

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02006/112401

発行日 平成20年12月11日(2008.12.11)

(43) 国際公開日 平成18年10月26日(2006.10.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Z N A E	2 G 0 4 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 B 0 6 3
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 24 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2007-528119 (P2007-528119)	(71) 出願人	504300181 国立大学法人浜松医科大学 静岡県浜松市東区半田山一丁目20番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2006/307950	(74) 代理人	100110249 弁理士 下田 昭
(22) 国際出願日	平成18年4月14日(2006.4.14)	(74) 代理人	100113022 弁理士 赤尾 謙一郎
(31) 優先権主張番号	特願2005-119290 (P2005-119290)	(72) 発明者	北川 雅敏 静岡県浜松市半田山4-17-12
(32) 優先日	平成17年4月18日(2005.4.18)	(72) 発明者	高 芸 静岡県浜松市半田山4-4-34-202
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	北川 恭子 静岡県浜松市半田山4-17-12
(31) 優先権主張番号	特願2005-368258 (P2005-368258)	Fターム(参考)	2G045 AA35 CB02 DA13 DA36 FB03 FB12
(32) 優先日	平成17年12月21日(2005.12.21)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌治療用組成物

(57) 【要約】

【課題】 癌を治療するための方法と治療用組成物を提供する。

【解決手段】 GPR48と転移との関係を解明する研究を行った結果、GPR48が癌細胞の浸潤能を亢進させる機能を持ち、GPR48の発現を阻害する又はその機能を阻害することにより癌の転移浸潤能が阻害されることを見出した。本発明においては、中和抗体やアンタゴニスト等によりGPR48の機能を阻害し、又はsiRNAやアンチセンス等によりGPR48の発現を抑制することによって癌の浸潤転移を抑制する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

Gタンパク共役型受容体 G P R 4 8 の抗体であって、Gタンパク共役型受容体 G P R 4 8 による癌細胞の浸潤能を不活性化する中和抗体を主成分とする癌治療用組成物。

【請求項 2】

前記抗体が、Gタンパク共役型受容体 G P R 4 8 の細胞外ドメインに相当するペプチドに対する抗体である請求項 1 に記載の癌治療用組成物。

【請求項 3】

前記ペプチドが配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 5 4 2 又はその部分配列から成る請求項 2 に記載の癌治療用組成物。

【請求項 4】

Gタンパク共役型受容体 G P R 4 8 をコードするポリヌクレオチド（配列番号 1）の連続する 1 9 ~ 2 7 塩基の塩基配列に相当し、Gタンパク共役型受容体 G P R 4 8 の発現を阻害するオリゴリボヌクレオチド、その相補的オリゴリボヌクレオチド、又はこれらから成る 2 本鎖 R N A を主成分とする癌治療用組成物。

【請求項 5】

前記塩基配列が配列番号 5 ~ 9 のいずれかである請求項 4 に記載の癌治療用組成物。

【請求項 6】

癌細胞又は癌組織由来細胞に試験物質を作用させ、Gタンパク共役型受容体 G P R 4 8 の発現の変化又は G P R 4 8 活性状態の変化を検出することから成る癌の転移浸潤能を阻害する薬剤のスクリーニング方法。

【請求項 7】

前記癌細胞又は癌組織が、癌患者からの生検試料又は外科的手法によって癌患者から採取された細胞又は組織である請求項 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

この発明は、Gタンパク共役型受容体 G P R 4 8 の発現を阻害する又はその機能を阻害することにより癌の転移浸潤能を阻害する癌治療用組成物とそのスクリーニング方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

癌の治療では、外科手術、放射線治療、免疫療法、化学療法等の治療法が行われており、それらの進歩により癌の治癒率は上昇している。しかしこれらの治療法は原発癌に限られ、転移性の高い癌は予後不良で治癒率は総じて低い。

一方、大腸癌、乳癌、胃癌、肺癌等の癌において、細胞周期制御因子である CDK 阻害タンパク質 p27^{Kip1} の発現量低下が見出され、p27^{Kip1} の発現量が低下している癌では予後が悪いという報告がある（非特許文献 1 ~ 3）。しかし p27^{Kip1} の発現量低下で何故予後が悪いのかは不明であった。

なお本発明者らにより予後不良の癌及び癌細胞の転移浸潤性に関連することが解明された G P R 4 8 は、7 回貫通ドメインを有するタンパク質のスーパーファミリーに属するロイシンリッチリピートを含む Gタンパク質結合レセプターであることは知られていたが、その機能は不明であった（非特許文献 4, 5）。

【0003】

【非特許文献 1】 Nature Medicine 1997 Feb;3(2):222-5.

【非特許文献 2】 Nature Medicine 1997 Feb;3(2):227-30.

【非特許文献 3】 Nature Medicine 1997 Feb;3(2):231-4

【非特許文献 4】 Mol Endocrinol. 2004 Sep;18(9):2241-54. Epub 2004 Jun 10.

【非特許文献 5】 Mol Endocrinol. 1998 Dec;12(12):1830-45.

