは、ペプチドで標識した標的に対して極めて強力な細胞障害活性を示したが、ペプチドで標識しなかった標的に対してはいかなる細胞障害活性も示さなかった。

【0236】

(10) CXADRL1を標的として内因性に発現する腫瘍細胞株に対する細胞障害活性

予測されたペプチドに対して生成させたCTLクローンについて、CXADRL1を内因性に発現する腫瘍細胞を認識して死滅させる、その能力を検討した。図9はCXADRL1-207 (ALSSGLYC) (配列番号: 124) に対して生成させたCTLクローン75の結果を示している。CTLクローン75は、CXADRL1およびHLA-A*0201を発現するSNU475に対しては強力な細胞障害活性を示したが、CXADRL1を発現するがHLA-A*0201は発現しないMKN74に対しては示さず、HLA-A*0201を発現するがCXADRL1は発現しないSNU-C4に対しても示さなかった。

【0237】

(11) 樹立されたCTLの特異性

CXADRL1-207 CTLクローンの特異性を確かめるために、非標識標的阻害アッセイも行った。⁵¹Crによって標識したSNU475細胞を放射性標的として用い、⁵¹Cr標識を行わずにCXADRL1-207 (配列番号: 124) で標識したT2細胞を非放射性標的として用いた。CXADRL1-207 (配列番号: 124) で標識したT2をアッセイ系に様々な比で添加すると、SNU475細胞に対する特異的細胞溶解は有意に阻害された(図10)。これらの結果は、E/T比を20とした場合の特異的溶解の比率として示されている。

【0238】

CXADRL1-207 CTLクローンに関して、これらのCTLクローンの特徴を検討するために、HLAクラスI、HLAクラスII、CD4およびCD8に対する抗体について、細胞障害活性を阻害する能力を調べた。SNU475細胞に対するCTLクローンの細胞障害性は、抗HLAクラスI抗体および抗CD8抗体を用いた場合に有意に低下し(図11)、このことからこのCTLクローンがCXADRL1由来のペプチドをHLAクラスIおよびCD8様式で認識することが示された。

【0239】

(12) 新規ヒト遺伝子GCUD1の発現および特徴分析

GCUD1 cDNAをプローブとして用いる多組織ノーザンブロット分析により、5.0kb転写物が精巣、卵巣および脳で特異的に発現されることが示された(図12)。GCUD1に対応するKIAA0913 (GenBankアクセッション番号: XM-014766) のヌクレオチド配列は4987ヌクレオチドからなるが、精巣、卵巣、および癌組織を用いたRT-PCR実験から、1245ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを含む4987ヌクレオチド(配列番号: 3) (GenBankアクセッション番号: AB071705) の転写物が明らかになった。さらに、GCUD1に対応するゲノム配列に関してゲノムデータベースを検索し、染色体バンド7p14に指定されたドラフト配列を見いだした(GenBankアクセッション番号: NT-007819)。cDNA配列とゲノム配列との比較により、GCUD1遺伝子が8つのエクソンからなることが判明した。

【0240】

(13) GCUD1の細胞内局在

GCUD1に対応する全コード領域をpCDNA3.1myc/Hisベクター中にクローニングし、この構築物をCOS7細胞に一過性にトランスフェクトした。COS7細胞を免疫細胞化学染色し、標識GCUD1タンパク質が細胞質中に存在することを明らかにした(図13)。

【0241】

(14) 細胞増殖に対するGCUD1の効果

細胞増殖に対するGCUD1の効果进行分析するために、GCUD1を発現するプラスミド(pcDNA3.1myc/His-GCUD1)をNIH3T3細胞にトランスフェクトすることにより、コロニー形成アッセイを行った。NIH3T3細胞において、pcDNA3.1myc/His-GCUD1は対照プラスミド(pcDNA3.1myc/His-LacZ)と比較して著しく多くのコロニーを誘導した(図14)。この結果は3回の独立した実験によって裏づけられた。

【0242】

(15) GCUD1の発現を低下させるように指定されたアンチセンスS-オリゴヌクレオチドによる胃癌細胞の増殖抑制

GCUD1の抑制が胃癌細胞の細胞死をもたらすか否かを検証するために、GCUD1の発現を抑制するために設計された様々なアンチセンスS-オリゴヌクレオチドを合成した。各アンチセンスS-オリゴヌクレオチドのトランスフェクションから6日後に、トランスフェクト細

10

20

30

40

50

胞の生存度をMTTアッセイによって計測した。MKN-28細胞において、アンチセンスS-オリゴヌクレオチド（GCUD1-AS5またはGCUD1-AS8）をトランスフェクトした生細胞は、対照S-オリゴヌクレオチド（GCUD1-S5またはGCUD1-S8）をトランスフェクトした生細胞の数よりも著しく少なかった（図15）。この結果は3回の独立した実験によって裏づけられた。同様の結果はMKN-1細胞でも観察された。

【0243】

(16) 抗GCUD1抗体の調製

GCUD1の発現について検討し、その機能を解明するために、GCUD1に対する抗血清を調製した。GST-GCUD1融合タンパク質を発現する細菌細胞からGCUD1の組換えタンパク質を抽出して精製した（図16）。この組換えタンパク質をウサギ3匹の免疫処置に用いた。抗GCUD1血清を用いたイムノプロットではFLAG標識GCUD1の47kDバンドが示され（免疫前血清では示されなかった）、これは抗FLAG抗体を用いて検出されたバンドとサイズの点でほぼ同一であった（図17）。

【0244】

(17) GCUD1由来の候補ペプチドの予測

表2（GCUD1）は、候補ペプチド（配列番号：155～194）を結合親和性の高い順に示している。合計40種のペプチドを下記の通りに選択して検討した。

【0245】

（表2）GCUD1由来の候補ペプチドの予測

HLA-A*0201 9 アミノ酸長

ランク	配列	スコア	位置
1	SIFKPFIFV	369.77	303
2	WLWGAEMGA	189.68	75
3	IMISRPRAWL	144.26	68
4	LLGMDLVRL	83.527	107
5	FIFVDDVKL	49.993	308
6	VCIDSEFFL	31.006	265
7	KPFIFVDDV	25.18	306
8	IVDRDEAWV	22.761	159
9	TLRDKASGV	21.672	257
10	KMDAEHPEL	21.6	196
11	ALDVIVSLL	19.653	126
12	YAQSQGWWT	19.639	207
13	KLRSTMLEL	13.07	367
14	YLIVDRDEA	11.198	157
15	AAPPSYCFV	7.97	3
16	GMDLVRLGL	6.171	109
17	KVTEGVRCI	6.026	179
18	CIDSEFFLT	4.517	266
19	TVQTMNTL	4.299	250
20	EMGANEHGV	3.767	80

HLA-A*0201 10 アミノ酸長

ランク	配列	スコア	位置
1	FIFVdDVKLV	374.37	308
2	LMDrDEAWV	366.61	158
3	FLTTaSGVSV	319.94	272
4	TMLEIEKQGL	234.05	371
5	ALLGmDLVRL	181.79	106
6	AIMIsRPRAWL	59.775	67
7	GVCIdSEFFL	59.628	264
8	KLVPkTQSPC	17.388	315
9	FNFSaVFSPV	14.682	220
10	YISIdQVPRT	10.841	56
11	GEGEfNFSEV	10.535	216
12	WAAEkVTEGV	8.927	175
13	VLPQnRSSPC	8.446	281
14	AAAPpSYCFV	7.97	2
15	TMMNlLRDKA	6.505	253
16	EVGDIFYDCV	5.227	397
17	AEMGaNEHGV	5.004	79
18	GLVvfGKNSA	4.968	20
19	QLSLiTKMDA	4.968	190
20	RSIFkPFIFV	4.745	302

【0246】

(18) 候補ペプチドを用いたT細胞の刺激およびCTLクローンの樹立

「材料および方法」の項に記載した様式で、GCUD1由来のこれらの候補ペプチドを用いてリンパ系細胞を培養した。その結果得られた、検出可能な細胞障害活性を示すリンパ系細胞を増やしてCTLクローンを樹立した。CTLクローンを上記のCTL系列から限界希釈法を用いて増殖させた。GCUD1-196（KMDAEHPEL）（配列番号：164）およびGCUD1-272（FLTTASGVS）（配列番号：177）によって誘導されたCTLクローンは、ペプチドで標識しなかった標的に対する細胞障害活性と比較して、ペプチドで標識した標的に対する細胞障害活性を、より高度に示した。これらのCTLクローンの細胞障害活性を図18に示した。それぞれのCTLクローンは、ペプチドで標識した標的に対して極めて強力な細胞障害活性を示したが、

ペプチドで標識しなかった標的に対しては細胞障害活性を示さなかった。

【0247】

(19) GCUD1を標的として内因性に発現する腫瘍細胞株に対する細胞障害活性

予測されたペプチドに対して生成させたCTLクローンについて、GCUD1を内因性に発現する腫瘍細胞を認識して死滅させる、その能力を検討した。図19は、GCUD1-196 (配列番号: 164) に対して生成させたCTLクローン23の結果を示している。CTLクローン23は、GCUD1およびHLA-A*0201を発現するSNU475に対しては強力な細胞障害活性を示したが、GCUD1を発現するがHLA-A*0201は発現しないMKN45に対しては示さなかった。

【0248】

(20) 樹立されたCTLの特異性

GCUD1-196 CTLクローンの特異性を確かめるために、非標識標的阻害アッセイも行った。⁵¹Crによって標識したSNU475細胞を放射性標的として用い、⁵¹Cr標識を行わずにGCUD1-196で標識したT2細胞を非放射性標的として用いた。GCUD1-196 (配列番号: 164) で標識したT2をアッセイ系に様々な比で添加すると、SNU475細胞に対する特異的細胞溶解は有意に阻害された (図20)。これらの結果は、E/T比を20とした場合の特異的溶解の比率として示されている。

【0249】

GCUD1-196 (配列番号: 164) CTLクローンに関して、これらのCTLクローンの特徴を検討するために、HLAクラスI、HLAクラスII、CD4およびCD8に対する抗体について、細胞障害活性を阻害する能力を調べた。SNU475細胞に対するCTLクローンの細胞障害性は、抗HLAクラスI抗体および抗CD8抗体を用いた場合に有意に低下し (図21)、このことからCTLクローンがGCUD1由来のペプチドをHLAクラスIおよびCD8様式で認識することが示された。

【0250】

(21) ヒト結腸癌 (colon cancer) において高頻度に上方制御される遺伝子FLJ20315の同定

23040種の遺伝子を含むcDNAマイクロアレイを用いて、11例の結腸癌組織の発現プロフィールを対応する結腸非癌粘膜組織と比較した。この分析によれば、多数の遺伝子の発現レベルが、対応する非癌組織と比較して癌組織で高頻度に上昇していた。そのうち、UniGeneクラスター (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>) のEST (FLJ20315)、Hs.18457に対応する施設内アクセッション番号B4469の遺伝子が、対応する非癌粘膜と比較して癌組織において1.44~11.22倍の範囲で上方制御されていた (図22a)。FLJ20315は18例の胃癌症例のうち6例、20例のHCC症例のうち12例、22例の肺癌 (腺癌) 症例のうち11例、2例の精巣腫瘍症例のうち2例、および9例の前立腺癌症例のうち3例でも上方制御されていた。このマイクロアレイの結果を明らかにするために、そのほかの結腸癌試料におけるこれらの転写物の発現を半定量的RT-PCRによって検討したところ、18例の腫瘍のうち15例でFLJ20315発現の上昇が確かめられた (図22b)。

【0251】

(22) RNF43の発現および構造

BLASTプログラムを用いて、米国国立バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information) の公開データベースにおけるFLJ20315配列のさらなる相同性検索を行ったところ、XM_097063、BF817142を含むEST、および染色体バンド17pter-p13.1に指定されているGenBankアクセッション番号NT-010651のゲノム配列が同定された。その結果、783アミノ酸のタンパク質 (配列番号: 6) をコードする2352ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを含む5345ヌクレオチドのアセンブルされた配列 (配列番号: 5) (GenBankアクセッション番号: AB081837) が得られた。この遺伝子はRNF43 (Ring finger protein 43) と命名された。最初のATGは、真核生物における翻訳開始のためのコンセンサス配列と一致する配列 (AGCATGC)、および上流にあるインフレームの終止コドンに隣接していた。cDNAとゲノム配列との比較により、この遺伝子が11個のエクソンからなることが判明した。RNF43のPCR産物をプローブとして成人多組織ノーザンブロットを用いたノーザンブロット分析では、バンドは検出されなかった (データは示していない)

10

20

30

40

50

)。しかし、5.2kbの転写物が胎児肺および胎児腎臓で発現されることが、同じPCR産物をプローブとして用いるヒト胎児組織ノーザンブロットを用いて明らかになった(図23a)。Simple Modular Architecture Research Tool (SMART、<http://smart.embl-heidelberg.de>)を用いたタンパク質モチーフに関する検索により、予想されるタンパク質がリングフィンガーモチーフを1つ含むことが判明した(コドン272~312)(図23b)。

