

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5259896号
(P5259896)

(45) 発行日 平成25年8月7日(2013.8.7)

(24) 登録日 平成25年5月2日(2013.5.2)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 K 38/22 (2006.01)A 6 1 K 37/32
A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 4 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2000-547993 (P2000-547993)
(86) (22) 出願日	平成11年5月11日(1999.5.11)
(65) 公表番号	特表2002-515404 (P2002-515404A)
(43) 公表日	平成14年5月28日(2002.5.28)
(86) 國際出願番号	PCT/US1999/010232
(87) 國際公開番号	W01999/058142
(87) 國際公開日	平成11年11月18日(1999.11.18)
審査請求日	平成18年5月2日(2006.5.2)
審判番号	不服2010-22145 (P2010-22145/J1)
審判請求日	平成22年10月1日(2010.10.1)
(31) 優先権主張番号	60/085,128
(32) 優先日	平成10年5月12日(1998.5.12)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	09/246,041
(32) 優先日	平成11年2月5日(1999.2.5)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	509266907 オンコリクス インコーポレイテッド アメリカ合衆国 テキサス州 77014 ヒューストン ウォルターズ ロード 14405 スイート 780
(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕幸
(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(74) 代理人	100142929 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】増殖性疾患を治療するための抗プロラクチン剤の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

129位のグリシンがアルギニンに置換されているヒトプロラクチン変異体の有効濃度を含む、プロラクチン受容体を発現する前立腺癌細胞の増殖を阻害するための組成物。

【請求項 2】

治療を必要とする被験者において前立腺癌の治療に用いられる請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】

ヒトプロラクチン変異体が併用療法レジメンの一部として被験者に投与される、請求項 2 記載の組成物。

【請求項 4】

併用療法レジメンが抗アンドロゲンの投与を含む、請求項 3 記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

1. 緒言

本発明は、その受容体に及ぼすプロラクチンの細胞増殖促進作用を阻害するための方法および組成物に関する。本発明の方法および組成物は、望ましくない細胞増殖を伴う悪性疾患と共に良性疾患の治療において用いてよい。

【0002】

2. 発明の背景

プロラクチン(「PRL」)は、構造的に成長ホルモンに関連し、程度は低いもののイン

10

20

ターロイキンファミリーのメンバーにも関連する23 kDaの神経内分泌ホルモンである（レイノルズ（Reynolds）ら、1997、*Endocrinol.* 138 : 5555 ~ 5560、カニンガム（Cunningham）ら、1990、*Science* 247 : 1461 ~ 1465；ウェルズ（Wells）ら、1993、*Recent Prog. Horm. Res.* 48 : 253 ~ 275）。これは、プロラクチン受容体を通じて作用し、乳房組織の増殖および最終分化（マニ（Mani）ら、1986、*Cancer Res.* 46 : 1669 ~ 1672；マラーキー（Malarkey）ら、1983、*J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56 : 673 ~ 677、ビスワス＆フォンデルアール（Biswas and Vonderhaar）、1987、*Cancer Res.* 47 : 3509 ~ 3514）、管上皮の増殖および分化の促進、分葉状単位の増殖および分化、ならびに授乳の開始および維持（ケリー（Kelly）ら、1993、*Recent Prog. Horm. Res.* 48 : 123 ~ 164；シウ（Shiu）ら、1987、*Recent Prog. Horm. Res.* 43 : 277 ~ 303）にとって必要である。生殖および免疫応答における役割を含む、その他の多様な作用がPRLに帰因している（ウェンボ（Wennbo）ら、1997、*Endocrinol.* 138 : 4410 ~ 4415；ニコル（Nicoll）、1974、「生理学ハンドブック（Handbook of Physiology）」、ノビル＆ソウヤー（Knobil and Sawyer）編、米国生理学会、ワシントンD.C.；シウ＆フリーセン（Shiu and Friesen）、1980、*Annu. Rev. Physiol.* 42 : 83 ~ 96）。

【0003】

プロラクチン受容体（「PPLR」）は、サイトカイン受容体スーパーファミリーに属し、PRLのみならず胎盤のラクトゲンおよび靈長類の成長ホルモン（「GH」）を含む一連のホルモンに結合して、分裂促進作用を生じる（オーマンディ（Ormandy）ら、1997、*J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 : 3692 ~ 3699；ホースマン（Horeseman）、1995、*Endocrinol.* 136 : 5249 ~ 5251；クレベンガー（Clevenger）ら、1990、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 6460 ~ 6464；バックリー（Buckley）ら、1985、*Life Sci.* 37 : 2569 ~ 2575；コステロ（Costello）ら、1994、*Prostate* 24 : 162 ~ 166）。PPLRはGHの受容体（「GHR」、ソマトゲン受容体とも呼ばれる）と相同であり、これらはいずれもサイトカイン受容体スーパーファミリーに属する（ケリー（Kelly）ら、1991、*Endocrin. Rev.* 12 : 235 ~ 251；ケリー（Kelly）ら、1993、*Recent Prog. Horm. Res.* 48 : 123 ~ 164；ホースマン＆ユ・リー（Horeseman and Yu-Lee）、1994、*Endocrin. Rev.* 15 : 627 ~ 649）。

【0004】

PRL活性と乳癌との関連が提唱されている（オーマンディ（Ormandy）ら、1997、*J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 : 3692 ~ 3699）。PRLレベルが上昇すると、ラットにおいて7,1-ジメチルベンズ（）アントラセンによって誘発される乳癌の増殖を促進することが判明したが、PRLを除去すると阻害作用を有することが認められた（ウェルシュ（Welsch）、1985、*Cancer Res.* 45 : 3415 ~ 3443）。乳房腫瘍の増殖は、齧歯類のPPLRに結合するヒトGHを過剰発現するトランスジェニックマウスにおいて増加した（バートケ（Bartke）ら、1994、*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 206 : 345 ~ 359）。性ステロイドの受容体とPRLは、同時発現されて交叉調節されることが発見されたが、これは腫瘍増殖の調節におけるエストロゲン、プログesterон、およびPRLの相乗作用を説明する可能性がある（オーマンディ（Ormandy）ら、1997、*J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 : 3692 ~ 3699）。

【0005】

それにもかかわらず、今日では、下垂体切除およびプロモクリプチン投与（いずれも下垂体によるPRL産生を減少または消失させる方向に向けられる）のようなPRLレベルを減少させる治療は、乳癌の治療において成功していない（ペイラート（Peyrat）ら、1984、*Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 20 : 1363 ~ 1367；ホウソン（Heuson）ら、1972、*Eur. J. Cancer* 8 : 155 ~ 156）。それにもかかわらず、オートクライイン／パラクライイン増殖調節ループが存在するならば（すなわち、下垂体はプロラクチンの複数の分泌源の一つに過ぎない；クレベンガー（Clevenger）ら、1995、*Am. J. Pathol.* 146 : 695 ~ 705；フィールズ（Fields）ら、1993、*Lab. Invest.* 68 : 354 ~ 360；ギンスバーグ＆フォンデルアール（Ginsburg and Vonderhaar）、1995、*Cancer Res.* 55 : 2591 ~ 2595；フー＆ウェルズ（Fu and Wells）、1995、*J. Biol. Chem.* 270 : 13133 ~ 13137を参照のこと）、PRLは乳癌において何らかの役割を果たしている可能性があると提唱してきた。この点に関して、PRLお

10

20

30

40

50

およびPRLRのRNAレベルは逆転写酵素 / PCR技術を用いて調べたところ、PRLおよびPRLRは乳癌 (>95%) および正常乳房組織 (>93%) において広く発現されていることが判明し、このことから、PRL/PRLR受容体における介入が乳癌の治療において有用となる可能性があることが示唆された（レイノルズ（Reynolds）ら、*Endocrinol.* 138 : 5555 ~ 5560）。実際に、最近、抗エストロゲン剤（タモキシフェン）、GH類似体（オクトレオチド）、および強力な抗プロラクチン剤（CV 205-502、下垂体によるプロラクチン分泌を阻害するドーパミンアゴニスト）を組みあわせた複合レジメンが、転移性乳癌患者においてタモキシフェン単独療法と比較してよりよい臨床成績を収めたことが報告されている（ボテンバル（Botenbal）ら、1998、*Br. J. Cancer* 77 : 115 ~ 122）。

【0006】

10

PRL発現と前立腺疾患との関連についても提唱されている（ウェンボ（Wennbo）ら、1997、*Endocrinol.* 138 : 4410 ~ 4415）。PRL受容体は前立腺組織に認められる（アラゴナ & フリーセン（Aragona and Friesen）、1975、*Endocrinol.* 97 : 677 ~ 684；リーケ（Leake）ら、1983、*J. Endocrinol.* 99 : 321 ~ 328）。PRLレベルは、前立腺過形成の発症と一致する年齢と共に増加することが認められ（ハモンド（Hammond）ら、1977、*Clin. Endocrinol.* 7 : 129 ~ 135；ベケマンス & ロビン（Vekemans and Robyn）、1975、*Br. Med. J.* 738 ~ 739）、PRLは前立腺組織において栄養および分化作用を有することが判明した（コステロ & フランクリン（Costello and Franklin）、1994、*Prostate* 24 : 162 ~ 166）。PRL遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスは前立腺が劇的に肥大した（ウェンボ（Wennbo）ら、1997、*Endocrinol.* 138 : 4410 ~ 4415）。それにもかかわらず、前立腺疾患におけるPRLの役割はなおもわかっていない（ウェンボ（Wennbo）ら、1997、*Endocrinol.* 138 : 4410 ~ 4415）。前立腺過形成を有する患者におけるPRLレベルは、増加しているか（オドマ（Odoma）ら、1985、*J. Urol.* 133 : 717 ~ 720；サロフ（Saroff）ら、1980、*Oncology* 37 : 46 ~ 52）、前立腺癌患者に限って増加しているか、または不变である（ハーパー（Harper）ら、1976、*Acta Endocrinol. (Copenh)* 81 : 409 ~ 426）ことが報告されている。ジャンセン（Janssen）らは、アンドロゲン不応性ヒト前立腺細胞株の増殖がPRLによって有意に調節できることを報告した（1996、*Cancer* 77 : 144 ~ 149）。これらの相違を説明するために、前立腺におけるPRLの局所合成（ネバレイネン（Nevalainen）ら、1997、*J. Clin. Invest.* 99 : 618 ~ 627）が重要な要因である可能性があると提唱されている。ラット前立腺上皮におけるPRLのアンドロゲン依存的発現が認められており、このことは、前立腺にプロラクチン作用のオートクライン / パラクラインループが存在し、これがアンドロゲン関連作用を媒介するという考え方の根拠となっている（ネバレイネン（Nevalainen）ら、1997、*FASEB J.* 11 (14) : 1297 ~ 1307）。さらに、臨床データは有望であるように思われる：下垂体切除は、前立腺癌患者において性腺摘除および副腎摘除と組みあわせると、相加的な治療効果を示すことが判明し（ブレンドラー（Brendler）、1973、*Urology* 2 : 99 ~ 102）、そしてラナ（Rana）らは、アンドロゲンとプロラクチンを合わせた最大抑制が起こった結果、進行前立腺癌患者において、従来の治療と比べて有意に改善された臨床反応が得られたことを報告している（ハビブ（Habib）ら、1995、*Eur. J. Cancer* 31A : 859 ~ 860）。

【0007】

30

PRL分子とその受容体の生物学的関連性を考慮して、多くの研究者らは本来の非改変型の分子と比較して構造的に異なるPRL変異体の活性を評価してきた。天然の磷酸化されたラットPRLは、ラットNb2 Tリンパ腫細胞の増殖を測定するアッセイ法およびGH₃細胞増殖のオートクライン調節において、非改変型PRLの増殖促進作用に拮抗すると報告されている（ワン & ウォーカー（Wang and Walker）、1993、*Endocrinol.* 133 : 2156 ~ 2160；クラウン（Krown）ら、1992、*Endocrinol.* 122 : 223 ~ 229）。さらに、179位のセリンの代わりに置換されたかさ高い陰性荷電アミノ酸（すなわちグルタミン酸塩またはアスパラギン酸塩）を有する磷酸化されたPRLの分子模倣体は、PRLの増殖促進作用に拮抗した（チェン（Chen）ら、1998、*Endocrinol.* 139 : 609 ~ 616）。

【0008】

40

50

PRL変異体デザインに関するその他の戦略は、PRLとその受容体との相互作用を破壊することを目的としている。この目的のため、研究者らはPRLRとGHRとの類推を行い、それに対し構造／機能関係がよりよく理解される。

【0009】

GHRの特定の特徴は、120位のグリシンがアルギニン残基に置換されているヒトGH（「hGH」）の変異体の完全なGHアンタゴニスト活性の基礎を研究することによって解明された（Chenら、1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 5061 ~ 5065；Chenら、1991、Mol. Endocrinol. 5 : 1845 ~ 1852；Chenら、1994、J. Biol. Chem. 269 : 15892 ~ 15897；Chenら、1995、Mol. Endocrinol. 9 : 1 ~ 7；Kopchick & Chenの米国特許第5,350,836号；Kopchick & Chenの米国特許第5,681,809号）。hGHは、hGHRの二量体型と複合体を形成すると予想された。Fuhら（Fuh）と彼の共同研究者は、それによってGHが第一の結合部位（GHのヘリックス1、ヘリックス4、およびループ1の部分によって分けられる）を通じて1つの受容体にまず結合して、不活性な中間体の1:1複合体を形成し、その後受容体結合hGHが結合部位2（G120R変異体において変異したGHのヘリックス3グリシンを含む）を通じて第二の受容体と相互作用して、活性な1:2ホルモン／受容体複合体を形成する（Fuhら、1992、Science 256 : 1677 ~ 1680；Fuhら、1993、J. Biol. Chem. 268 : 5376 ~ 5381；Goffinら、1994、J. Biol. Chem. 269 : 32598 ~ 32606）、という連続二量体形成モデルを提唱した。GHの120位のヘリックス3グリシンがアルギニン残基に置換されると、第二の結合部位は立体妨害されて、GHはもはや受容体二量体形成を誘導することができない。10
20

【0010】

PRLRの構造に関してはあまり知られていないが、PRLRも同様にホルモン媒介連続二量体形成によって活性化されることが示唆されている（Cunninghamら、1991、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 3407 ~ 3411；Fuhら、1992、Science 256 : 1677 ~ 1680；Fuhら、1993、J. Biol. Chem. 268 : 5376 ~ 5381）。PRLの22位のアラニン、25位のロイシン、26位のセリンおよび129位のグリシンのトリプトファンおよび／またはアルギニンへの変異を含む、GHのヘリックス3／ヘリックス1界面に対応すると考えられる領域に変異を含むヒトPRL（「hPRL」）の変異体が作製された（特に、A22W、L25R、L25W、S26R、S26W、およびG129Rを作製するため；Goffinら、1994、J. Biol. Chem. 269 : 32598 ~ 32606）。その論文では、A22、S26、およびG129における点突然変異は、変異体の分裂促進活性を2~3桁著しく低下させる（天然のPRLと比較して）と報告されたが（Nb2増殖アッセイ法において調べたところ）、G129R変異体（GHのG120Rの位置的類似体）はアンタゴニストというよりはむしろ弱いアゴニストとして作用することが報告された。その後、hPRLRをコードする核酸とリポーター遺伝子とをPRL反応性DNA配列の制御下で同時トランスフェクトさせた細胞をG129R hPRL変異体に暴露する、というPRL活性を調べるアッセイ法において調べたところ、アンタゴニスト作用が認められたことが報告された（Goffinら、1996、J. Biol. Chem. 271 : 16573 ~ 16579）。30