【発明の開示】

10

20

30

40

50

【発明が解決しようとする課題】**【0004】**

本発明者らは、p27^{Kip1}の発現量が低下している癌では予後が悪い（非特許文献1～3）ことの原因を解明するために、p27^{Kip1}の発現量低下によっておこる遺伝子発現を解析し、予後不良化の原因を解明すれば、癌の治療に応用できると考えた。

即ち、本発明は、癌を治療するための方法と治療薬を提供する。

【課題を解決するための手段】**【0005】**

本発明者らは、p27^{Kip1}の発現量が低下したモデルを作成し、変動している遺伝子をマイクロアレイを用いて解析した。即ち、ヒト大腸癌細胞株HCT116のp27^{Kip1}遺伝子をジーンターゲット法により片側ノックアウトした細胞（HCT-hp27-hKO）を作成し、p27^{Kip1}の発現量が低下していることを確認してモデル細胞とした。親株のHCT116に比べHCT-hp27-hKOで発現変動している遺伝子をマイクロアレイを用いて解析した。その結果、HCT-hp27-hKOにおいてGタンパク共役型受容体GPR48遺伝子(AF257182)の発現が有意に亢進していることが明らかになった。

本発明者らは、GPR48と転移との関係を解明する研究を行った結果、GPR48が癌細胞の浸潤能を亢進させる機能を持つことを見出し、更に、GPR48の発現を阻害する又はその機能を阻害することにより癌の転移浸潤能が阻害されることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0006】

即ち、本発明は、Gタンパク共役型受容体GPR48の抗体であって、Gタンパク共役型受容体GPR48による癌細胞の浸潤能を不活性化する中和抗体を主成分とする癌治療用組成物である。

また本発明は、Gタンパク共役型受容体GPR48をコードするポリヌクレオチド（配列番号1）の連続する19～27塩基の塩基配列に相当し、Gタンパク共役型受容体GPR48の発現を阻害するオリゴボヌクレオチド、その相補的オリゴボヌクレオチド、又はこれらから成る2本鎖RNAを主成分とする癌治療用組成物である。

更に、本発明は、癌細胞又は癌組織由来細胞に試験物質を作用させ、Gタンパク共役型受容体GPR48の発現の変化又はGPR48活性状態の変化を検出することから成る癌の転移浸潤能を阻害する薬剤のスクリーニング方法である。

また本発明は、Gタンパク共役型受容体GPR48の発現を抑制する又はGPR48の機能を阻害することから成る癌の治療方法でもある。

【発明を実施するための最良の形態】**【0007】**

本発明は、Gタンパク共役型受容体GPR48が癌細胞の浸潤能を促進する機能を持ち、癌の浸潤転移の指標となることを見出したこと（試験例1）に基づくものであり、Gタンパク共役型受容体GPR48の発現を抑制する又はGPR48の機能を阻害することにより癌を治療することができることに基づいている。

対象となる癌は如何なる癌でもよく、例えば、大腸癌、乳癌、胃癌、肺癌、胆道癌（胆管細胞癌、胆嚢癌）、膵癌、食道癌、肝細胞癌、喉頭癌、咽頭癌、甲状腺癌、子宮癌、卵巣癌、腎細胞癌、前立腺癌、膀胱癌、悪性黒色腫、脳腫瘍などが挙げられる。

本発明においては、中和抗体やアンタゴニスト等によりGPR48の機能を阻害し、又はsiRNAやアンチセンス等によりGPR48の発現を抑制することによって癌の浸潤転移を抑制する。

【0008】

中和抗体は、ヒトGPR48（配列番号2）の細胞外ドメインに対するペプチドを抗原とする抗体であって、GPR48の機能（癌の浸潤能の促進）を阻害する抗体である。この細胞外ドメインは、ヒトGPR48（配列番号2）のアミノ酸No.1～542である。本発明の中和抗体は、この細胞外ドメイン全体あるいはその部分に対する抗体であって、癌細胞の浸潤能を不活性化する抗体である。この抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナ

10

20

30

40

50

ル抗体でもよい。

【0009】

一方、RNA干渉（RNA interference）技術において、主に使用されているsiRNAは19～27塩基の二重鎖のRNAである。30塩基程度になると免疫反応が起き、逆に16塩基より短いと相補的な配列が増えることになり遺伝子特異性がなくなり抑制したい遺伝子以外の遺伝子を抑制してしまう可能性がある。

本発明で用いるRNA断片としては、標的RNAのセンス又はアンチセンスのものでよいが、これらはRNaseで容易に分解され、また効果が劣ると考えられるため、これらから成る2本鎖RNAが好ましく用いられる。この2本鎖RNAは通常センスとアンチセンスの2本を別々に合成し、それをハイブリダイズさせて2本鎖にして用いられる。

このRNA断片の長さは19～27塩基が有効と考えられており、後述の実施例においては19塩基のもの（配列番号5～9）が有効に機能している。

Gタンパク共役型受容体GPR48をコードするポリヌクレオチド（配列番号1）の連続する19～27塩基の塩基配列に「相当する」オリゴリボヌクレオチドとは、この遺伝子が転写されて生成するmRNAの、GPR48遺伝子の特定の塩基配列に相当する部分に相補的なRNAという意味であり、具体的にはこのGPR48遺伝子の特定のDNA配列のTをUに置き換えたものという意味である。またsiRNAは修飾されたものでもよい。

【0010】

本発明の癌治療用組成物は、他の公知の癌の治療薬や腫瘍増殖抑制剤等との合剤であってもよい。本発明の癌治療用組成物は、このような他の薬剤を含むキットの形態であってもよいし、滅菌等張塩水、防腐剤、緩衝剤などの薬学的に許容される媒体を含有してもよい。

また、本発明の癌治療用組成物は、上記癌治療用組成物を製剤化したものを希釈剤などと混合して投与するための注射用キットや、製剤化した個々の製剤を投与するための錠剤用キットなどのキットとして提供してもよい。