【0252】

(23) myc標識RNF43タンパク質の細胞内局在

RNF43タンパク質の細胞内局在を調べるために、myc標識RNF43タンパク質を発現するプラスミド(pDNAmyc/His-RNF43)をCOS7細胞に一過性にトランスフェクトした。この細胞からの抽出物および抗myc抗体を用いたウエスタンブロット分析により、標識されたタンパク質に対応する85.5kDaのバンドが示された(図24a)。続いて、同じ抗体を用いて細胞の免疫組織化学染色を行ったところ、このタンパク質が主として核内に存在することが示された(図24b)。SW480ヒト結腸癌細胞でもRNF43タンパク質の同様の細胞内局在が観察された。

【0253】

(24) 細胞増殖に対するRNF43の効果

RNF43を発現するプラスミド(pcDNA-RNF43)をNIH3T3細胞にトランスフェクトすることにより、コロニー形成アッセイを行った。pcDNA-RNF43をトランスフェクトした細胞は、対照細胞よりも有意に多数のコロニーを形成した(図25a)。RNF43によるコロニー形成活性の上昇は、RNF43の内因性発現が極めて少ないSW480細胞でも示された(データは示していない)。この増殖促進作用をさらに検討するために、外因性RNF43を安定的に発現するCOS7細胞(COS7-RNF43)を樹立した(図25b)。10%FBSを含む培養液中でのCOS7-RNF43細胞の増殖速度はCOS7-擬似細胞の増殖速度よりも有意に大きかった(図25c)。

【0254】

(25) RNF43の発現を低下させるように指定されたアンチセンスS-オリゴヌクレオチドによる、結腸癌細胞の増殖抑制

RNF43の発現抑制が結腸癌細胞の増殖遅延および/または細胞死をもたらすか否かを検証するために、対照S-オリゴヌクレオチドおよびRNF43に対応するアンチセンスS-オリゴヌクレオチドを5組合成し、検討した11種の結腸癌細胞株の中でRNF43の発現レベルが最も高かったLoVo結腸癌細胞にトランスフェクトした。5種類のアンチセンスS-オリゴヌクレオチドのうち、RNF43-AS1は、トランスフェクションから12時間後の時点で、対照S-オリゴヌクレオチド(RNF43-S1)と比較してRNF43の発現を有意に抑制した(図26a)。トランスフェクションから6日後の時点で、RNF43-AS1をトランスフェクトした生細胞の数はRNF43-S1をトランスフェクトした生細胞の数よりも有意に少なく、このことからRNF43の発現抑制がトランスフェクト細胞の増殖および/または生存性を低下させることが示唆された(図26b)。3回の独立した実験で一致する結果が得られた。

【0255】

(26) RNF43 siRNAを発現するプラスミドの構築、および結腸癌細胞の増殖に対するその効果

哺乳動物細胞において、19個の相補的ヌクレオチドおよび3'末端のチミジンまたはウリジンの相補的二量体を有する20塩基長または21塩基長の二本鎖RNA(dsRNA)から構成される低分子干渉RNA(siRNA)は、遺伝子発現の全体的な変化を伴わずに、遺伝子特異的な遺伝子サイレンシング作用を有することが最近示されている。このため、RNF43発現に対する効果について検討するために、様々なRNF43-siRNAを発現するプラスミドを構築した。種々のRNF43-siRNAのうち、psiH1BX-RNF16-4およびpsiH1BX-RNF1834は、SNUC4細胞におけるRNF43の発現を有意に抑制した(図27A)。RNF43の抑制が結腸癌細胞の増殖抑制をもたらすか否かを検証するために、SNUC4細胞にpsiH1BX-RNF16-4、psiH1BX-RNF1834、または擬似ベクターをトランスフェクトした。アンチセンスS-オリゴヌクレオチドのデータと一致して、psiH1BX-RNF16-4またはpsiH1BX-RNF1834をトランスフェクトした生細胞の数は対照生細胞の数よりも少なかった(図27B、27C)。

【 0 2 5 6 】

(27) 外因性Flag標識RNF43タンパク質による、COS7細胞の培養液中へのFlag標識RNF43タンパク質の分泌

RNF43のアミノ酸配列を有するタンパク質モチーフに関するSimple Modular Architecture Research Tool (SMART、<http://smart.embl-heidelberg.de>)を用いた検索によって、1つのシグナルペプチドおよび1つのリングフィンガードメインが予想されたことから、RNF43タンパク質の分泌について検討した。Flag標識RNF43を発現するプラスミド (pFLAG-RNF43) またはMyc標識RNF43を発現するプラスミド (pcDNA3.1-Myc/His-RNF43) または擬似ベクターをCOS7細胞にトランスフェクトし、0.5%ウシ胎仔血清を添加した培地中で細胞を48時間培養した。抗Flag抗体または抗Myc抗体を用いたウエスタンブロット分析により、分泌されたFlag標識RNF43またはMyc標識タンパク質が、それぞれpFLAG-RNF43またはpcDNA3.1-Myc/His-RNF43をトランスフェクトした細胞を含む培地中には検出されたが、擬似ベクターを有する細胞を含む培地中には検出されなかった (図28Aおよび28B)。

10

【 0 2 5 7 】

(28) NIH3T3細胞に対する、pFLAG-RNF43をトランスフェクトした細胞の培養液の効果

RNF43の外因性発現はNIH3T3細胞に対する増殖促進作用をもたらしたため、分泌されたFlag標識RNF43にもNIH3T3細胞に対する増殖作用があるか否かを検討した。NIH3T3細胞を培地を変更せずに培養するか、擬似トランスフェクト細胞またはpFlag-RNF43をトランスフェクトした細胞の馴化培地を用いて培養した。予想された通り、pFlag-RNF43またはpcDNA3.1-Myc/His-RNF43をトランスフェクトされた細胞の馴化培地中で培養した細胞は、非処理細胞または擬似ベクターをトランスフェクトされた細胞の馴化培地中で培養した細胞と比較して有意に高い増殖速度を示した (図29Aおよび29B)。これらのデータは、RNF43がその増殖促進作用を自己分泌的な様式で発揮することを示唆する。

20

【 0 2 5 8 】

(29) 組換えアミノ末端およびカルボキシル末端RNF43タンパク質の調製

RNF43に対する特異的抗体を作製するために、Nus標識RNF43タンパク質を発現するプラスミドを構築した (図30A)。このプラスミドを大腸菌BL21trxB (DE3) pLysS細胞に形質転換導入したところ、細菌抽出物における予想されるサイズの組換えタンパク質の産生がSDS-PAGEにより観察された (図30Bおよび30C)。

【 0 2 5 9 】

(30) 酵母2-ハイブリッドスクリーニング系によるRNF43相互作用性タンパク質の同定

RNF43の発癌機構を明らかにするために、酵母2-ハイブリッドスクリーニング系を用いてRNF43相互作用性タンパク質を検索した。同定された陽性クローンのうち、NOTCH2またはSTRINは、酵母細胞でpAS2.1-RNF43およびpACT2-NOTCH2 (図31B)、またはpAS2.1-RNF43およびpACT2-STRIN (図32B)を用いた同時形質転換により、RNF43と相互作用した。NOTCH2およびSTRINにおける相互作用の原因となる領域はそれぞれ図31Aおよび図32Aに示されている。

30

【 0 2 6 0 】

(31) RNF43由来のHLA-A24結合ペプチドの予測

RNF43のアミノ酸配列を、HLA-A24と結合するペプチドである9アミノ酸長または10アミノ酸長のペプチドに関して、結合予測ソフト (http://bimas.dcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform)を用いてスキャンした。表3は、予測されたペプチド (配列番号:71~90)を結合親和性の高い順に示している。合計20種のペプチドを下記の通りに選択して検討した。

40

【 0 2 6 1 】

(表3) HLA-A24との結合が予測されるRNF43ペプチド

(http://bimas.dcr.t.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform)

開始位置	アミノ酸配列 (9アミノ酸長)	結合親和性 *1	開始位置	アミノ酸配列 (10アミノ酸長)	結合親和性
RNF43-331	SYQEPGRRL	360	RNF43-449	SYCTERSGYL	200
RNF43-350	HYHLPAAAYL	200	RNF43-350	HYHLPAAAYL	200
RNF43-639	LFNLQKSSL	30	RNF43-718	CYSNSQPVWL	200
RNF43-24	GFGRTGLVL	20	RNF43-209	IFVILASVL	36
RNF43-247	RYQASCRQA	15	RNF43-313	VFNTEGDSF	15
RNF43-397	RAPGEEQRL	14	RNF43-496	TFCSSLSSDF	12
RNF43-114	RAPRPCLSL	12	RNF43-81	KLMQSHPLYL	12
RNF43-368	RPPRPGPFL	12	RNF43-54	KMDPTGKLNL	9
RNF43-45	KAVIRVIPL	12	RNF43-683	HYTPSVAYPW	8
RNF43-721	NSQPVWLCL	10	RNF43-282	GQELRVISCL	4

10

この表において、開始位置はRNF43のN末端からのアミノ酸の位置を表す。

【 0 2 6 2 】

(32) 予測されたペプチドを用いたT細胞の刺激

RNF43由来のこれらのペプチドに対するCTLを、「材料および方法」の項に記載の方法に従って作製した。その結果得られた、検出可能な細胞障害活性を示すリンパ系細胞を増やしてCTL系列を樹立した。

20

【 0 2 6 3 】

9アミノ酸長ペプチド(配列番号:71~80)刺激によって誘導されたCTL系列の細胞障害活性を表4に示した。

【 0 2 6 4 】

(表4) CTL系列の細胞障害性(9アミノ酸長)

開始位置	アミノ酸配列	結合親和性	細胞傷害性				樹立した CTLクローン
			×20		×2		
			Pep(+)	Pep(-)	Pep(+)	Pep(-)	
RNF43-331	SYQEPGRRL	360.0	2%	1%	0%	0%	
RNF43-350	HYHLPAAAYL	200.0	26%	17%	5%	4%	
RNF43-639	LFNLQKSSL	30.0	42%	33%	7%	5%	1
RNF43-24	GFGRTGLVL	20.0	8%	9%	1%	2%	
RNF43-247	RYQASCRQA	15.0	71%	82%	28%	16%	
RNF43-397	RAPGEEQRL	14.4	41%	32%	15%	15%	
RNF43-114	RAPRPCLSL	12.0	23%	26%	6%	9%	
RNF43-368	RPPRPGPFL	12.0	1%	0%	0%	0%	
RNF43-45	KAVIRVIPL	12.0	NE				
RNF43-721	NSQPVWLCL	10.0	68%	0%	26%	0%	13

30

40

NE: CTLクローンが樹立されず

RNF43-350 (HYHLPAAAYL) (配列番号:72)、RNF43-639 (LFNLQKSSL) (配列番号:73)、およびRNF43-721 (NSQPVWLCL) (配列番号:80)によって刺激されたCTL系列は、ペプチドで標識しなかった標的に対する細胞障害活性と比較して、ペプチドで標識した標的に対する細胞障害活性を、より高度に示した。これらのCTLクローンから出発して、RNF43-639について1つのCTLクローンが樹立され、RNF43-721について13種のCTLクローンが樹立された。

【 0 2 6 5 】

50

RNF43-721によって刺激されたCTL系列は、ペプチドで標識した標的に対して強力な細胞障害活性を示したが、ペプチドで標識しなかった標的に対してはいかなる細胞障害活性も示さなかった(図33)。

【0266】

10アミノ酸長ペプチド(配列番号:81~90)で刺激したCTL系列の細胞障害活性を検討することによって得られた結果を表5に示した。

【0267】

(表5) CTL系列の細胞障害性(10アミノ酸長)

開始位置	アミノ酸配列	結合親和性	細胞傷害性				樹立した CTLクローン
			×20		×2		
			Pep(+)	Pep(-)	Pep(+)	Pep(-)	
RNF43-449	SYCTERSGYL	200.0	1%	1%	0%	0%	
RNF43-350	HYHLPAAYLL	200.0			NE		
RNF43-718	CYSNSQPVWL	200.0			NE		
RNF43-209	IFVLILASVL	36.0			合成せず		
RNF43-313	VFNLTEGDSF	15.0			合成せず		
RNF43-496	TFCSLSSDF	12.0	8%	9%	0%	0%	
RNF43-81	KLMQSHPLYL	12.0	10%	5%	2%	-3%	20
RNF43-54	KMDPTGKLNL	9.6	5%	2%	0%	-1%	
RNF43-683	HYTPSVAYPW	8.4	0%	0%	0%	-1%	
RNF43-282	GQELRVISCL	8.4			NE		

NE: CTLクローンが樹立されず

RNF43-81(KLMQSHPLYL)(配列番号:87)またはRNF43-54(KMDPTGKLNL)(配列番号:88)によって刺激されたCTL系列は、ペプチドで標識しなかった標的に対する細胞障害活性と比較して、ペプチドで標識した標的に対して若干の細胞障害活性を示した。