【0011】

GH作用の天然に存在するアンタゴニストが存在する可能性がある。GHRの細胞不含切断型（「GH-BP」と呼ばれる）がヒトおよび特定の動物において同定されている（Baumann、1991、Acta Endocrinol. 124 (suppl 2) : 21 ~ 26；Baumann、1994、J. Endocrinol. 141 : 1 ~ 6；Baumann、1995、Endocrinol. 136 : 377 ~ 378）。GH-BPのヒト型は受容体の細胞外ドメインを含み、本来の受容体の蛋白質分解による切断または別のRNAスプライシングの結果となりうる。GH-BPは、GHのその受容体への結合を阻害するように作用することが示唆されている（Baumann、1991、Acta Endocrinol. 124 (suppl 2) : 21 ~ 26；Baumann、1994、J. Endocrinol. 141 : 1 ~ 6）。この仮説の根拠となるのは、先端巨大症患者（GHの過剰発現による）におけるGH-BPレベルはGHの血清レベルと反比例する（すなわち、GH-BPが少なければ、GH血清濃度は多くなる；Amitら、1992、Hormone Res. 37 : 205 ~ 211）とい40
50

う知見である。GH-BPのレベルが低いほど、GH受容体アッセイ法において先端巨大症の血清GHが比較的活性となる可能性があり、従って疾患に対して負の関与をする可能性がある（ホッフバーグ（Hochberg）ら、1994、Acta Endocrinol. 125 : 23~27）。サイトカイン受容体スーパーファミリーにおける他の受容体の可溶性型もまた認められている（バウマン（Baumann）、1995、Endocrinol. 136 : 377~378）。それにもかかわらず、本発明より以前にPRLRの天然に存在する細胞不含型の存在を示唆する如何なる証拠もなかった。

【0012】

3. 発明の概要

本発明は、その受容体に及ぼすプロラクチンの細胞増殖促進作用を阻害するための方法および組成物に関する。

10

【0013】

第一の組の態様において、本発明は、プロラクチン受容体に対してアンタゴニストとして作用するプロラクチン変異体、およびプロラクチン受容体を発現する細胞の増殖の阻害における該プロラクチン変異体の使用を提供する。本発明は、プロラクチン変異体が細胞増殖を用量依存的に阻害することができるという知見に基づいている。さらに、プロラクチン変異体は癌細胞においてアポトーシスを誘導することができることが認められた。好ましい態様において、プロラクチン変異体は129位のグリシンアミノ酸が別のアミノ酸に置換されている、ヒトプロラクチンの変異型である。特定の非制限的態様において、ヒトプロラクチンの129位のグリシンがアルギニンに置換されている。

【0014】

20

第二の組の態様において、本発明は、プロラクチンに結合することができ、それによってその受容体に結合するプロラクチンの利用率を減少させるプロラクチン受容体の切断型を提供する。本発明のプロラクチン変異体および切断型プロラクチン受容体は、プロラクチン受容体を発現する細胞の増殖を阻害する方法において用いてもよい。

【0015】

本発明はさらに、プロラクチン受容体を発現する細胞においてアポトーシスを誘導する方法を提供する。本発明は、プロラクチン変異体がヒト乳癌細胞において細胞アポトーシスを誘導することができるという知見に基づいている。

【0016】

30

本発明のさらにもう一つの態様において、本発明は、抗エストロゲン剤と共にプロラクチン変異体を使用することを含む、プロラクチン受容体を発現する細胞の増殖を阻害する方法を提供する。そのような抗エストロゲン剤には、タモキシフェン、ラロキシフェン、またはICI 164384（インペリアルケミカルインダストリーズ（Imperial Chemical Industries））が含まれるがこれらに限定されない。この方法は、プロラクチン変異体を抗エストロゲン剤と共に投与すると、細胞増殖に対して相乗的阻害作用を誘導するという知見に基づいている。さらに、プロラクチン変異体は抗アンドロゲン剤と共に用いてもよい。そのような抗アンドロゲン剤には、細胞増殖の相乗的な阻害を誘発するために、フルタミド、アナンドロン、または酢酸シプロテロンが含まれるがこれらに限定されない（抗アンドロゲン療法に関してはスミス（Smith, D. C.）、1997、Semin Urol. Oncol. 15 : 3~12；ゴメラ（Gomella, I. M.）、1997、3 : 16~24；スシウ（Suciu, S.）、1993、Cancer 15 : 3841~6を参照のこと）。

40

【0017】

したがって、そのような方法は、望ましくない細胞増殖を伴うヒトおよびヒト以外の動物における臨床的障害の治療に用いてもよい。特定の非制限的な態様において、本発明はヒトにおける乳癌および前立腺癌の治療に用いてもよい。

【0018】

5. 詳細な説明

制限するためではなくて、明確にするために、本発明の詳細な説明を以下の小章に分ける：

(i) プロラクチン変異体；

50

(iii) 切断型プロラクチン受容体；および
(iii) 本発明の用途。

【0019】

5.1 プロラクチン異変体

本発明は、その受容体でPRLの作用に拮抗するプロラクチン（PRL）変異体を提供する。

【0020】

プロラクチン（PRL）という用語は、本明細書においてヒトおよびヒト以外の動物型のホルモンであるプロラクチンを意味する。そのようなプロラクチンには、アミノ酸配列を図10に述べたプロラクチンが含まれるが、これらに限定されない（同様に、クック（Cook）ら、1981、J. Biol. Chem. 256: 4007；クック（Cooke）ら、1980、J. Biol. Chem. 255: 6502；コウモト（Kohmoto）ら、1984、Eur. J. Biochem. 138: 227；ツボカワ（Tsubokawa）ら、1985、Int. J. Peptide Protein Res. 25: 442；ボンダー（Bondar）ら、1991、ゲンバンク受入番号X63235；ササベージ（Sasavage）ら、1982、J. Biol. Chem. 257: 678；ミラー（Miller）ら、1980、Endocrinol. 107: 851；リ（Li）ら、1970、Arch. Biochem. Biophys. 141: 705；リ（Li）、1976、Int. J. Peptide Protein Res. 8: 205；マーチナント（Martinant）ら、1991、Biochem. Biophys. Acta. 1077: 339；レーマン（Lehman）ら、1988、Int. J. Peptide Protein Res. 31: 544；リ（Li）ら、1989、Int. J. Peptide Protein Res. 33: 67；ハンクス（Hanks）ら、1989、J. Mol. Endocrinol. 2: 21；ワタヒキ（Watahiki）ら、1989、J. Biol. Chem. 264: 5535；カラツアス（Karatzas）ら、1990、Nucl. Acids Res. 18: 3071；ヤスダ（Yasuda）ら、1990、Gen. Comp. Endocrinol. 80: 363；ノソ（Noso）ら、Int. J. Peptide Protein Res. 39: 250；バックバインダー（Buckbinder）ら、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3820；タカハシ（Takahashi）ら、J. Mol. Endocrinol. 5: 281；ヤマグチ（Yamguchi）ら、1988、J. Biol. Chem. 263: 9113；レントラー・デルルー（Rentler-Delrue）ら、DNA 8: 261；ヤスダ（Yasuda）ら、1987、Gen. Comp. Endocrinol. 66: 280；チャン（Chang）ら、1991、ゲンバンク受入番号X61049；チャン（Chang）ら、1991、ゲンバンク受入番号X61052；ヤスダ（Yasuda）ら、1986、Arch. Biochem. Biophys. 244: 528；クワナ（Kuwana）ら、1988、Agric. Biol. Chem. 52: 1033；ソング（Song）ら、1988、Eur. J. Biochem. 172: 279；メルシエ（Mercier）ら、1989、DNA 8: 119を参照のこと）。 10 20 30

【0021】

プロラクチン（PRL）変異体という用語は、本来の型のアミノ酸配列が、アミノ酸の挿入、欠失、および／または置換によって変化している場合を含む、その本来の型と比較して構造的に変化しているプロラクチンの型を意味する。

【0022】

そのような変異体の、PRLの受容体におけるPRLの作用に対する拮抗能は、通常の条件で、PRLによって媒介される作用の変異体の阻害能として定義される。例えば、PRLがある種の細胞に対して増殖作用を有する場合、本発明のPRL変異体は、その種の細胞の増殖を阻害する；以下の理論に制限されることなく、PRLは阻害作用が認められるためにはある程度のレベルが存在すると考えられる。図5Aは、本発明の実施例を説明しており、ここで、ヒトプロラクチン（hPRL）はT47Dヒト乳癌細胞の増殖を誘導するが、129位のグリシンがアルギニン残基に置換されている、hPRLAと呼ばれるhPRL変異体は、hPRLまたはhPRLAを加えていないT47D細胞と比較してT47D細胞の増殖を阻害する；T47DレベルがPRLを生じると考えられている（ギンスバーグ＆フォンデルアール（Ginsberg and Vonderhaar）、1995、Cancer Res. 55: 2591～2595）。 40

【0023】

特定の非制限的な実施例として、PRL変異体は、PRLおよびPRL変異体の双方が存在する場合に、その受容体を通じてのPRLの作用能を変異体が阻害するか否かを決定することによって、PRLのアンタゴニストとして同定されてもよい。一例として、PRLの所定の濃度Xが培養においてPRLRを発現する細胞の増殖において増加Yに関連している場合、同等の細胞試料を濃度XのPRLおよび濃度YのPRL変異体に暴露すると、細胞の増殖はZ増加するが、 50

ここでZはYより小さく、負の数であってもよいであろう。

【0024】

本発明の一つの非制限的な態様において、PRL変異体は129位のグリシンが別のアミノ酸に置換されているヒトPRLの変異体である。G129*として速記法で示される置換（ここで*はグリシン以外の天然または合成アミノ酸である）は、本来の配列からの単なる変異であってもよく、または幾つかの変化の一つであってもよい（アミノ酸の挿入、欠失、および/または置換を含む）。置換アミノ酸は、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、プロリン、メチオニンのような中性の極性アミノ酸；セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸のような中性の非極性アミノ酸；アスパラギン酸およびグルタミン酸のような酸性アミノ酸；ならびにアルギニン、ヒスチジン、またはリジンのような塩基性アミノ酸であってもよい。本発明の好ましい態様において、hPRLの129位のグリシンは、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、プロリン、チロシン、システイン、メチオニン、アルギニン、ヒスチジン、トリプトファン、フェニルアラニン、リジン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、およびグルタミン酸に置換してもよい。本発明の最も好ましい態様において、置換は129位のグリシンをアルギニン（G129R）に置換する。さらに特定の非制限的な態様において、本発明は、129位のグリシンが欠失しているプロラクチン変異体を提供する。
10

【0025】

さらに他の非制限的な態様において、プロラクチン変異体は融合蛋白質の一部としてもう一つの蛋白質に結合している。一つの特定の態様として、プロラクチン変異体はインターロイキン2に結合してもよい。そのような態様の一つの非制限的な例は、インターロイキン2に結合したヒトプロラクチンのG129R変異体である。
20

【0026】

本発明のPRL変異体は化学合成、または組換えDNA技術によって調製してもよい。一般的にPRLのcDNAは、標準的なPCR増幅技術、PRLを産生する細胞（脳下垂体細胞など）から調製した鋳型としてのRNAまたはcDNA、および既知のPRL核酸またはアミノ酸配列に基づいてデザインされたオリゴヌクレオチドプライマー、を用いて調製してもよい。hPRLをコードするcDNA調製の非制限的な実施例を下記の第7章に記載する。次にランダムに、または部位特異的変異誘発のいずれかによってPRL cDNAに変化を導入してもよい。オリゴヌクレオチド媒介部位特異的変異誘発を用いる例についても実施例7に記載しており、hPRLへのG129R置換の導入を説明する。
30

【0027】

PRL変異体が組換え技術によって產生される場合、PRL変異体をコードする核酸を、適したプロモーター／エンハンサー配列に機能的に結合した発現ベクターに組み入れてもよい。発現ベクターは、さらに、転写終結部位、ポリアデニル化部位、リボソーム結合部位、シグナル配列等を含む、PRL変異体の発現を助ける1つまたは複数のエレメントを含んでもよい。適した発現系には、哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母細胞、粘菌、ならびにトランスジェニック植物およびトランスジェニック動物を含む生物が含まれる。適した発現ベクターには、pHSV1のような単純ヘルペスウイルスに基づくベクター（ゲラー（Geller）ら、1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 8950～8954）；MFGのようなレトロウイルスベクター（ジャフィー（Jaffee）ら、1993、Cancer Res. 53 : 2221～2226）、および特にLN、LNSX、LNCX、LXSNのようなモロニーレトロウイルスベクター（ミラー＆ロスマン（Miller and Rosman）、1989、Biotechniques 7 : 980～989）；MVAのようなワクシニアウイルスベクター（スッター＆モス（Sutter and Moss）、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 10847～10851）；pJM17のようなアデノウイルスベクター（アリ（Ali）ら、1994、Gene Therapy 1 : 367～384；バークー（Berker）、1988、Biotechniques 6 : 616～624；ワンド＆ファイナー（Wand and Finer）、1996、Nature Medicine 2 : 714～716）；AAV/neoのようなアデノ関連ウイルスベクター（ムラ・カチョ（Mura-Cacho）ら、1992、J. Immunother. 11 : ~237）；レンチウイルスベクター（ツッファレイ（Zufferey）ら、1
40

997、Nature Biotechnology 15 : 871 ~ 875) ; pCDNA3およびpCDNA1(インビトロゲン社(Invitrogen))、pET11a、pET3a、pET11d、pET3d、pET22d、およびpET12a(ノバゲン社(Novagen))のようなプラスミドベクター；プラスミドAH5(SV40起点およびアデノウイルスの主要後期プロモーターを含む)、pRC/CMV(インビトロゲン社)、pCMU 11(パアボ(Paabo)ら、1986、EMBO J. 5 : 1921 ~ 1927)、pZipNeo SV(セプコ(Cepko)ら、1984、Cell 37 : 1053 ~ 1062)、pSR(DNAX、パロアルト、カリフォルニア州)、およびpBK-CMV；ならびにp2Bac(インビトロゲン社)のようなバキュロウイルス発現ベクター(オライリー(O'Reilly)ら、1995、「バキュロウイルス発現ベクター(Baculovirus Expression Vectors)」、オックスフォード大学出版)が含まれる。

【0028】

10

次に、組換え発現系において產生されたPRL変異体を、電気穿孔、クロマトグラフィー(アフィニティクロマトグラフィーを含む)、および限外濾過を含む、標準的な技術によって精製してもよい。

【0029】

5.2 切断型プロラクチン受容体

本発明は、細胞不含切断型プロラクチン受容体(本明細書においてPRL-BPと呼ばれる)を提供し、これはPRLとの結合能を保持し、したがって、PRL結合に関してPRLRの細胞表面型と競合することができ、それによって、PRLの受容体との相互作用能を阻害することができる。

【0030】

20

PRL-BPは、酵素的、または組換え型DNA技術のいずれかを用いて、PRLPの膜貫通および/または細胞内ドメインの全てまたは一部を除去することによって調製してもよい。本発明の特定の非制限的な態様において、切断されるPRLRはボウチン(Boutin)ら、1989、Mol. Endocrinol. 3 : 1455 ~ 1461に記載の通りである。

【0031】

組換え型の調製に関して、本来のプロラクチン受容体をコードする核酸分子を調製してもよく、次にPRL-BPをコードするように変化させてもよい。例えば、PRLRは下記の実施例9に述べる技術を用いてクローニングしてもよいが、これらに限定されない。

【0032】

多様な異なる生物からのPRLRのアミノ酸配列が既知である。ヒトPRLR配列はゲンバンク受入番号13032から得ることができる。さらに、PRLRの細胞外、膜貫通および細胞質ドメインを表すアミノ酸残基もまた既知である(例えば、ケリー(Kelly)ら、1989、Biol. Reprod. 40 : 27 ~ 32、を参照のこと)。これらのドメインが解明されれば、当業者は、PRLとの結合能を保持するがPRLの作用を阻害するために用いてもよいPRLRの切断型を容易に产生することができると考えられる。

30

【0033】

当業者に周知であるDNA組換え法を、PRL-BPコード配列および適当な転写/翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築するために用いることができる。発現効率は、適当な転写エンハンサー要素、転写ターミネーター等を含めることによって増強することができる。方法は、インビトロ組換え型DNA、合成技術およびインビオ組換え体を含んでもよい(例えば、参考としてその全体が本明細書に組み入れられる、サムブルック(Sambrook)の「分子クローニング、実験マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」、コールドスプリングハーバー研究所出版、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州、およびグローバー(Glover, D. M.)編、1985「DNAのクローニング：実践アプローチ(DNA Cloning : A Practical Approach)」、MRLプレス(株)、オックスフォード、イギリス、第I、II巻を参照のこと)。

