

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6546087号  
(P6546087)

(45) 発行日 令和1年7月17日(2019.7.17)

(24) 登録日 令和1年6月28日(2019.6.28)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 5/10 (2006.01)

C 12 N 5/10 Z N A

C 12 N 5/0735 (2010.01)

C 12 N 5/0735

C 12 N 15/113 (2010.01)

C 12 N 15/113 1 3 O Z

請求項の数 2 (全 48 頁)

(21) 出願番号 特願2015-524428 (P2015-524428)  
 (86) (22) 出願日 平成25年7月24日 (2013.7.24)  
 (65) 公表番号 特表2015-529454 (P2015-529454A)  
 (43) 公表日 平成27年10月8日 (2015.10.8)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2013/051899  
 (87) 國際公開番号 WO2014/018679  
 (87) 國際公開日 平成26年1月30日 (2014.1.30)  
 審査請求日 平成28年7月25日 (2016.7.25)  
 (31) 優先権主張番号 61/677,442  
 (32) 優先日 平成24年7月30日 (2012.7.30)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (31) 優先権主張番号 61/693,712  
 (32) 優先日 平成24年8月27日 (2012.8.27)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 507081094  
 ミネルバ バイオテクノロジーズ コーポ  
 レーション  
 米国, エムエー O 2 4 5 1, ウォルサム  
 , 4 O ペアー ヒル ロード  
 (74) 代理人 100088904  
 弁理士 厳司 隆  
 (72) 発明者 バンダッド, シンシア  
 米国, エムエー O 2 4 5 1, ウォルサム  
 , 4 O ペアー ヒル アールディー.  
 審査官 伊達 利奈

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NMEバリエント種の発現および抑制

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

胚性幹細胞、誘導多分化能幹細胞の分化を阻害するインビトロでの方法であって、生物学的に不活性状態であるNME1(NM23-H1)ヘクサマーを減少させることを含み、及び、MUC1\*受容体に結合できる2つの結合部位をもつモノマーであり生物学的にアクティブ状態であるNME7(NM23-H7)が、それを発現する核酸若しくは小分子の導入により、増加されることを含み、並びに、

(i) 生物学的に不活性な状態であるNME1(NM23-H1)ヘクサマーが、その発現をダウンレギュレートする核酸若しくは小さな分子の導入により減少する、又は(ii) 生物学的に不活性な状態であるNME1ヘクサマーをダウンレギュレートする第一の核酸と生物学的にアクティブ状態であるNME7をアップレギュレートする第二の核酸を同時に導入することにより、NME1(NM23-H1)ヘクサマーが減少し、かつ、NME7が増加する、方法。

## 【請求項 2】

ダウンレギュレートする核酸が、アンチーセンスDNA、阻害性RNA、siRNA、或いはshRNAであり、及びアップレギュレートする核酸が、コード化DNA、RNA、mRNAあるいはプラスミドである、又は細胞へのエントリーを促進するために修飾されたこれらの核酸の一である請求項1に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本願発明は、幹様の成長を調節し、かつ癌を治療するために、NMEファミリータンパク質およびそれらの関連する因子の発現を操作する分野に関する。

【背景技術】

【0002】

NM23は、これらのタンパク質中の共通性が、ADPへのATPの転換を触媒するヌクレオシド二リン酸キナーゼ(NDPK)ドメインの存在にあるタンパク質のファミリーとして存在する。

NM23は、以前、腫瘍ミグレーション因子として知られてきた。10のNM23ファミリーの最近の同定で、それらは、NMEタンパク質1-10としても知られている (Mol Cell Biochem (2009) 329:51-62, "The mammalian Nm23/NDPK family: from metastasis control to cilia movement," Mathieu Boissan, Sandrine Dabernat, Evelyne Peuchant, Uwe Schlattner, Ioan Lascu, and Marie-Lise Lacombe)。

【0003】

科学者は、最初にヒト白血病細胞から分化阻害因子を分離し、この因子の添加は、あるタイプの白血病および骨髓性細胞の化学的に誘導された分化を、阻止したことをしめた (Okabe-Kado, 1985, Cancer Research 45, 4848-4852, "Characterization of a Differentiation-inhibitory Activity from Nondifferentiating Mouse Myeloid Leukemia Cells); この抑制因子は、後に、NME1 (NM23-H1) として同定された (Okabe-Kado, 1992, "Identity of a differentiation inhibiting factor for mouse myeloid leukemia cells with NM23/nucleoside diphosphate kinase", Biochem Biophys Res Comm, 182 No.3 987-994)。白血病細胞は、終末分化が阻止される血液細胞である。興味深いことには、白血病細胞の分化を阻害する能力は、その触媒ドメインに依存しないことが証明された。その酵素活性をなくしたNDPKドメインの変異は、いくつかのタイプの白血病細胞の分化を阻止するタンパク質の能力に、効果がなかった。しかしながら、次の数十年間の科学文献は、NM23が分化を阻害するか、分化を加速するか、全く効果がないかどうかに関して、完全な混乱の様相を呈した。

【0004】

多くの研究論文が、NM23が、分化を誘導することを示す、証拠を提供した。Rosengardら、1989年、Dearolfら、1993年、そしてティモンズら、1993は、生体内において、示すジョウバエNM23同族体(awd)は、適切な分化に必要であることを報告した。Laksoら、1992は、NM23(マウス生体内)が、分化を誘導すること意味する、組織分化の開始で増加することを報告した。山城ら、1994は、生体外で、NM23レベルが、ヒト赤白血病細胞の分化中に増加すると報告した。ロンバーディら、1995は、NM23(マウス生体外)は、NM23が分化を誘導することを示す、細胞の分化の開始で増加することを結論づけた。Gervasi 1996年は、NM23(ネズミ生体外)の過剰発現は、ニューロンの分化と、アンチセンスDNA阻害下での分化でNM23のダウンレギュレーションを導いたことを報告した。Amendolaら、1997は、ヒト神経芽細胞におけるNM23のトランスフェクションが、分化を増加させたことを示した。

【0005】

NM23が、分化を誘導すると報告した多くの研究論文への直接の矛盾として、同じ時間枠の中で公表された等しい数の論文がNM23は分化を阻害したという反対の報告をした。ムニヨス・ドラドラ、1990は、ndk(*Myxococcus* NM23同族体、生体内)は、成長にとって不可欠であるが、その存在が分化を阻害することを意味する、成長の間にダウンレギュレートされていたことを見出した。岡部 - Kado 1992年は、生体外で、分化阻害因子(その後NM23と同じグループによって同定された)が、マウス白血病の分化を阻害したことを示した。山城ら、1994は、ヒト巨核芽球(*megakaryoblasts*)の分化中に、NM23レベルが減少すると報告した。これは、NM23が分化を阻害することと矛盾しない。岡部 - Kado 1995年は、組み換えNM23が、白血病細胞系統HEL、KU812およびK562の赤血液系分化を阻害したが、前駆体HL60、U937あるいはHEL/S細胞の単球もしくは顆粒球の分化ではそうではなかったことを示した。Venturelliら、1995は、NM23過剰発現が、ヒト造血性前駆体の、G-CSF依存顆粒球分化を阻害すると報告した。ウィレムスら、1998は、骨髓細胞から、ヒトCD34+赤血球性前駆体が分化するとともに、NM23発現が減少することを見出した。2002年には、ウィレム

10

20

30

40

50

スらが、NM23が、細胞増殖に効果がなく、分化を誘導も阻害もしなかったが、赤血球系系統へのCD34+細胞の分化へ傾けたことを示した。

【0006】

2000年のレビュー記事では、ロンバーディは、分化におけるNM23の役割に関するこれらおよび他の矛盾している結果を要約し、「細胞分化のコントロールにおけるNM23遺伝子の役割は、広く検討中であるが、NM23発現レベルとこのようなプロセスの間の機能的な結びつけは、完全には解明されていない」と結論を下した。言いかえれば、NM23と分化の間の機能的な結びつきは解明されていなかった。

【0007】

生物系では、タンパク質は、特別の方法で、細胞が機能するように命令する複雑なシグナルカスケードをしばしば構築する。例えば、細胞が分割する過程を始めるように指示される共通の方法は、膜貫通型タンパク質受容体の細胞外ドメインへタンパク質(リガンド)が結合するということであり、そこでは細胞外ドメインへのリガンドの結合は、受容体の立体構造の変異をもたらす。リガンド誘導構造変異は、細胞外ドメイン、細胞内ドメインあるいは両方で起こりえ、タンパク質または分子が、受容体に結合できることに帰着する。この外内シグナリングは、細胞に分割するように信号するために使用される共通のメカニズムであり、プログラム化細胞死および他の多くのプロセスを開始する。

10

【0008】

成長因子受容体の活性を調節する一般に用いられている1つのメカニズムは、細胞を分割させる細胞核への信号になるシグナリングカスケードを開始するキナーゼのようなタンパク質の修飾のために、よいドッキングサイトを作り、細胞内テイル(tails)をともに次々に接近させる、該受容体の細胞外ドメインのリガンド誘導二量化である。

20

【0009】

成長因子受容体の細胞外ドメインのリガンド誘導二量化は、リガンド二量体の結合を通じてしばしば遂行される；

それは、2つのリガンドが、互いに非共有結合で結合しホモ又はヘテロ二量体を形成するように結合し、同じ(ホモ)若しくは異なる(ヘテロ)2つの受容体に結合する。

【0010】

リガンド誘導受容体二量化の重要な例はNM23二量体で、それはMUC1\*細胞外ドメイン(腫瘍と幹細胞特異的であるMUC1膜貫通型タンパク質のトランケートフォームである)に結合若しくは二量化する。リガンドが、モノマー、二量体あるいはより高いオーダーのマルチマーであるかどうかは、その他のものと一緒に、その濃度の作用である。多くの成長因子受容体については、リガンドの二量体の型だけが、成長因子受容体を活性化する。さらに、原始的な生物学的システムでは、より高いオーダーのマルチマーが、二量体によって促進される機能を切断するフィードバックループが存在する。例えば、ファージ・ラムダのCIタンパク質は、四量体としてDNAに結合している場合、遺伝子の1セットの転写を開始するが、増加した濃度の作用で、CIタンパク質が八量体になると、これら遺伝子の転写を切断する。したがって、このような機能を調節するマルチマー化調節フィードバックループが、ヒトのような、より高等な有機体に存在すれば、それを発見することは価値があり、また各マルチマーの機能についての知識に基づいた機能を操作する方法を開発することは価値がある。

30

【発明の概要】

【0011】

1つの態様では、本発明は、出発細胞からより少ない成熟の細胞を生成する方法を提供し、それは、出発細胞をより少ない成熟の状態にもどすように誘導することを含み、それは、そのマルチマー化状態が生物学的にアクティブ状態であるNMEファミリーメンバーの量を増加させること又はそのマルチマー化状態が生物学的に不活性な状態であるNMEファミリーメンバーの量を減少させることを含む。

【0012】

別の態様では、本発明は、胚性幹細胞、誘導多分化能幹細胞あるいは先祖細胞の分化を阻

40

50

害する方法を提供し、それは、そのマルチマー化状態が生物学的にアクティブ状態であるNMEファミリーメンバーの量を増加させること又はそのマルチマー化状態が生物学的に不活性な状態であるNMEファミリーメンバーの相対量を減少させることを含む。

#### 【0013】

別の態様では、本発明は、細胞における多分化能を維持又は誘導する方法を提供し、それは、そのマルチマー化状態が生物学的に不活性な状態であるNMEファミリーの相対量を減少させることを含む。

#### 【0014】

さらに別の態様では、本発明は、胚性幹細胞、誘導多分化能幹細胞あるいは先祖細胞の分化を阻害する方法を提供し、それは、そのマルチマー化状態が生物学的に不活性な状態であるNMEファミリーの相対量を減少させることを含む。 10

#### 【0015】

上記の方法のどれでも、NMEファミリーの生物学的に不活性な状態のマルチマー化状態は、ヘクサマーかより高いオーダーのマルチマーでありうる。1つの態様では、そのようなNMEファミリーが、NME1(NM23-H1)あるいはNME2(NM23-H2)でありうる。

#### 【0016】

上記の方法のどれでも、NMEファミリーの生物学的にアクティブ状態中のマルチマー化状態は、二量体あるいはモノマーであることができ、それは同じターゲット受容体に結合することができる2ユニットを含んでいる。この点では、そのようなNMEファミリーが、NME1の突然変異体かバリエントであり、それは二量化を指向するか、その同系統のリガンドへの2つの結合ドメインを保持するしており、又はNME6若しくはNME7でありうる。 20

#### 【0017】

上記の方法のどれでも、そのマルチマー化状態が生物学的に不活性な状態であるNMEファミリーの相対量は、そのマルチマー化状態が生物学的にアクティブ状態であるNMEファミリーを加えることにより減少することが可能である。そのマルチマー化状態が生物学的にアクティブ状態であるNMEファミリーが、それを発現する核酸か小さな分子の導入により増加させることができる。

#### 【0018】

また、さらに、上記の方法のどれでも、そのマルチマー化状態が生物学的に不活性な状態であるNMEファミリーの相対量は、その発現をダウンレギュレートする核酸か小さな分子の導入により減少させることができる。 30

#### 【0019】

別の態様では、上記の方法のどれでも、不活性な状態を形成する第一のNMEをダウンレギュレートする第一の核酸とアクティブ状態を形成するNMEをアップレギュレートする第二の核酸を同時に導入することにより、そのマルチマー化状態が生物学的に不活性な状態であるNMEファミリーを減少させることができ、また、そのマルチマー化状態が生物学的にアクティブ状態であるNMEファミリーを増加させることができる。

#### 【0020】

上記の方法のどれでも、ダウンレギュレートする核酸は、アンチセンスDNA、阻害RNA、si RNAあるいはshRNA及び、アップレギュレートすることが符号化されたDNA、RNA、mRNAあるいはプラスミドである核酸でありうる。このような核酸は、細胞への導入を促進するため修飾されことが可能である。この観点から、ダウンレギュレートされうるNMEファミリーが、NME1、NME2あるいはNME1およびNME2を含む。この観点から、アップレギュレートされうるNMEファミリーが、二量化を指向するNME1、NME2の突然変異体かバリエント、又はNME6あるいはNME7であることができる。 40

#### 【0021】

別の態様では、本発明は、2量体形成を指向するか、同じリガンドの2つの結合ドメインをもつNME1突然変異体あるいはバリエントの発現を誘導する核酸、及び/又は以下を対象とする；a.NME7；及び/又はb.NME7の発現を誘導する核酸；及び/又はc.NME6；及び/又はd.NME6の発現を誘導する核酸；及び/又はe.NME1あるいはNME1およびNME2をダウンレギ 50

ュレートする核酸。

【0022】

さらに別の態様では、本発明は、培地が次のものを含んでいる、幹または先祖細胞の培養のための培地を対象とする：a. 2量体形成を指向するか、同じリガンドの2つの結合ドメインを持つNME1突然変異体あるいはバリアント；及び／又はb. 2量体形成を指向するか、同じリガンドの2つの結合ドメインを持つNME1突然変異体あるいはバリアントの発現を誘導する核酸；及び／又はc.NME7；及び／又はd.NME7の発現を誘導する核酸；及び／又はe.NME6；及び／又はf.NME6の発現を誘導する核酸；及び／又はg.NME1あるいはNME1およびNME2をダウンレギュレートする核酸。

【0023】

10

また別の態様では、本発明は、多分化能を誘導するために、あるいはより少ない成熟した状態に戻るために細胞を誘導する培地を対象とし、培地は次のものを含んでいる：a. 2量体形成を指向するか、同じリガンドの2つの結合ドメインをもつNME1突然変異体あるいはバリアント；及び／又はb. 2量体形成を指向するか、同じリガンドの2つの結合ドメインがあるNME1突然変異体あるいはバリアントの発現を誘導する核酸；及び／又はc.NME7；及び／又はd.NME7の発現を誘導する核酸；及び／又はe.NME6；及び／又はf.NME6の発現を誘導する核酸；及び／又はg.NME1あるいはNME1およびNME2をダウンレギュレートする核酸を含む。

【0024】

20

培地は、さらに多分化能を誘導する遺伝子又はOct4、SOX2、NANOG、KLF4およびc-Mycを含む小分子のいくつか若しくは全てをコードする核酸を含むことができる。

【0025】

又、別の態様では、本発明は、そのマルチマー化状態が生物学的に不活性な状態であるNMEファミリーの発現の減少を誘導する合成核酸を担持する宿主細胞を対象とする。NMEファミリーが、NME1、NME2あるいはNME1およびNME2でありうる。

【0026】

又、さらに別の態様では、本発明は、そのマルチマー化状態が生物学的にアクティブ状態であるNMEファミリーの発現の増加を誘導する合成核酸を担持する宿主細胞を提供する。この点では、NMEファミリーが、2量体形成を指向する或いは同じリガンドの2つの結合ドメインがある突然変異体かバリアント、NME6あるいはNME7を含みうる。

30

【0027】

別の態様では、本発明は、そのマルチマー化状態が生物学的に不活性な状態であるNMEファミリーの発現の減少を誘導する合成核酸と、そのマルチマー化状態が生物学的にアクティブ状態であるNMEファミリーの発現の増加を誘導する合成核酸とを担持する宿主細胞を提供する。この点では、その発現が減少するNMEファミリーが、NME1またはNME1とNME2でありえる。また、その発現が増加するNMEファミリーが、2量体形成を指向するか、同じリガンドの2つの結合ドメインをもつNME1突然変異体かバリアント、および／またはNME6および／またはNME7でありえる。細胞は、さらに宿主細胞の中で発現しないか、宿主細胞の中で変異させられる遺伝子の発現を誘導する核酸を担持しえる。宿主細胞は、さらに望まれない遺伝子をダウンレギュレートし、所望か訂正された遺伝子をアップレギュレートする核酸を担持しえる。宿主細胞は、胚性幹細胞、誘導多分化能幹細胞、先祖細胞あるいは体細胞でありえる。

40

【0028】

別の態様では、本発明は、上記された細胞が、患者に投与される患者を治療する方法を対象とする。細胞は、骨髄移植、特定のサイトへの移植、輸液投与、注入あるいは局所療法によって処理されうる。

その治療は、幹細胞、先祖細胞での治療によって、或いは遺伝的異常か欠陥の修復によって、緩和されるあらゆる疾病あるいは症状向けでありえる。あるいは、細胞は、患者への投与前に分化され、およびそこでNME1、NME6あるいはNME7が、分化プロセス中、取り除かれる。

50

## 【0029】

又、別の態様では、本発明は、患者の癌を治療する方法を対象とし、患者への薬剤の投与を含み、薬剤は、そのマルチマー化状態が生物学的に不活性な状態で、NMEファミリーメンバーの量を増大させ、そのマルチマー化状態が生物学的にアクティブ状態で、NMEファミリーメンバーの相対量を減少させる。この点では、そのマルチマー化状態が生物学的にアクティブ状態であるNMEファミリーが、NME7でりえる。また、そのマルチマー化状態が生物学的に不活性な状態であるNMEファミリーが、NME1、NME2あるいはNME8でりえる。

## 【0030】

本発明は、以下に記述の詳細な説明、添付図面からより完全に理解されるがそれは本発明を限定するものではない。 10

## 【図面の簡単な説明】

## 【0031】

【図1】図1A-Fは、NM23-S120G二量体中で培養された、あるいは、MEFsもしくはヒト乳がん細胞もしくはMUC1\*ブル・ダウンアッセイにおいてNMEアイソフォームの存在で、bFGF中で培養された、ヒト幹細胞中のNME1(A、D)、NME6(B、E)あるいはNME7(C、F)の存在を検知するためにウェスタンプロット写真を示す。

【図2】図2は、NME7特異的な抗体でプローブされたヒト胚性幹細胞溶解物のウェスタンプロットの写真である。

【図3】図3は、一連の濃度で存在するNME1-S120G二量体中での培養数日後における多分化能及び未分化のままであるヒトBG01v胚性幹細胞の写真を示す。 20

【図4】図4は、一連の濃度で存在するNME1野生型ヘクサマー中の培養数日後に、分化した及びもはや多分化能でないヒトBG01v胚性幹細胞の写真を示す。

【図5】図5は、一連の濃度で存在する20%NME1-S120G二量体および80%NME1野生型ヘクサマーの混合物中での培養数日後に、分化した及びもはや多分化能でないヒトBG01v胚性幹細胞の写真を示す。

【図6】図6は、bFGFで培養された同じ材料細胞と比較しての、NME1-S120G二量体中で37継代までの間培養されたヒト胚性H9幹細胞中の多分化能、ナイーブ及びプライムド遺伝子の発現レベルの量的PCR測定グラフを示す。

【図7】図7A-Bは、NME1、NME6およびNME7に特異的siRNAが、3つのNM23アイソフォームの発現を抑制するために使われた、ヒト幹細胞の写真を表す。 30

【図8】図8A-Fは、NME1、NME6およびNME7に特異的siRNAが、3つのNM23アイソフォームの発現を、別々にあるいはコンビネーションで抑制するために、使われた、ヒト幹細胞の写真を示す。

【図9】図9A-Dは、もし細胞が、安定な2量体として精製された組み換えNME1で処置される場合、NME7の抑制によって誘導された分化は救済されることを示すヒト幹細胞の写真である。

【図10】図10A-Bは、NME1、NME6およびNME7に特異的なsiRNAが全ての3つのNM23アイソフォームの発現の抑制のために使われ、全ての3つのNM23を抑制することで導かれた細胞成長及び分化の阻害は、安定な2量体として精製された組み換えNME1で処置され救済される、ヒト幹細胞の写真である。 40

【図11】図11A-Dは、NME1(A、C)あるいはNME7(B、D)の発現がsiRNAを使用し抑制され、あるいは抑制されしかし当該抑制された細胞が安定な2量体として精製された組み換えNME1で処置される(C、D)、ヒト幹細胞の拡大写真である。

【図12】図12A-Dは、NME1(A、C)あるいはNME7(B、D)の発現がsiRNAを使用し抑制され、あるいは抑制されしかし細胞が安定な2量体として精製された組み換えNME1で救済される(C、D)、ヒト幹細胞の拡大写真である。

【図13】図13A-Dは、NME1、NME6およびNME7の発現が抑えられ(A、C)、あるいはNME1とNME7が抑えられ(B、D)、そこにおいて細胞は、安定した2量体として精製された組み換えNME1中での培養によりある程度まで救われる(C、D)、ヒト幹細胞の拡大写真である。 50

【図14】図14は、RT-PCR実験のグラフを示し、そこで、多分化能遺伝子NANOG、OCT4およびKLF4、あるいは分化マーカーFOXA2、加えて、NME1、NME6とNME7遺伝子の発現が、NME1、NME6またはNME7が抑制され或いはノックアウトされた、ヒト幹細胞で測定された；コントロールは、モックトランスクレクション及び分化した同じ幹細胞である。分化マーカーFOXA2の著しい増加は、NMEノックアウト細胞と分化コントロールで見られた。NME1の発現の著しい増加が、NME6またはNME7が抑制される場合、観察される。

【図15】図15は、RT-PCR実験のグラフを示し、そこで、多分化能遺伝子NANOG、OCT4およびKLF4、あるいは分化マーカーFOXA2、加えて、NME1、NME6とNME7の遺伝子の発現が、NME1がノックアウトされ(KO)、NME1抑制細胞の一セットが、ヒト組み換えNME1二量体形で補われた培地で培養された、ヒト幹細胞で測定された；コントロールは、分化が許容された同じ幹細胞である。分化マーカーFOXA2の著しい増加は、NME1ノックアウト細胞と分化コントロールとで見られる。

【図16】図16は、RT-PCR実験のグラフを示し、そこで、多分化能遺伝子NANOG、OCT4およびKLF4、あるいは分化マーカーFOXA2、加えて、NME1、NME6とNME7の遺伝子の発現が、NME6がノックアウトされ(KO)、NME6抑制細胞の一セットが、ヒト組み換えNME1二量体形で補われた培地で培養された、ヒト幹細胞で測定された；コントロールは、分化が許容された同じ幹細胞である。