【0268】

(33) CTLクローンの樹立

上記の通りに、限界希釈法を用いてCTLクローンをCTL系列から増殖させた。RNF43-721に対する13種のCTLクローン、およびRNF43-639に対する1つのCTLクローンが樹立された(表4、前記を参照)。RNF43-721 CTLクローンの細胞障害活性は図34に示されている。それぞれのCTLクローンは、ペプチドで標識した標的に対して強力な細胞障害活性を示したが、ペプチドで標識しなかった標的に対してはいかなる細胞障害活性も示さなかった。

【0269】

(34) RNF43を標的として内因性に発現する結腸直腸癌細胞株に対する細胞障害活性

予測されたペプチドに対して生成させたCTLクローンについて、RNF43を内因性に発現する腫瘍細胞を認識して死滅させる、その能力を検討した。図35は、RNF43-721に対して生成させたCTLクローン45の結果を示している。CTLクローン45は、RNF43およびHLA-A24の両方を発現するHT29およびWiDRに対して強力な細胞障害活性を示した。一方、CTLクローン45は、HCT116(RNF43を発現するがHLA-A24は発現しない)またはTISI(HLA-A24を発現するがRNF43は発現しない)に対しては細胞障害活性を示さなかった。さらにCTLクローン45は、無関係なペプチドで標識したTISI、およびRNF43を発現するがHLA-A24はほとんど発現しないSNU-C4に対しては細胞障害活性を示さなかった(データは示していない)。

【0270】

(35) 樹立されたCTLの特徴分析

RNF43-721 CTLクローンの特異性を確かめるために、非放射性標的阻害アッセイを行った。⁵¹Crによって標識したHT29細胞を放射性標的として用い、⁵¹Cr標識を行わずにRNF43-721で標識したTISI細胞を非放射性標的として用いた。RNF43-721で標識したTISIをアッセ

10

20

30

40

50

イ系に様々な比で添加したところ、HT29細胞に対する特異的細胞溶解は有意に阻害された（図36）。この結果は、E/T比を20とした場合の特異的溶解の比率として示されている。RNF43ペプチドに対して生成させたCTLクローンの特徴を検討するために、HLAクラスI、HLAクラスII、CD3、CD4、およびCD8に対する抗体について、CTLクローン細胞障害活性を阻害する能力を調べた。WiDR細胞標的に対するCTLクローンの細胞障害性は、抗HLAクラスI抗体、抗CD3抗体および抗CD8抗体を用いた場合に有意に低下した（図37）。この結果は、CTLクローンがRNF43由来のペプチドをHLAクラスI、CD3およびCD8を介して認識することを示している。

【 0 2 7 1 】

(36) RNF43-721ペプチドの相同性解析

10

RNF43-721に対して樹立されたCTLクローンは極めて強力な細胞障害活性を示した。この結果は、RNF43-721の配列が、ヒト免疫系を感作させることが知られた他の分子に由来するペプチドと相同であることを示す可能性がある。この可能性を否定するために、BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) を用いてRNF43-721の相同性解析を行った。BLASTに収められた分子の中には、RNF43-721と完全に一致する配列も相同性の高い配列も認められなかった（表6）。

【 0 2 7 2 】

(表6) RNF43-721の相同性解析

(BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>)

同一性 (9/9)	0
同一性 (8/9)	0
同一性 (7/9)	0
同一性 (6/9)	2

20

これらの結果は、RNF43-721の配列が特有であり、RNF43-721を用いて樹立されたCTLクローンが他の分子に対する免疫応答を誘発する可能性は低いことを示している。

【 0 2 7 3 】

(37) エピトープ提示効率を向上させるためのRNF43-721の改変

ペプチド提示の効率を向上させるため、RNF43-721ペプチドをアンカー部位でのアミノ酸変更によって改変した。この改変により、ペプチドのHLAクラスI分子に対する結合親和性が向上すると考えられる。表7は、アミノ酸の2位が変化したRNF43-721においてHLA-A24分子に対する結合親和性が向上したことを示している（配列番号：91および92）。

30

【 0 2 7 4 】

(表7) RNF43-721の元のペプチドから改変されたペプチドにおいて予想される結合能力

配列	スコア	ランク*
NSQPVWLCL	10.08	10
NFQPVWLCL	50.40	3
NYQPVWLCL	504.00	1

40

* HLA-A24拘束的な9アミノ酸長ペプチド

【 0 2 7 5 】

(38) RNF43由来の候補ペプチドの予測

表8は、候補ペプチド（配列番号：87および93～111）を結合親和性の高い順に示している。

【 0 2 7 6 】

(表8) RNF43：エピトープペプチドの予測（HLA-A*0201）

9アミノ酸長

10アミノ酸長

番号	開始位置	配列	スコア	番号	開始位置	配列	スコア
1	60	KLNLTLLEGV	274.3	11	81	KLMQSHPLYL	1521.5
2	8	QLAALWPWL	199.7	12	357	YLLGPSRSAV	1183.7
3	82	LMQSHPLYL	144.2	13	202	LMTVVGTIFV	469.6
4	358	LLGPSRSAV	118.2	14	290	CLHEFHRNCV	285.1
5	11	ALWPWLLMA	94.8	15	500	SLSSDFDPLV	264.2
6	15	WLLMATLQA	84.5	16	8	QLAAIWPWLL	160.2
7	200	WILMTVVGT	40.1	17	11	ALWPWLLMAT	142.2
8	171	KLMEFVYKN	34.5	18	7	LQLAALWPWL	127.3
9	62	NLTLEGVFA	27.3	19	726	WLCLTPRQPL	98.2
10	156	GLTWPVCLI	23.9	20	302	WLHQHRTCPL	98.2

合計20種のペプチドを下記の通りに選択して検討した。

【0277】

(39) 候補ペプチドを用いたT細胞の刺激

「材料および方法」の項に記載した方法に従い、RNF43由来の候補ペプチドを用いてリンパ系細胞を培養した。その結果得られた、検出可能な細胞障害活性を示すリンパ系細胞を増やしてCTLクローンを樹立した。9アミノ酸長ペプチド(配列番号:93~102)を用いて刺激することで誘導されたCTL系列の細胞障害活性を表9に示した。

【0278】

(表9) CTL系列の細胞障害性 (HLA-A*0201 9アミノ酸長)

開始位置	アミノ酸配列	結合親和性	細胞傷害性 (%)			
			×20		×2	
			Pep(+)	Pep(-)	Pep(+)	Pep(-)
RNF43-60	KLNLTLLEGV	274.3	-2.1	0.2	-1.6	0.0
RNF43-8	QLAALWPWL	199.7	3.5	0.0	0.0	1.0
RNF43-82	LMQSHPLYL	144.2	1.7	1.2	0.0	-0.4
RNF43-358	LLGPSRSAV	118.2	-0.4	-0.7	0.0	-0.8
RNF43-11	ALWPWLLMA	94.8	90.2	1.5	45.4	1.3
RNF43-15	WLLMATLQA	84.5	-0.2	0.0	-0.4	-0.9
RNF43-200	WILMTVVGT	40.1	合成せず			
RNF43-171	KLMEFVYKN	34.5	2.6	0.0	1.1	-0.5
RNF43-62	NLTLEGVFA	27.3	合成せず			
RNF43-156	GLTWPVCLI	23.9	-0.4	0.7	-0.5	-0.3

NE: CTLクローンが樹立されず

RNF43-11-9 (ALWPWLLMA) (配列番号:97) によって誘導されたCTL系列は、ペプチドで標識しなかった標的に対する細胞障害性活性と比較して、ペプチドで標識した標的に対する細胞障害性活性を、より高度に示した。これらのCTLクローンから出発して、4種のCTLクローンがRNF43-11-9を用いて樹立された。RNF43-11-9によって刺激されたCTL系列は、ペプチドで標識した標的に対して強力な細胞障害活性を示したが、ペプチドで標識しなかつ

た標的に対してはいかなる明らかな細胞障害活性も示さなかった（図38A）。

【0279】

10アミノ酸長ペプチド（配列番号：87および103～111）によって刺激したCTL系列の細胞障害活性の検討の結果を表10に示した。

【0280】

（表10）CTL系列の細胞障害性（HLA-A*0201 10アミノ酸長）

開始位置	アミノ酸配列	結合親和性	細胞傷害性(%)			
			×20		×2	
			Pep(+)	Pep(-)	Pep(+)	Pep(-)
RNF43-81	KLMQSHPLYL	1521.5	18.0	27.6	6.3	8.3
RNF43-357	YLLGPSRSAV	1183.7	18.2	15.4	3.7	3.0
RNF43-202	LMTVVGTFIV	469.6	合成せず			
RNF43-290	CLHEFHRNCV	285.1	9.6	9.7	2.7	3.7
RNF43-500	SLSSDFDPLV	264.2	NE			
RNF43-8	QLAAIWPWLL	160.2	6.7	9.0	1.1	1.3
RNF43-11	ALWPWLLMAT	142.2	91.5	27.1	40.5	4.3
RNF43-7	LQLAALWPWL	127.3	NE			
RNF43-726	WLCLTPRQPL	98.2	NE			
RNF43-302	WLHQHRTCPL	98.2	7.4	6.1	1.5	2.2

NE：CTLクローンが樹立されず

RNF43-11-10（ALWPWLLMAT）（配列番号：108）によって誘導されたCTL系列は、ペプチドで標識しなかった標的に対する細胞障害活性と比較して、ペプチドで標識した標的に対する細胞障害活性を、より高度に示した。（図38B）。

【0281】

（40）CTLクローンの樹立

CTLクローンを上記のCTL系列から限界希釈法を用いて増殖させた。RNF43-11-9に対する4種のCTLクローンが樹立された（表9、前記参照）。RNF43ペプチド由来のCTLクローンの細胞障害活性は図39Aおよび39Bに示されている。それぞれのCTLクローンは、ペプチドで標識しなかった標的に対してはいかなる細胞障害活性も示さなかったが、ペプチドで標識した標的に対しては極めて強力な細胞障害活性を示した。

【0282】

（41）RNF43を標的として内因性に発現する結腸直腸癌細胞株に対する細胞障害活性

予測されたペプチドに対して生成させたCTLクローンについて、RNF43を内因性に発現する腫瘍細胞を認識して死滅させる、その能力を検討した。図40Aおよび40Bは、RNF43由来のペプチドに対して生成させたCTLクローンについて得られた結果を示している。これらのCTLクローンは、RNF43およびHLA-A*0201の両方を発現するDLD-1に対しては強力な細胞障害活性を示したが、RNF43を発現するがHLA-A*0201を発現しないHT29に対しては細胞障害活性を示さなかった。

【0283】

（42）CTLクローンの特異性

RNF43-11（9アミノ酸長）CTLクローンの特異性を確かめるために、非放射性標的阻害アッセイを行った。⁵¹Crで標識したHCT116細胞を放射性標的として用い、⁵¹Cr標識を行わずにRNF43-11で標識したT2細胞を非放射性標的として用いた。HCT-116細胞標的の特異的細胞溶解は、RNF43-11で標識したT2をアッセイ系に様々な比で添加すると有意に阻害された（図41）。

【0284】

産業上の利用可能性

新規ヒト遺伝子CXADRL1およびGCUD1の発現は、癌でない胃組織と比較して胃癌において顕著に上昇している。一方、新規ヒト遺伝子RNF43の発現は癌でない粘膜組織と比較して結腸直腸癌において顕著に上昇している。したがって、これらの遺伝子は癌の診断マーカーとして役立つ可能性があり、それらの遺伝子によってコードされるタンパク質は癌の診断アッセイに用いられる可能性がある。

【0285】

本発明者らは、新規タンパク質CXADRL1、GCUD1、またはRNF43の発現が細胞増殖を促進し、一方、CXADRL1、GCUD1、またはRNF43遺伝子に対応するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは低分子干渉RNAによって細胞増殖が抑制されることも示した。これらの所見は、CXADRL1、GCUD1、およびRNF43タンパク質のそれぞれが発癌活性を誘発することを示唆する。このため、これらの新規腫瘍性タンパク質は抗癌薬の開発にとって有用な標的となる。例えば、CXADRL1、GCUD1、もしくはRNF43の発現を阻止する作用物質、またはその活性を妨げる作用物質には、抗癌剤、特に胃癌および結腸直腸癌の治療用の抗癌剤として治療上の有用性があると考えられる。このような作用物質の例には、アンチセンスオリゴヌクレオチド、低分子干渉RNA、およびCXADRL1、GCUD1、またはRNF43を認識する抗体が含まれる。