40

【0034】

組換えDNA技術を用いてPRL-BPを產生する場合、例えば、溶解度または精製を容易にすることができる融合蛋白質を操作することが都合がよい可能性がある。そのような融合蛋白質は、所望のアミノ酸配列をコードする適当な核酸配列は、当技術分野で公知の方法に

50

よって適当なリーディングフレームにおいて互いにライゲーションすること、および当技術分野で一般的に公知の方法によって融合蛋白質を発現することによって作製することができる。そのような融合蛋白質に含まれるPRL-BP遺伝子産物は、例えば、一つまたは複数の細胞外ドメインまたは部分、好ましくはリガンド結合部分を含むことができる。

【0035】

hPRL-BP発現に関して一つの特定の実施例において、pcDNA3.1/His Xpress（インビトロゲン社、サンジエゴ、カリフォルニア州）のような哺乳類の発現ベクターを用いてもよい。このベクターはヒト早初期サイトメガロウイルスプロモーターおよびbGHポリA付加シグナルを含む。さらに、これはインフレーム（His）6ペプチドをN末端に提供し、これによってhPRL-BPの精製後に容易に検出することができる。そのようなベクターを用いて培養細胞において產生された組換え型hPRL-BPは、下記の第7章に記載する技術を用いて限外濾過によって濃縮してもよい。限外濾過後のhPRL-BPの濃度は、蛋白質アッセイ法によって決定して、抗His抗体（サンタクルズ、カリフォルニア州）を用いてウェスタンプロット解析によって確認してもよく、および密度測定法によって定量してもよい（フェルナデス＆コプチック（Fernandez and Kopchick）、1990、Anal. Biochem. 191：268～271）。

10

【0036】

または、切断型PRL-BPは、例えばペプチドシンセサイザーを用いて蛋白質合成技術によって作製してもよい。さらに、切断型PRL-BPは、天然に存在する、または遺伝子操作したPRLR產生細胞のいずれかから完全長のPRLR蛋白質を精製して、その後トリプシンのような蛋白質分解酵素を用いて精製蛋白質を酵素的に分解してPRL-BPを形成することによって調製してもよい。

20

【0037】

5.3 PRLRアゴニストおよびアンタゴニストを同定するためのスクリーニングアッセイ法

本発明は、PRLR活性を調節する化合物または組成物を同定するために用いることができ、したがって細胞増殖の調節および異常な細胞増殖に関連した疾患の治療に有用となる可能性がある、細胞に基づくアッセイ系を提供する。本発明の細胞に基づくアッセイ系は、細胞のアポトーシスを調べるためにデザインされる。アッセイ系はPRLRアンタゴニストであるG129RがPRLRを発現する細胞においてアポトーシスを誘導することができるという知見に基づいている。

【0038】

30

本発明に従って、PRLRの活性を調節し、それによって細胞増殖を調節する化合物をスクリーニングするために、細胞に基づくアッセイ系を提供する。PRLR活性に影響を及ぼす可能性がある化合物には、PRLRに結合して、且つシグナル伝達を活性化する（アゴニスト）、または活性化を遮断する（アンタゴニスト）のいずれかである化合物が含まれるがこれらに限定されない。本発明のアッセイ系は、PRLRと相互作用して、それによってその機能に影響を及ぼす化合物を同定するための迅速で信頼できる方法を提供する。

【0039】

プロラクチン受容体活性を調節することができる化合物を同定する方法は、

- プロラクチン受容体を発現する細胞に化合物を接触させる段階；
- 細胞のアポトーシスのレベルを測定する段階；および

40

c. (b)において得られたアポトーシスのレベルを化合物の非存在下で得られたレベルと比較する段階を含み、

(b)において得られたレベルが化合物の非存在下で得られたレベルと異なる場合、プロラクチン受容体活性を調節することができる化合物が同定される方法である。アポトーシスのレベルが該アッセイ法において増加していれば、プロラクチン受容体のアンタゴニストが同定される。

【0040】

本発明のさらにもう一つの態様において、以下の段階を含むプロラクチン受容体の活性を誘導することができる化合物を同定する方法であって、プロラクチン受容体媒介アポトーシスを誘導する化合物の存在下において、アポトーシスのレベルが減少すれば、プロラ

50

クチン受容体の活性を活性化することができる化合物が同定される方法が提供される：

- a. プロラクチン受容体媒介アポトーシスを誘導する化合物の存在下および非存在下で、プロラクチン受容体を発現する細胞に化合物を接触させる段階；
- b. プロラクチン受容体媒介アポトーシスを誘導する化合物の存在下および非存在下で、細胞におけるアポトーシスのレベルを測定する段階；および
- c. (b)において得られたアポトーシスのレベルを比較する段階。

【0041】

この目的のため、内因性にPRLRを発現する細胞を用いて受容体の活性を調節する化合物をスクリーニングすることができる。本発明の好ましい態様において、細胞は、例えば乳癌細胞または前立腺癌細胞のような形質転換細胞である。さらに、通常PRLRを発現していない細胞を、PRLR遺伝子を発現するように遺伝子操作することができ、そのような細胞をスクリーニング目的に用いてもよい。当業者は、トランسفエクションすることができ、且つPRLRのバックグラウンドレベルが低いか全くない任意の細胞株も許容可能であることを理解する。

【0042】

そのような細胞に基づくアッセイ系を利用する場合、PRLRを発現する細胞を試験化合物または溶媒対照（例えば、プラセボ）に暴露する。PRLRアゴニストを同定するようにデザインされたアッセイ法において、G129RのようなPRLR媒介アポトーシスを誘導する化合物もまた、アッセイ法に加えられる。暴露後、細胞はアポトーシスのレベルを測定するためにアッセイすることができる。アポトーシスを測定するようにデザインされたアッセイ法には、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ媒介dUTPニック末端標識（TUNEL）アッセイ法（ケバース（Kebers）ら、1998、Experimental Cell Research 240：197～205）；活性化カスパーゼを検出するアッセイ法（ジャニッケ（Janicke）ら、1998、J. Biol. Chem. 273：9357～9360）；ゲル電気泳動によって断片化DNAを検出するDNAラダーゲルアッセイ法（ブルシュ（Bursch）ら、1996、Carcinogenesis 17：1595～1607）；bcl-2およびbax蛋白質レベルを検出するアッセイ法（ビュエルツバーガー（Wuertzberger）ら、1998、Cancer Reseach 58：1876～1885）；アポトーシス細胞における核濃縮を検出するためのヘキスト／DAPI染色（ブルシュ（Bursch）ら、1998、Carcinogenesis 17：1595～1607）；細胞質膜上のホスファチジルセリンのアネキシンV染色（ファンエンゲランド（van Engeland）ら、1996、Cytometry 24：131～139）；ヨウ化プロピジウム染色後のフローサイトメトリーによるDNA含有量の分析（シャーウッド（Sherwood）ら、Methods in Cell Biology 46：77～97）；ならびに電子顕微鏡および位相差顕微鏡を用いた形態学的研究（ブルシュ（Bursch）ら、Carcinogenesis 17：1595～1607）が含まれる。

【0043】

試験化合物が、溶媒対照によって処置した細胞において認められるレベル以上にアポトーシスのレベルを誘発することができれば、その試験化合物はPRLRによって媒介されるシグナル伝達を阻害するアンタゴニストとして作用することを示している。対照的に、試験化合物が溶媒対照によって処置した細胞において認められたレベル以上に、G129Rのような化合物の存在下でアポトーシスのレベルを減少させることができれば、試験化合物がPRLRによって媒介されるシグナル伝達を誘導することが示される。

【0044】

高処理能スクリーニングは、考えられるPRLRアンタゴニストまたはアゴニストをそれぞれ含むマイクロタイヤーブレートのウェルに試験細胞を播種することによって行うことができる。ウェルはまた、完全な培地を含み、あるアゴニストがG129Rのような化合物であると同定される場合が含まれる。可能性があるアンタゴニストまたはアゴニストとのインキュベーション後、細胞を上記のような方法を用いてアポトーシスの有無をアッセイする。可能性があるアンタゴニストはPRLRを発現する細胞においてアポトーシスを誘導する化合物である。可能性があるアゴニストは、受容体結合に関してG129Rと競合して、それによってG129R誘導アポトーシスを阻害する化合物である。

【0045】

10

20

30

40

50

本発明に従ってスクリーニングしてもよい化合物には、無機化合物、ペプチド、抗体およびその断片、ならびにPRLRに結合してPRLRの活性を活性化する（すなわちアゴニスト）、またはPRLRの活性を阻害する（すなわち、アンタゴニスト）他の有機化合物（例えば、ペプチド模倣体）が含まれるが、これらに限定されない。化合物は例えば、ランダムペプチドライブラリのメンバーを含むがこれらに限定しない可溶性ペプチドのようなペプチド（例えば、ラム（Lam）ら、1991、Nature 354：82～84；ホーグテン（Houghten）ら、1991、Nature 354：84～86を参照のこと）、およびD-およびLまたはL-型アミノ酸からなる組合せ化学由来分子ライブラリ、ホスホペプチド（ランダムまたは部分的に縮重した定方向ホスホペプチドライブラリのメンバーを含むが、これらに限定しない；例えば、ソンギヤン（Songyang）ら、1993、Cell 72：767～778を参照のこと）を含んでもよいが、これらに限定されない。ライブラリのスクリーニングは、一般的に公知の多様な方法のいずれによっても行うことができる。本発明の特定の態様において、PRLのペプチド変異体は、PRLRの活性の調節能に関してスクリーニングしてもよい。

【0046】

本明細書に記述したアッセイ法を通じて同定される化合物は例えば、異常な細胞増殖に関連した疾患を改善するために有用となる可能性がある。スクリーニングにおいて同定された化合物の有効性を調べるアッセイ法は、癌のような増殖性疾患の動物モデル系において調べることができる。

【0047】

5.4 本発明の用途

本発明は、それによってPRL変異体（PRLアントゴニストとして作用する）またはPRLRの切断型（PRL結合に関して内因性受容体と競合する）をPRLの作用を阻害するために、特にPRL媒介細胞増殖を阻害するために用いることのできる方法および組成物を提供する。本発明の方法は、プロラクチン変異体またはPRLRの切断型を、増殖しつつある細胞がプロラクチン受容体を発現する増殖性疾患を有する被験者に投与することを含む。

【0048】

特に特異的な非制限的態様において、本発明のPRL変異体または切断型PRLR（PRL-BPとも呼ばれる）は、PRL/PRLR利用率に応じて変化する作用を推論することができるよう、異なるレベルのPRLRおよびLまたはPRLを発現する細胞株のパネルにおけるPRL活性の拮抗能について調べてもよい。例えば、hPRL変異体または切断型hPRLRの活性を、以下の異なる5つのヒト乳癌細胞株の全てまたはサブセットにおいて調べてもよい（ATCCから得たT-47D、MCF-7、HTB19、HTB20、およびHTB123）。これらの細胞株上のhPRL受容体数は：T-47D（25,800個／細胞）、MCF-7（8,300個／細胞）、HTB19（6,435個／細胞）、HTB20（5,480個／細胞）、HTB123（1,094個／細胞、正常乳房細胞＝1,700個／細胞）であると報告されている。したがって、これらの細胞株はヒト乳癌細胞上のhPRL受容体レベルのスペクトルを表す。ヒト乳癌細胞株を用いることは、種特異性によって引き起こされる可能性がある混乱（confusing）作用を回避するために、乳腺刺激ホルモン研究において広く用いられているラットNb2 T-細胞リンパ腫細胞株を用いるよりも好ましいことに留意されたい。PRL変異体または切断型PRLRの作用を決定するために用いることのできるアッセイ法には、(i)（変異型PRLに関して）アンタゴニストが受容体レベルで競合するか否かを調べための、競合的受容体結合アッセイ法；(ii)推定のアンタゴニストがPRLによって誘発される細胞内シグナル伝達を阻害するか否かを調べための、STAT 5蛋白質の磷酸化の検出／定量；および(iii)変異型PRLまたは切断型PRLRについて可能性がある阻害作用を調べる総合試験として用いられる細胞増殖アッセイ法、が含まれる。PRL、変異型PRL、または切断型PRLRの増殖または抗増殖作用を調べる1つの好ましい方法は、図6に概略を示し、下記の第8章に説明するような混合細胞培養アッセイ法である。

【0049】

本発明のPRL変異体またはPRL-BPの投与によって利益が得られる可能性がある疾患には、PRLRを発現する細胞の良性および悪性増殖の双方が含まれる。そのような疾患には、乳房腺腫および纖維囊胞症のような良性疾患、ならびに管型、硬性、髓様、コロイド型、お

10

20

30

40

50

および葉状の癌（局所または転移性）を含む乳癌のような悪性疾患を有する乳房の増殖性疾患；ならびに前立腺過形成および前立腺癌（局所または転移性）を含む前立腺の増殖性疾患が含まれるがこれらに限定されない。成長ホルモン受容体を発現する細胞を含む疾患有、PRLRと相同な受容体を発現する細胞を含む増殖性疾患もまた治療してもよい。

【0050】

下記の実施例11に記載するように、プロラクチン変異体はヒト乳癌細胞および前立腺癌細胞において細胞アポトーシスを誘導することができる。このように、本発明は、プロラクチン受容体を発現する細胞のみならず、プロラクチン受容体と相同な受容体を発現する細胞においてアポトーシスを誘導し、それによってそのような細胞の増殖を阻害する方法を提供する。本発明の1つの態様において、PRLR受容体の発現は、癌細胞集団のような、アポトーシスの標的とされる特異的細胞集団に向けることができる。PRLRを発現する核酸分子は、遺伝子療法プロトコールにおいて用いられる方法と同じ方法を用いて、標的細胞集団に移入することができる。標的細胞集団が表面上で発現されれば、プロラクチン変異体との接觸を通じて受容体が活性化されて、標的細胞のアポトーシスを誘導することができる。

10

【0051】

増殖性疾患の治療において、PRL変異体またはPRL-BPは、単独、または連続もしくは併用治療レジメンの一部として投与してもよい。非制限的な例として、治療すべき疾患が乳癌である場合、併用レジメンにおいて用いられるさらなる物質は、タモキシフェンのような抗エストロゲン剤および／または化学療法剤を含んでもよい。治療すべき疾患が前立腺癌である場合、併用レジメンにおいて用いられるさらなる物質は抗アンドロゲン剤および／または化学療法剤を含んでもよい。併用治療レジメンは、プロラクチン変異体を4-OHタモキシフェンのような抗エストロゲン剤と併用して用いたところ、相乗的な阻害作用を示したという知見に基づいている。

20

【0052】

したがって、本発明は、前記の方法において用いるために適した薬学的担体中にPRL変異体またはPRL-BPを含む組成物を提供する。そのような組成物は、局所適用、静脈内、動脈内、くも膜下、腹腔内、経口等を含む任意の適した技術によって投与することができる。

【0053】

30

本発明における用途に適した薬学的組成物には、その意図する目的を達成するために有効な量のPRL変異体またはPRL-BPを含む組成物が含まれる。より詳しく述べると、有効量は、PRLRを発現する細胞の増殖を阻害して、それによって増殖性疾患に関連した症状を減少させるために必要なPRL変異体またはPRL-BPの量を意味する。有効量の決定は、当業者が十分に行える範囲内である。

【0054】

本発明の化合物の有効濃度は、細胞培養系および／またはトランスジェニック動物において確立してもよい。有効量は異なる多様なアッセイ法を用いて決定できる。例えば、細胞増殖アッセイ法は、細胞増殖を阻害するために必要なPRL変異体またはPRL-BPの濃度を定量するために実施してもよい。さらに、細胞アポトーシスを誘導するために必要なPRL変異体またはPRL-BPの濃度を定量するアッセイ法を行ってもよい。腫瘍細胞増殖の阻害は、PRL変異体またはPRL-BPによる腫瘍細胞増殖の阻害を検出するためにアッセイすることができる。そのような場合、PRL変異体またはPRL-BPの有効量は、癌細胞の増殖を阻害し、且つ患者において腫瘍の増殖を阻害するために必要な量である。特定の場合、増殖性疾患を示す被験者に、プロラクチン変異体またはPRL-BPをさらに別の1つまたは複数の物質と共に同時投与することが望ましいかも知れない。そのような物質には例えば、タモキシフェンのような抗エストロゲン剤、または抗アンドロゲン剤が含まれる。これらのさらに別の化合物の有効量の決定は、当業者が十分に行える範囲内である。