【図17】図17は、RT-PCR実験のグラフを示し、そこで、多分化能遺伝子NANOG、OCT4およびKLF4、あるいは分化マーカーFOXA2、加えて、NME1、NME6とNME7の遺伝子の発現が、NME7がノックアウトされ(KO)、NME7抑制細胞の一セットが、ヒト組み換えNME1二量体形で補われた培地で培養された、ヒト幹細胞で測定された；コントロールは、分化が許容された同じ幹細胞である。分化マーカーFOXA2の著しい増加は、NME1の発現の著しい増加に加えてNME7抑制細胞で見られる。両方とも、抑制細胞がダイマー型NME1で補われた最少培地で培養されたときは、殆どノーマル状態にもどる。

【図18】図18は、RT-PCR実験のグラフを示し、そこで、多分化能遺伝子NANOG、OCT4およびKLF4、あるいは分化マーカーFOXA2、加えて、NME1、NME6とNME7の遺伝子の発現が、NME1、NME6とNME7が抑制され(KO)、抑制細胞の一セットが、ヒト組み換えNME1二量体形で補われた培地で培養された、ヒト幹細胞で測定された；コントロールは、分化が許容された同じ幹細胞である。分化マーカーFOXA2の著しい増加は、抑制細胞で見られ、そこで、ダイマー型のNME1で補われた最少培地で培養された抑制細胞は、ほぼ正常な遺伝子プロフィールへ戻った。

【図19】図19は、RT-PCR実験のグラフを示し、そこで、多分化能遺伝子NANOG、OCT4およびKLF4、あるいは分化マーカーFOXA2、加えて、NME1、NME6とNME7の遺伝子の発現が、NME1とNME7が抑制され(KO)、抑制細胞の一セットが、ヒト組み換えNME1二量体形で補われた培地で培養された、ヒト幹細胞で測定された；コントロールは、分化が許容された同じ幹細胞である。

【図20】図20は、ELISA分析のグラフを示し、そこで、MUC1\*細胞外ドメインの合成PSMGFRペプチドがマルチウェルプレートの表面に固定され、そして3つの異なる組み換えヒトNME6タンパク質が、該ペプチドへの結合性が分析された；1つは、変性あるいはリフォールドされた野生型ヒトNME6(NME6 WT RS)、第2は、二量化に寄与する領域が、海綿配列に交換されたヒトNME6(NME6 HuToS)、3番目は、突然変異体NME6 S139Gで、それは、二量化を指向する癌で同定されたNME1突然変異体に比較可能なポジションにある。すべては、MUC1\*の細胞外ドメインのペプチドへの結合を実証する。

【図21】図21A-Bは、ELISA分析のグラフを示し、そこで、MUC1\*細胞外ドメインの合成PSMGFRペプチドがマルチウェルプレートの表面に固定され、そして異なる組み換えヒトNME8タンパク質の、該ペプチドへの結合性が分析された；1つは、NME8ドメインAおよびBのみを含む構築物(NME8 1-2)であり、他はNME8ドメインBおよびCのみを含む構築物(NME8 2-3)である。テストされたNMEバリアントは、可溶型で発現されるか、リフォールドされていた(RS)。いくつかのケースでは、DTTが、大きなオリゴマーを分解するために添加された。全てで、MUC1\*の細胞外ドメインのペプチドへの結合を実証した。NM23 S120G二量

10

20

30

40

50

体が、NME8構成物の結合に対しての比較のために加えられた(A)。

【図22】図22A-Dは、NME1発現を抑制するsiRNAのトランスフェクション96時間後のヒト幹細胞(A,B)の拡大写真を示し、コントロール細胞では、トランスフェクション試薬が添加されたがsiRNAなし若しくはスクランブルされた配列siRNAを伴った(C,D)ケースを示す。コントロール細胞に対する、NME1抑制細胞の比較は、ほんの少しの差異を示した。幹細胞は、MUC1\*刺激成長因子として機能する二価の抗MUC1\*抗体の層上に植えつけられたことは注目される。

【図23】図23A-Dは、NME7発現を抑制するsiRNAのトランスフェクション96時間後のヒト幹細胞(A,B)の拡大写真を示し、コントロール細胞では、多分化能遺伝子OCT4が抑制された(C,D)ケースを示す。NME7抑制細胞のOCT4抑制に対する比較は、ほんの少しだけ差異がなく、両方で厳しく細胞生存率が阻害され、残った細胞は、纖維芽細胞形態を呈した。

10

【図24】図24は、NME6発現を抑制するsiRNAのトランスフェクション96時間後のヒト幹細胞(A,B)の拡大写真を示し、コントロール細胞では、トランスフェクション試薬が添加されたがsiRNAなし若しくはスクランブルされた配列siRNAを伴った(C,D)ケースを示す。NME6抑制細胞のコントロール細胞に対する比較は、ほんの小さな差異をしめしたが、NME6抑制細胞は、パネルBにおいて細胞クラスターのより明るく、厚くなる中心と見なすことができるのと同じくらい細胞を分化するエリアを持っていた。幹細胞は、MUC1\*刺激成長因子としても機能する二価の抗MUC1\*抗体の層に植えられたことは留意がいる。

【図25】図25は、RT-PCR実験のグラフを示し、そこで、多分化能遺伝子NANOG、OCT4およびKLF4、あるいは分化マーカーFOXA2、加えてNME1、NME6とNME7の遺伝子の発現が、NME1、NME6またはNME7を抑制するsiRNAのトランスフェクション96時間後ヒト幹細胞において測定された。成長因子、血清あるいはサイトカイニンを含まない最少培地は、48時間ごとに変更されたが、幹細胞は、MUC1\*刺激成長因子としても機能する二価の抗MUC1\*抗体の層に植えられたことは留意がいる。NME7の抑制は、分化マーカーFOXA2の発現の著しい増加を示す。

20

【図26】図26A-Dは、ヒトHES-3幹細胞の拡大写真を示し、細胞は、成長因子、血清あるいはサイトカイニンを含まない、そしてNME7モノマー(A,C)あるいはNME1(NM23-H1)2量体(B,D)が補充された最少培地で培養された。

【図27】図27A-Dは、ELISAサンドイッチ測定のグラフを示し、それは、NME7モノマーが、MUC1\*細胞外ドメインのPSMGFRペプチドに対する2つの結合部位を持っていることを示す。合成PSMGFRペプチドは、マルチウェルプレートの表面上で固定され、そして、組み換えヒトNME7(AとBのドメイン、そしてMリーダー配列が欠けている)タンパク質は、ペプチドへ結合性を分析され(A)、次に、ヒスチジン・タグに対する抗体を使用して検知される、ヒスチジン・タグ化PSMGFRペプチドによって結合された(B)。

30

【図28】図28は、NME1ヘクサマーの濃度の機能としてT47D乳癌細胞増殖のグラフを示す；実験は、NME1ヘクサマーが癌細胞成長を阻害することを示す。

【図29】図29A-Eは、NME1ヘクサマーでの治療に応じたDU145前立腺癌細胞の侵入割合のグラフを示し、一連の濃度上で(A)、及び細胞ミグレーション分析ウェル(B-E)の写真である。そこで、クロス(十字)は、成長するがん細胞のフィールドを横切ってエッティングされ、ギャップを横切ってミグレーションする能力が、時間の作用として測定された。写真は、時間0(B,C)、および16時間(D,E)で得られ、そこでは12 μMのNME1ヘクサマーが、細胞へ加えられ(C,E)、及びバッファーだけがコントロール細胞に加えられた(B,D)。NME1ヘクサマーは癌細胞ミグレーションを阻害した。

40

【図30】図30A-Kは、NME1ダイマーでの治療に応じたDU145前立腺癌細胞の侵入割合のグラフを示し、一連の濃度上で(A)、及び細胞ミグレーション分析ウェル(B-K)の写真である。そこで、スラッシュマークは時間0で成長がん細胞のフィールドを横切ってエッティングされ(B-F)、そして、ギャップを横切ってミグレーションする能力が、16時間で測定された(G-K)。NME12量体は癌細胞ミグレーションを阻害しなかった。1つのnME12量体が、2つのMUC1\*受容体を二量化する、最適な濃度(4-16 nM)で、NME12量体が、癌細胞成長を誘導することに留意がいる；大変高い濃度では、各々のNME12量体は、単一のMUC1\*受

50

容体に結合し、癌細胞成長およびミグレーションを阻害する。

【発明を実施するための形態】

【0032】

本願明細書の記述において、英語表記「a」と「an」は、単数と複数主題の両方に関連付けて使われる。

【0033】

本願明細書の記述において使用される、「生物学的に活性な」NMEマルチマーは、出発細胞をより少ない成熟した状態に戻すことを誘導するか、未熟な細胞の分化を阻害するか、あるいは細胞の未熟な状態を維持する、NMEマルチマーを含む。

【0034】

本願明細書の記述において使用される、「生物学的に不活性な」NMEマルチマーは、出発細胞をより少ない成熟した状態に戻すことを導かないか、未熟な細胞の分化を阻害しないか、あるいは細胞の未熟な状態を維持しない、NMEマルチマーを含んでいる。

【0035】

本願明細書の記述において使用される、「MUC1\*活性の増加」とは直接あるいは間接的にMUC1\*シグナリングを増加させることを指し、制限なしでMUC1\*受容体の二量化、及びMUC1受容体の開裂によるMUC1\*の生産の増加を含む。MUC1\*活性は、又、更なる開裂及び二量化である、MUC1受容体のより高い転写発現によって増加される。したがって、1つの発明の態様では、MUC1\*活性は、MUC1\*を二量化させるエフェクターモルクのより高い活性によって、あるいはMUC1\*が形成されるように、MUC1を開裂する開裂分子のより高い活性によって増加されることが可能である。したがって、リガンドを二量化させるMUC1\*、MUC1\*を形成するMUC1開裂酵素、あるいはMUC1の発現を増強するあらゆる転写活性化因子の活性を増加させることができるどんな化学的又は生物学的種も、「MUC1\*活性を増加させる」種として包含される。

【0036】

本願明細書の記述において使用された、「MUC1成長因子受容体」(MGFR)は機能的な定義であり、成長因子のような活性化リガンド又は開裂酵素のような修飾酵素と反応するMUC1受容体のその部分の意味である。MUC1のMGFR領域とは、以下に定義されるように、細胞表面に接近しており、PSMGFRの大部分あるいはすべてによって定義される細胞外の部分である。MGFRとは、未修飾のペプチドおよび酵素修飾をうけた例えは燐酸化、糖鎖形成などの修飾を受けたペプチドの両方を含む意味である。

【0037】

本願明細書の記述において使用されるように、「MUC1成長因子受容体の一次配列」(PSMGFR)は、ある場合において、MGFRの大部分あるいはすべてを定義するペプチド配列および該ペプチド配列の機能的なバリエント、ならびに該ペプチド配列の断片を指す。PSMGFRとは、SEQ ID NO 6として、およびその20(つまり1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19あるいは20)までのアミノ酸置換の整数値をもつ及び/又はそのN-末端および/またはC末端20個までのアミノ酸の付加又は欠失のなんらかの整数値をもつその機能的バリエント及び断片の全てを意味する。上記の「機能的バリエントあるいは断片」とは、SEQ ID NO 6のペプチドに、特異的に結合するまたは特異的に反応する能力を持っているバリエント又は断片、特異的に結合するまたは特異的に反応するリガンドを意味し、一方、該ペプチド分子は、他の同一分子との凝集(例えは自己凝集)する能力をもつような、自身に同一の他のペプチド分子の同一領域に強力に結合するものではない。SEQ ID NO 6のPSMGFRペプチドの機能的なバリエントであるPSMGFRの1つの例はSEQ ID NO 8であり、それは - SRY - の代わりに - SPY - 配列を含んでいることによってSEQ ID NO 6と異なる。

【0038】

本願明細書の記述において使用されたように、"MUC1\*"とは、細胞外のドメインがPSMGFR(SEQ ID NO: 5)で本質的に構成されるようにトランケートされた、N-末端をもつMUC1タンパク質を意味する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 9 】

本願明細書の記述において使用されたように「MUC1\*関連因子」とは、MUC1\*の活性を修飾する、活性化し、制御する、又はMUC1\*の発現を制御する物質を意味する。MUC1\*関連因子とは、制限なしで、MUC1\*受容体の二量化、MUC1\*の増加した生産、MUC1受容体の開裂誘導に影響する物質と、さらなる開裂と二量化である、MUC1受容体のより高い転写発現によるMUC1\*活性を増加させる物質を意味する。

## 【 0 0 4 0 】

本願明細書の記述において使用されるように、「有効な量」とは有益な又は所望の臨床的又は生化学的結果に有効な十分な量を意味する。有効な量は、1回以上投与することができる。この発明の目的のために、阻害剤の有効な量とは、細胞の多分化能誘導か維持するかあるいはMUC1\*を活性化するのに十分な量である。

10

## 【 0 0 4 1 】

本願明細書の記述において使用されるように、「断片」あるいは「機能的な誘導体」とは、本発明のネイティブリガンド又は受容体の生物学的に活性なアミノ酸配列バリアントと断片を意味し、共有結合性修飾と同様に、有機的な誘導物質との反応、翻訳後修飾によって得られる誘導体、非蛋白質のポリマーによる誘導体およびイムノアドヘシンをも意味する。

## 【 0 0 4 2 】

本願明細書の記述において使用されたように、「未成熟な」細胞とは、分化を少なくとももう1ステップうけることができ、分化を少なくとももう1ステップうけることができると知られている特別な細胞タイプのマーカーを発現する細胞を意味する。

20

## 【 0 0 4 3 】

本願明細書の記述において使用されるように、「出発細胞より少ない成熟状態にある細胞」とは、脱分化し、それが出発細胞とは異なる細胞に分化する増加した能力を持つか、出発細胞より多くの細胞タイプに分化する増加した能力を持っている細胞を意味する。より少ない成熟状態の細胞は、多分化能マーカーの発現の増加の測定、多分化能マーカーの発現レベルが多分化能性幹細胞のものに接近しているという決定、あるいは出発細胞よりより少ない成熟状態のマーカーの測定により同定することができる。例えば、任意の血球タイプに分化することができる造血幹細胞はCD34の発現およびCD38の欠如によって特徴づけられる。これらの細胞が分化するとともに、それらはCD34+/CD38-からCD34-/CD38+に変化する。もし、より少ない成熟状態に戻るためにCD34-/CD38+細胞を誘導すれば、細胞はCD34の発現を回復する。分化形質転換は出発細胞をより少ない成熟状態に戻ることを含み、そこでは細胞が不安定になり、たとえ、出発細胞が結果細胞として同じ相対的なレベルの分化状態にあったとしても、より分化細胞タイプに分化する方向に向く(Iedaら、2010; Efeら、2011)。例えば、心臓纖維芽細胞は、OCT4、SOX2、KLF4およびc-MYCの簡潔な異所性発現によって、より少ない成熟状態にもどり、この不安定状態から心筋細胞へ分化した。

30

## 【 0 0 4 4 】

本願明細書の記述において使用されるように、「リガンド」はポリペプチドのような分子に特異的に共有結合あるいは一時的に結合するあらゆる分子か物質、あるいは化合物を意味する。本明細書において使用された時、リガンドは抗体を含むことが可能である。他では、「リガンド」は、高い親和性で別の分子によって結び付けられる分子を意味し、MUC1\*のための自然か非自然なリガンドあるいはMUC1あるいはMUC1\*に結合する開裂酵素、あるいはMUC1\*のための二量化するリガンドに限定されない。

40

## 【 0 0 4 5 】

本願明細書の記述において使用されるように、「ナイーブ幹細胞」とは、胚盤胞の内部の細胞群と類似し定量的な特性を共有するものである。ナイーブ幹細胞は、プライム幹細胞に比べある遺伝子の発現において定量的な差異をもち、それは、胚盤胞の外胚葉部分からの細胞の特性および特徴を類似し共有する。顕著に、女性由来のナイーブ幹細胞は、XaXaと呼ばれる、2つの活性なX染色体をもつ。女性由来の後のプライム幹細胞は不活性化され

50

たX染色体の1つをもつ(Nichols and Smith,)。

【0046】

本願明細書の記述において使用されたように、「NME」ファミリータンパク質とは、10タンパク質(それらのうちのいくらかは最近発見された)のファミリーである。たとえNMEファミリーの多くがキナーゼ活性をもたなくとも、そこでは、ヌクレオシドニリン酸キナーゼ(NDPK)ドメインに共有される相同配列によってそれらに分類される。NMEタンパク質は以前にNM23-H1およびNM23-H2として、それらの発見とともに、NM23-H3、そしてNM23-10まで知られている。異なるNMEタンパク質は違った風に機能する。ここに、それらが二量体型である場合、NME1とNME6は、MUC1\*受容体(そこではその細胞外ドメインはPSMGFR配列で本質的に構成される)に結合し二量化させる; NME7にはMUC1\*受容体細胞外ドメインの2つの結合部位があり、またさらに受容体を二量化させる。NME1二量体、NME6二量体およびNM E7は、出発細胞より少ない成熟状態の細胞誘導か維持するMUC1\*リガンドとして使用のための好ましいNMEファミリーである。MUC1\*受容体に結合することができ、二量化させることができる他のNMEファミリーも、出発細胞より少ない成熟状態の細胞誘導か維持するために、MUC1\*リガンドとしての使用のために想定される。

【0047】

本願明細書の記述において使用されるように、「多分化能マーカー」とは、細胞が出発細胞より少ない成熟状態に戻る場合、その発現が増加される遺伝子およびタンパク質である。多分化能マーカーは、他の記述済みのものまた現在発見されているものと同様に、Oct4、SOX2、NANOG、KLF4、KLF2、Tra 1-60、Tra 1-81、SSEA4およびREX-1を含む。例えば、纖維芽細胞は、これらの多分化能マーカーの検知できる又は低レベルを発現しないが、CD 13と呼ばれる纖維芽細胞分化マーカーを発現する。ある細胞が出発細胞より少ない成熟状態にあるかどうか判断するために、一つは、出発細胞と結果細胞の間の多分化能マーカーの発現レベルで違いを測ることができた。

【0048】

本願明細書の記述において使用されるように、「刺激された幹細胞(primed stem cell)」とは、胚盤胞の外胚葉部分からの細胞の特性(trait)および特徴が似ており、これを共有する細胞である。

【0049】

本願明細書の記述において使用されたように、用語「特異的結合」とは、2つの分子間の非ランダムな結合反応を意味し、例えば、抗原と免疫応答する抗体分子間の、あるいはMUC1\*と特異的に結合するNM23、MUC1\*に結合する抗体、あるいはMUC1若しくはMUC1\*に結合する開裂酵素のような、別のポリペプチドと反応する非抗体リガンド間の結合を意味する。

【0050】

本願明細書の記述において使用されるように、「多分化能の」(pluripotent)幹細胞とは、身体中の任意の細胞タイプに分化するために3つの生殖細胞系列、内胚葉、外胚葉および中胚葉のすべてに分化することができる幹細胞を意味するが、完全な有機体を生じさせることはできない。全能性(totipotent)幹細胞とは、ヒトのような完全な有機体に分化するか成熟することができるものである。胚の多分化能性幹細胞に関して、それらは胚盤胞の内細胞塊に由来した細胞である。多分化能の典型的なマーカーは、Oct4、KLF4、NANOG、Tra 1-60、Tra 1-81およびSSEA4である。

【0051】

本願明細書の記述において使用されるように、「多能な」(multipotent)幹細胞とは、異なる細胞タイプの数が制限されるが、他の細胞タイプに分化することができる幹細胞を意味する。

【0052】

本願明細書の記述において使用されたように、「セミ多分化能」あるいは「プレiPS状態」とは、多分化能性幹細胞の形態の特性のうちのいくつかあるいはすべてを持っている細胞を意味し、しかし、多分化能マーカーの発現レベルあるいは3つの生殖細胞系列すべて

10

20

30

40

50

に分化する能力は、多分化能性幹細胞のそれ未満である。

〔 0 0 5 3 〕

本願明細書の記述において使用されるように、「幹様」形態とは、幹細胞に似ている形態で、多分化能遺伝子の1つ以上の発現のレベルあるいは多数の細胞タイプに分化する能力が似ていることを意味する。幹様形態とは、該細胞が丸い形態で、核のサイズと比較してやや小さく、それは、しばしば細胞質比率に対して大きな核を持ち、それは多分化能性幹細胞の特性をもつ。対照的に、纖維芽細胞形態は、細胞が長く細長い形を持ち、細胞質比率に対して大きな核を持っていないものである。さらに、多分化能性幹細胞は非付着性であり、一方、纖維芽細胞のような他の細胞タイプは付着性である。

( 0 0 5 4 )

本願明細書の記述において使用されるよう、「ベクター」「ポリヌクレオチド・ベクター」「コンストラク」「ポリヌクレオチドコンストラクト」とは、互換的に本願明細書の記述において使用される。

この発明のポリヌクレオチド・ベクターとは、制限なく、いくつかの型のうちのどれでもあてはめることが可能である。RNA、DNA、レトロウイルスのコートに包み込まれたRNA、アデノウイルスのコートに包み込まれたDNA、別のウイルスあるいはウイルス様型(単純疱疹およびアデノ関連性ウイルス(AAV)のような)で包まれたDNA、リポソームに包み込まれたDNA、ポリリシンとの複合体DNA、合成のポリカチオン性分子との複合体DNA、分子を免疫学的にマスクするため及び/または半減期の延長のためにポリエチレングリコール(PEG)のような合成物との複合体DNA、あるいは非ウイルス性蛋白質へ結合したDNAが例示される。好適には、ポリヌクレオチドはDNAである。本願明細書の記述において使用されるように、「DNA」は、塩基A、T、CおよびGだけでなく、これら塩基の類似もしくは修飾形態のものも含み、メチル化されたヌクレオチド、非荷電リンケージとチオエート(thioate)s)のようなヌクレオチド間修飾、糖類似体の使用、およびポリアミドのような修飾及び/または互換的主鎖構造が例示される。

( 0 0 5 5 )

本願明細書の記述において使用される、「マルチマー」とは、互いに共有結合でリンクされる、或いは互いに非共有結合するモノマーの複数をいう。

( 0 0 5 6 )

本願明細書の記述において使用される、「より高いオーダーのマルチマー」とは互いに共有結合でリンクされる、或いは互いに非共有結合するモノマーの複数をいい、ダイマーより大きい。

[ 0 0 5 7 ]

## リスト配列と元素リスト

[ 0 0 5 8 ]

a、g、c、t以外のヌクレオチドシンボルの使用については、WIPOの標準ST.25、付録2、表1において規定された協定に基づく：

kはt又はgを、nはa、c、t又はgを、mはa又はcを、rはa又はgを、sはc又はgを、wはa又はtを、vはc又はtを意味する

MTPGTQSPFF LLLLLTVLTV VTGSGHASST PGGEKETSAT QRSSVPSSTE KNAVSMTSSV LSSHSPGSGS STT  
QGQDVTL APATEPASGS AATWGQDVTS VPVTRPALGS TPPAHGVTS APDNKPAPGS TAPPAHGVTS APDTRP  
APGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGV  
S APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS T  
APPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APD  
TRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAH  
VTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS  
TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS AP  
DTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPA  
HGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAP  
GS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS

APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDNRPAALGS TAPPVHNVTS ASGSASGSAS TLVHNCTSAR ATTTPASKST PFSIPSHSD TPPTTLASHST KTDASSTHH S SVPPLTSSNH STSPQLSTGV SFFFSLSFHIS NLQFNSSLED PSTDYYQELQ RDISEMFLQI YKQGGFLGLS N IKFRPGSVV VQLTLAFREG TINVHDVETQ FNQYKTEAAS RYNLTISDVS VSDVPFPFSA QSGAGVPGWG IALL VLVCVL VALAIVYLIA LAVCQCRRKN YGQLDIFPAR DTYHPMSEYP TYHTHGRYVP PSSTDRSPEYE KVSAGNG GSS LSYTNPAVAA ASANL