またsiRNAを直接細胞に導入してもよく、その手段には特に制限はなく、リン酸カルシウム法、マイクロインジェクション法、プロトプラスト融合法、エレクトロポレーション、ウイルスベクターを用いる方法などが挙げられるが、リボソーム等に基づく市販のトランスフェクション試薬を用いるのが簡便である。

【0011】

また、癌細胞又は癌組織由来細胞に試験物質を作用させ、Gタンパク共役型受容体GPR48の発現の変化又はGPR48活性状態の変化を検出することにより、癌の転移浸潤能を阻害する薬剤（癌の治療薬）をスクリーニングすることができる。

この癌細胞又は癌組織は、被検者から採取した細胞又は組織であることが好ましく、癌の疑いのある患者からの生検試料又は外科的手法によって癌の疑いのある患者から採取された細胞又は組織であることがより好ましい。

GPR48の発現の変化を検出する方法に特に制限は無いが、抗原抗体反応、RT-PCR、cDNAマイクロアレイ、ノーザンブロッティング、マススペクトロメトリー解析、プロテインチップ解析等が挙げられる。これらは各分野の常法に従って行えばよい。

【0012】

スクリーニング方法としては下記のような方法が挙げられる。

(1) GPR48のアンタゴニスト及びシグナル伝達阻害のスクリーニング法

(i) マトリゲル浸潤アッセイによる方法

野生型GPR48及び恒常活性化型GPR48をHCT116等の細胞に導入したGPR48高発現細胞はマトリゲル浸潤アッセイで高い浸潤能を示すため、これらの細胞に被検物質を作用させ、その浸潤能を阻害する活性を指標にして、GPR48のアンタゴニストをスクリーニングすることができる。

(ii) cAMP濃度の測定による方法

GPR48の活性化状態は細胞内cAMP濃度で測定できるため、野生型GPR48及び恒常活性化型GPR48をHCT116等の細胞に導入したGPR48高発現細胞に被検物質を加えて培養後、細胞内cA

10

20

30

40

50

MP濃度を測定し、cAMP濃度の低下を指標に阻害作用を評価する。被検物質が野生型GPR48のcAMP濃度を低下させ恒常活性化型GPR48のcAMP濃度を低下させない場合は、GPR48のリガンド（未知）と拮抗する物質であることが予想される。一方両方のcAMP濃度を低下させた場合はリガンド拮抗物質でなく、GPR48とリガンドの結合以降のGタンパク質からアデニル酸シクラーゼを活性化の細胞内シグナル伝達経路を阻害することが予想される。

【0013】

(2) GPR48の発現抑制薬のスクリーニング法

(i) GPR48mRNAの発現量を測定することによる方法

HCT116等の培養細胞に被検物質を加えて培養後、RNAを抽出し、RT-PCR、cDNAマイクロアレイ、ノーザンブロッティング等を用いてGPR48mRNA量を測定し、GPR48mRNAの低下を指標にして、GPR48の発現抑制薬をスクリーニングすることができる。

10

(ii) GPR48タンパク質の発現量を測定することによる方法

HCT116等の培養細胞に被検物質を加えて培養後、免疫蛍光染色、ウエスタンブロット、フローサイトメトリー、プロテインチップなどの抗原抗体反応によって、あるいはマズスペクトロメトリーなどによる解析によってGPR48タンパク質量を測定し、その低下を指標にして、GPR48の発現抑制薬をスクリーニングすることができる。

(iii) GPR48レポーターアッセイによる方法

ヒトGPR48遺伝子上流-1671までの転写制御領域をPCRで増幅し、ルシフェラーゼレポーターベクターのPGVBに導入し、PGVB-GPR48-1671を構築した。このPGVB-GPR48-1671をHCT116等の培養細胞に導入し、被検物質を加えて培養後、細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を測定し、その低下を指標にして、GPR48の発現抑制薬をスクリーニングすることができる。

20

【0014】

RT-PCRとしては、通常のRT-PCR又はリアルタイムRT-PCRでもよい。

ヒトGPR48（配列番号1）から、常法に従ってヒトGPR48mRNAを特異的に増幅するプライマーを設計する。プライマーの配列はヒトGPR48mRNA中の配列で特異的な増幅を示すものあれば特に制限するものではない。Gタンパク共役型受容体GPR48の配列中の適当な2つのプライマーを用いたRT-PCR法により、前記細胞におけるGPR48の発現量を調べることができる。

【0015】

抗原抗体反応を検出する方法に特に制限はないが、免疫組織染色（蛍光染色含む）、FACS（フローサイトメトリー）、イムノブロット法、ドットブロット法、ELISA等を用いることができる。

30

抗体は、ヒトGPR48（配列番号2）に対するペプチドを抗原として抗体を作成することができる。この抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。

抗原抗体反応を検出する方法の例を挙げると、本発明の抗体を、検体中に存在するGPR48と反応させ、更にこの抗体を認識するプローブを反応させる。このプローブとしては、抗ヒトIgG抗体、プロテインG、プロテインA、プロテインLなどが挙げられる。このプローブには通常標識を付す。この標識としては、放射性同位元素（¹²⁵I）、酵素（ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ）、蛍光物質、発光物質等が挙げられる。酵素抗体を用いた場合には、基質を反応させてその変化（着色等）を観察すればよい。

40

【0016】

cDNAマイクロアレイの場合には、ヒトGPR48（配列番号1）由来のmRNAに対応する多数のプローブ（DNA）を固定したDNAチップを用意する。一方、検査対象の細胞又は組織からRNA分画又はmRNAを調製し、これと相補的なDNAを蛍光色素で標識して合成する。これを上記DNAチップに対合させて蛍光を測定することにより、GPR48の発現を検出することができる。