【0286】

さらに、本発明者らは、CXADRL1がAIP1と相互作用することを示した。CXADRL1の細胞増殖活性はCXADRL1とAIP1との結合によって調節されると考えられる。このため、CXADRL1とAIP1から構成される複合体の形成活性を阻害する作用物質も、癌、特に結腸直腸癌、肺癌、胃癌、および肝臓癌の治療および予防に有用な可能性がある。また、本発明者らはRNF43がNOTCH2またはSTRINと相互作用することも示した。RNF43の細胞増殖活性はRNF43とNOTCH2またはSTRINとの結合によって調節されると考えられる。このため、RNF43とNOTCH2またはSTRINから構成される複合体の形成活性を阻害する作用物質も、癌、特に結腸直腸癌、肺癌、胃癌、および肝臓癌の治療および予防に有用な可能性がある。

【0287】

本発明を、その特定の態様に言及しながら詳細に説明してきたが、発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、様々な変更および修正を行うことができることは当業者には明らかであると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0288】

【図1】胃癌におけるA5928 (CXADRL1) およびC8121 (GCUD1) の発現を示す。図1aは、cDNAマイクロアレイによって調べた14例の原発性胃癌におけるA5928の相対的な発現比 (癌/非癌) を示す。その発現は、カットオフフィルター (Cy3シグナルおよびCy5シグナルの両方が25,000を上回る) を通過した14例の胃癌のうち14例すべてにおいて上方制御されていた (Cy3 : Cy5強度比が > 2.0)。図1bは、cDNAマイクロアレイによって調べた12例の原発性胃癌におけるC8121の相対的な発現比 (癌/非癌) を示す。その発現は、カットオフフィルターを通過した12例の胃癌のうち10例で上方制御されていた (Cy3 : Cy5強度比が > 2.0)。図1cは、10例の胃癌症例を用いて半定量的RT-PCRによって分析したCXADRL1の発現を示す。図1dは、9例の胃癌症例を用いて半定量的RT-PCRによって分析したGCUD1の発現を示す。CXADRL1およびGCUD1いずれの発現分析に関してもGAPDHの発現を内部対照として用いた。

【図2】種々のヒト組織におけるCXADRL1の発現、ならびにCXADRL1の予想されるタンパク質構造およびタンパク質モチーフを示す。図2aは、多組織ノーザンプロット分析によって分析した、種々のヒト組織におけるCXADRL1の発現を示した写真である。図2bは、CXADRL1の予想されるタンパク質構造を示す。CXADRL1 cDNAは1,296ヌクレオチドのORFを含む3,423ヌクレオチドからなり、7つのエクソンから構成される。

【図3】CXADRL1の増殖促進作用を示す。図3aは、CXADRL1をトランスフェクトしたNIH3T3

10

20

30

40

50

細胞のコロニー形成アッセイの結果を示した写真である。図3bは、半定量的RT-PCRによって分析した、NIH3T3-CXADRL1細胞における外因性 CXADRL1の発現を示す。GAPDHの発現を内部対照として用いた。#2、#5、#6および#7はすべてCXADRL1をトランスフェクトしたNIH3T3細胞を示す。図3cはNIH3T3細胞の数を示す。10%FBSを含む培地中でのNIH3T3-CXADRL1細胞の増殖は擬似 (NIH3T3-LacZ) 細胞の増殖よりも統計学的に高度であった ($P < 0.05$)。

【図4】MKN-1細胞における、CXADRL1を抑制するために指定されたアンチセンスS-オリゴヌクレオチドの増殖阻害作用を示す。CXADRL1-AS4およびCXADRL1-AS5はMKN-1細胞の増殖を抑制することが示された。

【図5】St-4細胞に対するCXADRL1-siRNAの増殖抑制作用を示す。図5Aは、擬似siRNAまたはCXADRL1-siRNA#7をトランスフェクトしたSt-4細胞におけるCXADRL1およびGAPDH (対照)の発現を示した写真を提示する。図5Bは、対照-siRNAまたはCXADRL1-siRNA#7で処理した生細胞のギムザ染色の結果を示した写真を示す。図5Cは、対照プラスミドまたはCXADRL1-siRNA7を発現するプラスミドをトランスフェクトした細胞に対してMTTアッセイを行った結果を示す。

【図6】抗CXADRL1抗血清または抗Flag抗体を用いた、外因性Flag標識CXADRL1タンパク質を発現する細胞のイムノプロット分析の結果を示した写真を示す。

【図7】酵母2-ハイブリッド系によって検討したCXADRL1とAIP1との相互作用を示す。図7は、2-ハイブリッド系によって検討したCXADRL1とAIP1との相互作用を示した写真である。

【図8】CXADRL1-207の刺激によって生じたCTL系列のペプチド特異的細胞障害性を示す。このCTL系列は、CXADRL1-207で標識した標的細胞 (T2) に対して高い細胞障害活性を示したが、ペプチドで標識しなかった同じ標的細胞 (T2) に対しては明らかな細胞障害活性が検出されなかった。

【図9】SNU475、MKN74、およびSNU-C4に対するCXADRL1-207 CTLクローンの細胞障害活性を示す。CXADRL1-207 CTLクローンは、CXADRL1およびHLA-A*0201の両方を発現するSNU475に対して高い細胞障害活性を示した。これに対して、CXADRL1-207 CTLクローンは、CXADRL1を発現するがHLA-A*0201を発現しないMKN74に対して明らかな細胞障害活性を示さなかった。さらに、このCTLクローンは、HLA-A*0201を発現するがCXADRL1を発現しないSNU-C4に対しても明らかな細胞障害活性を示さなかった。

【図10】非放射性標的阻害アッセイの結果を示す。CXADRL1-207 CTLクローンはCXADRL1-207をHLA-A*0201拘束的な様式で特異的に認識する。Na₂⁵¹CrO₄で標識したSNU475を放射性標的として調製し、CXADRL1-207ペプチドで標識したT2 (ペプチド+) を非放射性標的 (阻害物質) として用いた。E/T比は20に固定した。SNU475の細胞障害活性は同一のペプチドで標識したT2を添加することで阻害されたが、ペプチドで標識しなかったT2を添加してもほとんど阻害されなかった。

【図11】CXADRL1-207 CTLクローンの細胞障害活性における、HLAクラスI、HLAクラスII、CD4、およびCD8に対して産生された抗体の作用を示した阻止アッセイの結果を示す。CXADRL1-207 CTLクローンはHLAクラスIおよびCD8拘束的な様式で細胞障害活性を示した。CXADRL1ペプチドによって生じたCTLクローンの特徴を調べるために、HLAクラスI、HLAクラスII、CD4、およびCD8に対する抗体を細胞障害活性の阻害能力に関して検討した。水平軸は細胞障害性の阻害率 (%) を表す。SNU475標的に対するCTLクローンの細胞障害性は、抗クラスI抗体および抗CD8抗体を用いた場合に有意に低下した。この結果は、CTLクローンがCXADRL1由来のペプチドをHLAクラスIおよびCD8依存的な様式で認識することを示している。

【図12】種々のヒト組織におけるGCUD1のノーザンプロット分析の結果を示した写真である。GCUD1の転写物のサイズは約3.5kbである。

【図13】pcDNA3.1myc/His-GCUD1をトランスフェクトした細胞の免疫細胞化学によって観察されたGCUD1の細胞内局在を示した写真を示す。プラスミドから発現したcMyc標識GCUD1タンパク質は細胞質に局在した。

10

20

30

40

50

【図14】コロニー形成アッセイによって検討したNIH3T3細胞に対するGCUD1の増殖促進作用を示した写真である。

【図15】MKN-28細胞に対する、GCUD1を抑制するように指定されたアンチセンスS-オリゴヌクレオチドの増殖阻害作用を示す。GCUD1-AS5およびGCUD1-AS8はMKN-28細胞の増殖を抑制することが判明した。

【図16】組換えGCUD1タンパク質の精製を示した写真を示す。

【図17】外因性Flag標識GCUD1タンパク質を発現する細胞における、抗GCUD1抗血清または抗Flag抗体を用いてイムノプロット分析を行った結果を示した写真を示す。

【図18】GCUD1-196(図18A)またはGCUD1-272(図18B)の刺激によって生じたCTL系列のペプチド特異的細胞障害性を示す。このCTL系列は、GCUD1-196またはGCUD1-272で標識した標的細胞(T2)に対して高い細胞障害活性を示したが、ペプチドで標識しなかった同じ標的細胞(T2)に対しては明らかな細胞障害活性が検出されなかった。

10

【図19】SNU475およびMKN45に対するGCUD1-196 CTLクローンの細胞障害活性を示す。GCUD1-196 CTLクローンは、GCUD1およびHLA-A*0201の両方を発現するSNU475に対して高い細胞障害活性を示した。これに対して、GCUD1-196 CTLクローンは、GCUD1を発現するがHLA-A*0201を発現しないMKN45に対しては明らかな細胞障害活性を示さなかった。

【図20】非放射性標的阻害アッセイの結果を示す。GCUD1-196 CTLクローンは、GCUD1-196をHLA-A*0201拘束的な様式で特異的に認識する。Na₂⁵¹CrO₄で標識したSNU475を放射性標的として調製し、GCUD1-196ペプチドで標識したT2(ペプチド+)を非放射性標的(阻害物質)として用いた。E/T比は20に固定した。SNU475に対する細胞障害活性は、同一のペプチドで標識したT2を添加することで阻害されたが、ペプチドで標識しなかったT2を添加してもほとんど阻害されなかった。

20

【図21】GCUD1-196 CTLクローンの細胞障害活性における、HLAクラスI、HLAクラスII、CD4、およびCD8に対して産生された抗体の作用を示した阻止アッセイの結果を示す。GCUD1-196 CTLクローンはHLAクラスIおよびCD8に拘束的な様式で細胞障害活性を示した。GCUD1ペプチドによって生じたCTLクローンの特徴を調べるために、HLAクラスI、HLAクラスII、CD4、およびCD8に対する抗体を細胞障害活性の阻害能力に関して検討した。水平軸は細胞障害性の阻害率(%)を表す。SNU475標的に対するCTLクローンの細胞障害性は、抗クラスI抗体および抗CD8抗体を用いた場合に有意に低下した。この結果は、CTLクローンがGCUD1由来のペプチドをHLAクラスIおよびCD8依存的な様式で認識することを示している。

30

【図22】結腸癌におけるFLJ20315の発現を示す。図22aは、cDNAマイクロアレイによって調べた11例の原発性結腸癌症例におけるFLJ20315の相対的な発現比(癌/非癌)を示す。その発現は、カットオフフィルター(Cy3シグナルおよびCy5シグナルの両方が25,000を上回る)を通過した11例の結腸癌症例のうち10例で上方制御された(Cy3: Cy5強度比が>2.0)。図22bは、さらに18例の結腸癌症例を用いて半定量的RT-PCRによって分析したFLJ20315の発現を示している(T、腫瘍組織; N、正常組織)。GAPDHの発現を内部対照として用いた。

【図23】図23aは、種々のヒト胎児組織におけるRNF43の胎児組織ノーザンプロット分析結果を示した写真を示す。図23bはRNF43の予想されるタンパク質構造を示す。

【図24】myc標識RNF43タンパク質の細胞内局在を示した写真を示す。図24aは、pcDNA3.1-myc/His-RNF43または対照プラスミド(擬似)のいずれかをトランスフェクトしたCOS7細胞の抽出物を用いてmyc標識RNF43タンパク質のウエスタンプロット分析を行った結果を示した写真である。図24bは、マウス抗myc抗体で染色してFITC結合二次抗体で可視化したトランスフェクト細胞の写真を示す。核はDAPIで対比染色した。

40

【図25】細胞増殖に対するRNF43の作用を示す。図25aは、NIH3T3細胞におけるRNF43のコロニー形成アッセイの結果を示した写真である。図25bは、擬似(COS7-pcDNA)細胞、およびpcDNA-RNF43をCOS7細胞にトランスフェクトして樹立したCOS7-RNF43細胞におけるRNF43の発現を示した写真を示す。図25cは、細胞増殖に関し、外因性RNF43を安定的に発現するCOS7-RNF43細胞と擬似細胞とを比較した結果を示す。

【図26】RNF43を抑制するように設計されたアンチセンスS-オリゴヌクレオチドの増殖

50

阻害作用を示す。図26aでは、対照S-オリゴヌクレオチド (RNF43-S1) またはアンチセンスS-オリゴヌクレオチド (RNF43-AS1) のいずれかによって12時間処理したLoVo細胞におけるRNF43の発現を、半定量的RT-PCRにより分析して示した写真で示す。図26bは、MTTアッセイによって測定した、対照S-オリゴヌクレオチドまたはアンチセンスS-オリゴヌクレオチドによる処理後のLoVo細胞の細胞生存度を示す。MTTアッセイは3回ずつ行った。

【図27】 RNF43-siRNAの増殖抑制作用を示す。図27Aは、RNF43の発現に対するRNF43-siRNAの作用を示した写真を示す。図27Bは、対照-siRNAまたはRNF43-siRNAによる処理後の生細胞のギムザ染色結果を示した写真を示す。図27Cは、対照プラスミドまたはRNF43-siRNAを発現するプラスミドをトランスフェクトした細胞に対するMTTアッセイの結果を示す。*、Fisherの制約付き最小有意差検定による評価で有意差 ($p < 0.05$)。 10