40

【0055】

組成物の量は、当然のこととして、治療すべき被験者、治療すべき増殖性障害、障害の

50

症状の重症度および処方医師の判断に左右される。場合によっては、望ましくない副作用によって治療をより低用量へと調節するのみならず、臨床反応が適切でない場合には治療をより高いレベルに調節することが必要であるかも知れない。

【0056】

6. 実施例：アンタゴニスト活性を有する変異型プロラクチンのデザイン

hPRLに関して現在利用できる結晶構造データはないため、ガルニエ (Garnier) ら (1987、J. Mol. Biol. 120: 97 ~ 120) が開発したコンピューターアルゴリズムプログラムを用いて、hPRLとhGHとの二次構造を解析して比較した。その結果、全体的なヘリックス領域が非常に類似していることが示され、このことは、これらのホルモンが類似の全体的立体構造を共有することを示唆している。第三のヘリックスにおけるアミノ酸配列をGHとPRLとで比較したところ、hPRLの129位グリシンがhGHの120位のグリシンに対応すること、そしてこれがGH/PRLファミリーにおいて絶対的に保存されていることが明らかである(チェン (Chen) ら、1994、J. Biol. Chem. 269: 15892 ~ 15897)。したがって、hPRL受容体特異的アンタゴニストを作製するために、hPRLにおけるグリシンのアルギニンへの置換変異体を調製した。10

【0057】

7. 実施例：G129Rプロラクチン変異体の調整

7.1 ヒトプロラクチン遺伝子のクローニング

ヒトPRLは逆転写酵素 (RT) を用いてその後ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行うことによって首尾よくクローニングされた。簡単に説明すると、ヒト下垂体ポリA RNA (クロンテック社 (ClonTech, Inc.) 、パロアルト、カリフォルニア州) を鋳型として用いた。hPRL cDNAの停止コドン (TAA) から2塩基先で始まるhPRLアンチセンスプライマー (5' GOTT AGCAGTTGTTGTTGTG 3') をデザインし、およびATGからセンスプライマー (5' ATGAACATCAA AGGAT 3') をデザインした。RT/PCRはパーキン・エルマーシータスインク (Perkin-Elmer Cetus, Inc.) (ノーウォーク、コネチカット州) のキットを用いて実施した。得られたhPRLのヌクレオチド配列を、改変したT7 DNAポリメラーゼ (シーケナーゼ、ユナイテッドステイツバイオケミカル (United States Biochemical)) を用いてジデオキシチーンターミネーション法によって決定したところ、ゲンバンクに報告された配列と1つの塩基が異なることを除いては同一であり、その結果コドン21位でのサイレント突然変異 (CTG CTC) が生じていることが判明した。20 pUCIG-Met発現ベクターの調製を含むクローニングプロセスの概略図を図1に要約する。

【0058】

7.2 G129Rプロラクチン変異体の作製

hPRL cDNAおよびM13 F1複製起点を含む親プラスミド (図1) を大腸菌 (CJ236) に形質転換した。ウリジンを含む一本鎖プラスミドDNAを、形質転換したCJ236細菌からヘルバーバクテリオファージM13k07を用いて単離した。G129R変異を指向する配列を含むオリゴヌクレオチド6 pmolを、アニーリング緩衝液 (200 mMトリス塩酸、20 mM MgCl₂、100 mM NaCl) において、70 °Cで5分間加熱した後徐々に冷却することによって一本鎖DNA 0.2 pmolとアニーリングした。G129R変異をコードするオリゴヌクレオチド (5' CGGCTCCTAGAGaggA TG-GAGCT 3') を用いて、T4 DNAポリメラーゼによって触媒される一本鎖DNAを鋳型として用いてDNAの相補鎖の合成をプライミングした。合成後、二本鎖DNAを用いて大腸菌 (DH5a) を形質転換した。個々のクローンを単離して、DNAヌクレオチドシークエンシングによってhPRL-G129Rに関してスクリーニングした。以降、G129R hPRL変異体をhPRLAと呼び、40 「A」はそのアンタゴニスト活性を指す。

【0059】

7.3 クローニングした蛋白質の発現

hPRLおよびhPRLAコード核酸をそれぞれ、cDNAの転写がマウスマタロチオネインエンハンサー / プロモーター配列およびbGHポリA付加シグナルによって制御される哺乳類細胞発現ベクターに挿入した (チェン (Chen) ら、1991、J. Biol. Chem. 266: 2252 ~ 2258 ; チェン (Chen) ら、1991、Endocrinol. 129: 1402 ~ 1408 ; チェン (Chen) ら、1991、Mol. 50

Endocrinol. 5 : 1845 ~ 1852 ; チェン (Chen) ら、1994、J. Biol. Chem. 269 : 15892 ~ 15897）。hPRLおよびhPRLAを産生する安定なマウスL細胞株を確立するために、マウスL細胞 [チミジンキナーゼ (TK) 隆性およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (APRT) 隆性] をインビトロ発現系として選択した。hPRL (陽性対照として用いられる) およびhPRLA (約 5 ~ 10 mg/L/24時間 / 細胞100万個) を発現する安定な細胞株を調製した。

【0060】

膜限外濾過を用いて、チェン (Chen) ら (1994、J. Biol. Chem. 269 : 15892 ~ 15897) が記述した技術を用いて、hPRLおよびhPRLAを細胞培養馴化培地から部分的に精製すると共に濃縮した。分離は相対的分子サイズおよび膜の孔サイズに基づいている。限外濾過膜は、アミコンインク(Amicon, Inc.) (ノートロウ、マサチューセッツ州) から得た。2つのタイプの膜、すなわちYM10およびYM100を使用した。膜貫通圧20 psiの下でアミコンYM100によって、攪拌した細胞200 mlをまず、培養培地からの大きい不純物を除去するために用いた。透過物 (hPRLの回収率 > 90%) を、溶液の容積を減少させて、このように蛋白質を濃縮するためにYM10膜を使用する第二の濾過プロトコールに適用した。hPRLまたはhPRL Aの濃度は、ディアグノスティックプロダクツコーポレーション(Diagnostic Products Corp.) (ロサンゼルス、カリフォルニア州) のイムノラジオメトリックアッセイ (IRMA) キットを用いて決定した。

8. 実施例：G129Rプロラクチン変異体の阻害活性

8.1 材料および方法

放射性受容体結合アッセイ法 ハーディング (Harding) ら (1996、J. Biol. Chem. 271 : 6708 ~ 6712) が記述したように、ラクトペルオキシダーゼ法を用いて、80 ~ 105 μ Ci / μ gの比活性を有するNa¹²⁵Iによって、精製hPRLを標識した。簡単に説明すると、1.0 mCiのNa¹²⁵IをhPRL 1 mgに加えた。次に、ラクトペルオキシダーゼ (10 μ gを0.4 mol/L 酢酸緩衝液10 μ lに溶解する、pH 5.6) およびH₂O₂ (1.76 mmol/Lを5 μ l) を加えた。30分後、移入用緩衝液 (0.47 mol/L蔗糖、0.06 mol/L KI、0.02%アジ化ナトリウム、pH 7.6) 100 μ lを加えることによって反応を終了させた。次に、放射性標識hPRLをセファデックスG-100クロマトグラフィーによって分離した。ヒト乳癌細胞を6 ウエルプレートに播種した。無血清DMEM中で2 ~ 3 時間プレインキュベートして、血清を枯渇させた後、細胞単層を、様々な濃度のhPRLまたはhPRLAの存在下で、¹²⁵I-hPRL (50,000 cpm) を含む無血清馴化培地に37 °Cで2 ~ 3 時間暴露した。室温で3 時間インキュベートした後、細胞を磷酸緩衝生理食塩液 (PBS) で2回洗浄して、その後1 % SDS/0.1N NaOH 1 ml中で溶解した。次に、溶解物中のCPMを決定した。非特異的結合は、非特異的置換を制御するために、非標識hPRL5 μ g/mlを通常のマウスL細胞馴化培地に加えることによって測定した。

【0061】

STAT5蛋白質のチロシン磷酸化のhPRL誘導のアッセイ法 STAT蛋白質は、分子量が約92 ~ 95 kDaの蛋白質のファミリーを表し、これはGHRまたはPRLR含有細胞をそれぞれGHまたはPRLで処置した場合にチロシン磷酸化されることが判明した。STAT 5のチロシン磷酸化は受容体媒介事象であり、リガンド誘発シグナル伝達における重要な段階であると考えられている (ワカオ (Wakao) ら、1994、EMBO J. 13 : 2182 ~ 2191；カザンスキ (Kazansky) ら、1995、Mol. Endocrinol. 9 : 1598 ~ 1609；ワックスマン (Waxman) ら、1995、J. Biol. Chem. 270 : 13262 ~ 13270)。このアッセイ法は、野生型PRLによるSTAT 5磷酸化誘導のhPRLおよびhPRLAの阻害能を評価するために用いた。

【0062】

簡単に説明すると、ヒト乳癌細胞を12 ウエルプレートに播種した。無血清DMEMにおいて2 ~ 3 時間プレインキュベーションした後、細胞を無血清DMEMにおいてhPRLおよびhPRLAの様々な濃度に暴露した。細胞を37 °Cで15分間インキュベートして、PBSで1回洗浄し、溶解緩衝液 (50 mMトリス塩酸、pH 6.8、1 % SDS、1 % メルカプトエタノール、0.1 M DTT、5 % 蔗糖、100 μ Mオルトバナジン酸ナトリウム、および0.6% プロモフェノールブルー) 300 μ l中に溶解した。細胞溶解液30 μ lを4 ~ 12.5% SDS-PAGEに供して、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (HRP) 結合抗ホスホチロシン抗体PY20およびECL試薬キット

10

20

30

40

50

ト(アマシャム社(Amersham)、イリノイ州)を用いてイムノプロット分析を行った。次に、プロットをX線フィルムに露出して標準的な方法を用いて現像した(コダック社(Kodak)、ロチェスター、ニューヨーク州)。このアッセイ法はチェン(Chen)ら(1994、J. Biol. Chem. 269: 15892~15897; チェン(Chen)ら、1995、Endocrinol. 136: 660~667; ワン(Wang)ら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 1391~1395; チェン(Chen)ら、1995、Mol. Endocrinol. 9(3): 292~302; ハーディング(Harding)ら、1996、J. Biol. Chem. 271(12): 6708~6712)に記載されている。

【0063】

細胞増殖アッセイ法 hPRLAを、組織培養において乳癌細胞増殖の阻害能に関して調べた。ヒト乳癌細胞株を、ATCCの推奨に従って対応する培養培地中で増殖させた。細胞を37℃で5%CO₂を含む空気の湿潤大気中で維持した。アッセイ条件は、本質的にギンスバーグ&フォンデルアール(Ginsburg and Vonderhaar)(1995、Cancer Res. 55: 2591~2595)が記述した通りであった。個々の増殖実験に関して、細胞を12ウェル培養プレートに密度約2×10⁴個/ml、1ml/ウェルで播種した。次に、細胞を1日間接着させて(T-47D、MCF-7、HTB19およびHTB20細胞、浮遊細胞であるHTB123細胞を除く)、その後上層の培地を除去して、ITS*(インスリン-トランスフェリン-セレニウム-BSA-リノレン酸培養添加剤; コラボレイティブリサーチ(Collaborative Research)、ベッドフォード、マサチューセッツ州)を含む培地によって無血清条件に変更した。hPRL単独またはhPRLAと併用したhPRLの様々な濃度を導入した。さらに3日間培養後、細胞を簡単にトリプシン処理してから回収して、細胞計数器において計数した。

【0064】

特定の実験に関しては、図6に概略を示す混合細胞培養アッセイ法を用いた。このアッセイ法において、乳癌細胞を、PRLまたはPRL変異体をコードし、それらの組換え型蛋白質を発現する核酸によってトランスフェクトした発現細胞と共に培養した。発現細胞の数を変化させることによって、混合培養細胞中に存在するPRLまたはPRL変異体の量は増加または減少した。図6に示すように、固定数の乳癌細胞(T47D)を多穴細胞培養プレートのウェルに加えた。対照として用いる特定のウェルでは、発現細胞を加えなかった。次に、発現細胞(hPRL(L-PRL)またはhPRLA(L-PRLA)のいずれかを発現するトランスフェクトしたL細胞)の数を増加させて、乳癌細胞含有ウェルに加えて、混合培養物を作製した。同じ数の発現細胞を平行して培養し、対照として用いた(T47D細胞を含まない)。標準的な条件で一定期間培養した後、ウェル中に存在する細胞数を計数して、対応する対照培養中のL細胞数を差し引いた。次に、得られた数をT47D対照培養におけるT47D細胞数と比較して、乳癌細胞増殖に及ぼす組換え型産物の作用を評価することができる。

【0065】

8.2 結果および考察

放射性受容体結合アッセイ法の結果 ヒト癌細胞のパネルに沿ってT-47DおよびHTB123細胞を用いて実施したアッセイ法の結果を図2に示す。それらは、ヒト白血病細胞、リンパ腫細胞および網膜芽細胞腫細胞と比較したところ、調べた細胞の中でも2つの細胞株(T-47DおよびHTB123)のhGH受容体特異的結合が最小であったことを示している。

【0066】

STAT5蛋白質の磷酸化 hPRLおよびhPRLA、およびその併用がT-47Dヒト乳癌細胞においてSTAT5蛋白質の磷酸化を誘導するか否かを調べる実験から、hPRLAがhPRLによって誘導されるシグナル伝達を遮断することができ(図3)、それによってPRLAのアンタゴニスト活性を証明することが示された。特に、図3は、hPRLによって誘導されたSTAT5蛋白質の磷酸化の誘導(レーン2)がhPRLAのみの存在下では認められなかつたこと(レーン3)、hPRLおよびhPRLAの等量が存在する場合(レーン4)には部分的に消失すること、そして過剰量のhPRLAが存在する場合には検出不可能であること(レーン5)を示している。

【0067】

細胞増殖アッセイ法 T-47D細胞をhGHまたはhPRLのいずれかに暴露した実験からの細胞増殖アッセイ結果を図4に示す。ベル型の用量反応曲線は、GHおよびPRLシグナル伝達

10

20

30

40

50

の双方に類似の作用機序（すなわち、1つのリガンドによって受容体が二量体を形成する）が用いられていることを示唆している。リガンドの結合部位1の親和性は、結合部位2の親和性より明らかにはるかに高いために、高濃度のホルモンでは、全ての受容体が、高親和性部位を通じて単一のリガンドによって占有される（「自己拮抗」現象）。図5A～BはhPRLおよびhPRLA（ヒトプロラクチンのG129R変異体）の作用（図5A）を、エストロゲンおよびエストロゲンアンタゴニストであるタモキシフェンの作用（図5B）と比較している。hPRLおよびエストロゲンはT47D細胞の増殖を増加させたが（無処置対照培養物と比較して）、hPRLAとタモキシフェンは同等の阻害作用を示した。

【0068】

図7および8は、hPRLまたはhPRLA（ヒトプロラクチンのG129R変異体）を発現するトランسفェクトしたL細胞の数を変化させて（y軸に示す）、T47Dヒト乳癌細胞と共に24もしくは72時間（図7）、または1、2、3もしくは5日間（図8）培養した混合細胞培養アッセイ法の結果を示す。hPRLはT47Dの増殖を増加させたが（無処置T47D細胞培養物と比較して）、hPRLAは増殖を100%まで阻害した。