ノーザンブロッティングの場合には、検体からRNA分画あるいはmRNAを調整した後、電気泳動により分画したRNAを、ゲルからニトロセルロース膜等に固定する。これにヒトGPR48（配列番号1）から作成した標識DNA（プローブ）に対合させて、発現する

50

mRNAを検出して、GPR48の発現を知ることができる。

マススペクトロメトリー（質量分析）解析には、検体からタンパク質を抽出し、質量分析機で分析し、GPR48のアミノ酸配列を持つ断片の量を測定することによりGPR48の発現を知ることができる。

プロテインチップ解析の場合には、検体からタンパク質を抽出し、GPR48の抗体等を固定したチップと反応させ、洗浄後、発色させプロテインチップ解析装置により量を測定することによりGPR48の発現を知ることができる。

以下、実施例にて本発明を例証するが本発明を限定することを意図するものではない。

【0017】

本実施例及び試験例において、定量的RT-PCR(QRT-PCR)法は以下の手順で行った。

培養細胞（又は凍結検体）にIsogen（和光社製）試薬を加え、ポリトロンホモジナイザーでホモジナイズし遠心し、エタノール沈殿し、RNAを抽出した。このRNAを鋳型にして、ランダムオリゴプライマーを用いてSuperScript Reverse Transcriptase（Invitrogen社製）でcDNAを合成した。

次にGPR48の発現量を定量するため、CAGTACCCAGTGAAGCCATT（配列番号3）及びTGTTGTCATCCAGCCACAGA（配列番号4）をヒトGPR48のプライマーセットとし、定量的RT-PCR（Cyber Green法）を行った。タックマン法等他のQRT-PCR法を用いてもよい。

耐熱性ポリメラーゼを含む反応液にプライマーセットと検体のcDNAを加え、リアルタイムPCR機（ロッシュ社製、Light Cycler）にセットし、94 15秒の熱変性のあと、54 20秒及び72 20秒のサイクル増幅を行うことによりGPR48mRNA量を定量した。

【0018】

また、本実施例及び試験例において、細胞の浸潤能は下記の方法で調べた。

マトリゲル浸潤チャンパー（Matrigel invasion chamber、BD Bioscience社製、24-well plate size）を用い、マトリゲル(matrigel)でコーティングされたPET膜（PET membrane、ポアサイズ8.0- μm ）のchamberの上にこれらの細胞を 5×10^4 cells/wellの数で播いた。チャンパーの下のウェル（well）中には、ケモアトラクタント（chemo-attractant）として10 $\mu\text{g/ml}$ フィブロネクチン（fibronectin、Roche製）を含んだ培地750 μl をいれた。36時間後、37 $^{\circ}\text{C}$ のCO₂インキュベーターから出して、綿棒でチャンパーの上の細胞を取り除き、マトリゲルを通り抜け、チャンパーの下へ浸潤した細胞をDiff-Quik kit（International Reagents Corporation社製）で染色し、顕微鏡で100倍拡大の条件で観察し、全視野の細胞を数えた。3回実験を行い、毎回の実験で1サンプルについて、3ウェルずつ実験を行った。

【0019】

実施例及び試験例において細胞内cAMPの測定は以下の手順で行った。

細胞内cAMPの測定にはDirect cAMP enzyme immunoassay キット（Sigma-Aldrich社）等を用いた。具体的には、上記細胞の培養培地を吸引して、直ちに0.1M HClを細胞の上にかけて、内因性のホスホジエステラーゼを失活させる。室温で10分後、600 gで遠心して得た上清を96ウェル-プレートに移して中和試薬を加える。さらにcAMP 抱合体（conjugate）及び抗cAMP抗体を入れ、2時間室温500rpmで振とうする。その後、well中の反応液を捨て洗浄用緩衝液で2回洗う。200 μl のp-NPP 基質を各ウェルに加えて室温で一時間インキュベートする。最後に50 μl のストップ液（stop solution）を加え405nmで吸光度を測る。各サンプルについて、3ウェルずつ実験する。標準曲線はcAMPを段階希釈した標準液を調整し、本プロトコルによりcAMP濃度を定量して検量線を作成し、これを用いて各サンプルのcAMP濃度を算出した。

【0020】

試験例 1

GPR48の癌細胞における機能を調べるためにGPR48発現プラスミド（pcDNA4-HisMax-hGPR48）をヒト大腸癌細胞HCT116にトランスフェクトし、導入された細胞をZeocinで選択し、安定発現細胞株（GPR48-19及びGPR48-33）を得た。また、比較のため、空ベクター（pcDNA4-Hi

10

20

30

40

50

sMax (R)、Invitrogen Corp.、図 1) をヒト大腸癌細胞HCT116にトランスフェクトし、導入された細胞をZeocinで選択し、安定発現細胞株(Vector 2及びVector 6)を得た。

これらの細胞におけるGPR48発現を、定量的RT-PCR法により調べた。その結果を図 2 に示す。pcDNA4-HisMax-hGPR48が導入されたGPR48-19及びGPR48-33においてGPR48mRNAが高発現していることが確認された。

次に、培養細胞の浸潤能を調べた。図 3 は、浸潤した細胞を染色した写真である。図 4 はその結果をグラフで表し、統計処理したものを示す。*印は、0.01以下の危険率で有意にGPR48-19, GPR48-33が対照のベクターより浸潤能が高いことを示す。