【図28】 標識したRNF43タンパク質の発現を示す。図28Aは、pFLAG-5CMV-RNF43 (レーン2) または擬似ベクター (レーン1) をトランスフェクトしたCOS7細胞の培養液中に分泌されたFlag標識RNF43タンパク質のウエスタンブロット分析結果を示した写真である。図28Bは、pcDNA3.1-Myc/His-RNF43 (レーン2) または擬似ベクター (レーン1) をトランスフェクトしたCOS7細胞の培養液中に分泌されたMyc標識RNF43タンパク質のウエスタンブロット分析結果を示した写真である。

【図29】 Myc標識またはFlag標識したRNF43タンパク質を含む馴化培地の増殖促進作用を示す。図29Aは、対照培地中 (1)、または擬似ベクター (2)、pcDNA3.1-Myc/His-RNF43 (3)、もしくはpFLAG-5CMV-RNF43 (4) をトランスフェクトしたCOS7細胞の馴化培地中で培養したNIH3T3細胞の形態を示した写真を示す。図29Bは、図29Aに記載された指定の培地中で培養したNIH3T3細胞の数を示す。データは各群に対する3回ずつの実験の平均として示されている; バー、 \pm SE。*、対照、擬似物と比較した場合の有意差 ($p < 0.05$)。 20

【図30】 RNF43のN末端組換えタンパク質 (N1) およびC末端組換えタンパク質 (C1) の調製を示す。図30Aは、組換えタンパク質RNF43-N1およびRNF43-C1の構造図を示す。図30Bは、0.2mM IPTGの存在下 (レーン2) または非存在下 (レーン1) での大腸菌におけるNus (商標) 標識RNF43-N1タンパク質の発現を示した写真である。図30Cは、1mM IPTGの存在下 (レーン2) または非存在下 (レーン1) での大腸菌におけるNus (商標) 標識RNF43-C1タンパク質の発現を示した写真である。

【図31】 酵母2-ハイブリッド系によって検討したRNF43とNOTCH2との相互作用を示す。図31Aは、NOTCH2の予想される構造および相互作用領域を示す。(a) はNOTCH2タンパク質の予想される完全長構造を示し、(b) は予想される相互作用関与領域 (responsible region) を示す (ECD、細胞外ドメイン; TM、膜貫通ドメイン; ICD、細胞内ドメイン)。図31Bは、2-ハイブリッド系によって検討したRNF43とNOTCH2との相互作用を示した写真である。 30

【図32】 酵母2-ハイブリッド系によって検討したRNF43とSTRINとの相互作用を示す。図32AはSTRINの予想される構造および相互作用領域を示す。(a) はSTRINタンパク質の予想される完全長構造を示し、(b) は予想される相互作用担当領域を示す (RING、RINGドメイン)。図32Bは、2-ハイブリッド系によって検討したRNF43とSTRINとの相互作用を示した写真である。

【図33】 RNF43-721の刺激によって生じたCTL系列のペプチド特異的細胞障害性を示す。このCTL系列は、RNF43-721で標識した標的細胞 (TISI) に対しては高い細胞障害活性を示したが (の線)、ペプチドで標識しなかった同じ標的細胞 (TISI) に対しては明らかな細胞障害活性が検出されなかった (の線)。このCTL系列はペプチド特異的細胞障害性を有することが示された。 40

【図34】 RNF43-721の刺激によって生じたCTLクローンのペプチド特異的細胞障害性を示す。材料および方法の項に記載した通りに、ペプチドで標識した標的 (TISI) に対し、13種のRNF43-721 CTLクローンの細胞障害活性を検討した。樹立されたRNF43-721 CTLクローンは、ペプチドで標識した標的細胞 (TISI) に対して極めて強力な細胞障害活性を及ぼしたが、ペプチドで標識しなかった同じ標的細胞 (TISI) に対しては明らかな細胞障害活性を示さなかった。 50

【図35】HT29、WiDR、およびHCT116に対するRNF43-721 CTLクローン45の細胞障害活性を示す。RNF43-721 CTLクローンは、RNF43を内因性に発現する腫瘍細胞をHLA拘束的な様式で認識して溶解する。HT29、WiDR、およびHCT116はいずれもRNF43を内因性に発現し、RNF43-721 CTLクローン45はエフェクター細胞としての役割を果たした。TISIを、RNF43を発現しない標的として用いた。RNF43-721 CTLクローン45は、RNF43およびHLA-A24の両方を発現するHT29（の線）およびWiDR（の線）に対して高い細胞障害活性を示した。一方、RNF43-721 CTLクローン45は、RNF43を発現するがHLA-A24を発現しないHCT116（の線）、およびHLA-A24を発現するがRNF43を発現しないTISI（の線）に対しては明らかな細胞障害活性を示さなかった。さらに、RNF43-721 CTLクローン45は、無関係なペプチドで標識したTISI（の点線）、およびRNF43を発現するがHLA-A24をほとんど発現しないSN U-C4（の線）に対しても細胞障害活性を示さなかった。

10

【図36】非放射性標的阻害アッセイの結果を示す。RNF43-721 CTLクローンは、RNF43-721をHLA-A24拘束的な様式で特異的に認識する。Na₂⁵¹CrO₄で標識したHT29を放射性標的として調製し、RNF43-721ペプチドで標識したTISI（ペプチド+）を非放射性標的（阻害物質）として用いた。E/T比は20に固定した。HT29に対する細胞障害活性は同一のペプチドで標識したTISIを添加することで阻害されたが（の線）、ペプチドで標識しなかったTISIを添加してもほとんど阻害されなかった（の線）。

【図37】RNF43-721 CTLクローンの細胞障害活性における、HLAクラスI、HLAクラスII、CD3、CD4、およびCD8に対して産生された抗体の作用を示した阻止アッセイの結果を示す。RNF43-721 CTLクローンは、HLAクラスI、CD3、およびCD8拘束的な様式で細胞障害活性を示した。RNF43ペプチドによって生じたCTLクローンの特徴を調べるために、HLAクラスI、HLAクラスII、CD3、CD4、およびCD8に対する抗体を細胞障害活性の阻害能力に関して検討した。水平軸は細胞障害性の阻害率（%）を表す。WiDR標的に対するCTLクローンの細胞障害性は、抗クラスI抗体、抗CD3抗体、および抗CD8抗体を用いた場合に有意に低下した。この結果は、CTLクローンがRNF43由来のペプチドをHLAクラスI、CD3、およびCD8依存的な様式で認識することを示している。

20

【図38】RNF43-11-9（図38A）またはRNF43-11-10（図38B）によって生じたCTL系列のペプチド特異的細胞障害性を示す。これらのCTL系列は、RNF43-11-9またはRNF43-11-10で標識した標的細胞（T2）に対して高い細胞障害活性を示したが、ペプチドで標識しなかった同じ標的細胞（T2）に対しては明らかな細胞障害活性が観察されなかった。

30

【図39】RNF43-11-9（図39A）またはRNF43-11-10（図39B）の刺激によって生じたCTLクローンのペプチド特異的細胞障害性を示す。材料および方法の項に記載した通りに、ペプチドで標識した標的（T2）に対する4種のRNF43-11-9 CTLクローンまたは7種のRNF43-11-10 CTLクローンの細胞障害活性を検討した。樹立されたRNF43-11-9およびRNF43-11-10 CTLクローンは、ペプチドで標識した標的細胞（T2）に対して極めて強力な細胞障害活性を及ぼしたが、ペプチドで標識しなかった同じ標的細胞（T2）に対しては明らかな細胞障害活性を示さなかった。

【図40】HT29およびDLD-1に対するRNF43-5 CTLクローン90およびRNF43-17 CTLクローン25の細胞障害活性を示す。RNF43-5 CTLクローン90およびRNF43-17 CTLクローン25は、RNF43を内因性に発現する腫瘍細胞をHLA拘束的な様式で認識して溶解する。HT29およびDLD-1はいずれもRNF43を内因性に発現し、RNF43-5 CTLクローン90およびRNF43-17 CTLクローン25はエフェクター細胞としての役割を果たした。T2を、RNF43を発現しない標的として用いた。RNF43-5 CTLクローン90およびRNF43-17 CTLクローン25は、RNF43およびHLA-A*0201の両方を発現するDLD-1に対して高い細胞障害活性を示した。一方、RNF43-5 CTLクローン90およびRNF43-17 CTLクローン25は、RNF43を発現するがHLA-A*0201を発現しないHT29に対しては明らかな細胞障害活性を示さなかった。

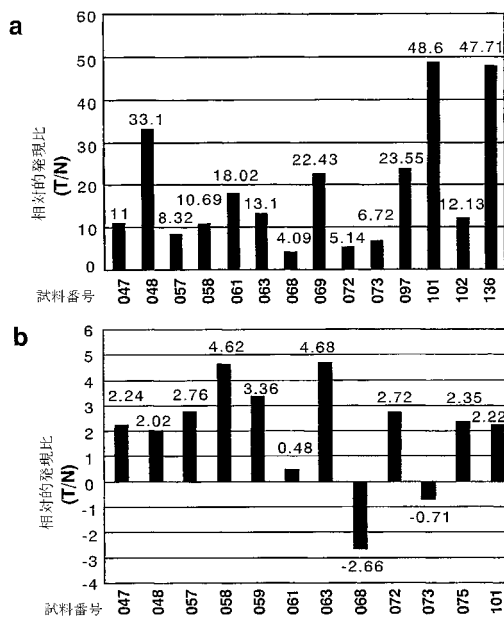
40

【図41】非放射性標的阻害アッセイの結果を示す。RNF43-11-9 CTLクローンは、RNF43-11-9をHLA-A2拘束的な様式で特異的に認識する。Na₂⁵¹CrO₄で標識したHCT116を放射性標的として調製し、RNF43-11-9ペプチドで標識したT2（ペプチド+）を非放射性標的（阻害物質）として用いた。E/T比は20に固定した。HCT116に対する細胞障害活性は、同一のペ

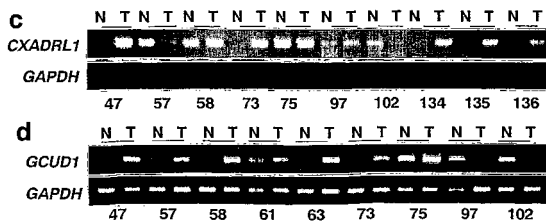
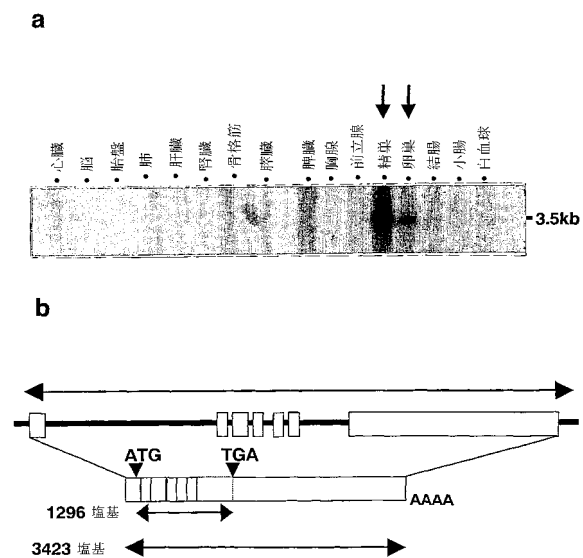
50