(SEQ ID NO: 1) 全長MUC1受容体(ムチン1前駆体(Genbank登録番号): P15941)。

MTPGTQSPFFLLLLLTVLT (SEQID NO: 2) 10

MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVTA (SEQID NO: 3)

MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVTG (SEQID NO: 4)

SEQ ID NOS:2、3および4は、MUC1受容体指向性N末端MUC-1シグナリング配列。細胞膜表面にトランケートされたアイソフォーム。3つまでのアミノ酸残基が、SEQ ID NOS: 2, 3, 4のバリアントによって示されるようなC末端で欠失することが可能である。

GTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPFPFSAQSGAGVPGWG IALLVLVCVLVALAIVYLIALAVCQCRRK N(SEQ ID NO:5) 20

そのN-末端でnat-PSMGFRを持っているトランケートされたMUC1受容体アイソフォームであり、全長MUC1受容体の膜貫通性の細胞質内の配列を含む。

GTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPFPFSAQSGA(SEQ ID NO: 6)

MUC1成長因子受容体(nat-PSMGFR -「PSMGFR」の例)のネイティブ一次配列。

TINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPFPFSAQSGA(SEQ ID NO: 7)

SEQ ID NO 6のN-末端で単一のアミノ酸欠失を持つMUC1成長因子受容体(nat-PSMGFR -「PSMGFR」の例)のネイティブ一次配列。

GTINVHDVETQFNQYKTEAASPYNLTISDVSVDVPFPFSAQSGA(SEQ ID NO: 8) 30

増強された安定性を持っているMUC1成長因子受容体のネイティブ一次配列の「SPY」の機能的なバリアント(var-PSMGFR -「PSMGFR」の例)。

TINVHDVETQFNQYKTEAASPYNLTISDVSVDVPFPFSAQSGA(SEQ ID NO: 9)

SEQ ID NO8のC末端で単一のアミノ酸欠失を持ち、増強された安定を持っているMUC1成長因子受容体のネイティブ一次配列の「SPY」の機能的なバリアント(var-PSMGFR -「PSMGFR」の例)。

tgtcagtgcgcggaaagaactacgggcagctggacatcttccagccggataccatccatgagcgagttaccc  
cacctaccacacccatggcgctatgtgccccctagcagtagccatcgtagccctatgagaaggttctgcaggtaacg  
gtggcagcagcctcttacacaaacccagcagttggcagccgttctgccaacttg(SEQID NO: 10) 40

MUC1の細胞質のドメインヌクレオチド配列。

CQCRRKNYQQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSTDSPYEKVSAGNGSSLSYTNPAVAAASANL(SEQ ID NO: 11)

MUC1の細胞質のドメインアミノ酸配列について記述する。

【0059】

ヒトNM23 H1

【0060】

(DNA)

【 0 0 6 1 】

atggccaactgtgagcgtacccatgcataaaccagatgggtccagcgggtcttggagatcatcaagcg  
 ttttgcgagaaggatccgccttgggtctgaaattcatgcaagcttccgaagatctcaaggaaacactacgttg  
 acctgaaggaccgtccattttgcgcctggtaaaatcatgcactcagggccgttagttccatggcttggagggg  
 ctgaatgtggtaagacggccgagtcatgcctggagaccacccctgcagactccaagctggaccatccgtggaga  
 ctctgcatacatacgttgcaggaacattatacatggcagtgattctgtggagatgcagagaaggagatcggcttgg  
 ttccacctgaggaactggtagattacacgagctgtcagaactggatctatgaatga(SEQ ID NO: 12)

【 0 0 6 2 】

(アミノ酸)

10

【 0 0 6 3 】

MANCERTFIAIKPDGVQRGLVGEIIRFEQKGFLVGLKFMQASEDLLKEHYVDLKDRPFFAGLVKYMHGPVAMVWEG  
 LNVVKTGRVMLGETNPADSKPGTIRGDFC1QVGRNIIHGSDSVSAEKEIGLWFHPEELVDYTSCAQNW1YE - (SEQ I  
 D, NO:13)

【 0 0 6 4 】

マウスNM23 H1

【 0 0 6 5 】

(DNA)

【 0 0 6 6 】

atggccaacagtggcgccacccatgcataaggctgtatgggtccagcgggtctggggcgagatcatcaagcg  
 gttcgagcagaagggttccgccttgggtctgaagttctgcaggcttcaaggagactacactg  
 acctgaaggaccgccttactggcctggtaaaatcatgcactcaggaccagtgttgcataggcttggaggg  
 ctgaatgtggtaagacaggccgctgtatgcctggagaccaccccgagactctaagctggaccatcaggaga  
 ctctgcatacatacgttgcaggaacatcatggcagcgattctgtaaagagcgcagagaaggagatcagcttgg  
 ttccacctgaggagctggtagatcagaagactgtgcgcagaactggatctatgaatga(SEQ ID NO: 14)

20

【 0 0 6 7 】

(アミノ酸)

【 0 0 6 8 】

MANsertFIAIKPDGVQRGLVGEIIRFEQKGFLVGLKFLQASEDLLKEHYTDLKDRPFFTGLVKYMHGPVAMVWEG  
 LNVVKTGRVMLGETNPADSKPGTIRGDFC1QVGRNIIHGSDSVKSAEKEISLWFQPEELVEYKSCAQNW1YE - (SEQ I  
 D, NO:15)

30

【 0 0 6 9 】

ヒトNM23 H2

【 0 0 7 0 】

(DNA)

【 0 0 7 1 】

atggccaacctggcgccacccatgcataaggccgtgcagcggccgtggggcgagatcatcaagcg  
 ctgcgagcagaagggttccgcctgtggccatgaagttccctccggccctctgaagaacaccatgaagcagcactacattg  
 acctgaaagaccgaccatctccctggctggtaagatcatgaactcaggccgtgtggccatggcttggaggg  
 ctgaacgtggtaagacaggccgagtgatgcctggggagaccatccagcagattcaaagccaggcaccatcggtgg  
 ctctgcattcaggatggcaggaacatcatggcagtgattcagtaaaaatgcgtaaaaaaaatcaggctatgg  
 tttaaggctgaagaactgggttgactacaagtctgtgcataactgggtctatgaataa(SEQ ID NO: 16)

40

【 0 0 7 2 】

(アミノ酸)

【 0 0 7 3 】

MANLERTFIAIKPDGVQRGLVGEIIRFEQKGFLVAMKFLRASEEHLKQHYIDLKDRPFFPGLVKYMNSGPVAMVWEG  
 LNVVKTGRVMLGETNPADSKPGTIRGDFC1QVGRNIIHGSDSVKSAEKEISLWFKPEELVDYKSCAHWDVYE - (SEQ I  
 D, NO:17)

【 0 0 7 4 】

マウスNM23 H2

50

【 0 0 7 5 】

(DNA)

【 0 0 7 6 】

atggccaaacctcgagcgtacccatggccatcaagccagatggcgtgcagcgcggctgggtggcgagatcatcaaacggtcgagcagaagggttccgcctggtgccatgaagttccttcgggcctctgaagaacacctgaagcagcattacatcgacctgaaagaccgtcctttcttcccggggtggtaagttacatgaactcggggcccggtggtgccatggcttgggaggggctcaatgtggtaaaacggccagtgatgtctggggagaccaatccagctgattcaaaaccaggcaccatccgtgggatttctgcattcaagttggcaggaacatcatggcagtgattcagttggagagtgtgagaaagagatccatctgtgtttaagccgaagaactgatcgactacaagttgtgcctcatgactgggtgtacgagtag (SEQ ID NO: 18)

【 0 0 7 7 】

10

### (アミノ酸)

【 0 0 7 8 】

MANLERTFIAIKPDGVQRGLVGEIIKRFEQKGFLVAMKFLRASEEHLKQHYIDLKDRPFFPGLVKYMNNSGPVVAMWEG  
LNVVKTGRVMLGETNPADSKPGTIRGDFCIQVGRNIHGSDSVESAEKEIHLWFKPEELIDYKSCAHDWVYE - (SEQ 1  
D, NO:19)

〔 0 0 7 9 〕

## マウスNME6

00

(DNA)

【 0 0 8 1 】 20  
atgacccatcttcgaaatccccaaatcttcagctcacactagccctgatcaagctgatgcaggccaccact  
gatccctggaggctttcatcagcagatctgagcaacaatgttcatgtacgaacgaggaaactgcagtgaaagctgg  
aggactgccggagggtttaccgagagcatgaaggcggttttctatcagcgcgtggatgttcatgacaagtggccca  
atccgagcctataatccttgcacaaagaatgccatccaacttggaggacactgtatgggacccaccagagttttcgac  
acgctataatagccccagattcaattcgatggaaatgttggccctcactgacacccgaaatactacccatggctcagactccg  
tggttccgcagcagagatgtcagccctttccctgacttcagtgaacacgcgtggatgtgaggaggagaaacccag  
ctgcgggtgtgtccgtgcactacagtccagaggaaggatccactgtgcagctgaaacacaggaggccacaaacaaccta  
aaaaacccatag(SEQ ID、NO:20)

( 0 0 8 2 )

30

(二二二四)

100351

MYSTERIQLAQQEYEAETRIVDAVANIEYELAIVIQQTEENKIETVTRTREQLWKEEDCNRKTRHEKRTYTKREVEYMTSQT  
IRAYIALAHKDAIQLWRTLMGPTRVFRARYIAPDSIRGSLGLTDTRNTTHGSDSVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEPEQLRCGPVHYSPEEGIHCAAETGGHKQPNKT-(SEQ\_ID, NO:21)

【 0 0 8 4 】

ヒトNME6:

【 0 0 8 5 】

(DNA)

【 0 0 8 6 】

atgaccggcagaatctggggagtggagatggccctaatcttgcaagccctcaggcttccagctcactcttagccctgatcaa  
gcctgacgcagtcgccccatccactgattctggaggctgttcatcagcagattctaagcaacaagttccgtattgtacgaa  
tgagagaactactgtggagaaaggaagattgccagaggttttaccgagagcatgaagggcgttttctatcagaggctg  
gtggagttcatggccagcggccaatccgagcctacatccttgcccacaaggatgccatccagcttggaggacgcctat  
gggaccaccagagttccgagcagccatgtggcccagattctatccgtggagtttccgcctcactgacaccgc  
acaccaccatggttcggaactctgtggtttccgcagcagagagatgtcagccctcttccctgacttcagtgaaacagcgc  
tggatgaggaggaagagcccaagtgcgcgtggccctgtgtctatagccagagggagggttccactatgttagctgg  
aacaaqgqggctaaqgaccqaqccctga(SEQ ID、NO:22)

[ 0 0 8 7 ]

### (アミノ酸)

[ 0 0 8 8 ]

50

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRL  
VEFMASGPIRAYILAHKDAQLWRTLMGPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVSASREIAAFFPDFSEQR  
WYEEEEPQLRCGPVCYSPEGGVHYVAGTGGLGPA - (SEQ ID、NO:23)

【0089】

ヒトNME6 1:

【0090】

(DNA)

【0091】

atgaccaggaaatctggggagtgagatggcctaatttgcgaagccctcaggctccagctactctagccctgatcaa  
gcctgacgcagtgcggccatccactgattctggaggctgttcatcagcagattttaagcaacaaggttccctgatgtaccaa  
tgagagaactactgtggagaaaggaagattccagagggtttaccgagagcatgaagggcgtttttctatcagaggctg  
gtggagttcatggccagcgggcaatccgagccatccctgcccacaaggatgccatccagctctggaggacgctcat  
gggaccaccaggatgttccgagcacgcccattttcagccagcagagatattccgtggagtttcggccctcactgacacccgca  
acaccacccatgggtcgactctgtggtttccgtggccctgtgtga(SEQ ID、NO:24)

10

【0092】

(アミノ酸)

【0093】

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRL  
VEFMASGPIRAYILAHKDAQLWRTLMGPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVSASREIAAFFPDFSEQR  
WYEEEEPQLRCGPV - (SEQ ID、NO:25)

20

【0094】

ヒトNME6 2:

【0095】

(DNA)

【0096】

atgctactctagccctgatcaaggctgacgcagtgcggccatccactgattctggaggctgttcatcagcagattttaag  
caacaaggttccctgatttacgaatgagagaactactgtggagaaaggaagattccagagggtttaccgagagcatgaag  
ggcggtttttctatcagaggctggtgagttcatggccagcgggcaatccgagccatccctgcccacaaggatgcc  
atccagctctggaggacgctcatgggaccaccagagtgttccgagcacgcccattttatccgtggag  
tttcggccctactgacacccgcaacaccaccatggttccgactctgtggtttccgtggccctgtgtga(SEQ ID、NO:  
26)

30

【0097】

(アミノ酸)

【0098】

MLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRLVEFMASGPIRAYILAHKDA  
QLWRTLMGPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEPQLRCGPV - (SE  
Q ID、NO:27)

40

【0099】

ヒトNME6 3:

【0100】

(DNA)

【0101】

atgctactctagccctgatcaaggctgacgcagtgcggccatccactgattctggaggctgttcatcagcagattttaag  
caacaaggttccctgatttacgaatgagagaactactgtggagaaaggaagattccagagggtttaccgagagcatgaag  
ggcggtttttctatcagaggctggtgagttcatggccagcgggcaatccgagccatccctgcccacaaggatgcc  
atccagctctggaggacgctcatgggaccaccagagtgttccgagcacgcccattttatccgtggag  
tttcggccctactgacacccgcaacaccaccatggttccgactctgtggtttccgtggccctgtgtga(SEQ ID、NO:  
27)

50

ggaggtgtccactatgttagctggAACAGGAGGCTAGGACCGCTGA (SEQ ID、NO:28)

【0102】

(アミノ酸)

【0103】

MLTLAIKPDAVAHPLILEAVHQQLSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRLVEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTLMGPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEPQLRCGPVCYSPEGGVHYVAGTGGLGPA - (SEQ ID、NO:29)

【0104】

ヒトNM23-H7-1

【0105】

(DNA)

【0106】

atgaatcatagtgtaaagattcgtttcatgcagagtggatgtatccaaatgcgttcacttctcgacgttatgagctttatTTTACCCAGGGATGGATCTGTTGAAATGCAATGATGTTAAAGCGGACAAATATGATAACCTGCACTTGGAAAGATTATTAATAGGCAACAAAGTGAATGCTTTCTCGACAACTGGTATTAATTGACTATGGGGATCAATATACAGCTGCCAGCTGGCAGTAGGAAAGAAAAACGCTAGCCCTAATTAAACCGATGCAATATCAAAGGCTGGAGAAATAATTGAAATAATAACAAAGCTGGATTACTATAACCAAACCTCAAATGATGATGCTTCAAGGAAAGAAGCATTGGATTTCTGATGAGATCACCAGTCAGACCCCTTTCAATGAGCTGATCCAGTTTACAAACTGGTCTATTGCTATTGCTATTGAGATTTAAGAGATGATGCTATATGTGAATGGAAAAGACTGCTGGGACCTGCAAACCTCTGGAGTGGCACGACAGATGCTCTGAAAGCATTAGAGCCCTTTGAAACAGATGGCATAAGAAAATGCAAGCGCATGGCCCTGATTCTTTGCTTCTGCGGCCAGAGAAATGGAGTTGTTTCTTCAAGTGGAGTTGTGGGCCGGCAAACACTGCTAAATTACTAATTGTACCTGGTCAATTGTTAAACCCATGCTGTCAGTGAAGGACTGTTGGAAAGATCCCTGATGGCTATCCGAGATGCAAGGTTGAAATCTCAGCTATGCAAGATGTTCAATATGGATCGGGTTAATGTTGAGGAATTCTATGAAAGTTTATAAAGGAGTAGTGCACGAAATCTGACATGGTGAACAGAAATGTTCTGGCCCTTGTGAGCAATGGAGATTCAACAGAAATAATGCTACAAAGACATTTCGAGAATTGTTGGACCTGCTGATCCTGAAATTGCCCGCATTAACGCCCTGGAACCTCTCAGAGCAATTGGTAAACACTAAGATCCAGAATGCTGTTACTGATCTGCCAGAGGATGGCCTATTAGAGTTCAATACTTCTTCAAGATCTGGATAATTAG (SEQ ID NO: 30)

【0107】

(アミノ酸)

【0108】

MNHSERFVIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFIGNKVNFSRQLVLDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAIMEILRDDAICEWKRLLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN. - (SEQ ID、NO:31)

【0109】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNM23-H7-1シーケンス

【0110】

(DNA)

【0111】

atgaatcactccgaacgctttttatcgccgaatggatgaccgaaatgcctccctgctgcgcgcctacgaactgcttttatccggcgatggtagcgtggaaatgcatgacgttaaaaatcaccgtaccccttctgaaacgcacgaaatatgataatctgcatctgaaagacctgtttatggcaacaaagtcaatgtttctcgtagctgtgtatcgattatggcactacgtacccgtcaactggtagtcgcaaaagaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgtacccattatcgaaattatcaacaaagcggtttcaccatcacgaaactgaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccccgtggatTTCTGCGTGTGACGCTATCTGCGAATGGAAACGCCCTGCTGGGCCGGCAAACCTCAGGTGTTGCGCGTACCGATGGAATTCTGCGTGTGACGCTATCTGCGAATGGAAACGCCCTGCTGGGCCGGCAAACCTCAGGTGTTGCGCGTACCGATGCCAGTGAATCCATTGCGCTCTGTTGGCACCGATGGTATCCGTAATGCGACACATGGTCCGGACTCTCGCATCGCAGCTCGTGAATGGAACCTGGTAGCTGAGCCCTGCTGGTAAATTCTGATGGCAATCCGTATGCTGGCTTGA

10

20

30

40

50

aatctcgccatgcagatgtcaacatggaccgcgtaacgtcgaagaattctacgaagtttacaaaggcggttaccg  
aatatcacgatatacgaaatgtactccgtccgtcgatggaaattcagcaaaacaatgccaccaaaacg  
ttcgtgaattctgtggccggcagatccggaaatcgacgtatctgcgtccggtaccctgcgcgaattttggtaa  
aacgaaaatccagaacgcgtgcactgtaccgatctgcggaaagacggctgtctggaaatttcaataacttttcaaaattc  
tgataatttag (SEQ ID NO: 32)

【0112】

(アミノ酸)

【0113】

MNHSERFVFIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFIGNKVNFSRQLVLIDYGD  
QYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIA 10  
MEILRDDAICEWKRLGPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCT  
CCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKT  
FREFCGPADPEIARHLRPGLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN- (SEQ ID、NO:33)

【0114】

ヒトNM23-H7-2

【0115】

(DNA)

【0116】

atgcatgtatgaaagaatcatgcacccattaaagcggaccaaatacgataaccgcacttggaaagattttatagg  
caacaaagtgaatgtctttctcgacactggattaaattgactatggggatcaatatacagctcgccagctgggcagta 20  
ggaaagaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatataaggctggagaaataattgaaataataacaaagct  
ggatttactataaccaactcaaaatgatgtcttcaaggaaagaagcatggatttcatgttagatcaccagtcaag  
acccttttcaatgagctgatccagtttattacaactggccttatttgcattggagattttaagagatgatgctatatt  
gtgaatggaaaagactgctggacactgcaaactctggagtgacgcacagatgctctgaaagcattagccctttt  
ggaacagatggcataagaaatgcagcgcattggccctgattttttgcattgcggccagagaaatggattttttcc  
ttcaagtggaggttgtggccggcaaacactgctaaatttactaattgtacctgtcatgtttaaaccatgctgtca  
gtgaaggactgttggaaagatccatggctatccgagatgcagggtttgaaatctcagctatgcagatgtcaatatg  
gatcggttaatgttggaaattctatgaaatttataaaggagatgtgaccgaaataatcatgacatggtgcacagaaatgt  
ttctggcccttgttagcaatggagattcaacagaataatgctacaagacatttcgagaattttgtggacctgctgatc  
ctgaaattggccggcatttacgcccggactctcagacatcttggtaaaactaagatccagaatgtgttcaactgt  
actgatctgcagaggatggctttagaggtcaataacttcaagatcttgataattga (SEQ ID NO: 34)

【0117】

(アミノ酸)

【0118】

MHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFIGNKVNFSRQLVLIDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIIEIINKA  
GFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIA 30  
MEILRDDAICEWKRLGPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNM  
DRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGLRAIFGKTKIQNAVH  
CTDLPEDGLLEVQYFFKILDN- (SEQ ID、NO:35)

【0119】

マウスNM23-H7-1

【0120】

(DNA)

【0121】

atgagagcgttcagcagggaaagaattccagtttggtttccatataatggcacccaaagaaatcagagcgagagattcgc  
tttcattgcagactggatgtccaaatgtttcatgtccgcacgcatacgactgtgttttacccacagacggatctg  
ttgaaatgcatgtatgaaatgcgcacccattaaagcggaccaagatgtgaggacctgcgcctggaaagatctattt  
ataggcaacaaatgtgtttctcgacacgtgggtttgactatgggaccaatacacaaggcccgacgtgg  
cagcagggaaagagaaaactttagccctgatcaacaccagatgcagtgtcaaggccggagaaatcatggatgataaaca  
aaatggatttactataaccaaactccgaatgtgactctgacaaggaaagaagcagcggactttcatgttagaccatcac 50

tcaagacctttataacgaactgatccagttatcacaagtggccgttattccatggagatcttaagagatgacgc  
gatctgtgagtgaaaagggttgcttggacccgcaactctggctatcacggacagatgccccggaaagcatccgagccc  
tcttggacagatggcgtgagaaatgcagctacggccctgatactttgcattgcgtgccagagaaatggaattgttt  
ttccctcaagtggaggctgtggccagcgaacactgctaaattaccaattgcacctgtgcatttaagcctatgc  
tatcagtgaaggaatgtggaaagatttaatagctattcggatgcatttgcatttggatgtcagcatacagatgtca  
atttggatcgggctaattgttgaagaattctatgaagtctataaaggtagtgcatttgcatttggatgtcagcatacagatgtca  
ctgtgcctccggccctgcgttagcaatagagatccaacagagcaaccctacaaagacatttgcatttggatgtcagcatacagatgtca  
tgatcctgaaatcgccggcatttacgacctgagaccctcagggcaattttggtaaaactaaggttcaaaatgcatttgc  
attgcacggatctgcccggaggatggcctggaggattttcaagatcttgcatttggataattag(SEQ ID NO:  
36)

10

【0122】

(アミノ酸)

【0123】

MRACQQGRSSSLVSPYMAPKNQSERFAFIAEWYDPNASLLRYELLFYPTDGSVEMHDVKNRRTFLKRTKYEDLRLEDLF  
IGNKVNFSRQLVLIDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAVSKAGEIIEMINKSGFTITKLRMMTLTRKEADFHDHH  
SRPFYNELIQFITSGPVIAIMEILRDDAICEWKRLGPANGLSRTDAPGSIRALFGTDGVRNAAHGPDTFASAAREMELF  
FPSSGGCGPANTAKFTNCTCIIKPHASEGMLGKILIAIRDACFGMSIAQMFNLDRANVEEFYEVYKGVVSEYNDMVTE  
LCSPCVAIEIQQSNPTKTFREFCGPADPEIARHLPETLRAIFGKTKVQNAVHCTLPEDGLLEVQYFFKILDN- - (S  
EQ ID、NO:37)

20

【0124】

マウスNM23-H7-2

【0125】

(DNA)