その結果、GPR48mRNAを高発現しているGPR48-19及びGPR48-33細胞は対照群のVector 2, Vector 6より明らかに浸潤能が高いことがわかった。

即ち、GPR48は癌細胞の浸潤を促進するといえる。

【 0 0 2 1 】

試験例 2

試験例 1 と同様に、恒常活性型GPR48発現プラスミド(pcDNA4-HisMax-hGPR48-T7551) をヒト大腸癌細胞HCT116にトランスフェクトし安定発現細胞株(GPR48-M6)を得た。各細胞における全GPR48量(内因性GPR48及び導入野生型GPR48、GPR48-T7551)をリアルタイムRT-PCR法により定量した。その結果を図 5 に示す。GPR48-19及びGPR48-M6では、対照群のvector-2の発現量(内因性GPR48mRNA量)の10倍以上の発現があった。

次に、GPR48-19, GPR48-M6及びVector 2の細胞 各 5×10^6 個をヌードマウス(BALB/c-nu/nu)皮下に接種し、6週間後、肺を摘出し、パラフィン抱埋し組織標本を作成した。転移を観察するため抗ヒトサイトケラチン抗体(Santa Cruz Biotechnology社製)で定法により免疫組織染色し、顕微鏡で観察した。その顕微鏡写真を図 6 に示す。その視野中の転移巢の数を図 7 (1) に示し、さらに小さな微小転移の数を図 7 (2) に示す。この結果より、野生型GPR48の導入により大腸癌細胞HCT116の転移能が増大することがわかった。

【 実施例 1 】

【 0 0 2 2 】

ヒトGPR48cDNA配列(配列番号 1)の451-469に相当する配列ggacttgttcagttacggc(No.1、配列番号 5)、356-374に相当する配列cagtaccagtggaagccat(No.2、配列番号 6)、735-753に相当する配列agcccgctcctagccttaa(No.3、配列番号 7)、1900-1918に相当する配列gataacagcctccaggacc(No.4、配列番号 8)のオリゴヌクレオチドを合成し、それをpSuper RNAi vector(Oligoengine社)に導入してpSuper-GPR48-KDプラスミドを作成した。対照としてスクランブル配列ttctccgaacgtgtcacgt(配列番号 10)を挿入したpSuper-Scrambleを作成した。

ノックダウンの効率を確かめるためにHepG2細胞(ATCCから入手)にpcDNA4-HisMax-hGPR48とこれらのプラスミドをコトランスフェクションし、GPR48の発現抑制効果を定量的RT-PCR法で解析した。

その結果を図 8 に示す。GPR48の発現抑制効果はNo.1が最も強かったが、No.2、3、4のいずれも十分な発現抑制効果を示した。

【 0 0 2 3 】

GPR48が比較的高発現しているヒト子宮頸癌細胞HeLa細胞にリポフェクション法でNo.1の配列を持つpSuper-GPR48-KDプラスミドをトランスフェクションして、ハイグロマイシンで選択しpSuper-GPR48-KDが導入されたクローン(GPR48-KD1及びGPR48-KD4)を樹立した。対照としてpSuper-Scrambleの安定発現細胞株(V1及びV3)を樹立した。

抗GPR48(実施例 4 の抗体)を用いた免疫蛍光染色を図 9 に示す。(1)はHeLa細胞にpSuperプラスミドを導入した対照群の浸潤細胞を示し、(2)はHeLa細胞にNo.1の配列を持つpSuper-GPR48-KDプラスミドを導入した対照群の浸潤細胞を示す。この結果、pSuper-GPR48-KDが導入されたことによりGPR48タンパク質の発現が抑制されていることが確認された。

また定量的RT-PCR法による解析結果を図 10 に示す。この結果、pSuper-GPR48-KDが導入されたことによりGPR48mRNAの発現が抑制されていることが確認された。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 4 】

これらの細胞株を用いて浸潤能を調べた。その結果を図 1 1 及び図 1 2 に示す。GPR48-KD1及びGPR48-KD4はV 1 及びV 3 に比べて明らかに浸潤能が低下している。

これらの結果は、GPR48は癌細胞の浸潤を促進する機能を持っており、siRNAによるノックダウン等でGPR48の発現量を抑制することにより癌の浸潤能を抑えることができることを示す。

【 実施例 2 】

【 0 0 2 5 】

ヒトGPR48cDNA配列(配列番号1)の355-373に相当する配列(ヒト及びマウス両方に共通な配列)CAGTACCCAGTGAAGCCAT(配列番号9)のオリゴヌクレオチドを合成し、それをpSuper RNAi vector (Oligoengine社)に導入してpSuper-GPR48-KDプラスミドを作成した。このプラスミドをマウスLewis肺癌細胞LLCにトランスフェクションし、150 µg/mlのhygromycinを培養液に添加して、hygromycin耐性コロニーを選別し、GPR48の発現が低下したクローン(GPR48-KD3、GPR48-KD28)を選別した。このノックダウン細胞(GPR48-KD3、GPR48-KD28)並びに対照としてpSuper-Scrambleの安定発現細胞株(V 1 及びV 3)をC57BL/6マウス皮下に 5×10^5 個接種し、4週間後、肺を摘出し表面を観察し、コロニー数を数えた。このコロニー数を図 1 3 に示す。この結果よりpSuper-GPR48 siRNAの導入によりマウスLewis肺癌細胞LLCの肺転移を抑制ことが示された。