プチドで標識したT2を添加することで阻害されたが、ペプチドで標識しなかったTISIを添加してもほとんど阻害されなかった。

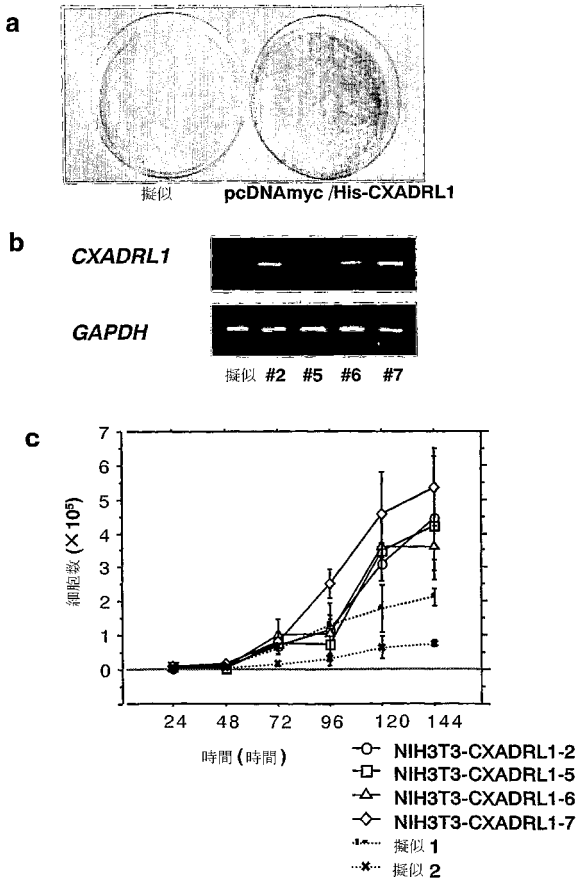
【図1】



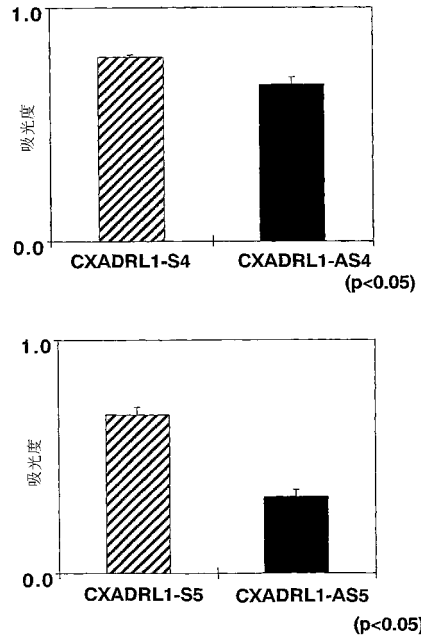
【図2】



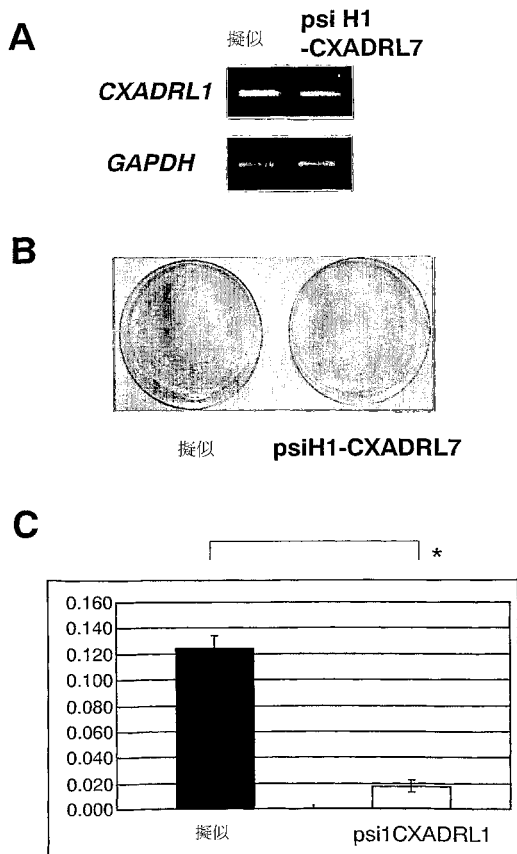
【 図 3 】



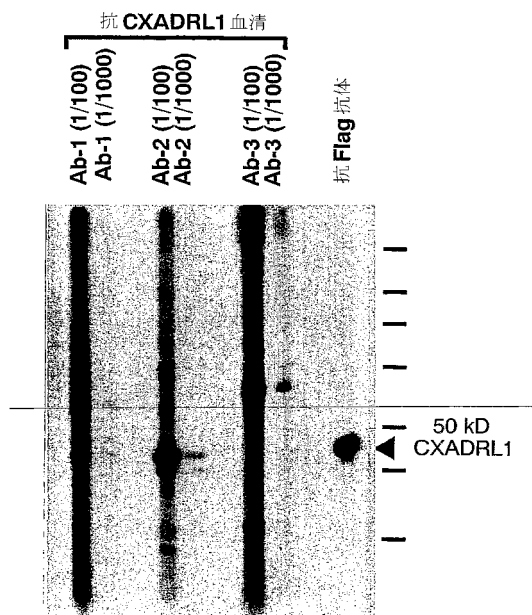
【 図 4 】



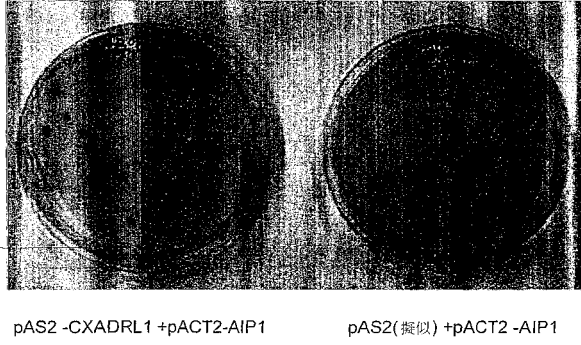
【 図 5 】



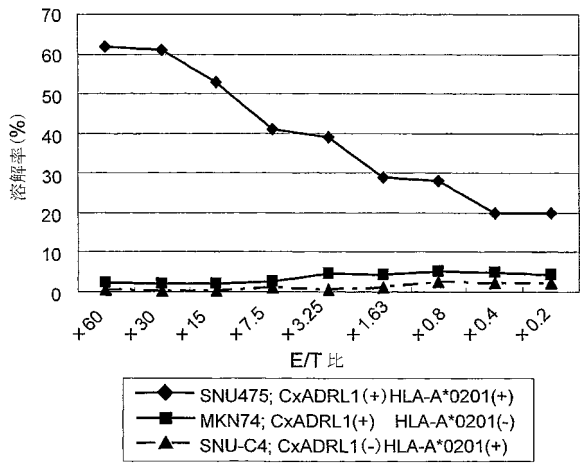
【 図 6 】



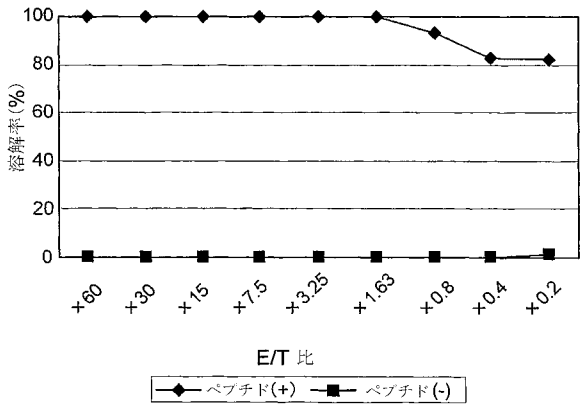
【 図 7 】



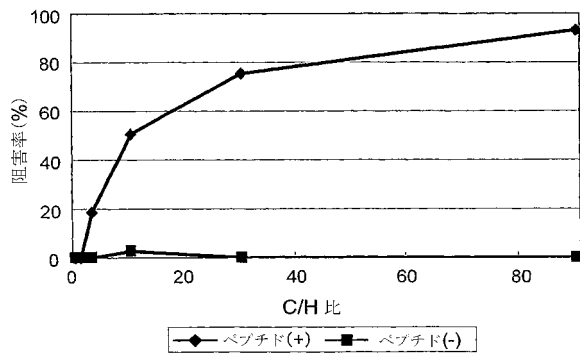
【 図 9 】



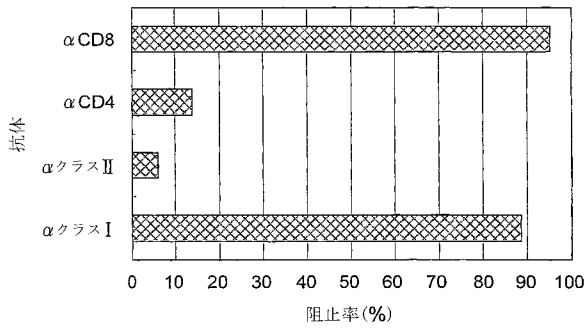
【 図 8 】



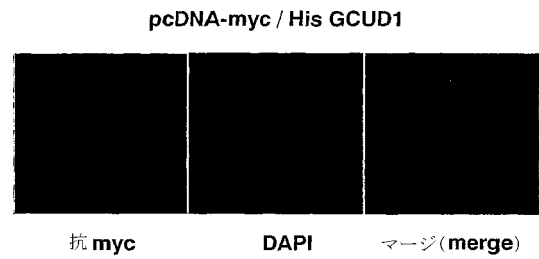
【 図 10 】



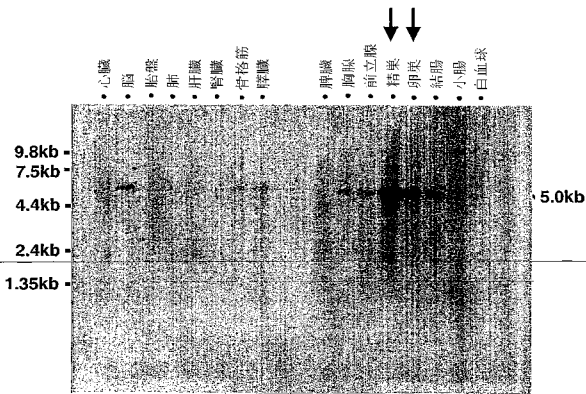
【 図 11 】



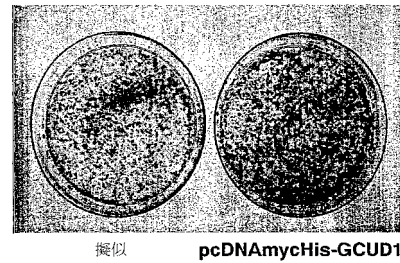
【 図 13 】



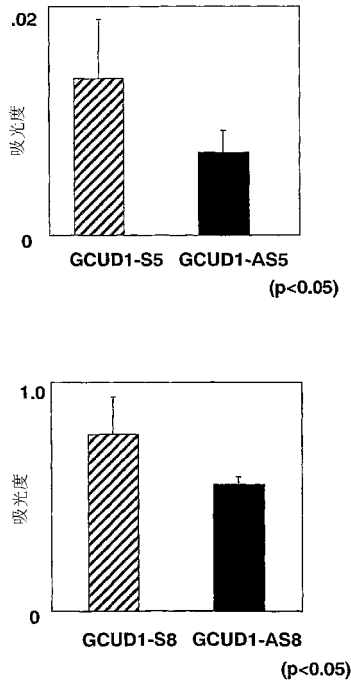
【 図 12 】



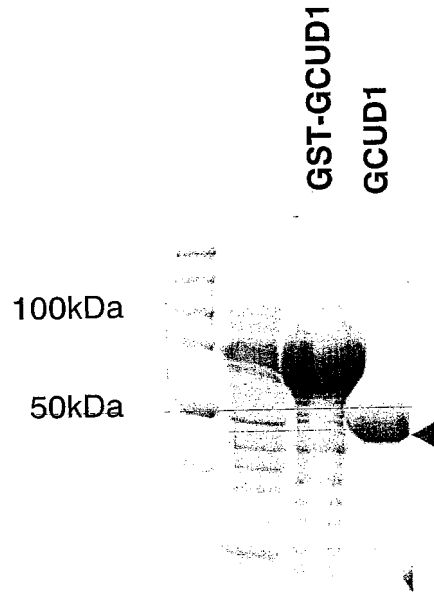
【 図 14 】



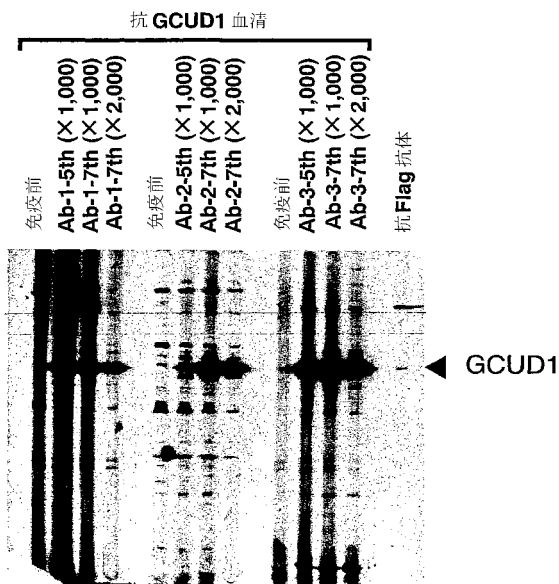
【 図 1 5 】



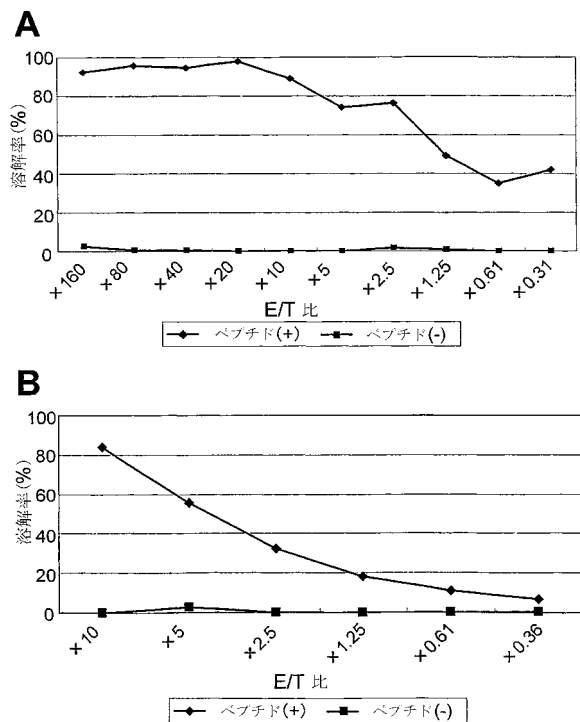
【 図 1 6 】



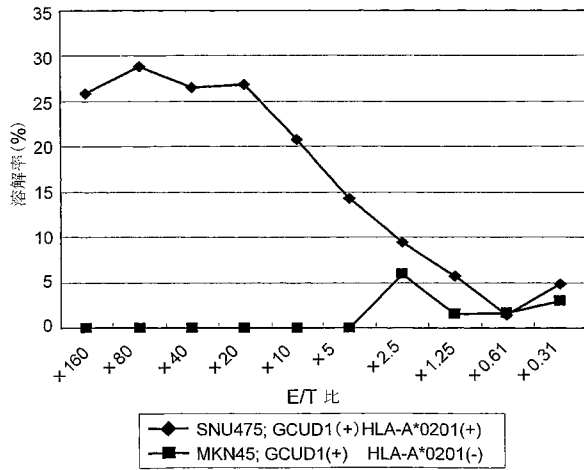
【 図 1 7 】



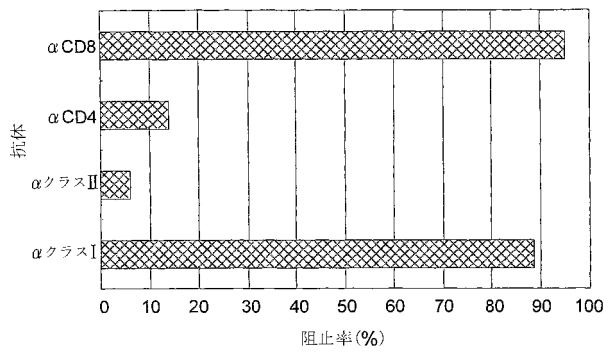
【 図 1 8 】