【0126】

atgagagcctgtcagcagggagaagaattccagtttggtttctccatataatggcacccaagaatcagagcgagagattcgc  
tttcattgcagagtggatgcattccaaatgcattgcattgcgtccgacgctatgagctgtgtttacccacagacggatctg  
ttgaaatgcatgtatgtaaaaatgcgtccacccattttaagcggaccaagatgaggacctgcgccttggaaagatctattt  
ataggcaacaaatgtcaatgtgtttctcgacacgtgggtgttgcattgcattatgggaccaatacacagccgcagctgg  
cagcaggaaagagaaaactttagccctgatcaaaccagatgcattgcattgcattgcattgcattgcattgcattgcatt  
aaatggatttactataaccaaactccgaatgcattgcattgcattgcattgcattgcattgcattgcattgcattgcatt  
tcaagacctttataacgaactgatccagttatcacaagtggccgttattccatggagatcttaagagatgacgc  
gatctgtgagtgaaaagggttgcttggacccgcaactctggctatcacggacagatgccccggaaagcatccgagccc  
tcttggacagatggcgtgagaaatgcagctacggccctgatactttgcattgcgtgccagagaaatggaattgttt  
ttccctcaagtggaggctgtggccagcgaacactgctaaattaccaattgcacctgtgcatttaagcctatgc  
tatcagtgaagatttatttattcattatgtaa(SEQ ID NO: 38)

30

【0127】

(アミノ酸)

【0128】

MRACQQGRSSSLVSPYMAPKNQSERFAFIAEWYDPNASLLRYELLFYPTDGSVEMHDVKNRRTFLKRTKYEDLRLEDLF  
IGNKVNFSRQLVLIDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAVSKAGEIIEMINKSGFTITKLRMMTLTRKEADFHDHH  
SRPFYNELIQFITSGPVIAIMEILRDDAICEWKRLGPANGLSRTDAPGSIRALFGTDGVRNAAHGPDTFASAAREMELF  
FPSSGGCGPANTAKFTNCTCIIKPHASEDLFIHYM- (SEQ ID NO:39)

40

【0129】

マウスNME8バリアント1

【0130】

(DNA)

【0131】

atggcaagaaaaagcgtgaagtccagctacagtcagtcgtcaatagtcagaacttgtggatgagatgttgctgaacaa  
aggcttaacagtgattgttaccaaggcctgggtggacccctgcaaaagccgtgcaagttttatcagaaaactaaaaaa  
atgaactgaacgaagatgagattttcacttcgtcgatgtgaagctgacaacattgtgactctccagccatttagagat

50

aatgtgagcccggtttctcttagtcttaatggtaaaatcattgcaagatcagggtgcaatgtccacttatacaa  
tagaaaagtcat taccttgcatacatgaaagagaggaaattgttagcaggtaaatggatcgccctcagatgttgcata  
cactagtagatgcaatcgatgaaagaatatgggaagttacagttatgaaagtgtcgcggaaagtttacaatatggcaattatc  
aaacctgtatgtactcatgagaaaaatatagaagttagggaaaaatagccaaagaaggatttgtatagaaatata  
agaaaacctgtatctccctgaagaggtagtgaggaaattctacactcatatagcagaccgcctgactttgaagagttt  
tcgtttctatgacaaatggcctcagctgtgtctatgtatctcaagaagactccgaggatttgcaggaagaaactctc  
ccgcagactgatacagaagaacctggcgttttggaaagagcctcacgttaggtttgcacctgtgatgataaagaagaa  
acgggacagtttgcaagagtataatggaccgcacagcatatgtctgattactgcatgtcgaggacgatgcggtaaggct  
ctaagctcattgacatattatccctgatttaaaactatgaaaagcacgaatgtacaaacgacgctagcattactgcat  
ccagacatctgtgaggaagagaaagatgacgtgttgcacgttattcacaatgaagggttaccatactgtcagaggca  
aatcgattatcagaggaagaagcaagaacagtgtcaagatccatgaaaacgaagagtatttgataatcttataaggc  
acatgaccgtaatcactttatgtccctgtctacggaggaaatgggtggaatattggaaaacatttaattggc  
aaaacgattggagaagcttatgcatctcatccacagagttatgtgtacagtttgcctcaggaatttccaccacca  
gttctacgggagcagttcaaaagcagcagctgagaaggaaatagcgcatttctccctccccagagcacacttgcattga  
tcaaggccatgtgacacacacaaagaatggagatccgtgaagaccattaaagaggcaggatttgcacgtgaccctgatg  
aaggaaatgcacccgtactccagagcatgcaaaacaaattttcaaaataacaggaaaagatttataaaaatgtatt  
ggaagtcttatcttgggcatgtcgcttagtcatggtttgcaccaagtggatgttgcagaatggaggcgaatggtt  
gcccagtagacccagaagaagcaaaactgtctcccaagaatccctccgagccaaatatggacttagacatttgcata  
gctgtccatgggcgtctaacttttctgaagcatcagaaatcattagtaatgtgttgcacagaggtaatcctgagaacta  
q (SEQ ID NO: 40)

【 0 1 3 2 】

## (アミノ酸)

【 0 1 3 3 】

MASKKREVQLQSVVNSQLWDEMLLNKGLTVIDVYQAWCGPCKAVQSLFRKLKNELNEDEIHFVVAEADNIVTLPQFRDKCEPVFLFSLNGKIAKIQGANAPLNRKVITLIDEEYGEVQYESAAEVYNMIAIKPDAVLMRKNEVREKIAKEGFVIEIQENLILPEEVVREFYTHIADQPDFFEEFVVSMTNGLSCVLIVSQEDSEVIQEETLPQTDTEEEPGVLEEPHVRFAPVMIKKRDSLQEYMDRQHMSDYCDVEDDAVKVSKLDILFPDFKTMKSTNVQTTLALLHPDICEEEKDDVLNVIHNEGFTILMQRQIVLSEEEARTVCKIHENEYFDNLIGHMTSNHSYVLALRRENGVEYWKTLIGPKTIEEAYASHPQSLCVQFASGNFPNTNQFYGSSSKAAAEEKIAHFFPPQSTLALIKPHVTHKERMEILKTIKEAGFELTLMKEMHLTPEHANKIYFKITGKDFYKNVLEVLSLGMSLVMVLTKWNAVEWRRMVGPDPEEAKLLSPESLRAKYGLDILRNAVHGASNFSSEASEISNVFTEGNPEN\*(SEQ\_ID\_NO: 41)

【 0 1 3 4 】

## マウスNME8バリアント2

【 0 1 3 5 】

(DNA)

【 0 1 3 6 】

atggcaagaaaaagcgtgaagtccagctacagtcaagtcgtcaatagtcagaacttgtggatgagatgttgctgaacaa  
aggcttaacagtgattgttaccaaggctgggtggacccttgc当地  
atgaactgaacgaagatgagatcttcaactcgtcgatgactgacaacattgtgactctccagccatttagagat  
aatgtgagcccggtttctcttagtcttaatggtaaaatcattgcaagatcagggtgcaatgctccacttatcaa  
tagaaaagtcat taccttgc当地  
cactagtagatgcaatcgatgaaagatatgggaaagtacagttatgaaagtgc当地  
aaacctgatgctgactcatgagaaaaatatagaagttagggaaaaatagccaaagaaggatgttatagaaaataca  
agaaaacctgatctccctgaagaggtagtgaggaaatctacactcatatagcagaccgc当地  
ccgcagactgatacagaagaaccggc当地  
acgggacagtttgc当地  
ctaagctcattgacatattatccctgatttaaaactatgaaaagcacgaatgtacaaacgacgctactgc当地  
ccagacatctgtgaggaagagaaagatgacgtgtgaacgttattcacaatgagggttcaccatactgatgc当地  
aatcgatattatcaqagqaaqaqaaqcaagaacagtgqcaagatccatgaaaacqaaagatatttqataatcttataggc

acatgaccagtaatcactttatgtcctgctacggagggaaaatggtgatggaaatattggaaaacataattggcca  
 aaaacgattgaggaagcttatgcattcatccacagagttatgttacagtttgcctcaggaaatttccctaccaacca  
 gttctacggagcagttcaaaagcagcagctgagaaggaaatagcgcatttctccctcccagagcacacttgcattga  
 tcaaggcctatgttacacacaaaagaatttacagaagctcaaggaggtatga(SEQ ID NO: 42)

【 0 1 3 7 】

(アミノ酸)

【 0 1 3 8 】

MASKKREVQLQSVVNSQNLWDEMLLNKGLTVIDVYQAWCGPCKAVQLFRKLKNELEDEILHFVVAEADNIVTLQFRD  
 KCEPVFLFSLNGKIIAKIQGANAPLIRKVTILIDEERKIVAGEMDRPQYVEIPLVDAIDEYGEVQYESAAEVYNMIAI  
 KPDAVLMLRKNIERKVEIAKEGFVIEIQENLILPEEVVREFYTHIADQPDFEEFVVSMTNGLSCVLIVSQEDSEVQEETL  
 PQTDTEEEPGVLEEPHVRFAPVMIKKKRDSLQEYMDRQHMSDYCDVEDDAVKVSKLIDILFPDFKTMKSTNVQTTLALLH  
 PDICEEEKDDVLNVIHNEGFTLMQRQIVLSEEEARTVCKIHENEYFDNLIGHMTSNHSYVLAIRRENGVEYWKTLIGP  
 KTIEEAYASHPQSLCVQFASGNFPTNQFYGSSSKAAEKEIAHFFPPQSTLALIKPHVTHKERIHRSSRR\*\*(SEQ ID  
 NO:43)

10

【 0 1 3 9 】

ヒトNME8

【 0 1 4 0 】

(DNA)

【 0 1 4 1 】

atggcaagaaaaacgagaagtccagttacagacagttcatcaataatcaaaggctgtggatgagatttgcagaacaa  
 aggcttaacagtgttaccacgcctgggtggaccttgcagagcaatgcacccattttagaaaatttggaaa  
 atgaactgaacgaagacaaattctgcatttgcgtcgcagaagctgacaacattgtacttgcagccatttagagat  
 aaatgtgaacctgtttcttttagttatggcaaaattatcgaaaagattcagggtgcaatgcaccgcttgttaa  
 taaaaaaagtattatattgtatcgatgaggagagaaaaattgcagcagggtgaaatggctcgaccctcagatcctgaaattc  
 catttagtagactcagattcagaatttgcgttgcagaatttgcattttatcattttatcattttatcattttatc  
 aaaccggatgtgttgcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatc  
 gcataagacagtgcactgaagaacaattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatc  
 tctctttatgacaaggcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatc  
 gaaccacagactgacaccgaacctaacgaacgatctgaggatcaacccgtgaggctgaaagccaggttacaccctgaaatgat  
 gaagaacaaacaagacattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatc  
 ctaatgttgcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatc  
 ttacttcgaccaaattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatc  
 gcaaagacaagatgttattatcggaaaaagaagcacaaggcactgtgcaaggaatttgcattttatcattttatcattttatc  
 ttatagaaaaacatgaccagtggccatctcttagccattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatc  
 ctgggaccaagaactgttgcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatc  
 ggttcaaccaggatgttgcaggcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatc  
 taggcttgcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatc  
 acacagggttgcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatc  
 agatttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatc  
 ttgaaaaacatgttgcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatcattttatc  
 aaactaa(SEQ ID NO: 44)

20

【 0 1 4 2 】

(アミノ酸)

【 0 1 4 3 】

MASKKREVQLQTVINNQSLWDEMQLNKGLTVIDVYQAWCGPCRAMQPLFRKLKNELEDEILHFVVAEADNIVTLQFRD  
 KCEPVFLFSVNGKIIEKIQGANAPLVNKKVNLIDEERKIAAGEMARPQYPEIPLVDSDSEVSEESPCEVQELYSIAI  
 KPDAVISKKVLEIKRKITKAGFIIEAEHKTVLTEEQVVFYRADIQRDFEEFVSMFTGSLSYILVVSQGSKHNPPEET  
 EPQTDTEPNERSEDQPEVEAQVTGMMKQKDSLQEYLERQHQLCDIEEDAANVAKFMDAFFPDFKKMKSMLKTLA  
 LLRPNLFHERKDDVLRIKDEDFKILEQRQVVLSEKEAQALKEYENEDYFNKLIEENMTSGPSLALVLLRDNGLQYWKQL  
 50

LGPRTEEAIEYFPESLCAQFAMDSLPVNQLYGSDSLETAEREIQHFFPLQSTLGLIKPHATSEQREQILKIVKEAGFDL  
TQVKKMFLTPEQTEKIYPKVTGKDFYKDLLEMLSVGPSMVI LTWKNAVAEWRRLMGPTDPEEAKLLSPDSIRAQFGISK  
LKNIVHGASNAYEAKEVNRLFEDPEEN\* (SEQ ID NO: 45)

【0144】

最適化されたNME8大腸菌

【0145】

(DNA)

【0146】

atgctggtaataaaaaagtcatcaacctgatcgacgaagaacgcggaaatcgccgtggtaatggcacgcccgaata  
cccgaaatcccgctgggtatagcgactctgaagttcagaagaatcgccgtgcgaatcagtcgaggactgtattcga  
tcgcaattatcaaaccggatgctgtcattccaaaaagtgctggaaatcaaacgtaaaatcaccaagcgggtttcatt  
atcgaaagccgaacataaaaccgtgtgacggagaacacagggtggtaattttattcagttatcgccgtacgcgcactt  
tgaagaatttgcgttatgaccagcggccgtcttacattctggcgtgagtcagggttccaaacacaatccgcca  
gccaagaaacggaccgcagaccgatcggaacacgcgttctgaagagaccgcggaaatggaaagcacaatgg  
ccggcatgtgaaaaataaacaggatagtctgaagaataccgtggtaatccgcgtacgcgcacttgcgttatcga  
agaagacgcggccaacgtggcggaaattcatggatgcctttccggacttcaagaaaatgaaaactgaaa  
aaaccctggccctgctgcgtccgaacctgttccacgaacgtaaagatgacgttctgcgcattcatcaaagatgaagactt  
aaaatccctggaaacagcggcaagttgcctgtcggaaaagaaggcacaggctgtgcaaaagaatacgaaaacgaagatta  
cttcaacaaactgtgaaaacatgacccgtggccgtcgctggcacttgcgtgataatggcctgcagtt  
ggaaaacaactgtgggtccgcacggcgtcagaagacccatgtaaacttccggaaaggcctgtgcacagttgcatt  
gattctctgcccgtgaaaccactgtatggcagtgactccctggaaaccgcggaaacgtgaaatccgcatttccgc  
gcaaaatgtaccctgggtctgattaaaccgcacgcgtccgaacagcgcgaacaaattctgaaatcgtcaagaagcc  
gcttcgatctgacccaggtaagaaaaatgttctgacccggaaacaaacggaaaaatctatccgaaatcgtcaagg  
gatattctacaaagacctgtggaaatgctgagttggccgtccatg, gtcattgttgcacaaatggaaatgcgg  
gcagaatggcgtccgtatgggtccgcggatccggaaagcggaaactgtctgagccggacttattcgcgtcagtt  
tggcatcagcaactgaaaacattgttcatggtgcgtccatgcgtatgaagcggaaatgttgcacccgttt  
aagacccggaaagaaaataa(SEQ ID NO: 46)

10

【0147】

(アミノ酸)

【0148】

30

MLVNKKVNLIDEERKIAAGEMARPQYPEIPLVDSDFSEVSEESP CESVQELYSIAIKPDAVISKKVLEIKRKITKAGFI  
IEAEHKTVLTEEQVVFYSRADIQRDFEEFVFSMTSGLSYILVVSQGSKHNPPSEETEPQTDTEPNERSEDQPEVEAQVT  
PGMMKNQKDSLQEYLERQHQLAQLCDIEEDAANVAKFMDAFFPDFKKMKSMLKETLALLRPNLFHERKDDVLRIIKDEF  
KILEQRQVVLSEKEAQALCKEYENEDYFNKLIEENMTSGPSLALVLLRDNGLQYWKQLLGPTVEEAIEYFPESLCAQFAM  
DSLPVNQLYGSDSLETAEREIQHFFPLQSTLGLIKPHATSEQREQILKIVKEAGFDLTQVKKMFLTPEQTEKIYPKVTGK  
DFYKDLLEMLSVGPSMVI LTWKNAVAEWRRLMGPTDPEEAKLLSPDSIRAQFGISKLKNIVHGASNAYEAKEVNRLFE  
DPEEN\* (SEQ ID NO: 47)

【0149】

最適化されたNME8 1-2大腸菌

【0150】

40

(DNA)

【0151】

atgctggtaataaaaaagtcatcaacctgatcgacgaagaacgcggaaatcgccgtggtaatggcacgcccgaata  
cccgaaatcccgctgggtatagcgactctgaagttcagaagaatcgccgtgcgaatcagtcgaggactgtattcga  
tcgcaattatcaaaccggatgctgtcattccaaaaagtgctggaaatcaaacgtaaaatcaccaagcgggtttcatt  
atcgaaagccgaacataaaaccgtgtgacggagaacacagggtggtaattttattcagttatcgccgtacgcgcactt  
tgaagaatttgcgttatgaccagcggccgtcttacattctggcgtgagtcagggttccaaacacaatccgcca  
gccaagaaacggaccgcagaccgatcggaacccgaaacgcgttctgaagagaccgcggaaatggaaagcacaatgg  
ccggcatgtgaaaaataaacaggatagtctgaagaataccgtggtaatccgcgtacgcgcacttgcgttatcga  
agaagacgcggccaacgtggcggaaattcatggatgcctttccggacttcaagaaaatgaaaactgaaaactggaaa  
50

aaaccctggccctgctgcgtccgaacctgttccacgaacgtaaagatgacgttctgcgcacatcatcaaagatgaagacttc  
aaaatccctggaaacagcgccaagttgcctgtctgaaaaagaaggcacaggctctgtgcaaaagaatacgaaaacgaagatta  
cttcaacaaactgatcgaaaacatgacctcaggccgtcgctggcactggttctgctgcgtgataatggccctgcagtt  
ggaaaacaactgctgggtccgcacggcgtcaagaaggcattgaatacttcccgaaaggcctgtgtgcacagtttgcatt  
gattctctgcccgtgaaccaactgtatggcagtgactccctggaaaccgcggaaacgtgaaatccagcatttcttcga  
gcaccaccaccaccactga (SEQ ID NO: 48)

【0152】

(アミノ酸)

【0153】

MLVNKKV1NL1DEERK1AAGEMARPQYPE1PLVDSDEVSEESP CESVQELYSI A11K PDAV1SKKVLE1KRK1TKAGFI 10  
1EAEHKTVL1EEQVVFY1ADQRDFEEFV1SFMTSGLSY1LVV1SQGSKHNPPSEETEPQTDTEPNERSEDQPEVEAQVT  
PGMMKNKQDSLQEY1LERQH1LAQLCD1EEDAANVAKFMDAFFPDFKKMKS1KLEKL1ALLRPNLFHERKDDVLR11KDEF  
K1LEQRQVVL1SEKEAQALC1KEYENEDYFNKL1ENMTSGPSL1ALVLLRDNG1QYWKQ1LLG1PRTVEEA1EYFPESLCAQFAM  
D1SLPVNQLYGSDS1LETAERE1QHFFLEHHHHHH\* (SEQ ID、NO:49)

【0154】

最適化されたNME8 2-3Eの大腸菌

【0155】

(DNA)

【0156】

atgctggaaaaaccctggccctgctgcgtccgaacctgttccacgaacgtaaagatgacgttctgcgcacatcatcaaaga 20  
tgaagacttcaaaatccctggaaacagcgccaagttgcctgtctgaaaaagaaggcacaggctctgtgcaaaagaatacgaaa  
acgaagattacttcaacaaactgatcgaaaacatgacctcaggccgtcgctggcactggttctgctgcgtgataatggc  
ctgcagtttggaaacaactgctgggtccgcacggcgtcaagaaggcattgaatacttcccgaaaggcctgtgtgcaca  
gtttgtatggattctctgcccgtgaaccaactgtatggcagtgactccctggaaaccgcggaaacgtgaaatccagcatt  
tcttccgctgcaaaagtaccctgggtctgatataaccgcacgcgacgtccgaacagcgcgaacaaattctgaaaatcgtc  
aaagaagccggcttcgatctgacccaggtgaagaaaatgttctgaccccgaaacaaacggaaaaatctatccgaaagt  
cacgggcaaaagatttctacaaagacactgctggaaatgctgagttgtgtccgtccatggcatgattctgacccaaatgg  
atgcggttgcagaatggcgtccctgatgggtccgcacggatccggaaaggcaaaactgctgagccggactctattcgc  
gctcagtttggcatcagcaaactgaaaaacattgttcatggcgtccatgcgtatgaagcgaagaagttgtgaaccg  
cctgtttgaagacccggaaagaaaatctcgagcaccaccaccaccactga (SEQ ID NO: 50) 30

【0157】

(アミノ酸)

【0158】

MLEKTL1LLRPNLFHERKDDVLR11KDEFK11EQRQVVL1SEKEAQALC1KEYENEDYFNKL1ENMTSGPSL1ALVLLRDNG  
LQYWKQ1LLG1PRTVEEA1EYFPESLCAQFAMDS1LPVNQLYGSDS1LETAERE1QHFFPLQSTLGL1KPHATSEQREQ11LK1V  
KEAGFDLTQVKKMFLTPEQTEK1YPKVTGKDFYKDLLEMLSVGPMVM1LTKWNAVAEWRRLMGPTDPEAKLLSPDS1R  
AQFG1SKLKN1VHGASNAYEAKEVNRLFEDPEENLEHHHHHH\* (SEQ ID、NO:51)

【0159】

NMEファミリータンパク質の構造および機能

【0160】

本発明者は、MUC1分解産物(MUC1\*)の成長因子受容体機能が、その細胞外ドメインのリガンド誘導二量化によって活性化されること、及び、MUC1\*のリガンドがNM23(Mahanta、2008年ら)だったことを以前に見出した。本発明者は、さらに、それは、MUC1\*(図21および27)のPSMGFR部分に結合し、分化を阻害し、幹細胞及び先祖細胞性の成長をサポートする(Hikitaら、2008年； Smaggheら、2013年)、NM23-H1のダイマー型であることを実証した。反対に、ヘクサマーとしてのNM23-H1は、多分化能を促進しないし維持しない；むしろ、それは分化を誘導する。典型的な実験は、図3-5に示される。二量体の型と異なり、NM23-H1ヘクサマーは、MUC1の細胞外ドメインのPSMGFR部分に結合しない。したがって、NME1ヘクサマーは、分化誘導という生物学的機能をもつけれど、ここでは簡略化のために、「生物学的に不活性な」マルチマーとしてNME1をリファーする、というのも、それは出発細胞 40

をより少ない成熟した状態に戻すように誘導せず、未熟な細胞の分化を阻害せず、あるいは細胞の未熟な状態を維持しないNMEマルチマーであるからである。同様に、ここに、我々は、「生物学的に活性な」NMEマルチマーとして、NME1二量体をリファーし、それは、出発細胞をより少ない成熟した状態に戻すように誘導する、未熟な細胞の分化を阻害する、或いは、細胞の未熟な状態を維持する、NMEマルチマーである。

#### 【0161】

さらに、本発明者は、NME1(NM23-H1)二量体のように、NME7(NM23-H7)モノマー(ラコンブ、2000年ら)はまた、MUC1\*の細胞外ドメインに結合し二量化すること、幹あるいは幹様細胞において多分化能を促進するか維持するのに単独で十分であることを見出した(図26および図27を参照)。さらに、本発明者は、NME1二量体あるいはNME7モノマーが、多分化能を誘導するかより少ない成熟した状態に戻るように細胞を誘導することを見出した。10

#### 【0162】

我々は、いくつかのNM23ファミリーが、他のものあるいは同じNMEタンパク質の他のマルチマー化状態が、分化を促進するか、誘導する間、多分化能を促進するか誘導する、幹関連機能をもつことを見出した。

NME1(NM23-H1)は、幹細胞成長を促進し、二量体のみである場合、分化を阻害する。NME6は、略NME1と同じ分子量で、海綿(*Suberites domuncula*)では、二量体としてそれが存在することが報告される(Perina et al, 2011, "Characterization of Nme6-like gene/protein from marine sponge *Suberites domuncula*" Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 384:451-460)。我々は、NME6を発現し、ELISA分析で、NME6は、MUC1\*細胞外ドメインに由来したPSMGFRペプチドに結合することを示した(図20)。この結合実験では、ヒトNME6野生体タンパク質は、あるバリエント(S139G)(NME1をダイマー形成指向にするS120G変異体に類似の変異体(チャン、1986年ら))及び別のバリエント(NME1をダイマー形成指向にする同じ領域が、報告によれば海綿中のNME6は二量体として存在するので、海綿中の該配列をマッチさせるように変異された(S139A、V142D、V143A))と共にテストされた。20