【 実施例 3 】

【 0 0 2 6 】

実施例 1 で得たV1及びGPR48-KD4細胞を細胞 1×10^6 個をヌードマウス(BALB/c-nu/nu)尾静脈より投与し、6週間後、肺を摘出し、パラフィン抱埋し組織標本を作成した。転移を観察するため抗ヒトサイトケラチン抗体(Santa Cruz Biotechnology社製)で定法により免疫組織染色し、顕微鏡で観察した。その顕微鏡写真を図 1 4 に示す。その視野中の転移巣の数を図 1 5 (1) に示し、さらに小さな微小転移の数を図 1 5 (2) に示す。この結果よりpSuper-GPR48-siRNAの導入によりヒト子宮頸部癌細胞HeLaの肺転移が抑制されることが示された。

【 実施例 4 】

【 0 0 2 7 】

本実施例では、GPR48に対する中和抗体を作成した。GPR48が7回膜貫通型受容体であることからリガンド結合部位は細胞外ドメインであると予想し、ヒトGPR48(配列番号2)の細胞外部位と考えられるアミノ酸339から350の配列をもつ合成ペプチド(CQEQKMLRTLTL、配列番号11)を抗原とした。この合成ペプチドをKLHと結合させ、ウサギに4回免疫した。抗体価が上がったのを確認し、全採血して抗血清を得た。抗原であるこのペプチドを共有結合させたレジンを作成し、これに抗血清を吸着させて洗浄後、低pH溶出液により溶出させて中和し、精製抗ヒトGPR48抗体とした。

GPR48発現ベクター-pcDNA4-HisMax-hGPR48をトランスフェクションした293細胞(ATCCから入手)の抽出液をSDSポリアクリルアミド電気泳動で分離し、ウェスタンブロット解析した。その結果、分子量104kDにヒトGPR48のバンドが検出された。また、図 9 に示すように、この抗体は、免疫蛍光染色がGPR48の発現量に対応した反応性を示すことから、GPR48に対する特異抗体であることが確認された。

【 0 0 2 8 】

次に、GPR48を安定発現しているヒト大腸癌細胞株HCT116由来GPR48-19細胞を用いて、この抗GPR48抗体の浸潤能への影響について検討した。 5×10^4 cells/ウェルのHCT-GPR48細胞をチャンパーの上に播いて、抗GPR48抗体又はコントロールIgG(Sigma社から入手)を8 µg/mlを加えた。ケモアトラクタントとしては10 µg/ml フィブロネクチン(Roche)を含んだ培地750 µlを用いた。36時間後、マトリゲルを通り抜けてチャンパーの下へ浸潤した細胞を染色したのちカウントした。1サンプルについて3ウェルずつ3回の実験を行った。

その結果を図 1 6 に示す。コントロールIgGで処理したGPR48-19細胞は高い浸潤能を示した。一方、抗GPR48抗体処理群(GPR48-19-GPR48)は、コントロール抗体処理群(GPR48

10

20

30

40

50

-19-IgG) に比べて、GPR48-19細胞の浸潤能を有意に阻害した。この抗GPR48抗体はGPR48に結合しその機能を阻害し、GPR48依存的浸潤を阻害する中和抗体であることが示された。このことはGPR48の中和抗体が転移抑制を目的とした治療に有用であることを意味している。

【実施例 5】

【0029】

ヒトGPR48cDNA(配列番号1)の2264番目のシトシンをチミンに変換することにより第4膜貫通領域に存在する755番目のスレオニン残基をイソロイシンに置換したヒトGPR48-T755I cDNAを作成し、pcDNA-HisMaxベクターに導入した。このpcDNA-HisMax-hGPR48-T755Iあるいは野生型pcDNA-HisMax-hGPR48あるいはpcDNA-HisMax空ベクターをHEK293細胞にトランスフェクトし、細胞内cAMPを測定したところ、空ベクターを導入した細胞(Vector)に比べ、野生型GPR48導入細胞(GPR48)が高いcAMP値を示した。図17に示すように恒常的活性化型GPR48導入細胞(GPR48-M)は著しく高いcAMP値を示し、常にアデニル酸シクラーゼを活性化する恒常的活性化型変異体であることがわかる。さらにヒト大腸癌細胞HCT116細胞にこれらのプラスミドをトランスフェクトし、Zeocinによって選択して、安定発現細胞を得た。図18にマトリゲル浸潤アッセイによりこれらの細胞の浸潤能を測定した結果を示す。空ベクターを導入した細胞(Vector2,6)に比べ、野生型GPR48導入細胞(GPR48-19,33)が高い浸潤能を示し、恒常的活性化型GPR48導入細胞(GPR48-M6,M8)はさらにそれより高い浸潤能を示した。

これらの結果より、野生型GPR48及び恒常活性化型GPR48をHCT116等の細胞に導入したGPR48高発現細胞の示す上昇した浸潤能を阻害する活性を指標にGPR48のアンタゴニストをスクリーニングすることができる。さらにこのアッセイを用いれば被検物質の作用機序を推察できる。すなわち被検物質が野生型GPR48の浸潤能を低下させ恒常活性化型GPR48の浸潤能を低下させない場合は、GPR48のリガンド(未知)と拮抗する物質であることが予想される。一方両方の浸潤能を低下させた場合はリガンド拮抗物質でなく、GPR48とリガンドの結合以降～浸潤能発現までの細胞内シグナル伝達経路を阻害することが予想できる。