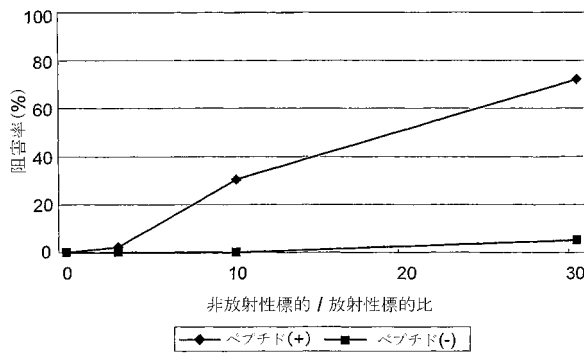
【図19】



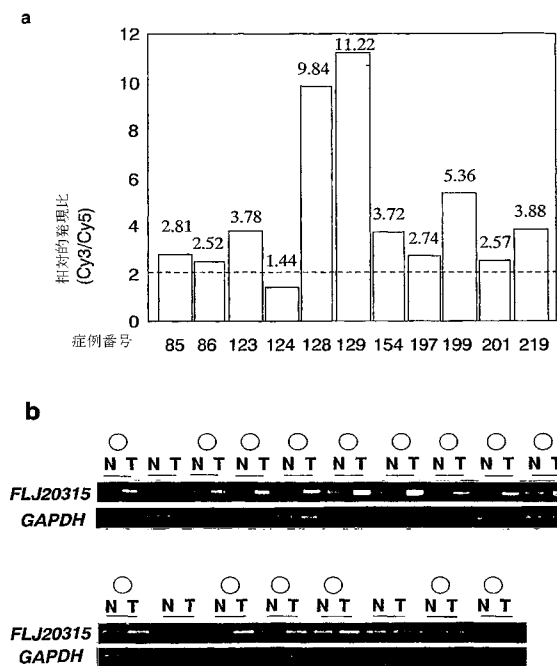
【図21】



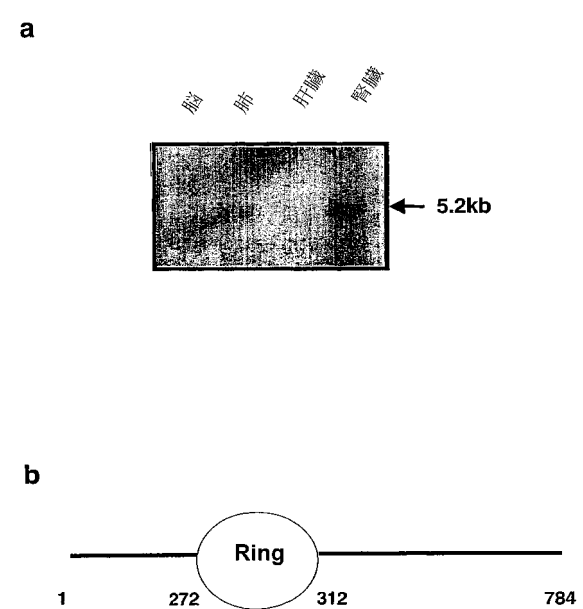
【図20】



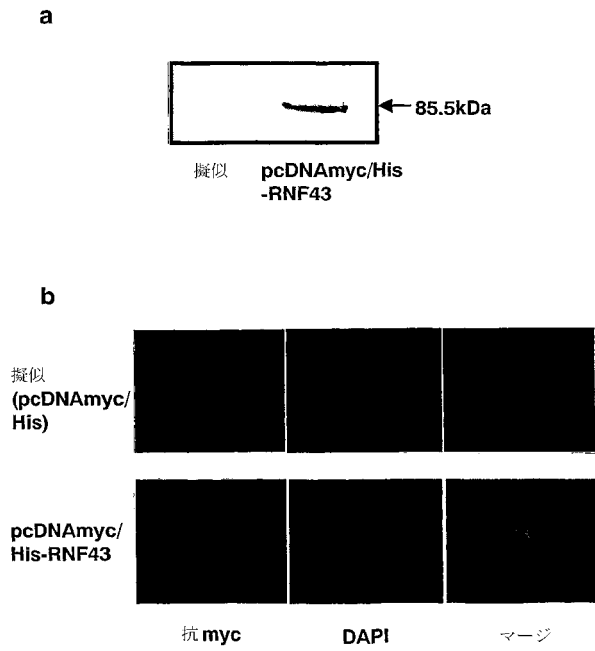
【図22】



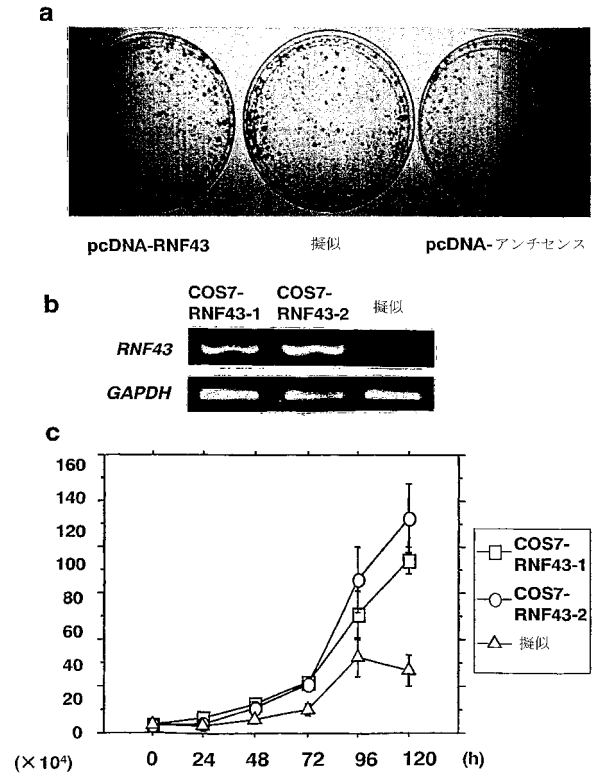
【図23】



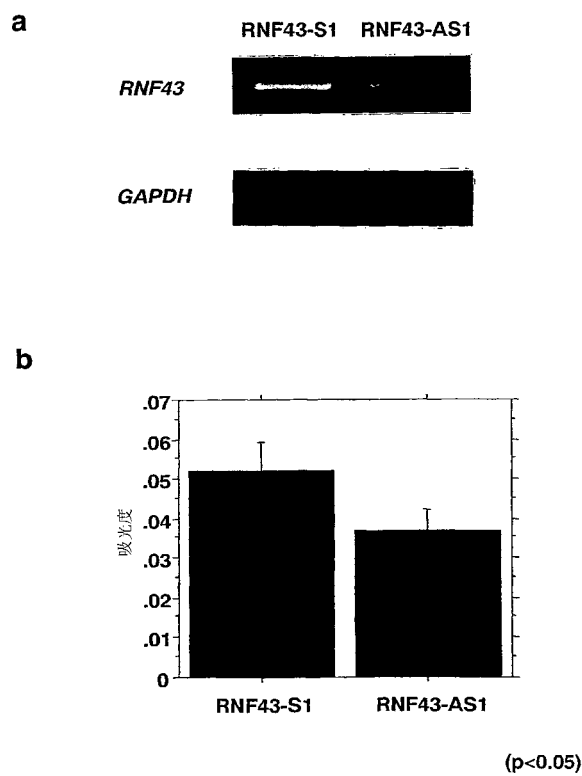
【 図 2 4 】



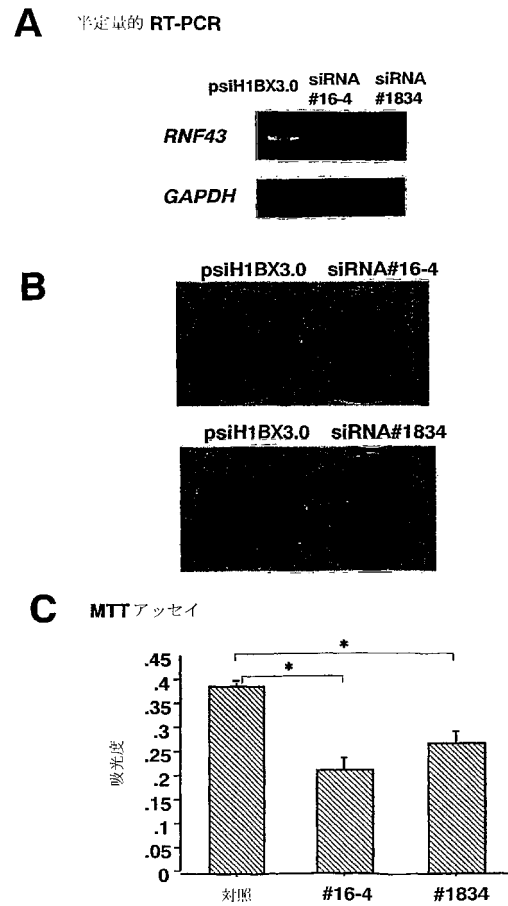
【 図 2 5 】



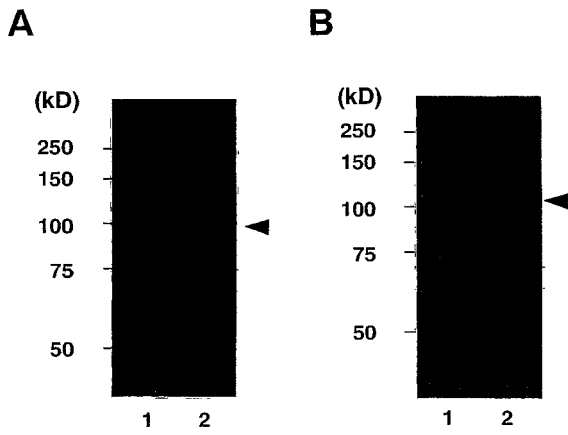
【 図 2 6 】



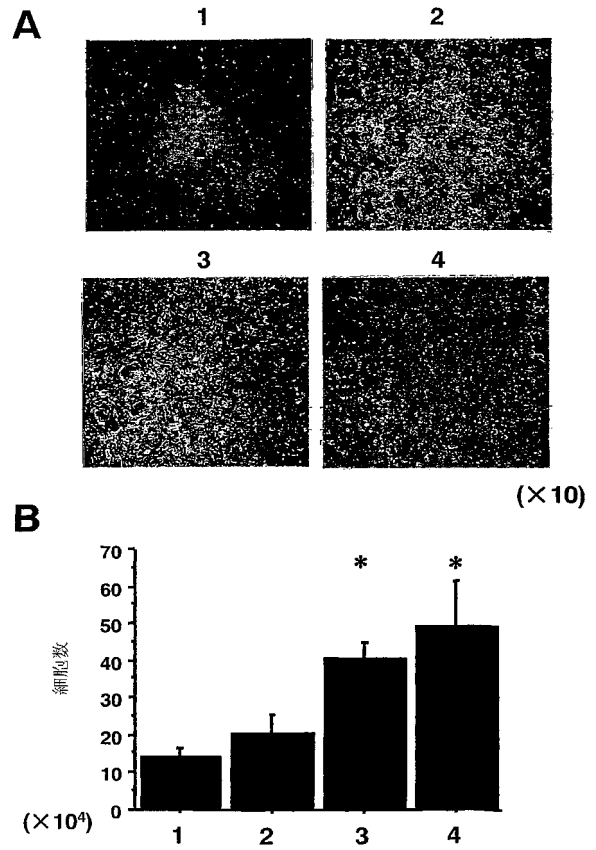
【 図 2 7 】



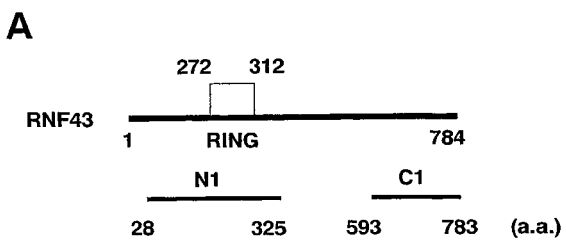
【 図 2 8 】



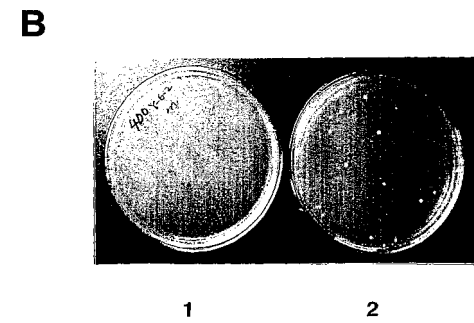
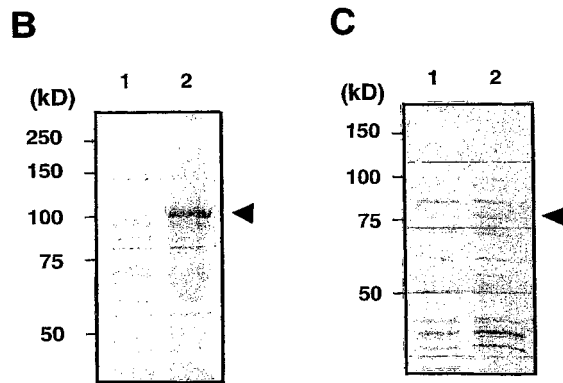
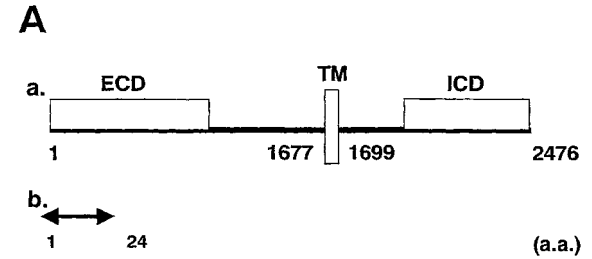
【 図 2 9 】



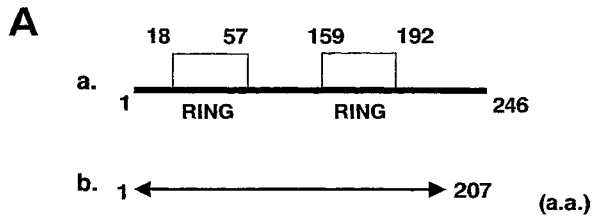
【 図 3 0 】



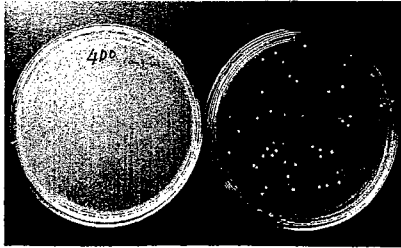
【 図 3 1 】



【図32】



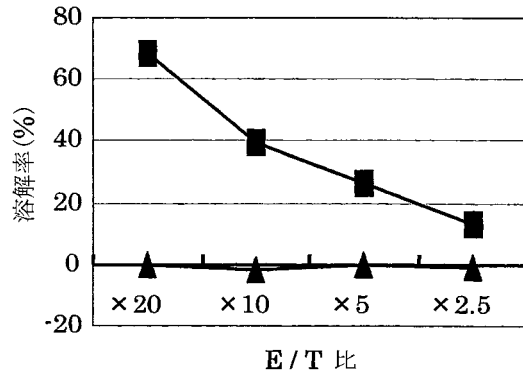
B



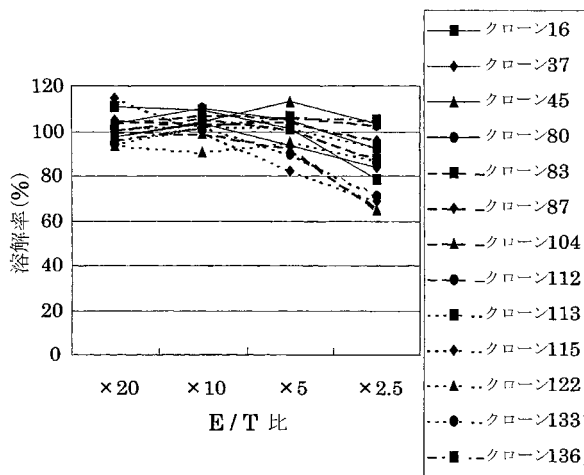
1

2

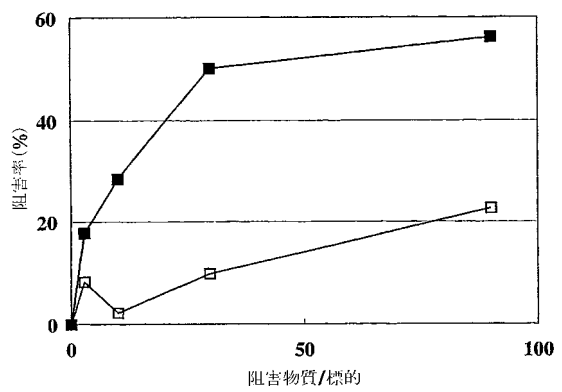
【図33】



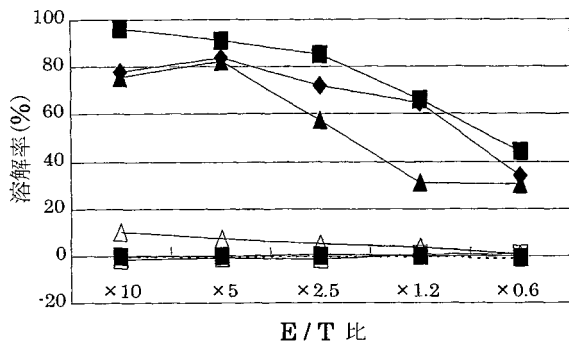
【図34】



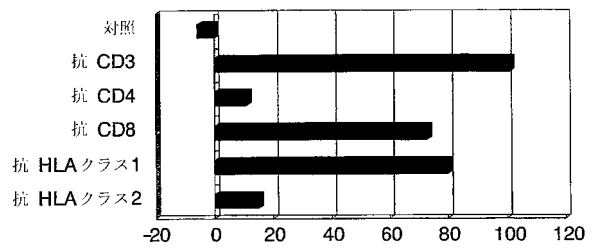
【図36】



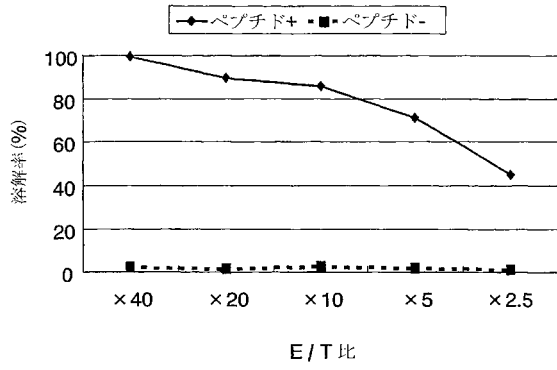