#### 【0163】

NME7(NM23-H7)は、モノマーのタンパク質だが、本発明者は、それが二量体のように機能することを見出した。それは、2つのNDPKの触媒ドメインを含んでおり、およそNME1またはNME6のモノマーの2倍の分子量であり、ヒト胚幹(ES)によって発現・分泌され、癌細胞と同様に、多分化能幹(iPS)細胞を誘導した(図1,2及び27)。NME8は、MUC1の細胞外ドメインにある結合親和性を持つ別のNMEファミリーである。NME8(ミランダ - Vizuete、2003年ら)は、3つのドメインがある: A、BおよびC。NME8が、単にドメインAおよびBとして発現される場合、それはモノマーであり、その一方でCをもつBはオリゴマーを形成する。NME8は、幹様の成長をターンオフするためにMUC1に結合し、それを再集合化する。30

#### 【0164】

ELISA実験が、行なわれ、そこで、NME8、ドメインAおよびB("1"および"2"図21)あるいはドメインBおよびC("2"および"3"図21のうちの「3」)の、MUC1\*細胞外ドメイン由来のPSMGFRペプチドへの結合能に関してテストされ、そして、NME1二量体(図21AのNM23 S120G)の結合性と比較した。図で見ることができるように、ある結合は観察されるが、それがダイマー型である場合の、NME1の結合性からははるかに少なかった。図21Bで見ることができるように、最大結合は、NME8がオリゴマーであるときに見られ、それは、NME1ヘクサマーのように、NME8マルチマーあるいはオリゴマーは、MUC1の細胞外ドメインへの結合によって、及び、生物学的に活性なNMEマルチマーの結合部位を塞ぐために受容体を再群化することによって分化を導くことを示す。40

#### 【0165】

NMEファミリータンパク質は、細胞および組織成長の異なる時に差別的に発現される。我々は胚性幹細胞にNME6、NME7およびNME1を検知するのに対し、NME1およびNME2だけが、成人細胞あるいは成人幹細胞に通常的に発現される。NME1が、幹細胞分化を阻害するのではなく、むしろ誘導するヘクサマーを形成するので、それは、NME7が、それらが分化誘導へ50

クサマーを形成することができないことから、胚形成において、およびナイープ状態の幹細胞において、初期に発現されるということをもたらす。胚形成の最も初期の段階では、分化の成長および抑制は、幹細胞のある密度に達し、分化の開始を欲するときの後期段階において重要である、ヘクサマーの制御機能と共に、デフォルトになるだろう。私たちの知見を支持して、ボイアーラ(Boyer et al、2005年、"Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells", Cell, Vol. 122, 947-956)は、多分化能誘導タンパク質、SOX2とNANOGは、NME7のプロモーターに結合する、しかし、他のNMEファミリーでは無い。このことは、それが発現された最初のNMEタンパク質であり、それが多分化能を誘導する或いは維持するが、それを遮断するヘクサマーを形成できないという考え方と一致するということを示している。ボイアーラは、さらに、多分化能誘導タンパク質、SOX2とOCT4は、MUC1\*への開裂をもたらすNME7の標的レセプター、MUC1のプロモーターに結合することを報告した。SOX2とOCT4は、さらに、MUC1開裂酵素MMP-16のプロモーターに結合する。これら多分化能誘導タンパク質が、MUC1のプロモーター、その開裂酵素およびそのリガンド(NME7)に重複して結合するという事実は、タンパク質のこのサブセットが多分化能に重要で、NME7が、成長胚で発現された多分化能タンパク質の1番目である、ということを立証している。2量体形成を指向するNM23バリエントにおいて培養される場合、NME7は、ヒト幹細胞によって高度に発現される。

#### 【 0 1 6 6 】

実施例1は、BG01vヒト胚性幹細胞が、抗MUC1\*单クローン抗体MN-C3のコーティング上に、NM23-S120G(主として二量体として存在するためにリーフォールドされ精製されている)において成長する、あるいはマウス纖維芽細胞フィーダー細胞上のbFGF中で培養されるという実験を記述する。得られた細胞のウェスタンプロットは、NM23-S120G二量体中で培養された、幹細胞中でNME7が、高度に発現される(図1、Part I.C - レーン1-)が、bFGF中で培養された幹細胞においてはほんの弱い発現(レーン2)をすることを示す。我々は、NM23二量体中で培養された幹細胞が、ナイープ状態に戻すということを示した(Smaghhe、2013年ら)。それは市販の幹細胞ラインのすべてがそうであるように、bFGF中で培養されたヒト幹細胞のプライムド状態より少い成熟した状態である。プライムド状態幹細胞よりナイープ状態幹細胞中で、より多くのNME7が発現されるという事実は、NME7が、胚形成の大変早いステージで優先的に発現され、胚或いは胎児成長において遅くにはないということと一致する。

#### 【 0 1 6 7 】

成人の組織の分析は、NME7が、成人組織で、全く存在しないか、かろうじて検知できることを示した。実施例4は、ヒト胚性幹細胞が、MUC1\*抗体表面上のNM23-S120G二量体、あるいはマウス纖維芽細胞フィーダー細胞の表面上のbFGFにおいて培養され、次に、ナイープ遺伝子の発現レベル対プライムド遺伝子の発現レベルを測定するためにRT-PCRによって分析された実験について記述する。図6は、NM23二量体中で培養された幹細胞が、より高いレベルのナイープ遺伝子およびより低いレベルの分化されたプライムド遺伝子を発現することを示す。これらの結果は図1Cで示される知見と一致している。レーン1と2の比較は、NME7が、人体における如何なる細胞タイプに分化できる所望のナイープ幹細胞でかなりの程度で発現されることを示す。したがって、例えばNME7の発現をおこすことができる核酸の導入によって、細胞でのNME7の発現を増加させるストラテジー、又は、NME7タンパク質、又は2量体形成を指向するNME1突然変異体若しくはバリエントを加える方法は、多分化能を維持する、胚若しくは誘導多分化能幹細胞においてナイープ幹細胞状態を維持し、及び/または、体細胞、皮膚芽細胞(dermablasts)および纖維芽細胞を含む、より成熟した細胞タイプにおいて多分化能を誘導するというストラテジーである。これらのストラテジーは、NME7かNME1二量体形成か二量体ミミックバリエントに加えて、多分化能遺伝子OCT4、Sox2、Nanog、Klf4あるいはc-mycの1つ以上の異所的発現を含みうる。これらの実験は、NME7がよりナイープ幹細胞中で発現されるNM23の初期の型であるとの結論を下した。

#### 【 0 1 6 8 】

10

20

30

40

50

我々は、ダイマー型のNME23が、幹細胞を、しばしばナイーブ状態と呼ばれる、より多分化能状態に戻るように、誘導することを既に示した。私たちの実験および他の人のものは、bFGF中での幹細胞の培養かマウス纖維芽細胞フィーダー細胞(MEF)層上での幹細胞の培養が、「プライムド」状態と呼ばれる少ない多分化能状態に、幹細胞を誘導するか維持することを示した。図1(C)を参照して、これらプライムド幹細胞は、より少ないNME7を発現し、NME7が、よりナイーブ、そして真に多分化能幹細胞状態に関係するという考え方一致している。ナイーブ状態のヒト幹細胞は、機能的な成人の細胞に分化することができると予測されるので、ナイーブ幹細胞は、治療での使用と同様に研究用として好適な細胞である。したがって、NME7の発現を誘導することを含んでいるストラテジーは、治療の用途のために細胞を得ることが好適である。反対に、癌のNME7の発現を減少させるストラテジーは、抗癌治療になるだろう。 10

#### 【0169】

NME7は、単一のタンパク質として存在するが、2つのモノマーで構造上構成され、したがって、二量体として機能する。NME7は、2つのNDPKドメインを含み、それらの部分は、MUC1\*成長因子受容体に結合する。実施例1は、さらに、プル・ダウン分析と呼ばれる結合実験について記述する。この実験では、MUC1\*細胞外ドメインペプチドが、BG01vのヒト胚性幹細胞からの溶解物でインキュベートされたベッドに付着される。洗浄ステップおよびベッドからのリリースの後、MUC1\*ペプチドとの相互作用によって捕らえられた種は、SDS-PAGEゲル上で分離され、そして、抗NME7抗体でプローブされた。図1(F)-レーン1は、NME7が、MUC1\*細胞外ドメインに結合することを示す。NME7の2のNDPKドメインの部分は、MUC1\*成長因子受容体に結合し、そして、それを二量化させ、多分化能を維持し、多分化能を誘導し、幹と先祖細胞の分化を阻害するパスウェイを活性化する。 20

#### 【0170】

NME6は、二量体として存在し、高いオーダーのマルチマーの形成に抵抗する。NME6二量体は、MUC1\*成長因子受容体に結合し、それを二量化させ、それは多分化能を維持し、多分化能を誘導し、そして幹と先祖細胞の分化を阻害するパスウェイを活性化する。2量体形成を指向するNME1突然変異体およびバリエントのように、NME6とNME7の両方が、多分化能を維持し誘導し、iPS細胞を含む幹と先祖細胞の分化を阻害することができる。 30

#### 【0171】

2量体形成を指向するNME1突然変異体およびバリエントのように、NME6とNME7は、成長を誘導するか、未分化の状態でそれらを維持するか、あるいはそれらの分化を阻害するように、幹細胞(胚、あるいは誘導多分化能)あるいは先祖細胞に、外生的に、加えることができる。NME6とNME7は、多分化能を誘導するために幹または先祖細胞へ外生的に加えることができる。さらに、2量体形成を指向するNME1突然変異体かバリエント、NME6および/またはNME7、又は二量体として作用する単一鎖を含むそのバリエントをコードする核酸は、より分化されなかった状態に戻るかあるいはより少ない成熟した状態で細胞を維持するように細胞を誘導するように、細胞へ導入することができる。 30

#### 【0172】

NME1とNME2の野生体タンパク質は、四量体、ヘクサマーおよびより高いオーダーのマルチマーを形成する。我々は、NME二量体だけが、分化を阻害する間に、幹および先祖細胞の増殖をサポートするために、MUC1\*成長因子受容体のPSMGFR部分に結合することを発見出した。さらに、我々は、NME二量体あるいはNME7モノマーが、細胞を、例えば、体細胞、皮膚芽細胞(dermablasts)、纖維芽細胞およびその他を含む、より成熟した細胞に対して、多分化能を誘導するために、より少ない成熟状態に戻らせることを見出した。さらに、我々は、主としてヘクサマーおよびより高いオーダーのマルチマーとして存在する、NME1野生体タンパク質が、MUC1\*成長因子受容体のPSMGFR部分に結合せず、幹と先祖細胞の分化を引き起すを見出した[Smaggheら、2013年]。NME1は、二量体、四量体およびヘクサマーを含むマルチマーを形成する。我々は、NME1のダイマー型が、未分化の状態で幹細胞を維持し、さらにより成熟した細胞の多分化能を誘導することを示した。しかしながら、幹細胞密度の増加に従い、幹細胞から分泌されたNME1の量は、局所濃度の増加を誘導 40

し、それは、多分化能をサポートせず、実際、異なる細胞表面レセプターに結合し、および活性的に分化を誘導することを指向する。したがって、それは、有害なヘクサマーの蓄積を回避するように、NME1アイソフォームを抑制するため、多分化能の維持か誘導には有利である。対照的に、NME7は、NME1二量体として機能するように見える。したがって、多分化能の維持か誘導のために、NME7の発現を増加させること、あるいは、外生的に加えることは有利である。多分化能のメンテナンスか誘導のために、さらに好適な方法は、NME1を抑え、NME7の発現を増加させるか、NME1を抑え、NME7またはNME1の二量体の相対的濃度を増加させることである。これらの実験は、さらに故意に分化を誘導する方法が、NME1ヘクサマーを加えるか、NME1の抑制を中止することであることを示す。したがって、幹若しくは先祖細胞が分化せずに自己複製を持つことを指向するとき、生体において或は生体外において、幹または先祖細胞の野生体NME1の発現をダウンレギュレートすることは、大きな利点になるだろう。NME2は、また、ヘクサマーおよびより高いオーダーのマルチマーを形成するので、さらに、多分化能の維持又は誘導の間、及び分化の抑制が望まれる場合、NME1ダウンレギュレーションに加えて、NME2をダウンレギュレートすることは望ましい。別の実施態様では、NME1又はNME1とNME2は、NME1S120GあるいはP96SあるいはNME6若しくはNME7における同様の変異のような、2量体形成を指向するNME1突然変異体およびバリエントが、外生的に加えられるか、それらをコードする核酸が細胞中で発現させる間、ダウンレギュレートされる。

#### 【0173】

好ましい態様では、より高いオーダーのマルチマー(二量体より大きな)を形成することができるNMEファミリーが、抑制される。もっと好ましい態様では、NME1の発現は、多分化能状態の細胞を促進するか維持するかあるいはより少ない成熟した状態に戻るために細胞を誘導するために抑制される。特別な種の抑制は、当業者に知られる多くの方法によって実行することができる。ターゲット種は、タンパク質レベルか核酸レベル：DNAまたはRNAで抑制することができる。発現されるタンパク質は、タンパク質の活性か結合部位を抑制するか阻止する抗体あるいは小さな分子の使用によって抑制されることができる。あるいは、タンパク質の発現は、RNAi、shRNAあるいはsiRNAのような、アンチセンス核酸、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、阻害RNAの使用により阻害することができる。小さな分子もまた、標的タンパク質の発現をブロックするか阻害するために使用されてもよい。

#### 【0174】

ターゲットとされた遺伝子の発現あるいは抑制を誘導するために、細胞へ、核酸を導入する技術は公知のいくつかの技術がある。例えば、細胞は、所望或いは非所望の遺伝子をコードするシーケンスを含んでいるベクターでトランスフェクトするか形質導入することができる。ベクターは自然界における、ウィルス、DNAあるいはRNAでありえる。他の方法は、興味のある遺伝子をコードするmRNAを細胞に導入することを含んでいる。抑制のためにターゲットとされた遺伝子は、shRNAかsiRNA、アンチセンス核酸などを使用してダウンレギュレートすることができる。遺伝子をコードする核酸のエントリーを促進するいくつかの方法は、コード化核酸がリポソーム中に包埋されるために、界面活性剤の使用を含んでいる。又、他の方法は、O-メチル化あるいはコレステロールのようなモエティーで遺伝子をコード化する核酸を修飾することを含んでおり、それは、細胞への核酸のエントリーを促進する(米国特許出願No.US2010/0173359、2008年7月11日にファイルされた、それらの内容は、モエティーのその開示のために参照によってここに組込まれる)。これらの後の方法は、界面活性剤ほど過酷な処理ではなく、その結果、細胞に、ターゲットとされた遺伝子を、連続的に発現させるか抑制するために、繰り返し使用することができる。例えば、Accell(商標)siRNAは、トランスフェクション試薬(Dharmacon社Layfayette(コロラド))なしで、細胞による取り込み、安定性、ターゲット特異性のために特に修飾される。Accell(商標)システムは、多分化能を阻害するNME1あるいはNME1およびNME2のような遺伝子をダウンレギュレートするために使用することができる。Accell(商標)システムの修正は、幹若しくは先祖細胞増殖又は多分化能の誘導のために、有益な遺伝子のシーケンスを

10

20

30

40

50

担持する核酸を修飾するためにを使用することができる。遺伝子のアップレギュレーションあるいはダウンレギュレーション用の多くの技術が当業者に知られており、分化を誘導するヘクサマーのような、より高いオーダーのマルチマーを形成することができるNMEファミリータンパク質をダウンレギュレートするために使用することができる。例えば、多分化能あるいはより少ない成熟した状態への復帰を促進するために、NME1および/またはNME2は、2量体形成を指向するNME1突然変異体及びバリアント、NME6及び/又はNME7、二量体として作用する単一鎖バリアントを含むそれらのバリアントのように、多分化能を維持するか誘導する遺伝子のアップレギュレーションで、あるいはアップレギュレーションなしで抑制される。

## 【0175】

10

NME1またはNME2のダウンレギュレートか、2量体形成を指向するNME1突然変異体とバリアント、NME6および/またはNME7、或は二量体として作用する単一鎖バリアントを含むそれらのバリアントをアップレギュレートするかどうか、2量体形成を指向するNME1突然変異体とバリアント、NME6および/またはNME7、或は二量体として作用する単一鎖バリアントを含むそれらのバリアントの外生的な蛋白質形態を添加するかどうかにおいて、これらのタンパク質及び核酸は、徐放性形態で調製され、或はオーバータイムで細胞に移送するためにカプセル化されうる。上記の方法を使用し、細胞培養(特に幹か先祖細胞培養)は、大幅に縮小された時間および労働で非常に単純化することができる。分化を誘導するNME1および(または)NME2の発現が抑制される場合、1つ必要なことは、多分化能幹か先祖細胞増殖を促進し、分化を阻害し、或はより成熟した細胞を多分化能に誘導するために、外生的な、2量体形成を指向するNME1突然変異体とバリアント、NME6および/またはNME7を添加、無添加で十分な緩衝液を加えることである。好ましい態様では、NME1および/またはNME2は抑制され、一方、NME7は、多分化能を促進するか、維持するか、誘導するかあるいはより少ない成熟した状態に戻るために細胞を誘導するために、アップレギュレートされるか、外生的に加えられる。

## 【0176】

20

NME7の抑制は、幹様の成長を非常に阻害する。ヒト幹細胞中のNME7のsiRNA抑制は、成長の大きな抑制、および残った細胞の分化の誘導をもたらした。成長の定量化が観察され、写真でしめされた。幹様の形態から纖維芽細胞状の形態への変更と同様に細胞増殖の抑制の量は、多分化能遺伝子OCT4が抑制された細胞のそれに似ていた。さらに、RT-PCRは、NME7の抑制が、FoxA2(それは分化状態のマーカーである)の発現の著しい増加をもたらすことを示した。これらの実験では、成長因子は加えられず、また、細胞は24時間ごとに、トランスフェクション薬剤の添加後の96時間まで、特徴づけられた。典型的なイメージは、図23および図25で見ることができる。

## 【0177】

30

反対に、NME1の抑制は、幹様の成長あるいは形態に、効果がほとんどなかった。RT-PCRは、分化マーカー、FoxA2の発現の著しい増加を示さなかった。細胞増殖の量および幹様の形態の持続性は、トランスフェクション試薬が加えられたが、搔き混ぜられたsiRNAがNME1をターゲットとするsiRNAに置き換えられた負のコントロール実験のそれと一致していた。典型的なイメージは図22および図25で見ることができる。NME6の抑制は、観察された分化のいくつかのエリアと共に、適度に、幹様の成長に対する副作用を持っていた。分化のエリアは、非常に厚く見える厚く白くなったエリアとして、あるいは、互いの上に積まれた厚い細胞の暗いエリアとしてみられた。典型的なイメージは図24および図25で見ることができる。

## 【0178】

40

これらの結果は、NME1が、ある増加した濃度でNME1が形成するヘクサマーの負の効果を除去するために、抑制されうることを示す。実際、NME1が抑制される場合、典型的にはsiRNAノックダウン実験で50-75%縮小まで減少するが、NME1の局所濃度を減少し、かくしてヘクサマー形成の可能性を減少させるようである。もし、NME1が抑制されるが、NME7、あるいはNME6およびNME7がノックダウンされない場合、幹細胞成長は進み、さらに増強される

50

。そこでは、付加的な組み換え成長因子を加える必要はない。実際、NME1の一時停止は、多分化能を促進し、多分化能成長を遮断することができ、分化を誘導することできるヘクサマーを形成しないNME7の濃度の増加を誘導する。

【0179】

したがって好ましい態様において、NME7ではなく、NME1が、多分化能幹細胞中で抑制される。それはそれらの成長を可能にし、組み換えNMEの添加を含む外生的に加えられた成長因子の添加のなしで分化を阻害する。ダイマー型のNME7あるいはNME1は、外生的に加えられるが、しかしながら、細胞数を増加させる。

【0180】

NME1のノックダウンは、培地へ加えられる成長因子なしで、96時間後にさえ、効果がほとんどなかった。幹細胞が、ダイマー型のbFGFあるいはNME1のような幹細胞成長因子を欠く、最少培地において培養された場合、幹細胞は、48時間までに急速に分化するということはよく知られている。NME1だけがノックダウンされた時、NME1二量体として機能したと推定される、多分化能を促進することができる、NME6とNME7を残しており、これはおこらなかつた(図11, 22, 25参照)。

10

【0181】

NMEファミリー、アイソフォームあるいはバリアントの発現は、誘導性の発現システムを経て可能のように、トランジェント、安定化又は制御することができ、その結果、NMEファミリーあるいはバリアントの発現は、トランジェントであり、調節可能な方法で、開始又は遮断される。生物学的に活性的なNMEファミリーかバリアント、特にNME6あるいはNME7アイソフォームかバリアントの持続的発現は、分化を阻害する間、多分化能を維持するか誘導するか、自己再生を促進する。反対に、生物学的に活性的なNMEファミリーあるいはバリアント、特にNME6あるいはNME7アイソフォームかバリアントの一時的な(トランジェントな)発現は、ある限定された期間の分化を阻害している間、多分化能を維持し或いは誘導し、その後、細胞は分化する。あるいは、NME1野生体の発現は、生物学的に不活性なNME1ヘクサマー型が生産されるので、細胞に分化を開始させるために活性化されうる。同様に、NME6および/またはNME7の発現は、分化を誘導することを抑制することができる。NMEタンパク質の発現もしくは抑制は、発現プラスミド、細胞或いは核への導入を促進するためにコレステロールのようなモエティーで誘導化されうる、発現あるいは抑制のためのリニアな核酸(例えばsiRNA)を含む、当業者に知られていたいくつかの技術を使用して行なうことができる。

20

【0182】

本願発明のNMEファミリー、アイソフォームあるいはバリアントが外生的に加えられるか、NMEファミリーあるいはバリアントの発現が誘導される、細胞は、以下を含み、それに限定されない; 体細胞、皮膚芽細胞、纖維芽細胞、幹細胞、多分化能幹細胞、骨髄細胞、抹消採決血液細胞、造血幹細胞、先祖細胞、患者細胞、遺伝子欠損か変更を担持する細胞あるいは近隣の細胞に分泌されたNMEファミリーあるいはバリアントを供給するのが目的のフィーダー細胞が例示される。本願発明のNMEファミリー、アイソフォームあるいはバリアントが外生的に加えられるか、NMEファミリーあるいはバリアントの発現が誘導される、細胞は、患者細胞でありうる。患者細胞は、より少ない成熟した状態へ細胞をもどらせ、欠陥遺伝子を修飾するか交換し、かつ訂正された遺伝子担持細胞の自己複製を誘導することが望まれる、遺伝子欠損か変更を担持するものでありえる。患者細胞は、その患者又は幹または先祖細胞での治療を必要とする別の患者の処理のために、本願発明のNMEファミリーあるいはバリアントを使い、多分化能になるように誘導されうる。NMEファミリーあるいはバリアントは、外生的に加えるか、任意の望ましい細胞タイプに分化するように指向できる、iPS細胞の生成のために、患者細胞によって発現されうるべく作った。その後、そのような細胞は、治療目的のために、患者あるいは別の患者に投与されうる。