【実施例 6】

【0030】

ヒトGPR48遺伝子(配列番号1)の転写開始点上流-1671までの転写制御領域(配列番号12)をPCRで増幅し、ルシフェラーゼレポーターベクターのPGVBに導入し、PGVB-GPR48-1671を構築した。このPGVB-GPR48-1671を親株のHCT116細胞及びp27^{Kip1}を片側ノックアウトしたHCT116細胞(HCT-p27-hKO)にトランスフェクトし、48時間培養後、細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を測定した。細胞抽出液を調整し、ルシフェラーゼ活性の測定にはピッカジーンキット(東洋インキ社製)を用いた。その結果図19に示す様にHCT-p27-hKO(p27+/-)でルシフェラーゼ活性が3倍以上増加していた。この結果は、図20に示すQRT-PCRの結果と同様の傾向を示し、GPR48の発現量の測定に本レポーターアッセイがQRT-PCRの代用として用いることができることを示している。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】試験で用いたベクターpcDNA4-HisMax(Invitrogen Corp.)のマップおよび挿入可能部位を示す図である。BamHIとEcoRIの間にGPR48のcDNAが挿入されている。

【図2】GPR48発現プラスミドを導入したヒト大腸癌細胞におけるGPR48mRNAの発現量を示す図である。縦軸はGPR48mRNAの相対量を示す。

【図3】GPR48発現プラスミドを導入したヒト大腸癌細胞において細胞が浸潤していることを示す写真である。各写真の横幅は0.34mmである。灰色の点はマトリゲルでコーティングされたPET membraneのポア(穴)、黒色の点は浸潤して通り抜けた細胞を示す。(1)はHCT116細胞にpcDNA4-HisMaxベクターを導入した対照群の浸潤細胞を示し、(2)はHCT116細胞にpcDNA4-HisMax-GPR48を導入したGPR48高発現細胞の浸潤細胞を示す。

【図4】GPR48発現プラスミドを導入したヒト大腸癌細胞において浸潤した細胞数を示す図である。縦軸は、マトリゲルでコーティングされたPET membrane(ポアサイズ8.0- μ m)

10

20

30

40

50

のポア（穴）を浸潤して通り抜けた細胞の数（1チャンパーあたりの浸潤細胞の総数）を示す。

【図5】GPR48発現プラスミドを導入したヒト大腸癌細胞安定発現細胞株（GPR48-M6）におけるGPR48mRNAの発現量を示す図である。縦軸はGPR48mRNAの相対量を示す。

【図6】空ベクター（Vector2）および恒常活性型GPR48-T755I（GPR48-M6）の安定発現細胞株を接種したマウスの肺の組織標本を免疫染色した顕微鏡写真である。矢印で示すのが大きな転移巣（macroscopic-metastasis）で、さらに小さな微小転移（microscopic-metastasis）は矢頭で示した。図中のスケールバーは100 μmを示す。

【図7】GPR48発現プラスミドを導入したマウスの大腸癌細胞の転移巣の数を示す図である。縦軸はマウス1匹あたりの6つの肺セクションの転移数の合計の各群9匹の平均を示す。（1）は図6の視野中の転移巣の数を示し、（2）はさらに小さな微小転移の数を示す。

【図8】siRNA（No.1）によりノックダウンした癌細胞（HepG2細胞）のGPR48発現量を示す図である。縦軸は、対照のpSuper-Scrambleに対する相対値を示す。

【図9】siRNA（No.1）によりノックダウンした癌細胞（HepG2細胞）抗GPR48抗体を用いた免疫蛍光染色を示す図である。（1）はHeLa細胞にpSuperプラスミドを導入した対照群の浸潤細胞を示し、（2）はHeLa細胞にNo.1の配列を持つpSuper-GPR48-KDプラスミドを導入した対照群の浸潤細胞を示す。

【図10】GPR48mRNAを定量的RT-PCR法で定量した結果を示す図である。

【図11】浸潤した細胞の染色写真を示す図である。各写真の横幅は0.34mmである。灰色の点はマトリゲルでコーティングされたPET membraneのポア（穴）、黒色の点は浸潤して通り抜けた細胞を示す。（1）はHeLa細胞にpSuperプラスミドを導入した対照群の浸潤細胞を示し、（2）はHeLa細胞にNo.1の配列を持つpSuper-GPR48-KDプラスミドを導入した対照群の浸潤細胞を示す。

【図12】浸潤した細胞数を示す図である。

【図13】マウスリス肺癌細胞LLCのGPR48をノックダウンした細胞（GPR48-KD3、GPR48-KD28）をマウス皮下に接種し、肺表面に転移したコロニー数を示す図である。縦軸はマウス1匹あたりのコロニー数の合計の各群8匹の平均を示す。

【図14】ノックダウン細胞（GPR48-KD4）及びpSuper-Scrambleの安定発現細胞株（V1）を接種したマウスの肺の組織標本を免疫染色した顕微鏡写真である。矢印で示すのが大きな転移巣（macroscopic-metastasis）で、さらに小さな微小転移（microscopic-metastasis）は矢頭で示した。図中のスケールバーは100 μmを示す。

【図15】ノックダウン細胞（GPR48-KD4）を導入したマウスの大腸癌細胞の転移巣の数を示す図である。縦軸はマウス1匹あたりの6つの肺セクションの転移数の合計の各群9匹の平均を示す。（1）は図14の視野中の転移巣の数を示し、（2）はさらに小さな微小転移の数を示す。