10

【0069】

図9A～Bは、2つの異なるヒト乳癌細胞様T47DおよびMCF-7（それぞれ、図9Aおよび9B）に対する、混合細胞培養でのhPRLAの阻害作用を比較している。トランسفェクトされたL細胞によって発現されたhPRLAは、双方の細胞株に対して阻害作用を示したが、おそらくMCF-7細胞と比較してT47D細胞上のプロラクチン受容体の数がより多いために、その作用はT47D細胞においてより大きかった（シウ（Shiu）ら、1979、Cancer Res. 39 : 4381～4386；オーマンディ（Ormandy）ら、1997、J. Clin. Endocrinol. Metab. 82 : 3692～3699）。

20

【0070】

9. 実施例：プロラクチン受容体のクローニング

hPRL-BP cDNAを逆転写酵素（RT）の後にポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いてクローニングした。推定の膜貫通ドメインから66塩基に位置するNcoI制限酵素切断部位でhPRL-BPアンチセンスプライマーをデザインし、終止コドン(TGA)を組み入れた（5' GCACT~~tca~~GTA TCCATGGTCTGGT 3'）。翻訳開始コドンATGを含むセンスプライマーをデザインした（5' AG AAGGCAGCCAA~~atg~~AAG 3'）。RT/PCRは、パーキンエルマー・シータスインク（ノーウォーク、コネチカット州）のキットを用いて実施した。又クレオチド配列hPRL-BPは、改変したT7 DNAポリメラーゼ（シーケナーゼ、ユナイテッドステイツバイオケミカル）を用いてジデオキシチエーンターミネーション法によって決定した。

30

【0071】

10. 実施例：プロラクチンアンタゴニストの阻害作用およびタモキシフェンと併用した場合のその相乗作用

以下の章は、プロラクチン変異体を抗エストロゲン剤と共に加えると、細胞増殖に相乗的な阻害作用を誘導することを示す細胞増殖アッセイ法に由来するデータを記述する。

【0072】

10.1 材料および方法

RT-PCR RT-PCR技術を用いてhPRL cDNAをクローニングした。ヒト下垂体mRNAはクロントックラボラトリーズインク（Clontech Laboratory, Inc.）（パロアルト、カリリフォルニア州94303）から購入した。RT-PCRキットはパーキンエルマーインク（ノーウォーク、コネチカット州）から購入した。hPRL cDNAの停止コドン（小文字）から2塩基のhPRLアンチセンスプライマー（RT反応のための）をデザインし（5' GC~~tta~~GCAGTTGTTGTG 3'）、および翻訳開始コドンATGからセンスプライマーをデザインした（5' atgAACATCAAAGG AT3'）。RT-PCR反応は製造元の推奨に従って実施した。次に、PCR産物を、インビトロゲンコーポレーション（カールスバッド、カリリフォルニア州）の発現ベクターpcDNA3.1にクローニングした。hPRL cDNAの発現はヒト早初期サイトメガロウイルス（CMV）エンハンサー／プロモーター、ならびにウシGH遺伝子からのポリアデニル化シグナルおよび転写終結配列によって制御した。このベクターは、ネオマイシン抵抗性哺乳類細胞の選択を可能に

40

50

するネオマイシン遺伝子も含む(図1B)。

【0073】

Hprl-G129Rの合理的デザイン 第三のヘリックス領域における全ての既知のPRLのアミノ酸配列をGH配列と共に配置した。hPRLの129位のグリシンがPRLにおいて不变であり、hGHの120位に対応することは明らかであり、このことはその機能においておそらく重要な役割を有することを示唆している。したがって、本発明者らは、hPRLの129位のグリシンにおける単一のアミノ酸置換変異体(hPRL-G129R)を作製することを決定した。本発明者らは、hPRLR特異的アンタゴニストを产生することを期待して、hGHアンタゴニストの検出にこれまで首尾よく用いられてきたものと類似のアプローチを用いた(図11)。

【0074】

オリゴスクレオチド定方向変異誘発 PCR変異誘発プロトコールを用いて、hPRL-G129R cDNAを作製した。所望の変異を含むオリゴスクレオチド(5' CTTCTAGAGcgcATGGAGCTCAT A 3'; および5' CCCTAGACTCGAGCGGCCGCC 3')はナショナルバイオサイエンスインク(National Biosciences, Inc.) (プリマス、ミネソタ州)により合成された。129位のアルギニンに対するコドンを小文字で示し、制限部位XbaIを下線で示す。PCR産物をXbaIによって消化して、先に記述したベクターに再びライゲーションした(図1B)。次に、変異をDNAスクレオチドシークエンシングによって確認した。

【0075】

細胞株 2つのヒト乳癌細胞株(T47-DおよびMCF-7)およびマウスL繊維芽細胞株をA TCCから得た。いずれのヒト乳癌細胞株もエストロゲン受容体(ER)陽性でPRLR陽性の細胞株として特徴付けされている(オーマンディ(Ormandy, C. J.)ら、1997、J. Clin. Endocrinol. Metabol. 82: 3692~99)。細胞は、MCF-7細胞およびL細胞に関してはダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)にて、T47-D細胞に関してはRPMI-1640培地にて、デキストランコーティングしたチャコールで処理した10%ウシ胎児血清(DCC-FCS)を加えた後に単層培養物としてルーチン的に増殖させた。ヒト乳癌細胞の培地はフェノールレッドを加えずに用いた(その可能性があるエストロゲン様活性を回避するため)。培養細胞を37度5%CO₂を含む湿潤大気中で維持して、週に2回継代した。

【0076】

hPRLおよびhPRL-G129R蛋白質の発現および產生 マウスL細胞トランスフェクションおよび安定な細胞の選択は、これまでに記載された方法に軽度の改変を加えて実施した(ゾウ(Zhou, Y.)ら、1996、Gene 177: 257~129; サン(Sun, X. Z.)ら、1997、J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 63: 29~36)。簡単に説明すると、細胞を6ウェルプレートに播種して、培養が50%コンフルエンツになるまで培養した。トランスフェクションの当日に、細胞を無血清培地によって1回洗浄して、pcDNA3-hPRLまたはpcDNA3-hPRL-G129R 1 μgおよびリポフェクタミン10 μl(ギブコBRL(GibcoBRL))を含む無血清培地1 ml中で5時間培養した。増殖培地2 mlをDNA/リポフェクタミン溶液に加えて、インキュベーションを継続した。18~24時間のインキュベーション後、新鮮な増殖培地を用いてDNA/リポフェクタミン混合物を含む培地と交換した。トランスフェクションの72時間後、細胞を1:10に希釈して、neo遺伝子発現に関して選択するために選択培地(400 μg/ml G418)に継代した。個々のコロニーを単離して増殖させた。個々の細胞株の発現レベルは、ディアグノスティックプロダクツインク(ロサンゼルス、カリフォルニア州)のイムノラジオメトリー・アッセイ(IRMA)キットを用いて決定した。発現レベルが高い細胞株を増殖させた。

【0077】

hPRLおよびhPRL-G129Rを含む馴化培地を以下のように調製した。安定な細胞を85~90%コンフルエンツでT-150培養フラスコに播種した。次に、増殖培地を、1%DCC-FCSを含むRPMI-1640培地50 mlに交換して、1日おきに3回採取した。採取した培地をプールして、0.2 μmフィルターユニットを通して濾過し、細胞片を除去して、使用するまで-20度保存した。hPRLまたはhPRL-G129Rの濃度はhPRL IRMAによって決定した。ウェスタンプロット分析プロトコールを用いてそれぞれのバッヂ産物をさらに確認した(フェルナンデクス(Fernandez, E.)ら、1990、Anal. Biochem. 191: 268~271)。本発明者らは、こ

10

20

30

40

50

のプロトコールを、インビトロ研究のためのhGHアンタゴニストを含むhGH類似体研究に用いた（Chen, W. Y. ら、1994、J. Biol. Chem. 269 : 15892 ~ 15897）。

【0078】

T47-D細胞におけるSTAT蛋白質のチロシン磷酸化 このアッセイ法は、モデル標的細胞としてT47-D細胞を用いて、シグナル伝達に及ぼすhPRLおよびhPRL-G129Rの作用を調べるためにデザインされている。簡単に説明すると、T47-D細胞を12ウェルプレートに播種した。無血清培地での2~3時間のプレインキュベーションの後、細胞を無血清培地中で様々な濃度のhPRLもしくはhPRL-G129R、またはhPRLとhPRL-G129Rとの混合物に暴露した。細胞を37℃で15分間インキュベートして、PBSで1回洗浄して、溶解緩衝液（50 mMトリス塩酸、pH 6.8、1% SDS、1% メルカプトエタノール、0.1 M DTT、5% 蔗糖、100 μM オルトバナジン酸ナトリウム、および0.6% ブロモフェノールブルー）200 μl中に溶解した。次に、バイオラドプロテインIIシステムを用いて細胞溶解液30 μlを4~12.5% SDS-PAGE解析した。電気泳動後、ゲルをハイボンド-ECL(Hybond-ECL)メンブレン（アマシャム社、イリノイ州）に100ボルトの一定電圧で2時間転写した。プロットをすすぎ用緩衝液（10 mMトリス塩酸、pH 7.5、75 mM NaCl、0.1% ツイーン20、1 mM EDTA）中に4% BSA（ベーリンガー・マンハイム(Boehringer Mannheim)、インジアナ州）を含むプロッキング溶液中で2時間インキュベートして、その後すすぎ用緩衝液で2回15分間洗浄した。プロットを、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ（HRP）結合抗ホスホチロシン抗体PY20（アマシャム社、イリノイ州）をプロッキング溶液中に0.1 μg/mlの濃度で含む溶液と共に1時間インキュベートした。インキュベーション後、プロットをすすぎ用緩衝液（15分、それぞれ2回）によって洗浄して、製造元（アマシャム社、イリノイ州）の提唱に従って試薬キットを用いて展開した。次に、プロットをX線フィルムに露出して、標準的な方法（コダック社、ロチェスター、ニューヨーク州）を用いて現像した。

【0079】

HPRLG129R馴化培地 アッセイ条件はギンスバーグ & フォンデルアール（Ginsburg and Vonderhaar）（1995、Cancer Res. 55 : 2591 ~ 2595）が記述した方法から改変した。T47-D細胞をトリプシン処理して、1%DCC-FCSを含むRPMI-1640培地の中で96穴プレートに容量100 μl/ウェルで加えた。それぞれの細胞株にとって最適な細胞数/ウェルは、滴定アッセイ後に予め決定した。T47-D細胞に関しては、細胞15,000個/ウェルを播種した。細胞を沈殿させて、一晩（12~18時間）接着させ、その後hPRL、hPRL-G129R、E2、または4-OHタモキシフェンのいずれかの様々な濃度を培養培地の総量100 μlとして加えた。精製したhPRL（NIHの国立ホルモン & 下垂体プログラム（National Hormon & Pituitary Program）のパーロウ（Parlow）博士からの寄贈）を、安定なL細胞から產生されたhPRLの陽性対照として用いた。細胞を、5%CO₂インキュベータ内で37℃でさらに96時間インキュベートした。インキュベーション後、MTS-PMS溶液（セルタイター-96アクエアスキット(Cell Titer 96 Aqueous kit)、プロメガコーポレーション(Promega Corp.)）を、製造元の指示に従ってそれぞれのウェルに加えた。バイオラド(BIO-RAD)ベンチマークマイクロプレートリーダーを用いて、プレートを490 nmで読みとった。実験は3連で行い、それぞれの細胞株について3~6回繰り返した。

【0080】

10.2 結果

hPRLのクローニングおよび変異誘発 RT-PCR技術を用いてhPRL cDNAをヒト下垂体mRNAからクローニングした。対応するPCR産物のサイズは長さが663塩基対であり、これをpcDNA3.1発現ベクターにクローニングした。hPRLのヌクレオチド配列は、自動シークエンサー（PEアプライドバイオシステムズ(PE Applied Biosystems)、フォスター・シティ、カリフォルニア州）を用いてジデオキシチャーンターミネーション法によって決定した。hPRL cDNA配列は、1つの塩基の違いを除いてゲンバンクに報告された配列と同一であり、その結果コドン21位でのサイレント変異が起こる(CTG CTC)ことが判明した。HPRL-G129R cDNAもまた、PCRによって產生して、シークエンシングした。

【0081】

10

20

30

40

50

hPRLおよびhPRL-G129Rの発現 マウスL細胞をhPRLまたはhPRL-G129R cDNAのいずれかに安定にトランسفェクトさせて、neo抵抗性クローニングを選択して増殖させた。馴化培地を採取してRIMAキットを用いて発現の有無を調べた。hPRLおよびhPRL-G129Rを約~1 mg/L /24時間 / 細胞100万個の量で産生するhPRLおよびhPRL-G129R安定なマウスL細胞株を作製した(図12)。

【0082】

hPRL-G129RによるSTAT蛋白質のチロシン磷酸化の阻害 STAT蛋白質は、分子量約92~95 kDaの蛋白質のファミリーを表す。GHアンタゴニストの阻害作用は、STAT蛋白質のチロシン磷酸化の阻害レベルを測定することによってアッセイすることができる(Chenら、1994、J. Biol. Chem. 269: 15892; Wangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 1391~1395; Silvaら、1993、Endocrinology 133: 2307~2312)。そのようなアッセイ法を用いて、GHアンタゴニストhGH-G120Rは、STAT蛋白質磷酸化のGH誘導を用量依存的に阻害することが示された。

【0083】

T47-Dヒト乳癌細胞に対してhPRLおよびhPRL-G129Rを用いた結果から、hPRL-G129RがSTAT蛋白質の磷酸化を刺激するために活性でないことが示された。しかし、hPRL-G129RをhPRLと共に加えると、hPRLによって誘導されたシグナル伝達を用量依存的に遮断することができ(図13)、このことは、これがhPRLアンタゴニストとして機能していることを示唆している。hPRL-G129Rは、hPRLによって誘導されるSTAT蛋白質の磷酸化を5:1の比で完全に阻害した。

【0084】

ヒト乳癌細胞増殖アッセイ法 ヒトPRLおよびhPRL-G129Rは、細胞培養において乳癌細胞増殖を刺激/阻害するか否かに関してさらに調べた。hPRL、hPRL-G129R、E2、4-OHタモキシフェンを加えた後の乳癌細胞増殖の光学顕微鏡検査を図14A~Eに示す。hPRL(15B)、hPRL-G129R(15C)とE2(15D)、4-OHタモキシフェン(15E)処置細胞との間の細胞密度に有意な差が認められることは明らかである。同様に、hPRL-G129R処置細胞の全体的な細胞状態は、光学顕微鏡検査の下で健康ではなかったことを指摘することは注目に値する。

【0085】

96ウェル細胞増殖アッセイ法の結果を図15~18に示す。hPRLはT47-D増殖を用量依存的に刺激した。hPRLの最大刺激(250 ng/ml)は1回投与/4日間インキュベーションの後に基礎レベルを約20%上回った。しかし、hPRLおよびE2を同時に適用すると、相乗作用が認められた。10 nM E2の存在下でhPRLの最大反応(100 ng/ml)は、hPRL単独と比較して3倍以上であった(図15)。

【0086】

一方、hPRL-G129Rは、細胞増殖に対して用量依存的な阻害作用を示した(図16A)。hPRL-G129R(150 ng/ml)の阻害作用は、アッセイ系において4-OHタモキシフェンの最大500 nM用量より強力であった(図16B)。4-OHタモキシフェン(500 nM)の1回処置の最大阻害は対照の約15%であるが(図16B)、hPRL-G129Rの1回処置による最大阻害は対照の25%であった(図16A)。hPRL-G129Rはまた、hPRL誘導細胞増殖を競合的に阻害することができた。hPRL-G129Rは、1:1のモル比でhPRLの刺激作用を停止させることができ、2:1のモル比では、細胞増殖を阻害した(図17)。より重要なことは、hPRL-G129Rを4-OHタモキシフェンと共に適用すると、阻害作用はhPRL-G129Rまたは4-OHタモキシフェンの最大用量のいずれかと比較して倍加した(図18)。例えば、100 nM 4-OHタモキシフェンは100 ng/mlのhPRL-G129Rの存在下においても15%阻害を生じ、阻害作用は対照の約32%となつた。