30

【0183】

NMEファミリータンパク質と癌の治療

【0184】

40

50

NME7は、幹細胞と同様に癌細胞によっても分泌される。いくつかの癌細胞は、優先的に二量体を形成し、ヘクサマーの形成を阻害する突然変異体NME1を発現し、これらの場合、癌細胞が、ヘクサマーを形成しない、二量体のNME1成長因子によって幹様の成長を示し、そして、結果として、分化を誘導しないことを意味する。他の癌では、NME7の幹様の成長因子機能は、ヘクサマーの分化誘導効果を克服することができる。したがって、癌の治療法として、NME7は抑制される。二者択一で、容易にヘクサマーを形成する、NME1あるいはNME2は、癌の治療法として過剰発現される。本発明の1つの態様では、NME7は抑制され、また、NME1および/またはNME2は、幹様の成長を阻害するために、影響を受けた細胞へ外生的に導入されるか、過剰発現される。一般的に、ヘクサマー型のような、分化誘導マルチマー化状態に抵抗するなんらかのNMEファミリーが、癌を治療するために抑制される。NME1またはNME2の高濃度のような、分化を誘導するNMEファミリーが、幹様の成長によって特徴づけられる、癌あるいは他の病弊を治療するために、導入されるか過剰発現される。本発明は、インビトロ、エクソビオ、インビオで、これらの方法を実行することを包含する。本発明は、例えば癌の治療法として幹様の成長を阻害するために、或いは、例えば傷のサイトで幹様の成長を誘導するために、患者において、NMEファミリーの発現を抑制するか誘導する薬剤を投与することを包含する。

【0185】

我々は、2量体型のNME1は、多分化能因子として、及び、最小無血清培地に加えられたとき、幹細胞及び癌細胞両方の成長を刺激する成長因子として機能することを示した。ここで、我々は、ヘクサマー型のNME1で癌細胞を処理することが、癌細胞成長およびミグレーションを阻害し、NME1二量体での治療は効果がなかった、と報告する。典型的な実験は、図28-30に示される。

【0186】

異なるNMEマルチマーは、異なるサイトでMUC1に結合しうる。異なる開裂酵素は、分化誘導マルチマー用の結合部位が存在しないように、MUC1を、開裂する。例えば、癌細胞、あるいは幹様の成長を示す他の細胞において、MUC1を開裂する酵素は、幹細胞中の開裂酵素とは異なるかもしれないし、幹様の成長を遮断するマルチマーの結合部位より下流でMUC1を開裂しうる。そのような場合、プライムド幹細胞には存在しない、MUC1開裂酵素を抑制することは有利であろう。癌を治療するために、プライムド幹細胞に存在する開裂酵素の癌細胞中の発現を誘導することは有利でありえる。

【0187】

したがって、そのマルチマー化状態が生物学的にアクティブ状態であるNMEファミリーの量を増加させるかそのマルチマー化状態が生物学的に不活性な状態であるNMEファミリーの相対量を減少させることは、出発細胞からより少ない成熟した細胞を生成する方法、あるいは多分化能状態でありえる幹様の状態で細胞を維持するための方法である。同様に、そのマルチマー化状態が生物学的にアクティブ状態であるNMEファミリーの量を増加させるかそのマルチマー化状態が生物学的に不活性な状態であるNMEファミリーの相対量を減少させることは、胚性幹細胞、誘導多分化能幹細胞あるいは先祖細胞の分化を阻害する方法である。

【0188】

反対に、癌の治療のために、そのマルチマー化状態が生物学的にアクティブ状態であるNMEファミリーの量を増加させる薬剤かそのマルチマー化状態が生物学的に不活性な状態であるNMEファミリーの相対量を減少させる薬剤は、患者に投与される。

【0189】

そのマルチマー化状態が生物学的にアクティブ状態であるNMEファミリーの発現を誘導する核酸、あるいはそのマルチマー化状態が生物学的に不活性な状態であるNMEファミリーの発現を抑制する核酸は、より少ない成熟しているか、幹様の状態かに、誘導を促進するため、或いはそれに維持するために、宿主細胞に導入することができる。宿主細胞は、宿主細胞の中で発現しないか、宿主細胞の中で変異させられる遺伝子の発現を誘導する核酸を担持しうる。欠陥遺伝子の場合には、望まれない遺伝子をダウンレギュレートし、所望

10

20

30

40

50

か訂正された遺伝子をアップレギュレートする核酸も、宿主細胞に導入することができる。宿主細胞の起源は、ドナーまたは患者でありえ、皮膚、歯、骨髄、血液、胎盤、羊水、胚盤胞、胎児などに由来することができ、及び幹細胞、iPS細胞、先祖細胞あるいは体細胞でありえる。本発明の方法で使用される宿主細胞は、患者に投与することができる。患者への細胞の投与方法は、骨髄移植、特定のサイトへの移植、輸液投与、注入あるいは局所療法を含む。これらの方法は、疾病か症状が、幹細胞、先祖細胞、あるいは遺伝的異常か欠陥の修飾での治療によって、緩和されうる、あらゆる条件あるいは疾病を治療するために使用することができる。本発明の方法で処理された細胞も、患者に投与する前に、先祖または体細胞に分化することができる。分化が望まれる時には、そのマルチマー化状態が生物学的にアクティブ状態であるNMEファミリーが、分化を許容するために撤退する。

10

#### 【0190】

NMEがすべての種の中に高度に保存されるので、ここに記述された方法は、ヒトNME種に制限する意図はなく、また、ヒト細胞での使用に制限されていない。

#### 【0191】

本発明は、ここに記述された特定の具体化によって、その範囲が制限されるものではない。確かに、ここに記述されたものに加えての発明の様々な修飾は、上記記述とそれに伴う図からの当業者に自明である。

そのような修正は、本願発明請求項の範囲内にあることが意図される。以下の実施例は、制限的記載ではなく、本発明の実例を示すものである

#### 【実施例】

20

#### 【0192】

##### 実施例 1

ヒト幹細胞が、NME1(H1)およびNME2(H2)に加えてNME6またはNME7を発現するかどうか判断するために、我々は、様々なヒト幹細胞ラインからの溶解物および上澄みについてのウェスタンプロット分析を行った。ヒト胚性幹細胞ラインBG01v細胞が、a)抗MUC1\*単クローナル抗体MN-C3で覆われた細胞培養プレート上ののみで、ダイマー型のNM23-S120Gで、あるいはb)マウス・フィーダー細胞(MEF)上の4ナノグラム/mLのbFGFで、培養された。培養3日後に、幹細胞は回収され溶解され、次に、NME1、NME6およびNME7の存在を検査のために抗体を使用し、ウェスタンプロットによって分析した。比較のために、同じ分析を、T47D MUC1\*陽性の乳癌細胞について、平行に行った。コントロールとして、組み換えNM23-H1野生体(NM23-wt)タンパク質が、ゲルに充填され、3つの異なるNMEを認識する抗体で検査した。NM23-S120G二量体および野生体ヘクサマーの明白な分子量が両方ともモノマーの重量であるかに見えるように、ゲルが変性ゲルであることに注意！

30

ゲルを検査するために使用される抗体は次のものに対するものである：

NME1: NM23-H1(C-20)；

NME6: NM23-H6(L-17)および

NME7: nm23-H7(B9)

(すべてサンタクルーズ・バイオテクノロジー社から購入された)。

#### 【0193】

40

図1は、6つのウェスタンプロット・ゲルの写真を示す。部分I.A-Cは、細胞溶解物がゲル電気泳動によって分離され、次にA) NME1、B)NME6およびC)NME7への抗体で検査したウェスタンプロットを示す。

各パネルで、レーン1は、抗MUC1\*単クローナル抗体MN-C3で覆われた細胞培養プレート上でNM23-S120G(ダイマー型)中で培養されたBG01v幹細胞に相当する；レーン2はMEFでのbFGF中で培養されたBG01v幹細胞に相当する；レーン3はT47D乳癌細胞に相当する；レーン4は精製された組み換えNM23-H1野生体(NM23-wt)に相当する。

#### 【0194】

50

図1(A)は、抗MUC1\*抗体表面上のダイマー型のNM23中で培養された(レーン1)か、マウス・フィーダー細胞(MEFs)表面上のbFGF中で培養された(レーン2)かにかかわらず、NME1が、BG01vのヒト胚性幹細胞中に存在することを示す。さらに、NME1はヒト乳癌細胞中に存在す

る(レーン3)。また、ポジティブコントロール(レーン4)は、使用された抗体が、実際に、NME1精製タンパク質を認識することを示す。

【0195】

図1(B)は、NME6が、これらの抗体を使用して、テストされたサンプルのうちのどれにも存在しないことを示す。

【0196】

図1(C)は、NME7は、細胞が抗MUC1\*表面でNM23(二量体)において培養されるときヒト幹細胞の中で強く発現される(レーン1)が、MEFフィーダー細胞上bFGF中で培養された幹細胞中には弱くしか発現されないこと(レーン2)を示す。NME7も、ヒト乳癌細胞で強く発現される(レーン3)が、H1アイソフォームに特異的な(尊による)C-20抗体によっては認識されない。

10

【0197】

図1(D-F)は、どのNMEが、MUC1\*細胞外ドメインペプチドに結合するかを決めるための、プル・ダウントラクション分析のウェスタンプロット写真を示す。ヒスチジンタグ化MUC1\*細胞外ドメインペプチド(GT1INVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVSPFPFSAQSGA-HHHHH)が、NTA-Niアガロースベッドに付着され、次に、図1のパート1におけるのと、同じ細胞溶解物でインキュベートした。4で1時間のインキュベーションの後、ベッドは15000RPMで5分間遠心分離機にかけられた。上澄みは廃棄し、また、非特異性の結合により結合された種を除去するために、ベッドはPBSで洗われた。イミダゾールが、ベッドから複合体を遊離させるために添加された。遠心分離の後、上澄みは、ゲル電気泳動によって分離され、図1パート1に示すように、NME1(D)、NME6(E)およびNME7(F)に対する抗体で、分析をした。図1(D)は、発明者が以前に示したように、幹細胞中のNME1が、NM23(二量体)(レーン1)あるいはbFGF(レーン2)中で培養されたとしても、MUC1\*細胞外ドメインペプチドに結合することを示す。

20

レーン3は、乳癌細胞溶解物中のNME1もまた、MUC1\*細胞外ドメインペプチドに結合することを示し、レーン4は、C-20 NME1特異抗体が、精製組み換え野生体NME1に結合することを示す。図1(E)を参照すると、このゲルは、図1のパート1でこれら細胞溶解物に存在しないとしめされた、NME6もまた、MUC1\*ペプチドによってプルダウントラクションされないことを示す。重要なことには、図1(F)は、NME7が、MUC1\*細胞外ドメインペプチドに結合することを示す。NM23二量体中で、およびMUC1\*抗体表面で、培養された幹細胞からのNME7は、MEF上でbFGF中で培養された幹細胞より、より大量のNME7を発現した。図1のパート1と一致し、NME7はMUC1\*ペプチドに結合すると示され、そして、その相互作用によって分析においてプルダウントラクションした(レーン1)。しかしながら、NME7は、レーン2に現われず、それは恐らくbFGF中で培養された細胞の減少された発現による。レーン3は、乳癌細胞中で発現されたNME7が、MUC1\*に結合することを示し、およびレーン4は、NME7抗体がNME1アイソタイプを認識しないので何らタンパク質はないことを示す。NME7は、細胞においてMUC1\*受容体を二量化させるために、恐らく2つのMUC1\*ペプチドに結合し、それにより、多分化能、分化の成長および抑制を刺激する。

30

【0198】

実施例2

ヒト幹細胞ラインBG01vおよびHES-3細胞のウェスタンプロット分析は、NME7に特異的な(尊による)NME抗体は、NME7および22-25kDaの明白な分子量をもつ別の種を認識することをしめす(図2)。

40

【0199】

実施例3

本発明者は、ダイマー型、あるいは細胞上でMUC1\*受容体を二量化させた型である、NM23が、多分化能幹細胞成長を促進し、分化を阻害し、そして、体細胞を含む、より成熟した細胞の、多分化能を誘導したことを以前に示した。結合実験は、ダイマー型NM23は、細胞上のMUC1\*受容体、およびフリーMUC1\*細胞外ドメインペプチドに結合することを示した。しかしながら、野生体タンパク質のヘクサマー型あるいはS120G突然変異体のヘクサマー型を使用する実験は、幹細胞を分化させた。細胞の局在性実験は、ヘクサマーが細胞へ結

50

合でき、それが分化を誘導する要素に推測上結合する、核に転位置することを示した。したがって、ヘクサマー及びより高いオーダーのマルチマーを形成する他のNMEファミリーと同様に、低濃度でヘクサマーを形成するNME1(NM23-H1)の発現が、体細胞のようなより成熟した細胞の多分化能を誘導しているインビトロでの幹細胞培養の過程に有害であり、幹細胞集合体を再構成するかあるいは内生の幹細胞集合体をこえる拡張が所望される、幹または先祖細胞を患者に植え付ける過程には有害であることは明らかである。

#### 【0200】

NME1野生体の有害な影響を示すために、我々は、以下のいずれかで、ヒト幹細胞(BG01vs)を培養した；すべてNME1-S120G二量体で(図3)、すべて、ヘクサマーNME-wtで(図4)、あるいは、NME1-S120G二量体が20%であり、NME-wtが80%および総NME濃度が8nM 104nMである2つの混合物(図5)か選んだ。図3-5は、植え付け4日目の結果の幹細胞の写真である。暗く、厚くなった細胞のエリアは、細胞質比率に対し大きな核を備えた明瞭で小さな細胞の単一の層である多分化能幹細胞とは対照的に、幹細胞が分化したことを示す。イメージは、NM23二量体(NME1-S120G二量体)が、多分化能幹細胞成長を全面的に支援し(図3)、その一方でヘクサマー型が細胞を分化させている(図4)ことを明白に示す。図5は、ヘクサマーである、かなりの量のNME1野生体の存在が、二量体の存在にもかかわらず、幹細胞を分化させることを示す。したがって、ヒト幹細胞において内生の、それらによって分泌された野生体NME1は、幹と先祖細胞の成長およびメンテナンスを阻害し、体細胞のようなより成熟した細胞の多分化能の誘導を阻害する。

#### 【0201】

##### 実施例4

bFGF中で培養された細胞と比較する、NM23二量体中で培養されたヒト幹細胞のためのプライムドマーカーに対してのナイーブのRT-PCR。

ヒト胚のH9幹細胞は、抗MUC1\*単クローニング抗体MN-C3で覆われたプラスチックウェア上に植えつけられ、そして、37回継代で、よりダイマー集合体のみに精製されたNM23-S120G中で培養された。成長している細胞のサンプルは、継代8、12、14、21、26および37で回収された。比較のために、同じスタート貯蔵からの細胞が、マウス・フィーダー細胞(MEF)の層上でbFGFにおいて培養された。細胞は標準の量的PCR技術を使用して分析した。OCT4およびNANOG(多分化能遺伝子)、KLF4、およびKLF2(ナイーブ遺伝子)およびLHX2、OTX2、XISTおよびFOXA2(プライムド遺伝子)の発現レベルは、GAPDHに比較して測定され、MEF上のbFGF中で培養された細胞においてそれらの発現を標準化した。図6で見ることができるよう、NM23二量体(NME1-S120G二量体)で培養された幹細胞は、ナイーブ遺伝子のより高いレベル及びプライムド遺伝子のより低いレベルを発現し、それは、該細胞が、bFGF中の幹細胞培養より原始的で、ナイーブ状態であることを示している。図1、パートI.Cに示される実施例1の結果とともに、NME7はプライムド状態ではなくナイーブ状態の特性であり、また、多分化能幹細胞成長をよりサポートできる。これらのデータは、細胞の多分化能のメンテナンスのためのその発現についての、分化の抑制あるいは細胞の多分化能の誘導を導く核酸、及び外生のNME7を加える論理的根拠を提供する。NME7のそのような導入には、分化誘導NME1の抑制を伴う場合がある。

#### 【0202】

##### 実施例5

##### NMEファミリーの抑制

#### 【0203】

いくつかのNMEの有害な影響、および多分化能のメンテナンスか誘導における他のNMEの有益な効果を実証するために、我々は、多分化能幹細胞中のNME1、NME6およびNME7の1つ以上をノックダウンするために、siRNAが使用されたノックダウン実験を行った。siRNAが、市販で入手可能な確立しているESおよびiPS細胞に加えられた。細胞は、血清なしの最小幹細胞成長培地において培養され、また、フィーダー細胞とマトリゲル中に存在する任意の成長因子の導入を回避するために、幹細胞表面レセプタ(MUC1\*)に対する抗体の層上に、多分化能幹細胞は、植えつけられた。

10

20

30

40

50

**【 0 2 0 4 】**

NME1、NME6およびNME7は、いくらかが分化を促進し、他のものはそれを阻害することの考慮なしに、NM23sをノックダウンする効果を評価するために、ともに全てノックダウンした。図7Aで見ることができるように、NME1、NME6およびNME7の発現を抑制することは、貧弱な細胞増殖に帰着し、細胞増殖の厚くなったエリアによって確認できるように分化を誘導し、そこで、細胞は、より小さな核を持っており、纖維芽細胞状の形態を呈する。アイソフォームは有害で、それは多分化能のメンテナンスによいということは考慮せず、NM23をノックダウンすることは、48時間以内に分化を誘導する。対照実験では、等しい量の挿き混ぜられたsiRNAが加えられ、分化の誘導は観察されない(図7B)。

**【 0 2 0 5 】**

単一ノックダウン実験では、NME1の抑制は、効果がほとんどあるいはまったくなかった。また、最初の48時間以内に有意の分化はなかった(図8A)。NME6だけの抑制は、適度の効果があるが、48時間で、NME1ノックダウンと有意に異なっているように見えなかった(図8B)。ありのままの比較で、NME7のダウンレギュレーションは、幹細胞成長に劇的な負の効果を持ち、分化を誘導する(図8C)。トリプルおよびダブルノックダウン実験(図8D-F)で、NME1とNME7両方の抑制は、分化を誘導しそして細胞成長を抑制する(図8F)、しかし、NME1だけが抑制される図8Aに対して比較すると、結果は、NME1とNME7の間の相乗効果ではなく、加えられたsiRNA量の2倍添加によることを示唆する。

**【 0 2 0 6 】**

組み換えNME1二量体の添加が、NME7の抑制によって誘導された分化を救うかどうかを判断するために検討した。NME1あるいはNME7(9A、B)の、いずれかに特異的なsiRNAが、上述されるような培養において、多分化能幹細胞に加えられた。同一のウェルで、siRNAが加えられ、さらに、組み換えNME1二量体が加えられた。図9Dで見ることができるように、組み換えNME1二量体の添加は、NME7が抑制される場合に生じる分化を妨げた。組み換えNME1二量体の添加は、NME1が抑制されている多分化能細胞の成長を増加させるが、いずれの場合も有意な分化はなかった。

**【 0 2 0 7 】**

3つのNM23アイソフォームすべてのノックダウン(図10A)によって誘導された分化と細胞増殖の阻害は、安定した二量体として精製された組み換えNME1の添加によって、部分的に、救済される(図10B)。

**【 0 2 0 8 】**

NME1、NME6およびNME7に特異的なsiRNAは、サンタクルーズ研究所、サンタクルーズ(CA)から購入した。使用された方法は、StemgentTM siRNAトランスフェクション・キットを利用した。その方法は、siRNAミセルを形成するために脂質を使用し、それは細胞膜に浸透し、次に、それをダウンレギュレートするためにターゲットとされたRNAに作用する。

**【 0 2 0 9 】**

ネガティブコントロールとして、挿き混ぜられたシーケンスsiRNAが使用され、また、試薬が加えられたが、siRNAは加えられない、模擬のトランスフェクションがなされた。ポジティブコントロールとして、OCT4siRNAが加えられた。同じ細胞の多数のノックダウンの影響を評価するため、挿き混ぜたsiRNAが、単一のノックダウンの濃度の3倍で加えられた。OCT4は、多分化能遺伝子で、したがって、その発現を抑制することは、幹細胞分化に帰着する。

**【 0 2 1 0 】****実施例 6**

実施例5の実験が、96時間まで継続した。細胞形態学の評価は、付加的警告をもつが、48時間観察をおこなった。96時間後、NMEバリアントノックダウン実験を、他のNMEアイソフォームにおける、1つのNMEアイソフォームを抑制する効果を分析のためと同様に、多分化能遺伝子の発現を分析するためにおこなった。各実験条件からの細胞は、別々にペレット化され、RT-PCRによって分析した。分化遺伝子Foxa2に加えて、多分化能遺伝子Nanog、OCT4およびKlf4及びNMEアイソフォームNME1、NME6およびNME7の発現レベルが測定された。

10

20

30

40

50

発現レベルは、siRNAのコントロール模擬トランスフェクションに対して標準化した。siRNAは、典型的には、50-75%までターゲット遺伝子を抑制する。ポジティブコントロールとして、Oct4に特異的なsiRNAを使用した。正常な幹細胞培地および成長因子中で培養されたとしても、OCT4siRNAでトランスフェクトされた幹細胞は、予想通り、分化をした。

#### 【0211】

結果：

図14を参照すると、多分化能遺伝子OCT4がノックダウンされる分化コントロールでは、分化遺伝子Foxa2が上昇すること、また3つ全てのNME遺伝子の発現が抑制されることを見られる。同じ分化遺伝子Foxa2も、NME1、NME6あるいはNME7が、ノックダウンされる場合、上昇する。しかしながら、1つのNME遺伝子がノックダウンされる場合、他のNME遺伝子の1つ又は両方における増加があることが観察される。NME1が、ノックダウンされる場合、NME6が増加される。NME6が、ノックダウンされる場合、NME1およびNME7が増加される。NME7が、ノックダウンされる場合、NME1が増加される。

#### 【0212】

NME1の組み換えダイマー型が、培地へ加えられるとき、救済効果がある。図15は、NME1がノックダウンされるとき、分化コントロールでの発現レベルと比較して、増加は最小であるが、分化遺伝子Foxa2の発現の増加があることを示す。これは、NME1がノックダウンされた、幹細胞で分化の可視サインを示さない、図11Aおよび図12Aの写真と一致している。組み換えNME1二量体が、培地へ加えられる場合、図15は、分化遺伝子Foxa2の著しい減少、およびNME1とNME7の発現の増加があることを示す。図11Bおよび図12Bの写真は、組み換えNME1二量体が加えられかどうかにかかわらず、未分化の幹細胞の数の増加があるが、細胞の有意の分化はないということを示す結果と一致する。この結果は、NME1が、2量体として機能するNME6又はNME7がなお存在するので、重大な悪影響なしで多分化能幹細胞においてノックアウト又はダウンレギュレートできることをしめす。

#### 【0213】

図16を参照して、NME6のsiRNA抑制は、分化マーカーFoxa2の適度の増加だけに帰着する。しかしながら、組み換えNME1二量体が、培地へ加えられる場合、分化遺伝子Foxa2の発現に大きな増加があり、しかし、それには、多分化能遺伝子Kif4の発現、およびNME6自体の発現の活性化の大きな増加が伴う。対応する細胞の検査は、NME6が抑制された時、細胞増殖の減少および分化の非常に適度の増加があったことを示した。結果は、NME6が、多分化能幹細胞中に存在することを示唆するが、その役割は、有害な結果なしで単独でNME6をノックダウンすることができるという点で、クリティカルではない。しかしながら、組み換えNME1二量体に加えることは、分化の阻害あるいは成長を改善しない。

#### 【0214】

NME7のノックダウンは、急速に分化された細胞及び細胞増殖に最大・最多の負の効果を持つ(図11Bおよび図12Bを参照)。組み換えNME1二量体の添加は、適度の救済効果があり、そこでは、細胞は、より少ない分化のように見える(図11Dおよび図12D)。図17は、NME7ノックダウンが、NME1二量体が培地へ加えられる場合に減少する分化遺伝子Foxa2のレベルを、増加させたことを示す。組み換えNME1二量体の添加は、さらに、NME7の欠如を補うためにNME1発現のレベルを減じた。

#### 【0215】

図13は、3つのすべてのNMEが、細胞増殖と分化に負の効果を持つことなしに、ノックダウンされることはないと示す。トリプルノックダウンは、96時間後に生きている全く小さな細胞を生じさせ、それらの細胞は、完全に分化していた(図13A)。NME1とNME7のノックダウンは、同一の負の効果があり(図13B)、それは、NME6の役割が、NME1とNME7ほど重要ではないことを示唆した。ダイマーの組み換えNME1の添加は、細胞増殖の改善を示したが、しかし制限のあるものであった(図13C、D)。図18は、トリプルノックダウンが、分化遺伝子Foxa2の増加とすべてのNMEの大幅に縮小された発現をおこすことを示した。組み換えNME1二量体が、培地に加えられる場合、Foxa2のレベルは下るが、多分化能遺伝子およびNME遺伝子のレベルは、分化コントロールで発現されたレベルに匹敵した。図19は、N