【図35】



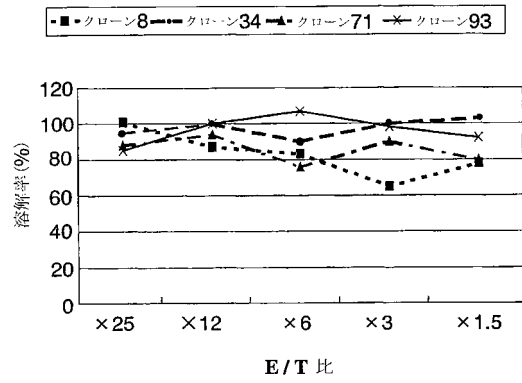
【図37】



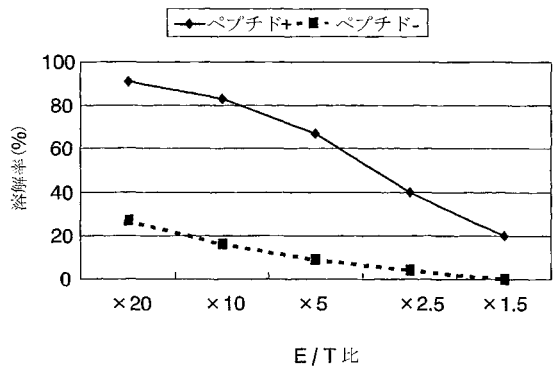
【図38A】



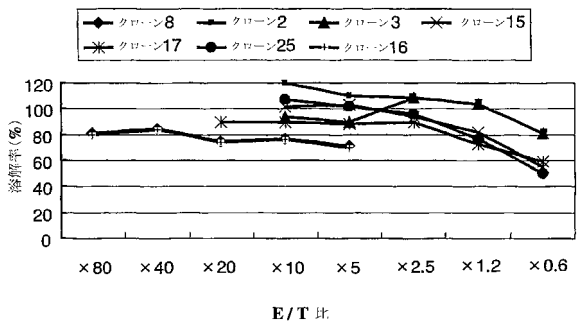
【図39A】



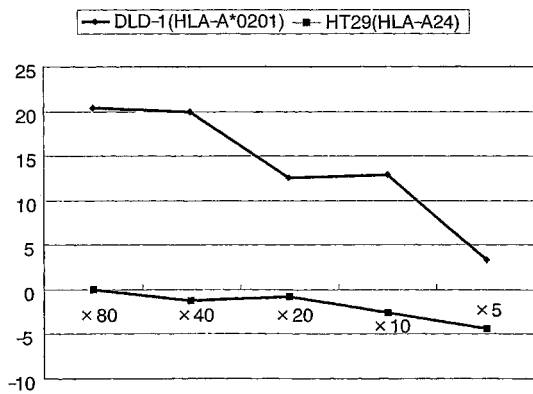
【図38B】



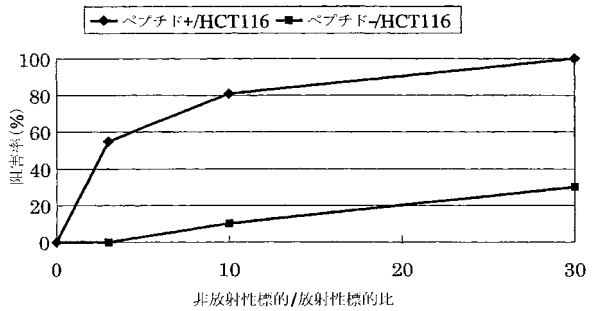
【図39B】



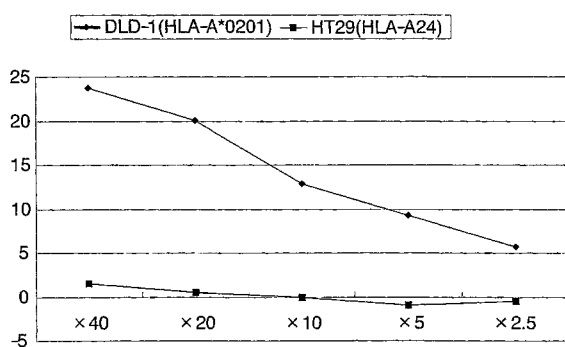
【図40A】



【図41】



【図40B】



【配列表】

0004594085000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
C 0 7 K	14/82	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 0 7 K	16/32	(2006.01)	C 0 7 K	14/82	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 0 7 K	16/32	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
			G 0 1 N	33/50	Z

(31)優先権主張番号 60/451,013

(32)優先日 平成15年2月28日(2003.2.28)

(33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

(72)発明者 角田 卓也
東京都港区白金台1-5-12

審査官 山本 匡子

(56)参考文献 国際公開第00/050588(WO, A1)
国際公開第01/066689(WO, A1)
J. Biol. Chem., 2001年, Vol.276, No.18, P.15386-15396

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
Science Direct
Wiley InterScience
CiNii