【0087】

同時培養実験 安定なマウスL細胞株は、マウスL細胞が検出不可能なPRLRを有するという事実により、それらがhPRLまたはhPRL-G129Rのいずれかを産生するか否かによらず、通常のL細胞と同様に類似の速度で増殖する(Chenら、1994、J. Biol. Chem. 26

10

20

30

40

50

9 : 15892 ~ 15897)。同時培養実験のセットアップにより、生物学的に活性なhPRL-G129Rの持続的な存在が提供され、それによってこれらの腫瘍細胞における最大反応が得られた。

【 0 0 8 8 】

L-G129R細胞と共に培養後のヒト乳癌細胞株はいずれも、用量依存的な増殖阻害を示した(図19A~B)。反応は、馴化培地実験と比較してかなり劇的であった。細胞増殖の完全な阻害は双方の細胞株において得られた。MCF-7細胞の反応パターンがT47-D細胞のパターンと比較して右にシフトしたことは注目に値する、すなわちMCF-7細胞では同じ阻害作用を誘発するためにより多くのhPRL-G129Rを必要とした。これらの結果は、MCF-7細胞上のhPRLRの総数がT47-D細胞上に認められる数よりはるかに少ないという事実によって説明することができる(オーマンディ(Ormandy)ら、Genes Dev. 15 : 167 ~ 178; シー(Shih)、1981、「ホルモンと乳癌(Hormones and Breast Cancer)」、コールドスプリングハーバー研究所、パイク、シイテリ、およびウォルシュ(Pike, Siiteri, and Walsh)編、185 ~ 194頁)。

【 0 0 8 9 】

11. 実施例：ヒトプロラクチン受容体アンタゴニストG129Rは多数のヒト乳癌細胞株および前立腺癌細胞においてアポトーシスを誘導する

11.1 材料および方法

細胞株 ヒト乳癌細胞株MDA-MB-134、T-47D、BT-474、およびMCF-7はATCCから得た。これらの乳癌細胞株はそのPRLRレベルに基づいて選択した。細胞株MDA-MB-134は最高のPRLRレベルを有し、これにPRLRレベルが減少する順にT-47D、BT-474、MCF-7が続く(オーマンディ(Ormandy)、J. Clinical Endocrinology and Metabolism 82 : 3692 ~ 3699)。

【 0 0 9 0 】

細胞培養 ATCCから得たT-47D細胞は、10%FBS(ギブコBRL)を加えたRPMI1640(フェノールレッドを含まない)において増殖させた。BT-474細胞は10%FBSおよびATCC推奨添加剤を加えたRPMI 1640培地(フェノールレッドを含まない)において増殖させた。MCF-7細胞を、10%FBSを加えたDMEM培地(フェノールレッドを含まない)において増殖させた。細胞は5%CO₂の存在下で湿潤大気中で37℃で増殖させた。MDA-MB-134細胞は、20%FBSを加えたLeibovitz L-15培地中でCO₂不含大気中で増殖させた。乳癌細胞をトリプシン処理(0.02%トリプシン-EDTA)して、10%CSS(チャコール通過血清)加えたそれぞれの培地(フェノールレッドを含まない)中で1週間増殖させた。その後、細胞を再度トリプシン処理して、8室スライドシステム(ラブテックII(Lab-Tek II))に1室あたり60~70%のコンフルエンスで播種した。翌日、1%CSSを加えたそれぞれの培地(フェノールレッドを含まない)を用いて乳癌細胞に処置を施した。MDA-MB-134 VI細胞は、フェノールレッド含有培地であるが、他の乳癌細胞と同じ血清条件で増殖させた。

【 0 0 9 1 】

ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ媒介dUTPニック末端標識(TUNEL)アッセイ法 断片化DNAのニックをその3-OH末端で標識する。酵素ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いてフルオレセイン標識dUTPを3-OH末端に取り込ませる。所定の処置期間の後、製造元の指示に従ってチャンバーを取り外し、TUNELアッセイ法(アポトーシス検出システム、フルオレセイン-プロメガ(Fluorescein-Promega))を製造元の指示通りに実施した。オリンパスIX 70顕微鏡システムを用いて、スライドをFITCフィルターの下で調べた。

【 0 0 9 2 】

11.2 結果

アポトーシス(プログラムされた細胞死)は、細胞の死を時間的および秩序的に調節する中心的な生理的メカニズムの1つである(ステラー(Stellar, H.)、1995、Science 267 : 1445)。アポトーシスの生化学的特徴は、ヌクレオソーム内部のDNA切断であり(ワイルー(Wyllie)、1980、Nature 284 : 555; ロイ(Roy)ら、1992、Exp. Cell Res. 200 : 416 ~ 424; ワイルー(Wyllie)、1980、Int. Rev. Cytol. 68 : 251 ~ 306)、これはTUNE

10

20

30

40

50

Lアッセイ法または従来のゲル電気泳動によって検出することができる(Chen、1996、J. Biol. Chem. 61: 9~17)。癌は、少なくとも幾つかの生理学的刺激に反応してアポトーシスを受ける能力が減少した悪性疾患である(Hoffmanら、1994、Oncogene 9: 1807)。癌細胞をアポトーシスを引き起こすように誘導することができる薬物は、癌療法において有効となることが証明されると考えられる。

【0093】

本明細書に示したように、PRLRアンタゴニストであるG129Rは、多数のヒト乳癌細胞株においてDNA断片化によって検出されるアポトーシスを誘導することができる。図20A~Fは、G129Rが24時間の処置後に用量依存的にアポトーシスを誘導すること、およびアポトーシスが生理学的濃度(50 ng/ml、図20C)においても起こることを示している。G129RのPRLRに対する特異性を証明するために、hPRL(NIHのパーロウ博士の寄贈)およびG129Rを同時に用いて細胞を1:1および1:4の比で処理した(図20G~H)。G129RがhPRLと1:1の比で競合できること(図20E)、そしてG129Rによって誘導されたDNA断片化を4:1の比で競合的に逆転できることは明白である(図20F)。hPRLのマイトゲン救済作用はG129Rがアポトーシスを誘導するさらなる別の証明である。同じ結果がBT-474細胞を用いて得られた。

【0094】

乳癌細胞におけるDNA断片化は、G129Rの50 ng/mlの濃度による2時間処理後でも明らかである(図21A~D)。これまでの研究において、4-OHタモキシフェンが乳癌細胞の増殖をG129Rと共に相乗的に阻害することが示された。したがって、4-OHタモキシフェンも同様にDNA断片化によるアポトーシスを乳癌細胞において誘導することを確認するために、4-OHタモキシフェンを本試験に含めた。意外にも、4-OHタモキシフェンは、4-OHタモキシフェンが細胞増殖を阻害することができるという事実にも関わらず、同じプロトコールによってアッセイしたところ、T-47D、MCF-7、またはBT-474細胞において、1 μMもの高濃度でもアポトーシスを誘導しなかった(図22A~H)。4-OHタモキシフェンとは対照的に、G129R 250 ngは、24時間の処置後に4つ全てのPRLR陽性乳癌細胞株において、アポトーシスDNA断片化を誘導した(図23A~F)。

【0095】

さらに、カスパー-3活性化に及ぼすhPRL-G129Rの作用を、図24に示すように、T-47D細胞においてアポップアラート(ApopAlert)CPP32/カスパー-3アッセイキット(クロンテック社(ClonTech)、パロアルト、カリフォルニア州)を用いてアッセイした。T-47D細胞は250 ng/mlのhPRL-G129Rによって2時間処置した。アッセイ法はDEVD-CHO(カスパー-3阻害剤)の存在下で実施して、hPRL-G129Rによるカスパー-3誘導が特異的事象であることを証明した。

【0096】

上記のデータは、乳癌細胞がプロラクチンを主な増殖因子として利用するように順応し、PRLRに対するG129Rの競合的結合によってこれを枯渇させると、PRL増殖シグナルの遮断に至り、アポトーシスを起こすことを示している。このように、hPRLによって提供される持続的なマイトゲンシグナルが、乳癌細胞内に存在するアポトーシスシグナルを無効にして、遅延型アポトーシスプロセスを行なう可能性がある。本明細書に示したデータは、プロラクチン受容体アンタゴニストであるG129Rが、タモキシフェンと共に内分泌療法において、またはそれ自身乳癌の治療に用いることができる事を示している。

【0097】

さらに、2つの前立腺癌細胞は、TUNELアッセイ法を用いて検出すると、hPRL-G129Rの250 ngによる24時間の処理に反応してアポトーシスを起こした(図25)。試料は2本ずつ実施して、それぞれの試料は細胞約200万個で構成された。

【0098】

本発明は、本発明の個々の局面の単なる説明として解釈される、本明細書に記述した特異的な態様によって範囲を制限されるわけではなく、機能的に同等な方法および成分も本発明の範囲内である。実際に、本明細書に示して記述したものに加えて、本発明の様々な

10

20

30

40

50

改变が、前述の説明および添付の図面から当業者には明らかになると考えられる。そのような改变は本発明の範囲内に含まれると解釈される。様々な論文を本明細書に引用しているが、その内容はその全文が参照として本明細書に組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

【図 1 A】 発現プラスミドpUCIG-MT-hPRL cDNAのクローニングおよび構築の概略図。

【図 1 B】 プラスミドマップとPCR定方向変異誘発の一般的方法。親ベクターであるpcDNA3は、ヒト早初期サイトメガロウイルス(CMV)転写調節配列ならびにウシGH遺伝子(BGH pA)からのポリアデニル化シグナルおよび転写終結配列を含む。hPRL cDNAは、ヒト下垂体mRNAからRT-PCRを用いてクローニングして、BstXI部位に挿入した。変異体はXba I部位でPCRプライマーをデザインすることによって作製した。10

【図 2】 様々なヒト癌細胞株(x軸に沿って記載)を用いたhGHおよびhPRLの競合的放射性受容体結合実験からのデータ。HTB123およびT47Dはヒト乳癌細胞株である。y軸は特異的結合の百分率を表す。各点はそれぞれ2連で実施した3つの実験の平均値を表す。

【図 3】 様々な条件でT47Dヒト乳癌細胞株におけるSTAT蛋白質(矢印のバンド)の磷酸化を示すウェスタンプロット分析。左から右に読み、レーン1は対照培養を示し、レーン2は5 nM hPRLを加えた培養、レーン3は5 nM hPRLAを加えた培養、レーン4は培養物を5 nM hPRLおよび5 nM hPRLAに暴露した場合の競合的作用を示し、ならびにレーン5は、培養物を5 nM hPRLおよび25 nM hPRLAに暴露した場合の競合的作用を表す。

【図 4】 乳癌細胞の増殖に及ぼす成長ホルモンとプロラクチンの影響。x軸はT47Dヒト乳癌細胞の培養培地に存在するhGHまたはhPRLの濃度を表す。y軸はインキュベーション期間終了時の細胞総数を表す。点は、それぞれを2連で実施した3つの実験の平均値(+SD)である。20

【図 5 A - B】 (A) 培養T47Dヒト乳癌細胞の増殖に及ぼすhPRLまたはG129Rプロラクチン変異体hPRLAの様々な濃度の影響。(B) 24または72時間でのT47D細胞の増殖に及ぼすエストロゲン(E2)およびタモキシフェン(Tam)の様々な濃度の影響。

【図 6】 T47D細胞増殖に及ぼす組換え型hPRLおよびG129Rプロラクチン変異体hPRLAの作用を評価する混合細胞培養アッセイ法のダイヤグラム。

【図 7】 24および72時間後の混合細胞培養アッセイ法におけるT47D乳癌細胞増殖に及ぼす組換え型発現hPRL(L-PRL)およびG129Rプロラクチン変異体hPRLA(L-PRLA)の作用。

【図 8】 1日(D1)、2日(D2)、3日(D3)、または5日(D5)後での混合細胞培養アッセイ法におけるT47D乳癌細胞増殖に及ぼす組換え型発現hPRL(L-PRL)およびG129Rプロラクチン変異体(L-PRLA)の作用。30

【図 9 A - B】 組換え型G129ヒトプロラクチン変異体hPRLAを発現するL細胞との混合細胞培養アッセイ法における、培養3日後の(A)T47Dヒト乳癌細胞、または(B)MCF-7ヒト乳癌細胞の増殖。

【図 10 A - B】 様々なヒトおよびヒト以外のプロラクチンの型のアミノ酸配列。

【図 11】 GHまたはhPRL(リガンド)アンタゴニストのメカニズムの概略図。リガンドにおける4つのらせん領域(点のついた楕円形)をI、II、IIIおよびIVと印す。2つの膜結合型受容体(影付きの楕円形)も同様に図に示す。Argは、第3のヘリックスにおける置換変異を表し、これによって第二の受容体が機能的複合体を形成することが妨害される(AからB)。40

【図 12】 G129R変異体をコードするように遺伝子操作されたpcDNA3ベクターにトランスフェクトさせたマウスL細胞によるhPRL-G129R遺伝子発現のイムノプロット解析。レーンA~Dは、標準物質として精製されたhPRL(NIHから)を含む試料を表す。レーンE~Hは、安定的にトランスフェクトされたマウスL細胞からの培養培地を表す。

【図 13】 ヒト乳癌細胞(T47-D)においてhPRLによって誘発されたSTAT蛋白質のチロシン磷酸化に及ぼすhPRL-G129Rのアンタゴニスト作用。レーンの割付はA、陰性対照；B、100 ng/ml hPRLによって刺激した細胞；C、100 ng/ml hPRL-G129Rで処置した細胞；D、100 ng/ml hPRLおよび100 ng/ml hPRL-G129Rによって処置した細胞；E、100 ng/ml hPRLおよび500 ng/ml hPRL-G129Rによって処置した細胞。矢印は95 kDa蛋白質の位置を示す。50

【図14A-E】 200 ng/ml hPRL(15B) ; 200 ng/ml hPRL-G129R(15C) ; 200 nM E2(15D) ; または200 nM 4-OHタモキシフェン(15E)を1回処置し4日間インキュベーションした後の、対照(15A)と比較したT47-Dヒト乳癌細胞の光学顕微鏡検査。200倍。

【図15】 T47-Dヒト乳癌細胞増殖アッセイ法におけるhPRLの用量反応効果およびE2との相乗効果。x軸はE2の非存在下(白いカラム)、または存在下のいずれかにおけるhPRL濃度を表す。それぞれのデータは3個ずつのウェルによる少なくとも3回の独立した実験の平均値を表す。バーはSDである。

【図16A-B】 4-OHタモキシフェン(17A)およびhPRL-G129R(17B)の用量反応効果。x軸は4-OHタモキシフェン(17A)およびhPRL-G129R(17B)の濃度を表す。それぞれのデータの点は3個ずつのウェルによる少なくとも3回の独立した実験の平均値を表す。バーはSDである。

【図17】 hPRL誘発T47-D細胞増殖に及ぼすhPRL-G129Rの用量反応阻害効果。x軸はhPRLの非存在下(白いバー)およびhPRLの存在下のいずれかでのhPRL-G129Rの濃度を表す。それぞれのデータの点は3個ずつのウェルによる少なくとも3回の独立した実験の平均値を表す。バーはSDである。

【図18】 T47-Dヒト乳癌細胞増殖アッセイ法におけるhPRL-G129Rの用量反応阻害効果および4-OHタモキシフェンとの相乗効果。x軸は4-OHタモキシフェンの非存在下(白いカラム)、または存在下のいずれかでのhPRL-G129R度を表す。それぞれのデータ点は3個ずつのウェルによる少なくとも3回の独立した実験の平均値を表す。バーはSDである。

【図19A-B】 共培養法を用いた2つのヒト乳癌細胞株におけるhPRL-G129Rの用量反応阻害効果。x軸は共培養したL細胞(対照)またはL-hPRL-G129R細胞数を表す。それぞれのデータの点は3個ずつのウェルによる少なくとも3回の独立した実験の平均値を表す。バーはSDである。

【図20A-F】 TUNELアッセイ法を用いて24時間処置した後のhPRL-G129Rに対するT47-Dヒト乳癌細胞の用量反応(パネルA~F)。パネル(G)および(H)は、hPRLとhPRL-G129Rとの比が1:1(125 ng/ml hPRL + 125 ng/ml hPRL-G129R; パネルG)および1:4(125 ng/ml hPRL-G129R + 500 ng/ml hPRL; パネルH)の場合での競合の結果を示す。