10

20

30

40

50

ME1とNME7がともにノックダウンされた場合、非常に類似のパターンの遺伝子発現があることを示した。

#### 【0216】

##### 実施例7

上述されるように行なわれた別のNMEノックダウン実験では、ヒト胚性幹細胞(BG01V)が、抗MUC1\*抗体(MN-C3)の表面に植えつけられた。特定のNMEタンパク質が、siRNAを使いノックダウンされ、RT-PCRと同様のイメージが、siRNAの96時間ポスト・トランスフェクションでの結果を定量的に示した。成長因子も血清も、siRNAトランスフェクション後に細胞へは加えられなかつた。最小の幹細胞培地は、48時間ごとに変更した。図22A、Bは、NME1が抑制され、そして、添加された何らの成長因子も血清もない状態における、96時間後の幹細胞の写真を示す。細胞数および細胞形態は、幹様にみえ、そして、図22C、Dに示される、トランスフェクション試薬が加えられたがナンセンスsiRNAが加えられた、負のコントロール実験からは判別不能に見えることは注目される。

これらの結果は、NME1を抑制することが、幹様の成長に有害な影響がないことを示す。対照的に、図23A、Bは、NME7の抑制が、幹様の成長を阻害し、及び、一般に幹細胞の成長を阻害したことを示す。1個の残存する細胞集合体は、図23Bの中心に細胞のより厚く、より白いクラスタリングに見ることができるように、分化している。多分化能遺伝子OCT4を抑制する(図23C、D)、ポジティブコントロールとの比較によって、NME7の抑制は、重要な多分化能遺伝子OCT4の抑制に匹敵することが確認される。図24A、Bで示されるNME6の抑制は、図24Bで示される図でみることができる分化のエリアのように、適度の程度に、幹様の成長を阻害した。しかしながら、NME6抑制は、搔き混ぜられたsiRNAが加えられたネガティブコントロール細胞に似ているように見える(図24C、D)。

#### 【0217】

上記された結果として生じたNME抑制実験のRT-PCRは、NME7の抑制だけが、分化のマーカーであるFoxa2発現の著しい増加に帰着したことを示した。

#### 【0218】

##### 実施例8

組み換えヒトNME7は、多分化能幹細胞成長を促進し維持する。

#### 【0219】

多分化能を維持し、かつ分化を阻害する能力に関して、組み換えNME7をテストした。NME7及びNME7-ABの可溶性バリアントは、以前に記述された(W013/059373、PCT/US12/60684、2012年10月17日にファイルされた、それらの内容は参照によって組み入れられる)ように、生成され精製した。ヒト幹細胞(iPS cat# SC101a-1およびシステム・バイオサエンス)は、メーカーの指示書に基づき、5回継代のために、マウス纖維芽細胞フィーダー細胞の層上に4ng/mlのbFGF中で成長をさせた。その後、これらのソース幹細胞は、単クローナーの抗MUC1\*抗体(MN-C3)の12.5 μg/ウェルで被覆された6-ウェルの細胞培養プレートVita<sup>TM</sup>(The rmoフィッシャー)に植えつけられた。細胞は、1つのウェル当たり300,000個の細胞の密度で置かれた。基本培地は次のものから成る最小幹細胞培地である：

400mlのDME/F12/GlutaMAX I(Invitrogen# 10565-018)、100mlのノックアウト血清置換(KO-SR, Invitrogen# 10828-028)、5mlの100xMEMの非本質的アミノ酸溶液(Invitrogen# 11140-050)および0.9ml(0.1mM)の - メルカプトエタノール(55mMストック, Invitrogen# 21985-023)。

基礎培地は任意の培地になりえる。好ましい具体化例では、基礎培地は他の成長因子およびサイトカインが存在しない。基礎培地には、NME7-ABかNM23-H1の8nMが加えられ、折りたたまれそして安定した二量体として精製された。培地は48時間ごとに変更され、加速的成長により、回収され、植えつけ後3日目で、継代した。図26は、NM23-H1二量体、あるいはNME7モノマーでの、ヒト幹細胞の培養が、多分化能幹細胞成長に帰着することを示した。NME7およびNM23-H1(NME1)二量体両方は、多分化能に成長し、100%コンフルエントなときでさえ、分化がなかつた。写真で見ることができるように、NME7細胞は、NM23-H1二量体中で育てられた細胞より速く成長をした。最初の採取の細胞数は、NME7中の培養が

10

20

30

40

50

NM23-H1二量体中の培養より、1.4倍多い細胞を生産することを確認した。

#### 【0220】

##### 実施例9

ELISA分析は、NME7-ABが、2つのMUC1\*細胞外ドメインペプチドに同時に結合することを示す。

#### 【0221】

C末端のシステイン(PSMGFR-Cys)を担持するPSMGFRペプチドは、Inject Maleimide活性化BSAキット(Thermoフィッシュラー)を使用して、BSAに共有結合でつながれた。PSMGFR-Cy結合BSAは、0.1M炭酸塩/重炭酸ソーダバッファーpH 9.6で10 μg/mLに希釈され、そして50 μLが96ウェルプレートの各ウェルに加えられた。4°Cで一夜インキュベーション後、プレートは、PBS-Tで2度洗われ、そして、3%のBSA溶液が、ウェル上の残りの結合部位を阻止するために加えられた。室温1h後、プレートは、PBS-Tで2度洗われ、そして、PBS-T+1%BSAで希釈されたNME7が、異なる濃度で加えられた。室温1h後、プレートは、PBS-Tで3度洗われ、そして、PBS-T+1%BSAで希釈された抗NM23-H7(B-9、サンタクルーズ・バイオテクノロジー)が、1/500の稀釈で加えられた。室温1h後、プレートはPBS-Tで3度洗われ、そして、PBS-T+1%BSAで希釈されたヤギ抗マウスHRPが、1/3333の稀釈で加えられた。室温1h後、プレートはPBS-Tで3度洗われ、そして、NME7の結合が、ABTS溶液(Pierce)を使用して、415nmで測定した。

#### 【0222】

ELISA MUC1\*二量化：NME7結合用のプロトコルが使われ、また、NME7は11.6 μg/mLで使用された。

#### 【0223】

室温1h後、プレートは、PBS-Tで3度洗われ、そして、PBS-T+1%BSAで希釈されたHisタグ化PSMGFRペプチド(PSMGFR-His)、あるいは、ビオチン付加PSMGFRペプチド(PSMGFRビオチン)が、異なる濃度で加えられた。室温1h後、プレートはPBS-Tで3度洗われ、そして、PBS-T+1%BSAで希釈された抗HistagHRP(Abcam)、あるいは、streptavidin-HRP(Pierce)が、1/5000の濃度で加えられた。室温1h後、プレートはPBS-Tで3度洗われ、そして、別のPSMGFRペプチド(それは抗His抗体によって、あるいはstreptavidinによってシグナルすることができなかった)結合化BSAに結合させたNME7への、PSMGFRペプチドの結合を、ABTS溶液(Pierce)を使用して、415nmで測定した。

#### 【0224】

##### 実施例10

ヘクサマー型のNME1は、癌細胞成長とミグレーションを阻害する。

#### 【0225】

T47D乳癌細胞は、NME1とNME7の両方を分泌する。ヘクサマーのNME1が癌細胞成長を阻害し、および同じ方法での幹細胞成長における幹細胞成長が阻害されたかどうか判断するために、T47DのMUC1\*陽性乳癌細胞が、本質的にすべてのヘクサマーの安定な集合体として精製されたNME1の量を変えることによって、培養された。T47D細胞は、10%のFBS RPMIにおいて成長し、トリプシンで集められた。細胞は遠心沈殿され、血液細胞計で数えられた。ウェルあたり6,000個の細胞が、96ウェルプレートに植えつけられた。24時間後に、培地は、ヘクサマーの変わる濃度と1%のFBS RPMIに変更した。培地は48時間後に再び変更した。細胞の生存率は、細胞にあるATPの量を測定するVialightプラス(Lonza、RocklandME)細胞分析を使用して、96時間で測定した。データは、培地のみのコントロールに対するパーセント細胞成長として図示される。別のコントロールとして、癌細胞成長を阻害するその能力によって、私たちが同定した、小さな分子(MN547)を、ポジティブコントロールとして使った。図28は、ヘクサマー型NME1が、濃度依存的に、乳癌細胞の増殖を阻害することを示す。

#### 【0226】

##### 実施例11

ヘクサマー型NME1は癌細胞ミグレーションを阻害するが、NME1二量体はしない。

10

20

30

40

50

## 【0227】

癌細胞ミグレーションは、癌細胞が他の組織を侵略する或いは超自然的な転移を始めるために、種々の局所で着床する方法の一つとしてしばしばみなされる。癌細胞ミグレーションの抑制剤をテストする1つの方法は「スクラッチ法」である。これらの分析では、癌細胞は植えつけられ、集密度近くへ増殖することを許容される。

ピペット先端あるいは他の道具が、細胞のセクションをこすり取るために使用される。細胞がない各ウェルにおいて、「スラッシュ」又は「クロス」型の領域をもつ成長癌細胞のバンクグラウンドを残して、除去された細胞は、洗い流された。ヘクサマーか二量体のいずれかの純粹な集合体として精製されたNME1が加えられ、さらに16時間あるいは24時間成長させた。

10

## 【0228】

DU145 MUC1\*陽性前立腺癌細胞を、10%のFBS RPMIにおいて成長させ、トリプシンで集められた。細胞は、遠心沈殿され、血液細胞計で数えられた。ウェルあたり、およそ $1 \times 10^6$ 細胞が、10%FBS RPMIの6ウェルプレートに植えつけられた。翌日、クロス・マーク(NME1ヘクサマー)あるいはスラッシュ・マーク(NME1二量体)が、定義された領域の細胞を除去するために、無菌1000  $\mu$ Lピペット先端を使用して作られた。ミグレーションされた細胞は、優しく洗い流した。培地は、ヘクサマーまたは二量体の変わる濃度と10%のFBSに変更した。写真は、写真の中心としてラインのクロスを使用して、スクラッチのとき( $t=0$ )及び16時間後に得た。時間0、および時間16時間については、スクラッチのエリアは、ImageJソフトウェアで定量された。データは、それ自身の行動開始時刻の写真に關係づけて、スクラッチへの細胞侵入パーセントとして表される。

20

## 【0229】

図29Aは、示された濃度で、NME1ヘクサマーで処理された癌細胞のための侵入パーセントのImageJ定量化によるグラフを示す。図29B-Eは、時間0(B、C)、および16時間(D、E)での写真を示す。コントロール(D)との比較によって、NME1ヘクサマー(E)が、癌細胞侵入を阻害することは明らかである。

## 【0230】

図30Aは、示された濃度で、NME1二量体で処理された癌細胞のための侵入パーセントのImageJ定量化のグラフを示す。図30B-Kは、時間0(B-F)、および16時間(G-K)での写真を示す。コントロール(G)への比較によって、NME1二量体(H、I)が、癌細胞侵入を阻害しないことは明らかである。NME1二量体が、成長を刺激するために、癌細胞上のMUC1\*成長因子受容体の細胞外ドメインへ結合し、二量化させることを参照するべきである。私たちが幹細胞で示したように、~4-16nMというNME1二量体の濃度は、一つのNME1二量体が、2つのMUC1\*受容体に結合するので、十分である。より高い濃度(J、K)では、2つの受容体を二量化させることではなく各MUC1\*受容体への1つのダイマー結合があるようである。したがって、非常に高いNME1二量体濃度では、侵入の抑制がある。

30

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0231】

[0001]Boissan, M., et al. (2009). "The mammalian Nm23/NDPK family: from metastasis control to cilia movement." Mol Cell Biochem 329(1-2): 51-62.

40

[0002]Okabe-Kado, J., et al. (1985). "Characterization of a differentiation-inhibitory activity from nondifferentiating mouse myeloid leukemia cells." Cancer Res 45(10): 4848-52.

[0003]Okabe-Kado, J., et al. (1992). "Identity of a differentiation inhibiting factor for mouse myeloid leukemia cells with NM23/nucleoside diphosphate kinase." Biochem Biophys Res Commun 182(3): 987-94.

[0004]Rosengard, A. M., et al. (1989). "Reduced Nm23/Awd protein in tumour metastasis and aberrant Drosophila development." Nature 342(6246): 177-80.

[0005]Dearolf, C. R., et al. (1988). "Developmental consequences of awdb3, a cel

50

I-autonomous lethal mutation of *Drosophila* induced by hybrid dysgenesis." *Dev Biol* 129(1): 159-68.

[0006]Timmons, L., et al. (1993). "The expression of the *Drosophila* *awd* gene during normal development and in neoplastic brain tumors caused by *Igl* mutations." *Dev Biol* 158(2): 364-79.

[0007]Yamashiro, S., et al. (1994). "Alteration of *nm23* gene expression during the induced differentiation of human leukemia cell lines." *Oncogene* 9(9): 2461-8.

[0008]Lombardi, D., et al. (1995). "The association of the *Nm23-M1* protein and beta-tubulin correlates with cell differentiation." *Exp Cell Res* 217(2): 267-71.

[0009]Gervasi, F., et al. (1996). "nm23 influences proliferation and differentiation of PC12 cells in response to nerve growth factor." *Cell Growth Differ* 7(12): 1689-95.

[0010]Amendola, R., et al. (1997). "DR-nm23 gene expression in neuroblastoma cells: relationship to integrin expression, adhesion characteristics, and differentiation." *J Natl Cancer Inst* 89(17): 1300-10.

[0011]Munoz-Dorado, J., et al. (1990). "Nucleoside diphosphate kinase from *Myxococcus xanthus*. I. Cloning and sequencing of the gene." *J Biol Chem* 265(5): 2702-6.

[0012]Okabe-Kado, J., et al. (1995). "Inhibitory action of nm23 proteins on induction of erythroid differentiation of human leukemia cells." *Biochim Biophys Acta* 1267(2-3): 101-6.

[0013]Venturelli, D., et al. (1995). "Overexpression of DR-nm23, a protein encoded by a member of the nm23 gene family, inhibits granulocyte differentiation and induces apoptosis in 32Dc13 myeloid cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(16): 7435-9.

[0014]Willems, R., et al. (1998). "Decrease in nucleoside diphosphate kinase (NDPK/nm23) expression during hematopoietic maturation." *J Biol Chem* 273(22): 13663-8.

[0015]Willems, R., et al. (2002). "Extracellular nucleoside diphosphate kinase N M23/NDPK modulates normal hematopoietic differentiation." *Exp Hematol* 30(7): 640-8.

[0016]Lombardi, D., et al. (2000). "nm23: unraveling its biological function in cell differentiation." *J Cell Physiol* 182(2): 144-9.

[0017]Ptashne, M. (2004). *A Genetic Switch, Phage Lambda Revisited*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[0018]Ieda, M., et al. (2010). "Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors." *Cell* 142(3): 375-86.

[0019]Efe, J. A., et al. (2011). "Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy." *Nat Cell Biol*. 13(3): 215-22.

[0020]Nichols, J. and A. Smith (2009). "Naive and primed pluripotent states." *Cell Stem Cell* 4(6): 487-92.

[0021]Mahanta, S., et al. (2008). "A minimal fragment of MUC1 mediates growth of cancer cells." *PLoS One*. 3(4): e2054.

[0022]Hikita, S. T., et al. (2008). "MUC1\* mediates the growth of human pluripotent stem cells." *PLoS One*. 3(10): e3312.

[0023]Smagghe, B. J., et al. (2013). "MUC1\* ligand, NM23-H1, is a novel growth factor that maintains human stem cells in a more naive state." *PLoS One*. 8(3): e58601.

[0024]Lacombe, M. L., et al. (2000). "The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases." *J Bioenerg Biomembr* 32(3): 247-58.

10

20

30

40

50

[0025]Perina, D., et al. "Characterization of Nme6-like gene/protein from marine sponge *Suberites domuncula*." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 384(4-5): 451-60.

[0026]Chang, C. L., et al. (1996). "A nucleoside diphosphate kinase A (nm23-H1) serine 120->glycine substitution in advanced stage neuroblastoma affects enzyme stability and alters protein-protein interaction." *Oncogene* 12(3): 659-67.

[0027]Miranda-Vizuete, A., et al. (2003). "Cloning and developmental analysis of murid spermatid-specific thioredoxin-2 (SPTRX-2), a novel sperm fibrous sheath protein and autoantigen." *J Biol Chem* 278(45): 44874-85.

[0028]Boyer, L. A., et al. (2005). "Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells." *Cell* 122(6): 947-56. 10

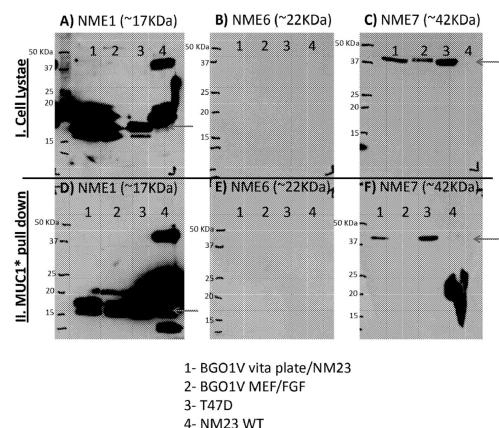
### 【 0 2 3 2 】

ここに引用された参考のすべて全体は参考によって本発明で具体化される。

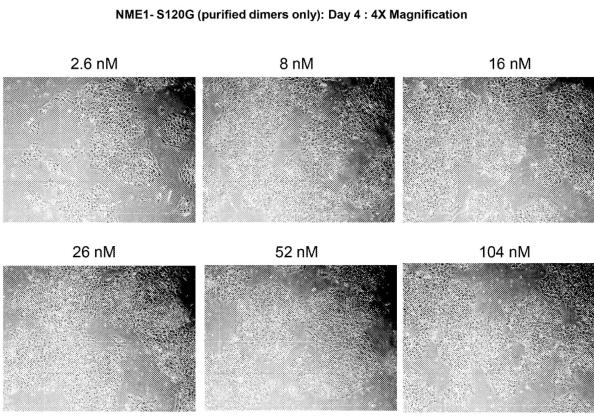
### 【 0 2 3 3 】

当業者は、ルーチン実験、ここに詳細に記述された発明の特別な実施例の多くの等価物に限定されず、これらを使い、本願発明を認識するかあるいは確認することができる。そのような等価物は、クレームの範囲内に包含されることが意図される。

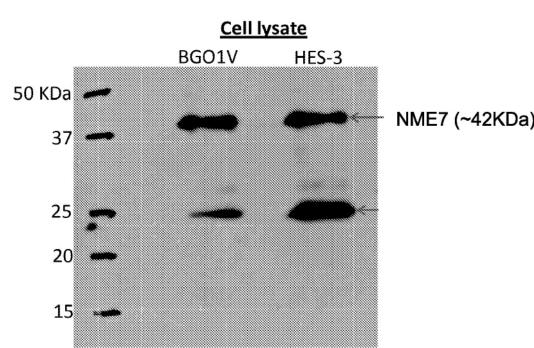
### 【 図 1 】



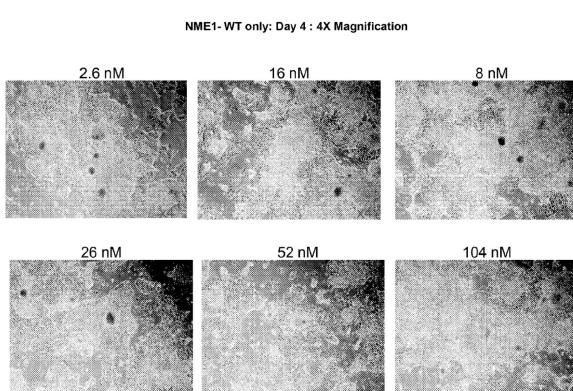
### 【 図 3 】



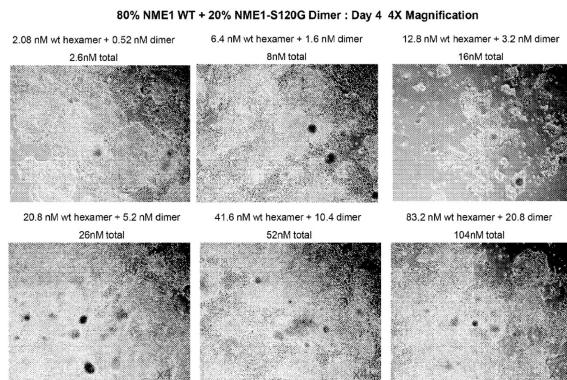
### 【 図 2 】



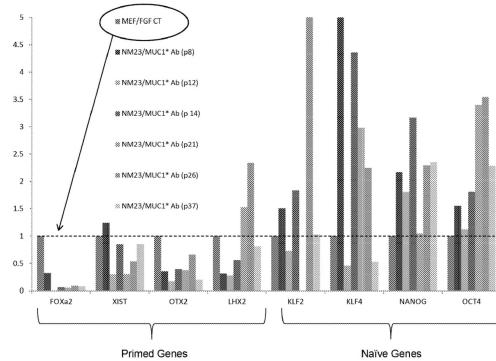
### 【 図 4 】



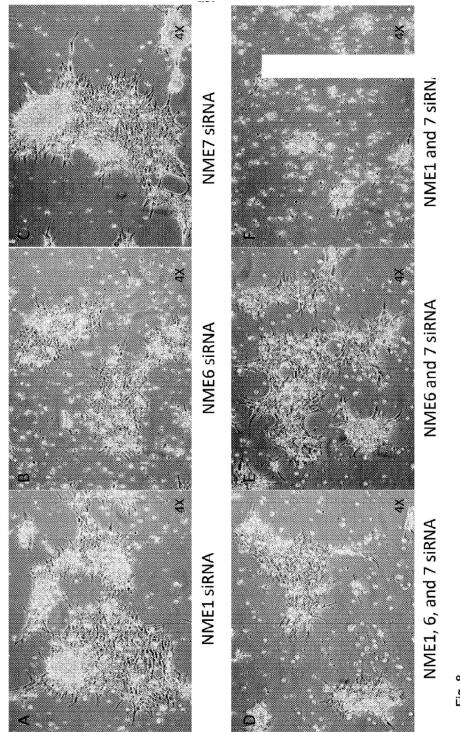
【図5】



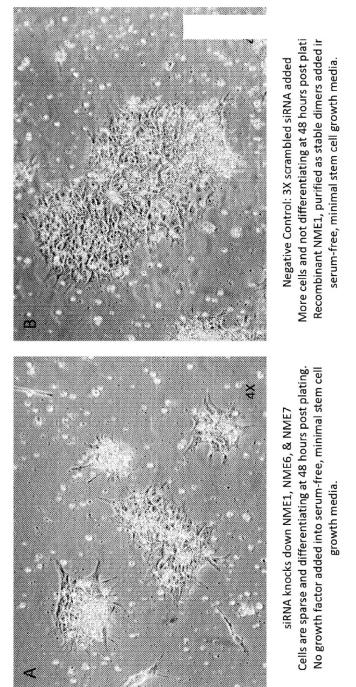
【図6】



【図8】

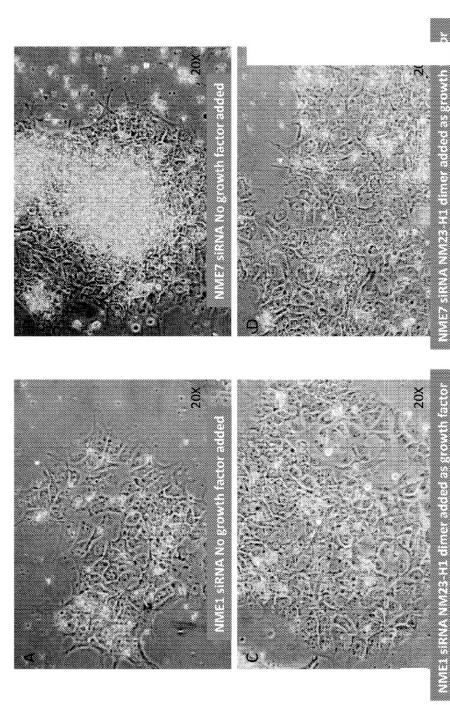
Fig. 8  
no exogenous growth factor, no media change at 48 hours

【図7】



Negative Control: 3X scrambled siRNA added  
Recombinant NME1 purified as stable dimer added  
More cells and not differentiating at 48 hours post plating.  
No growth factor added into serum-free, minimal stem cell growth media.