【図21A-E】 TUNELアッセイ法を用いてhPRL-G129R処置(50 ng/ml)に反応したT47-Dヒト乳癌細胞の時間経過。

【図22A-H】 TUNELアッセイ法を用いた4-OHタモキシフェン処置(1 μMを24時間)に対する多数の乳癌細胞の反応。ラベルCおよびTはそれぞれ、対照および処置細胞を表す。

【図23A-F】 TUNELアッセイ法を用いて、250 ng hPRL-G129Rの24時間処置に対する多数の乳癌細胞の反応。ラベルCおよびTはそれぞれ、対照および処置細胞を表す。

【図24】 hPRL-G129Rによるカスパー-ゼ-3の誘導。アポップアラートCPP32 / カスパー-ゼ-3アッセイキット(クロンテック社(Clontech)、パロアルト、カリフォルニア州)を用いてT-47D細胞におけるカスパー-ゼ-3活性化に及ぼすhPRL-G129Rの作用を示す。T-47D細胞を250 ng/ml hPRL-G129Rで2時間処置した。hPRL-G129Rによるカスパー-ゼ-3の誘導が特異的事象であることを証明するために、アッセイ法をDEVD-CHO(カスパー-ゼ-3阻害剤)の存在下で実施した。試料を2本ずつ試験し、それぞれの試料は細胞約200万個で構成された。

【図25】 TUNELアッセイ法を用いて、hPRL-G129R250 ngの24時間処置に対する2つの前立腺癌細胞の反応。

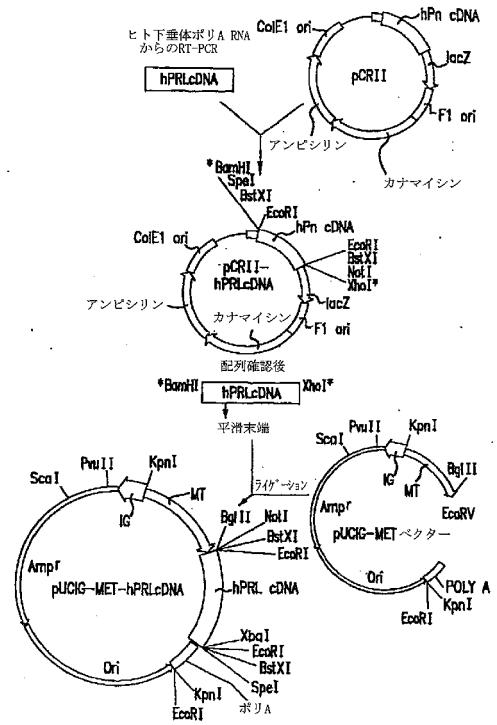
10

20

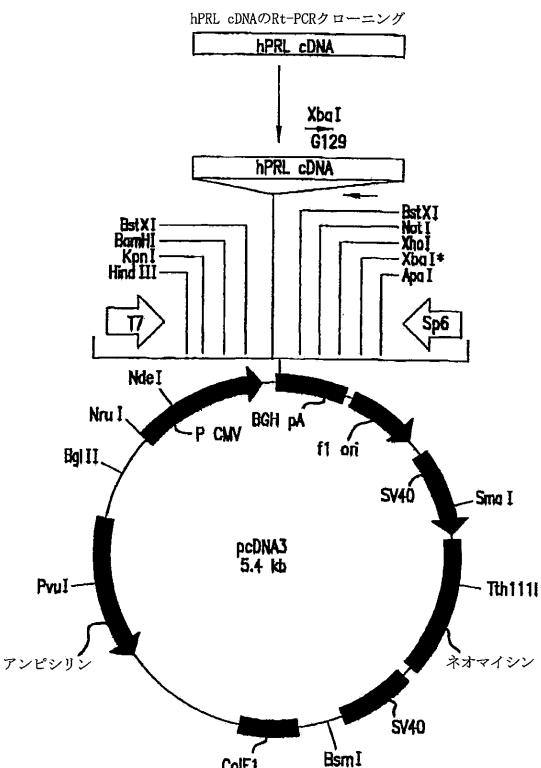
30

40

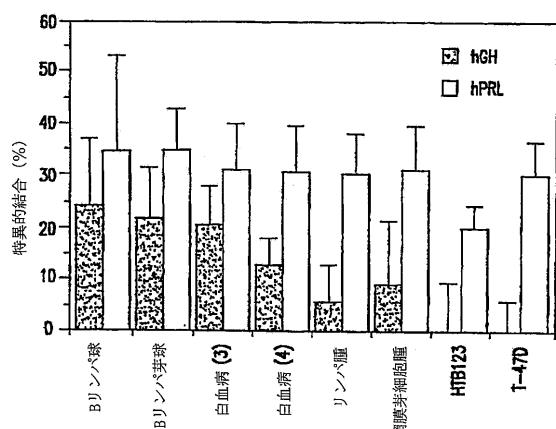
【図1A】



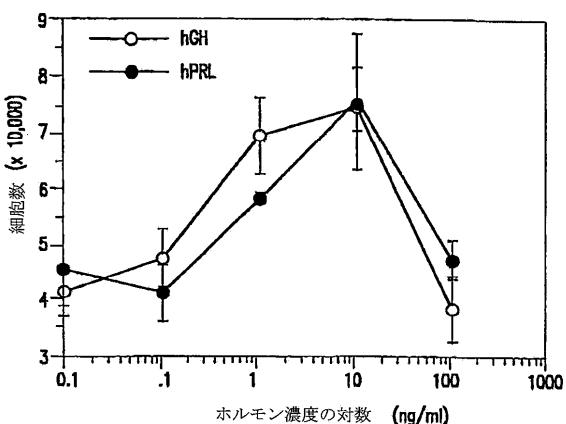
【図1B】



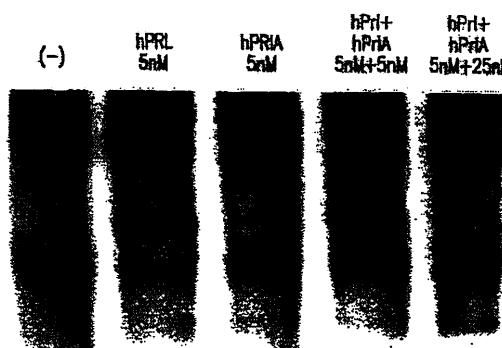
【図2】



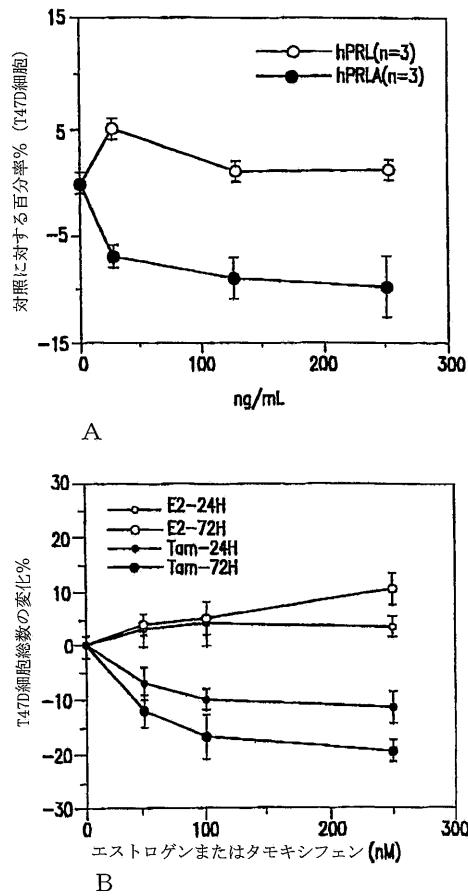
【図4】



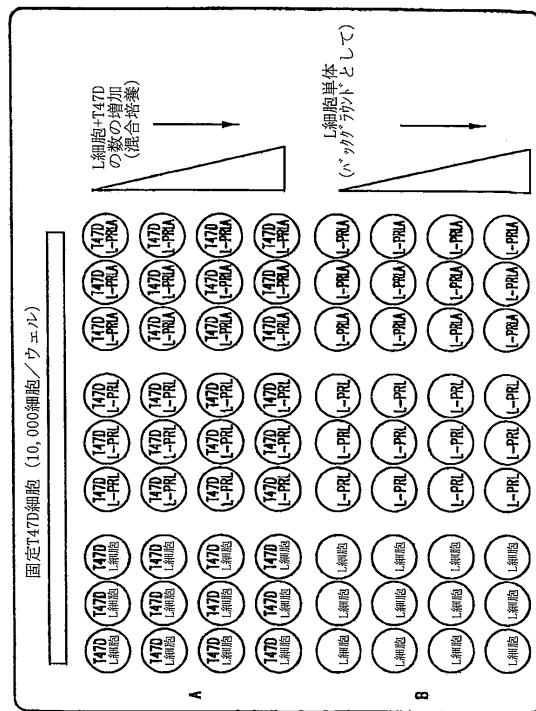
【図3】



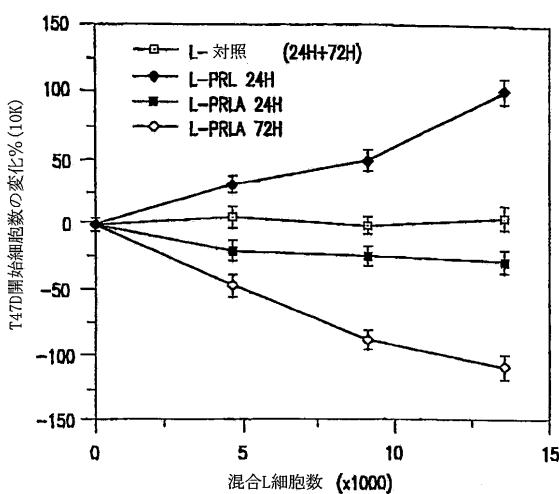
【図5】



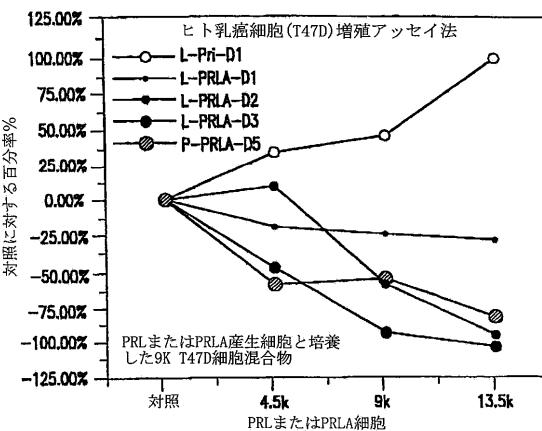
【図6】



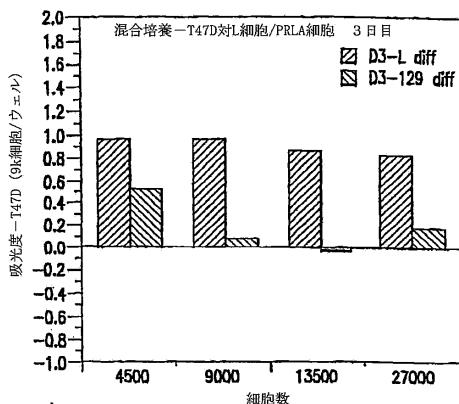
【図7】



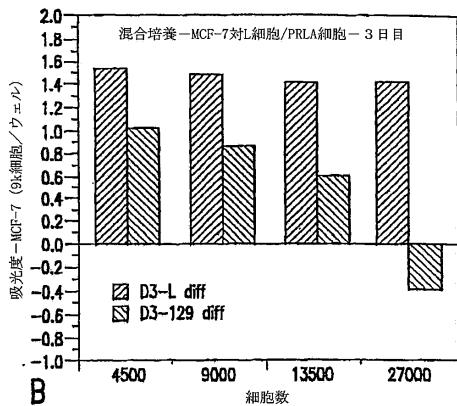
【図8】



【図9】

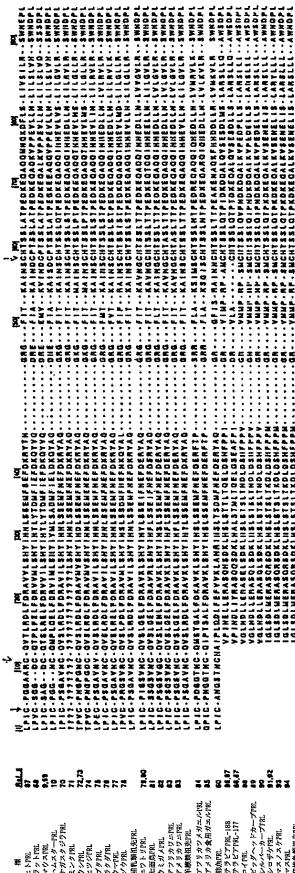


A

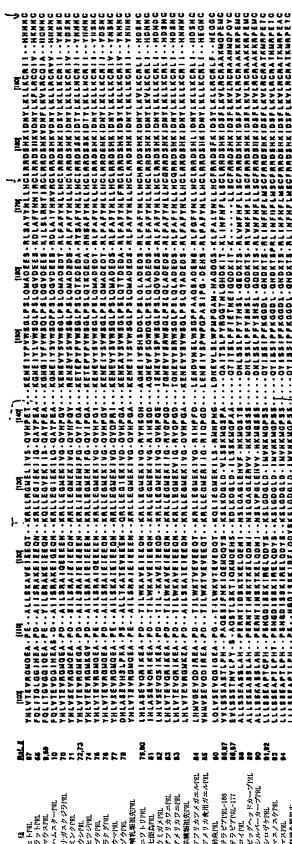


【 囮 1 0 B 】

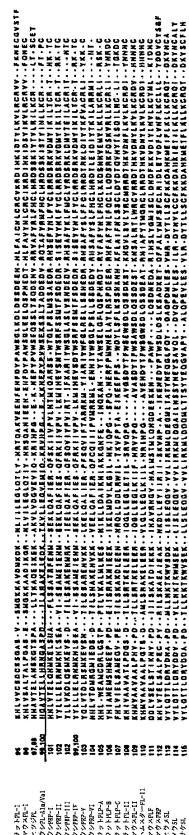
【図10A】



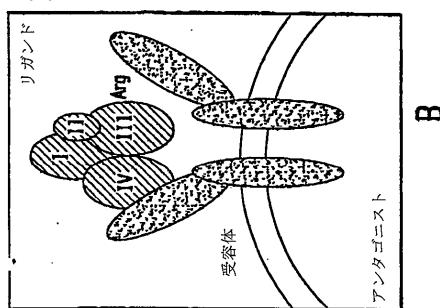
【図10C】



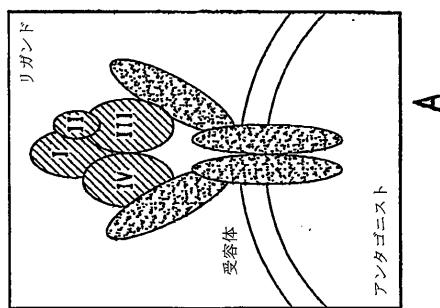
【図 10 D】



【図 11】

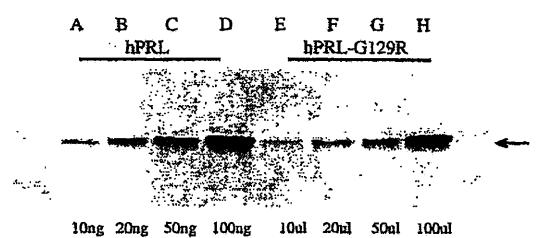


B

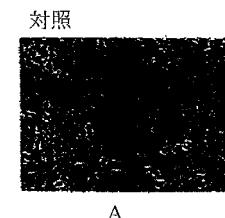


A

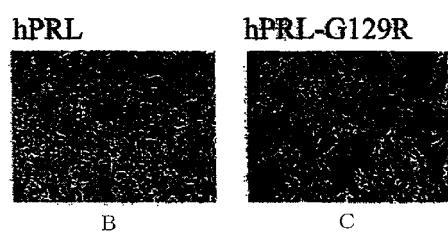
【図 12】



【図 14】



A

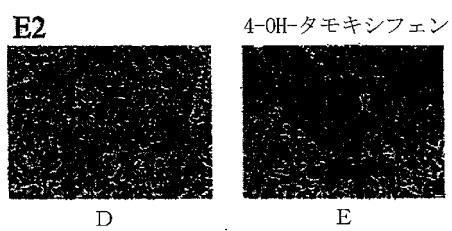
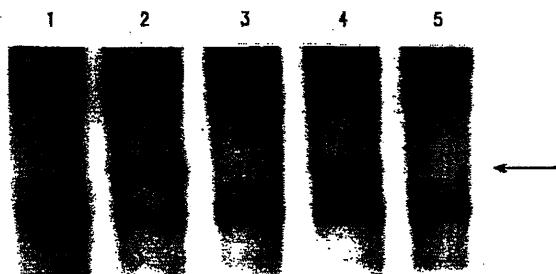


B

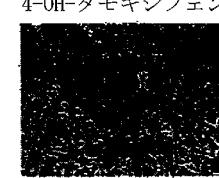


C

【図 13】

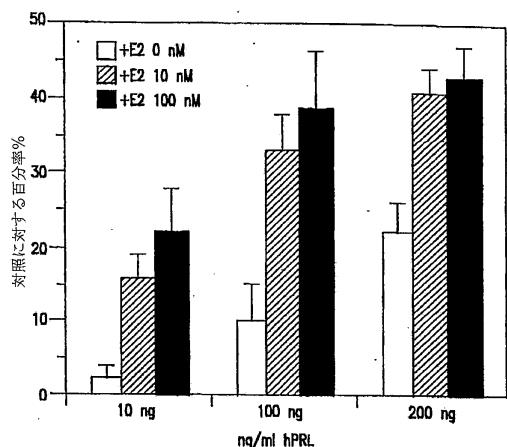


D

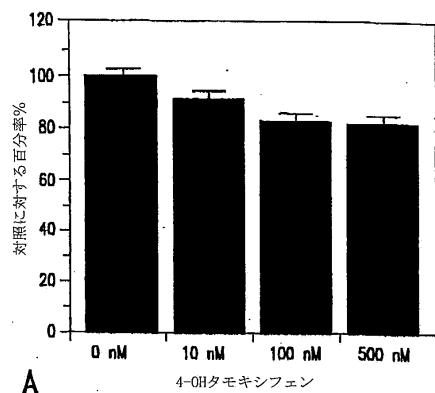


E

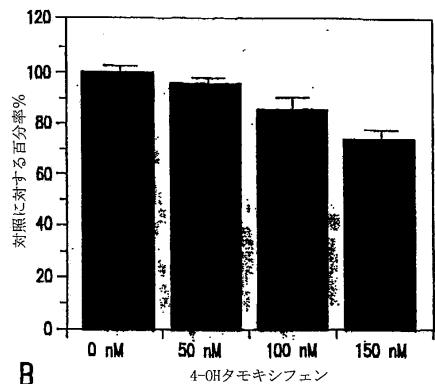
【図15】



【図16】

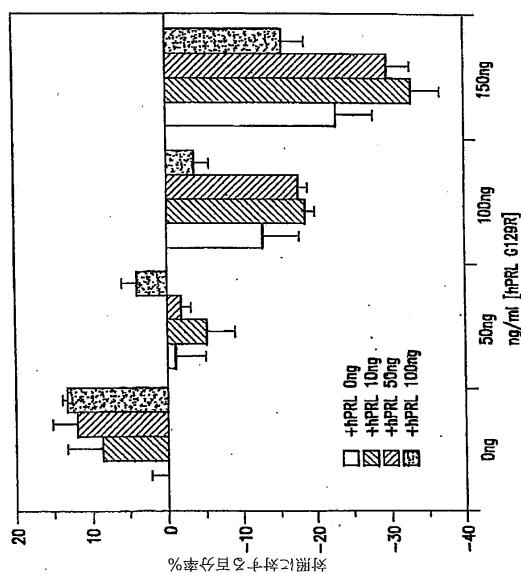


A

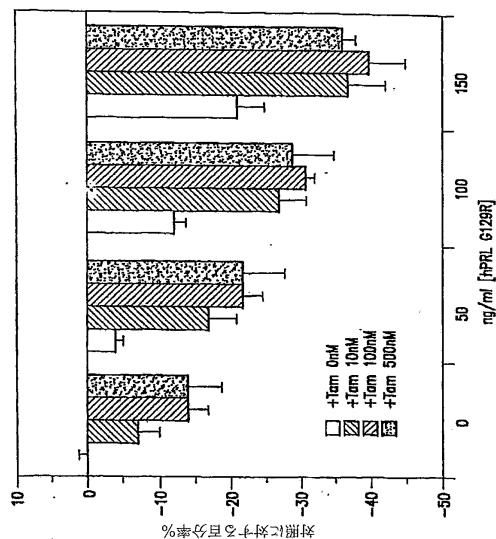


B

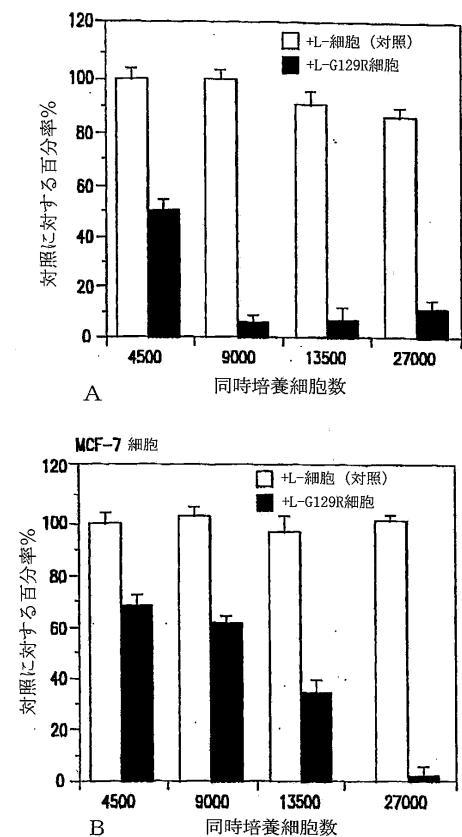
【図17】



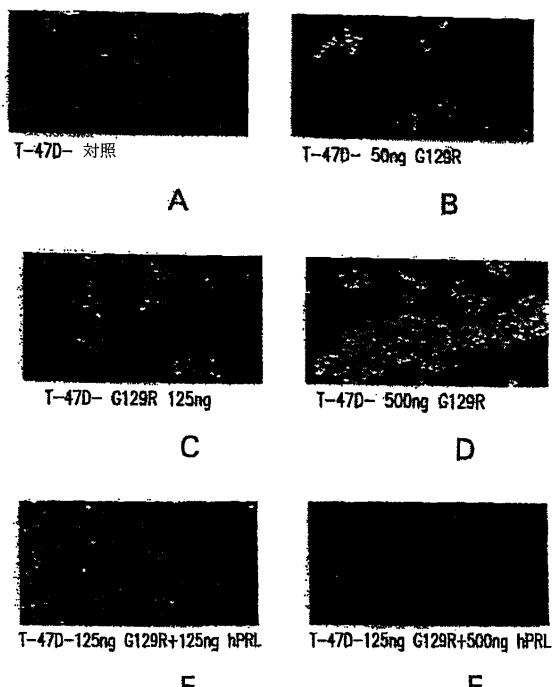
【図18】



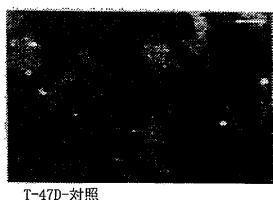
【図19】



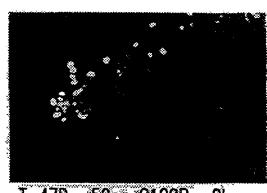
【図20】



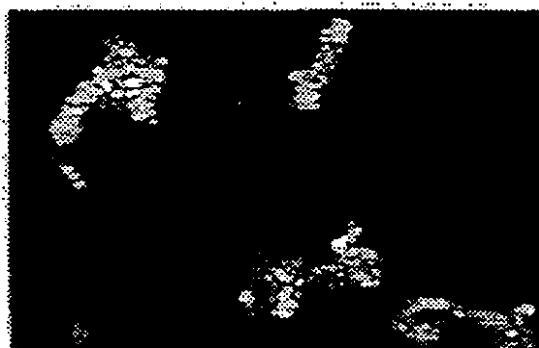
【図21 A】



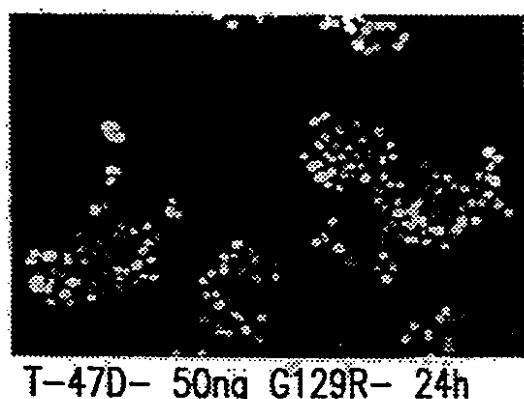
【図21 B】



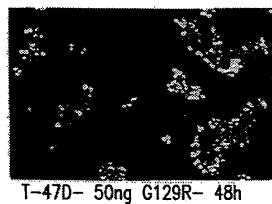
【図21 C】



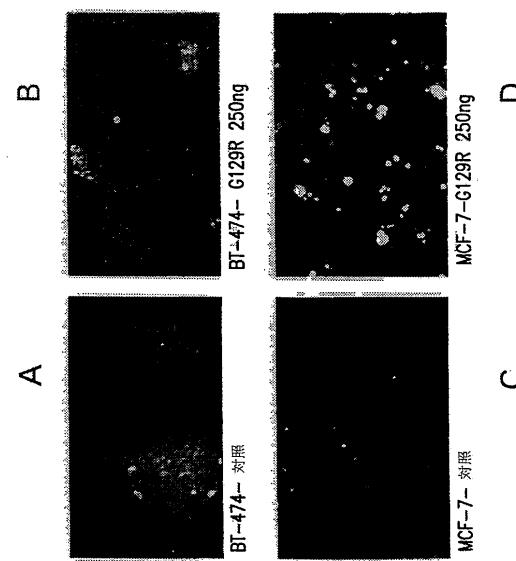
【図21 D】



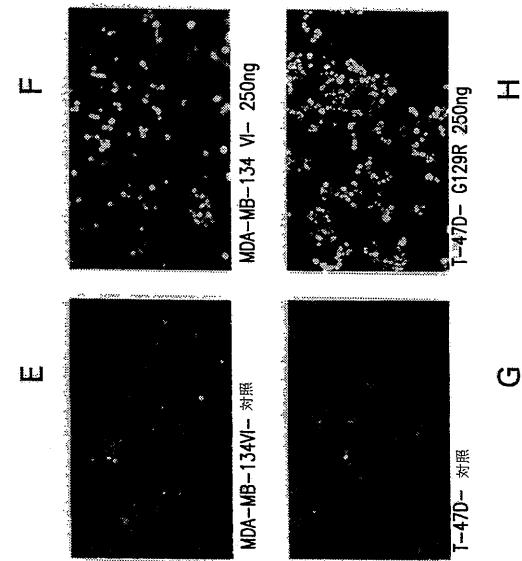
【図 2 1 E】



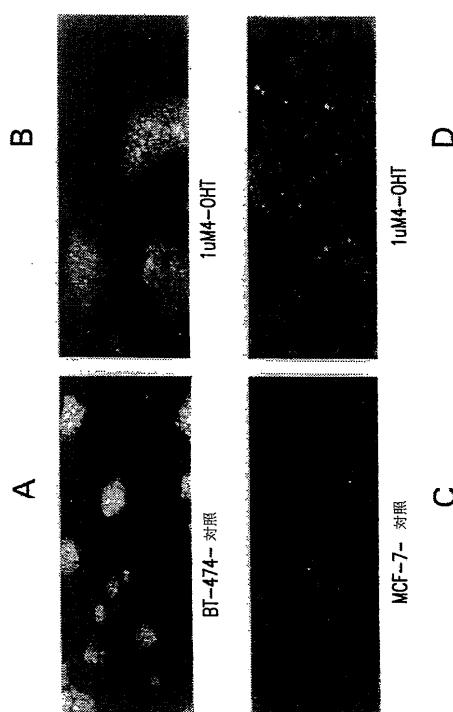
【図 2 2 A - D】



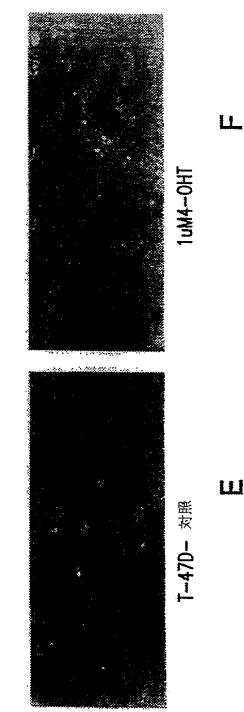
【図 2 2 E - H】



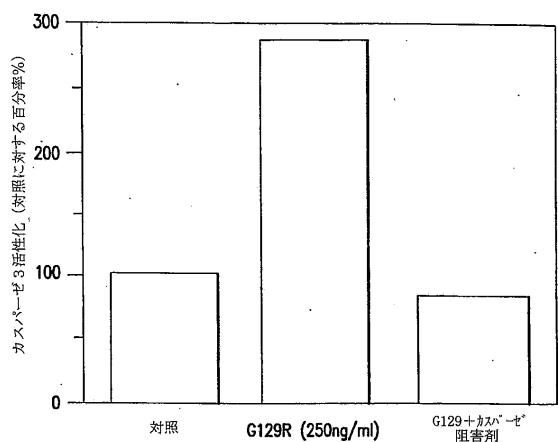
【図 2 3 A - D】



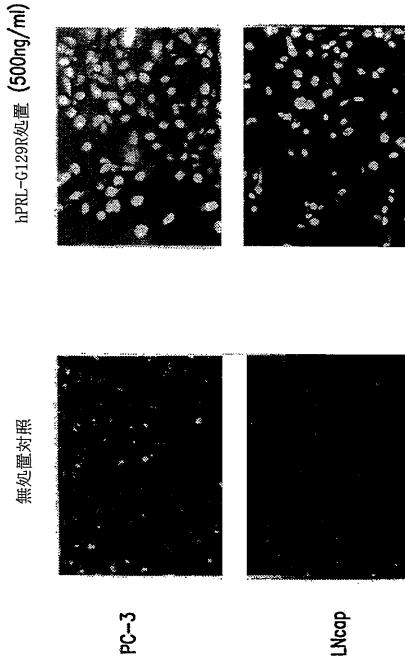
【図 2 3 E - F】



【図24】



【図25】



【配列表】

0005259896000001.app
0005259896000002.xml

フロントページの続き

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 シェン ウエン ワイ.
アメリカ合衆国 サウスカロライナ州 クリムゾン ブルックウッド ドライブ 107 イー.
(72)発明者 ワグナー トーマス イー.
アメリカ合衆国 サウスカロライナ州 グリアー ゴールデン ウィングス ウェイ 104

合議体

審判長 横尾 俊一
審判官 天野 貴子
審判官 穴吹 智子

(56)参考文献 特開平7-304691 (JP, A)
RANA A. et al, Eur J Cancer, 1995, Vol. 31A, No. 6,
, p. 871-5
GOFFIN V. et al, J Biol Chem, 1996, Vol. 271, No.
. 28, p. 16573-9
JANSSEN T. et al, Cancer, 1996, Vol. 77, No. 1, p. 1
449-9
GOFFIN V. et al, J Mammary Gland Biol Neopla
sia, 1997, Vol. 2, No. 1, p. 7-17

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K38/00, 45/00
CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE/STN