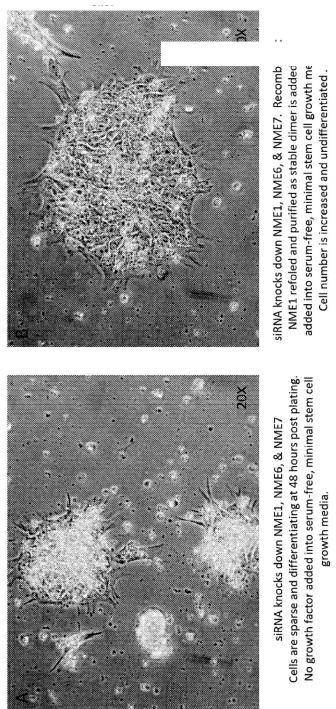
【図9】



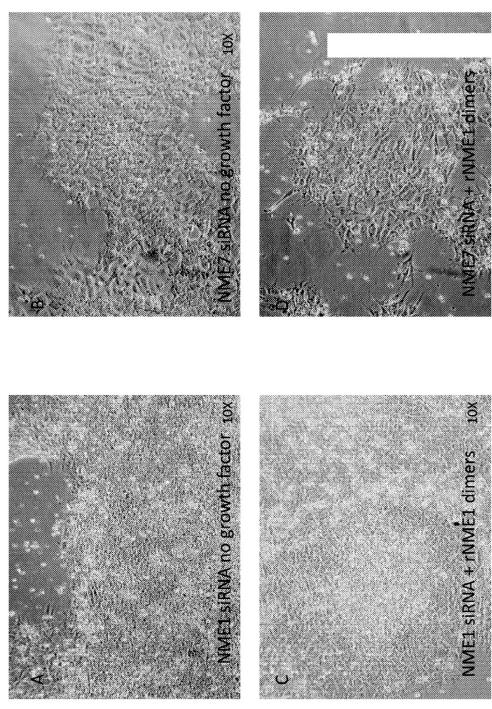
Differentiation induced by Suppression of NME7 is prevented by adding recombinant NME1, refolded and purified as dimer

【図10】

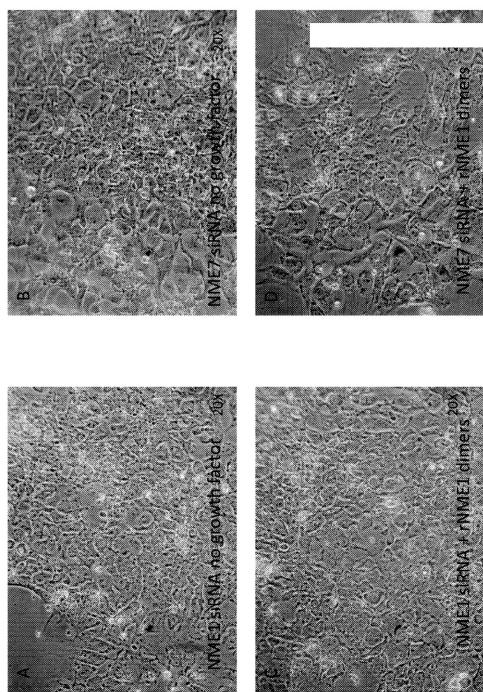
**Differentiation induced by Suppression of NME1, NME6 and NME7 is prevented by adding recombinant NME1, refolded and purified as dimer**



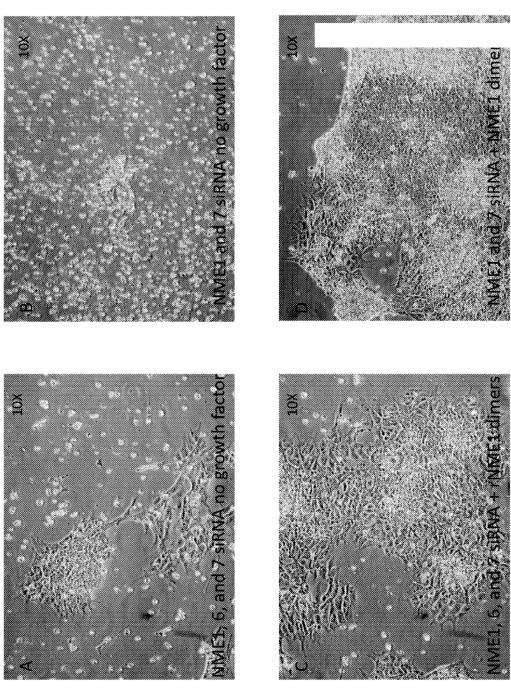
【図11】



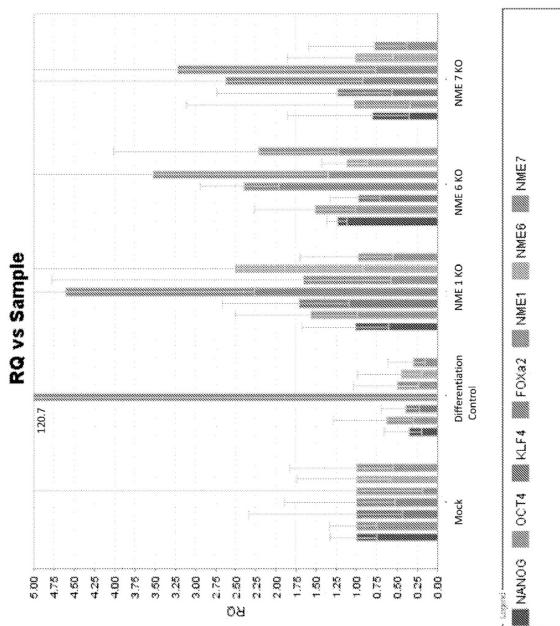
【図12】



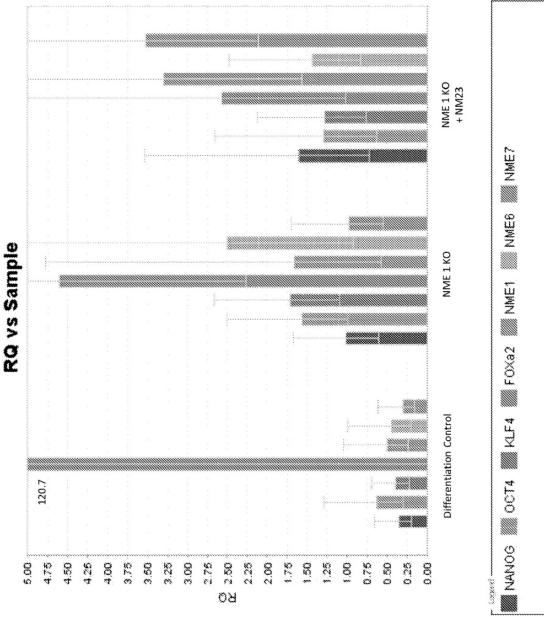
【図13】



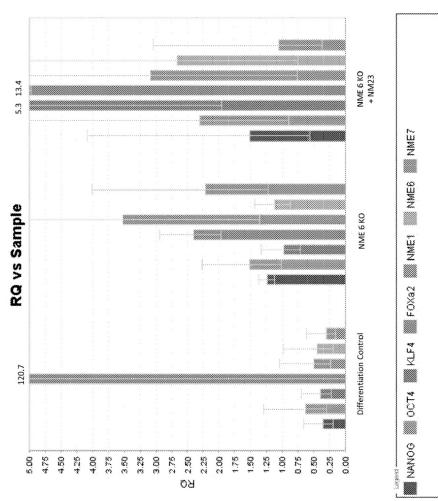
【図14】



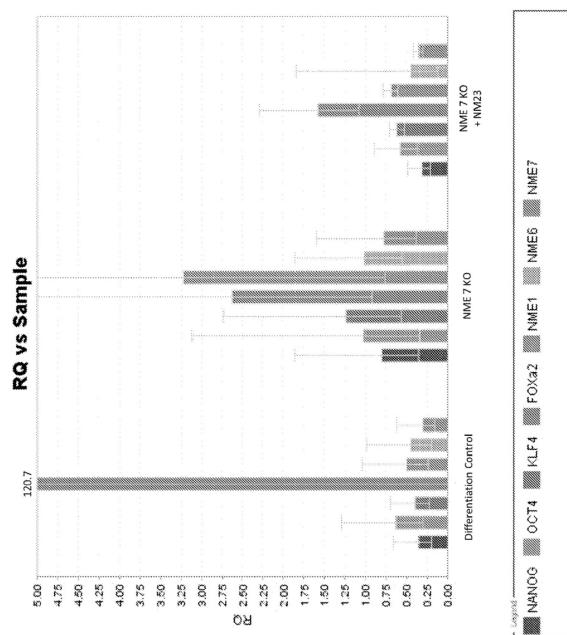
【 図 1 5 】



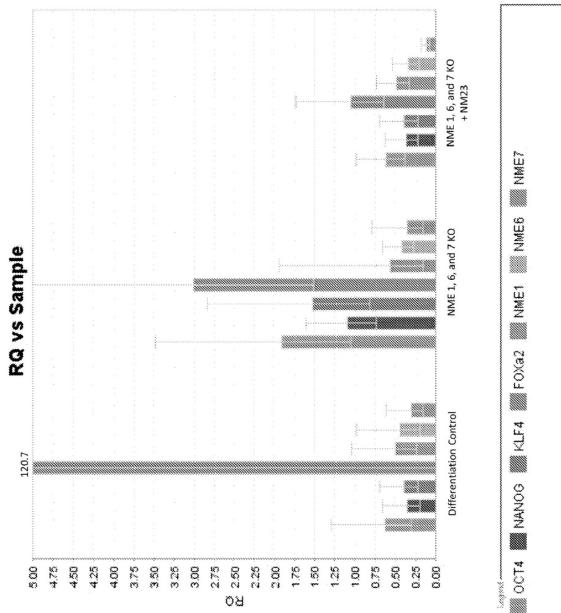
【図16】



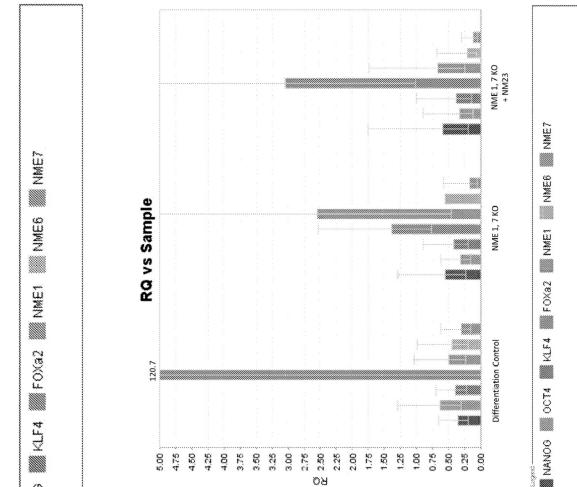
【図17】



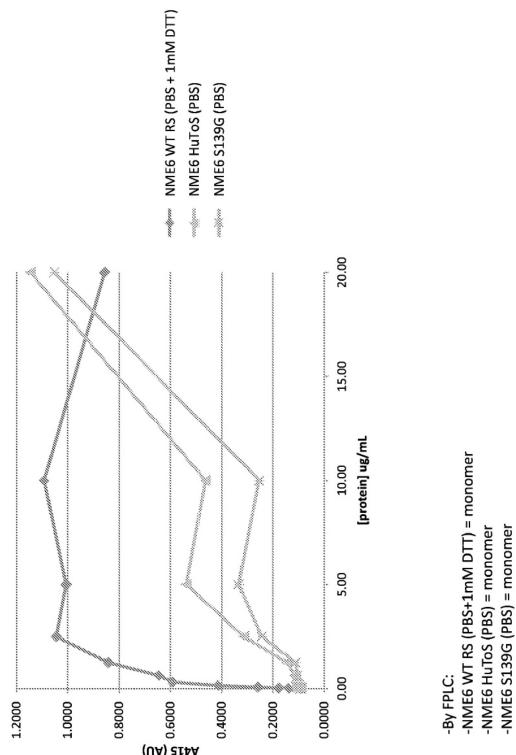
【図18】



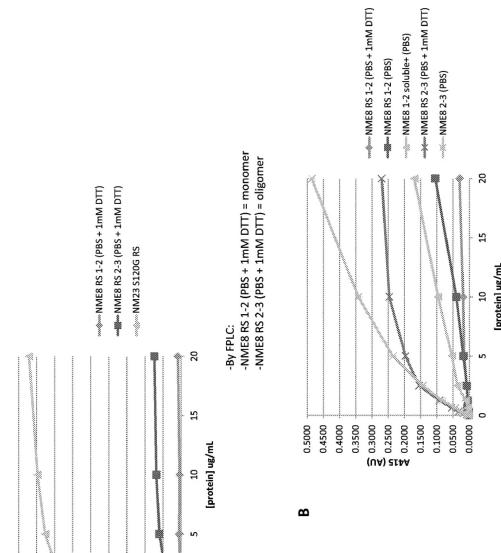
【 図 1 9 】



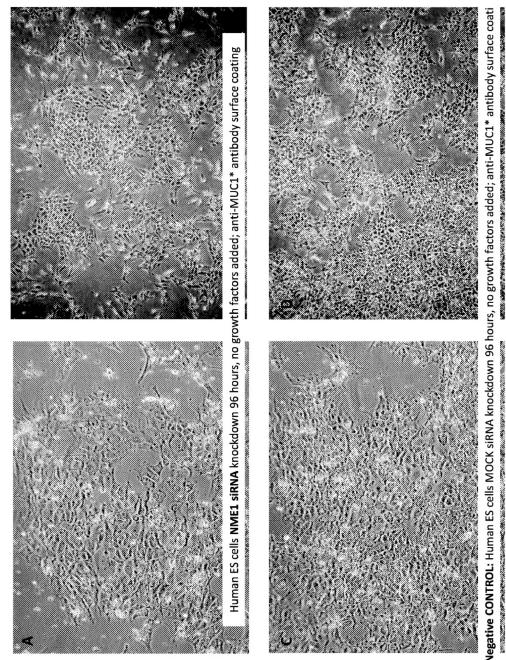
【図20】



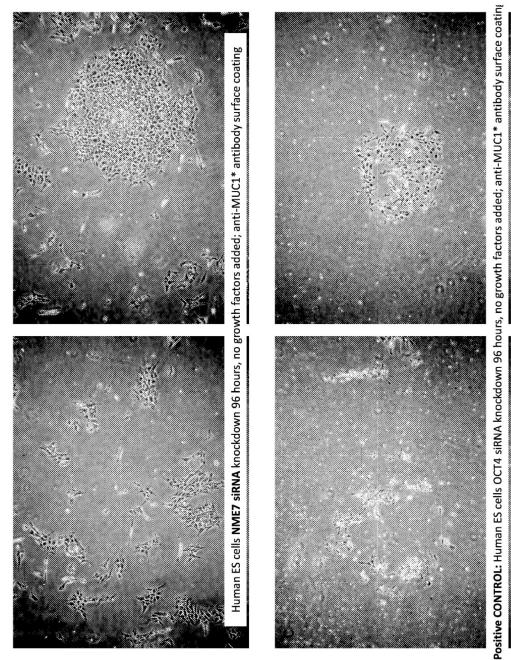
【 図 21 】



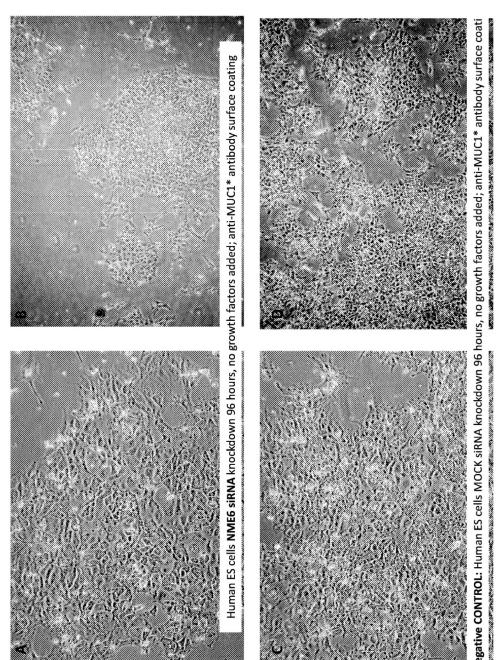
【図22】



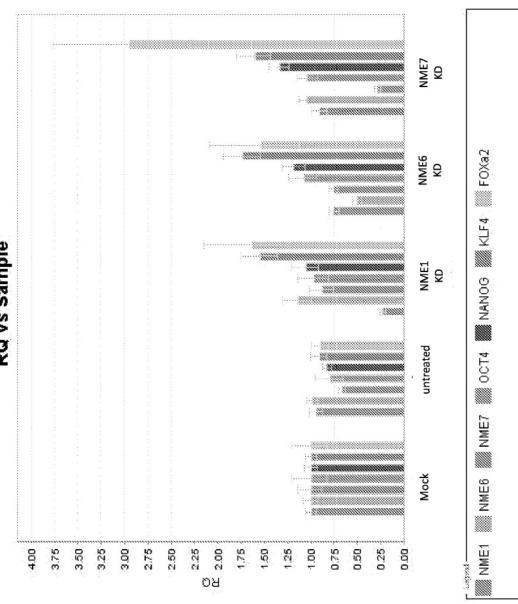
【図23】



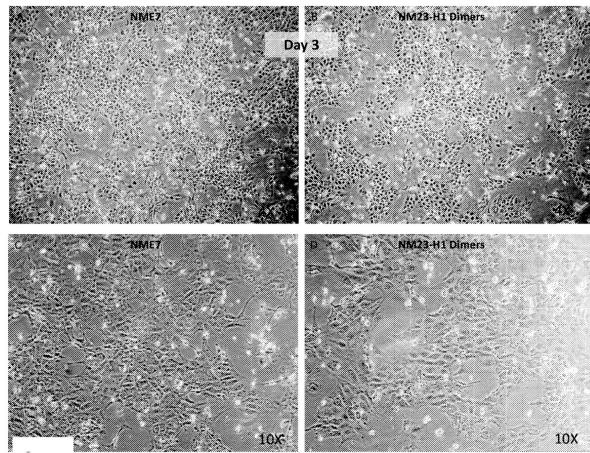
【図24】



【図25】



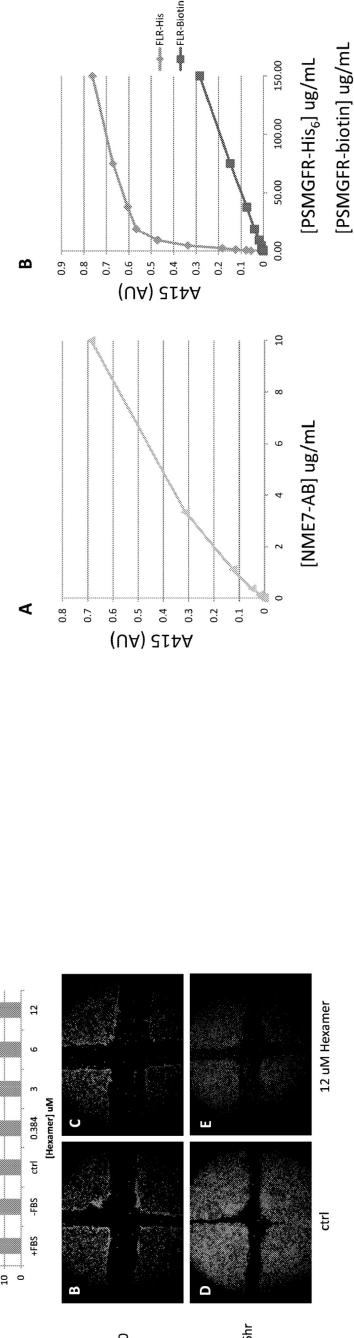
【 図 26 】



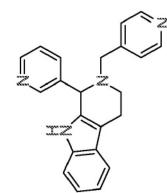
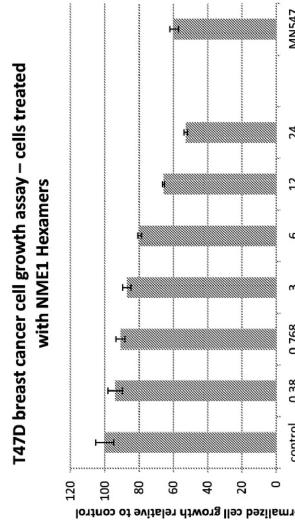
【 図 27 】

**ELISA shows NME7 Dimerizes MUC1\***

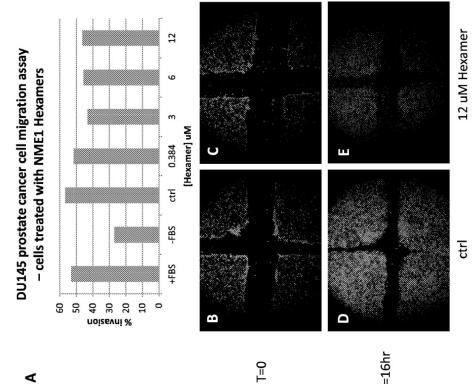
MUC1\* extra cellular domain peptide immobilized on plate was bound by NME7 to saturation; a second MUC1\* peptide with a C-terminal His-tag or Biotin was added and visualized by HRP labeled antibody to either His-tag or HRP labeled streptavidin



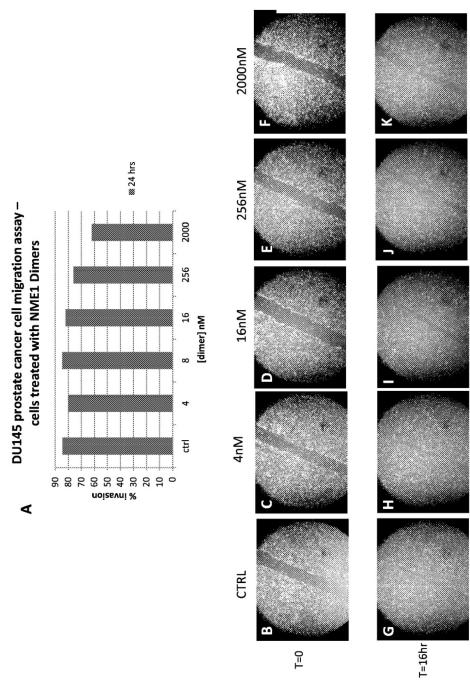
【図28】



【図29】



【図30】



【配列表】

0006546087000001.app

---

## フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/684,654  
(32)優先日 平成24年8月17日(2012.8.17)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 61/675,292  
(32)優先日 平成24年7月24日(2012.7.24)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 PCT/US2012/060684  
(32)優先日 平成24年10月17日(2012.10.17)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 61/683,155  
(32)優先日 平成24年8月14日(2012.8.14)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 61/679,021  
(32)優先日 平成24年8月2日(2012.8.2)  
(33)優先権主張国 米国(US)

## 前置審査

(56)参考文献 特表2012-505636 (JP, A)  
国際公開第2010/144887 (WO, A1)  
国際公開第2008/070171 (WO, A1)  
特表2010-504090 (JP, A)  
PLoS One, 2008, Vol.3, No.10, e3312, pp.1-13  
Cancer Research, 2010.12.17, Vol.71, No.3, pp.1177-1186

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

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