【図16】GPR48の中和抗体で処理した癌細胞（HCT116）の浸潤能を示す図である。

【図17】細胞内cAMPを示す図である。縦軸はcAMPの産生量（pmole）を示す。

【図18】マトリゲル浸潤アッセイの結果を示す図である。縦軸はマトリゲル膜を通過した細胞の総数を示す。

【図19】ルシフェラーゼ活性を示す図である。縦軸はWTのルシフェラーゼ活性の平均を1とした相対的ルシフェラーゼ活性を示す。

【図20】GPR48mRNA量を示す図である。縦軸はWTのGPR48mRNA量の平均を1とした相対的GPR48mRNA量を示す。

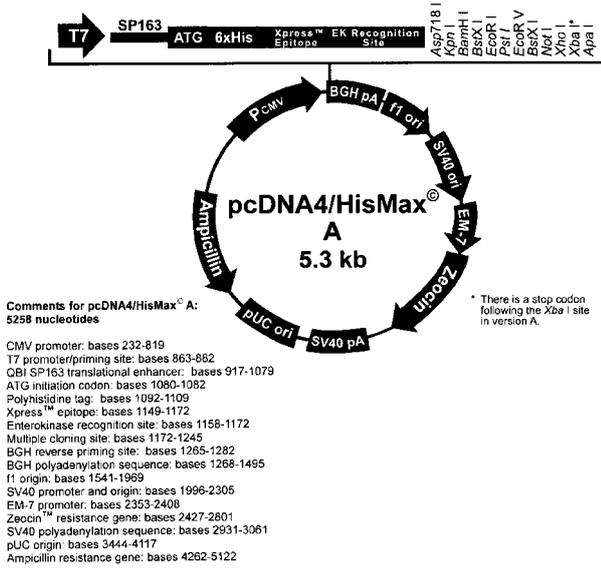
10

20

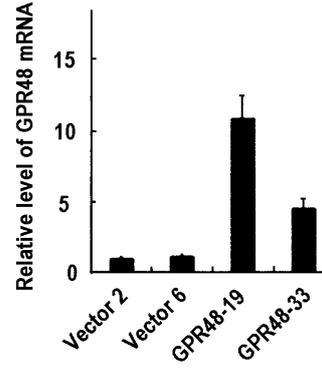
30

40

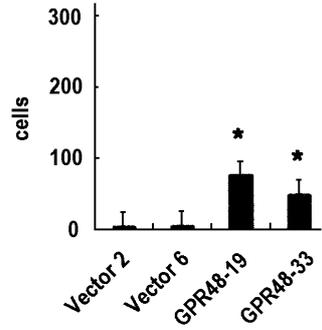
【 1 】



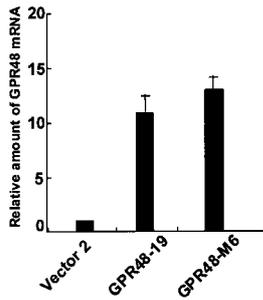
【 2 】



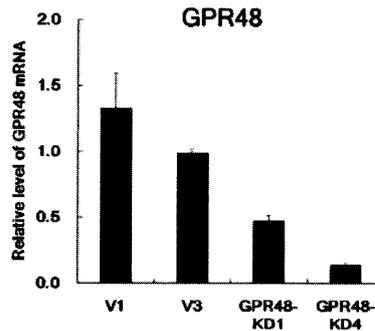
【 4 】



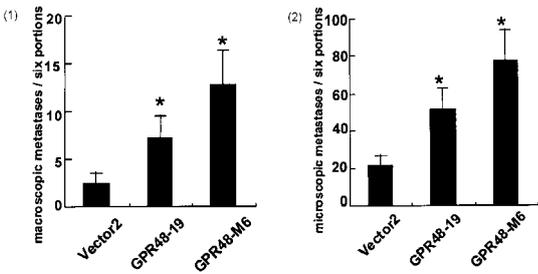
【 5 】



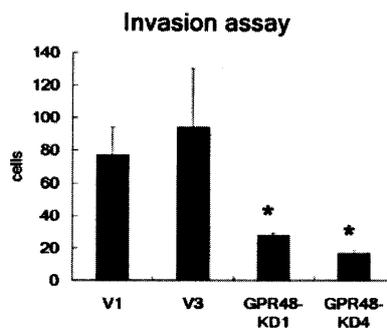
【 10 】



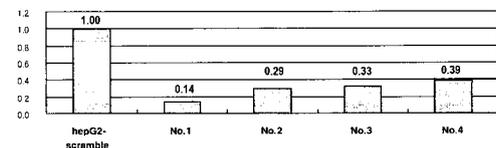
【 7 】



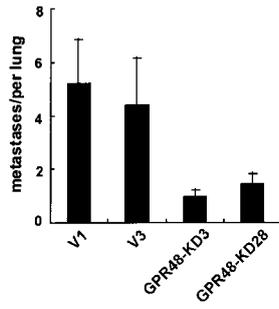
【 12 】



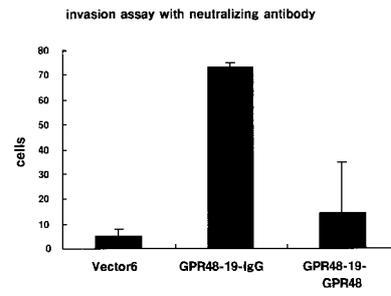
【 8 】



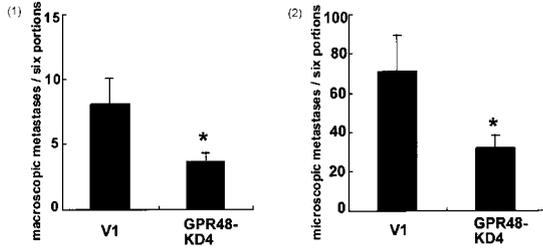
【 1 3 】



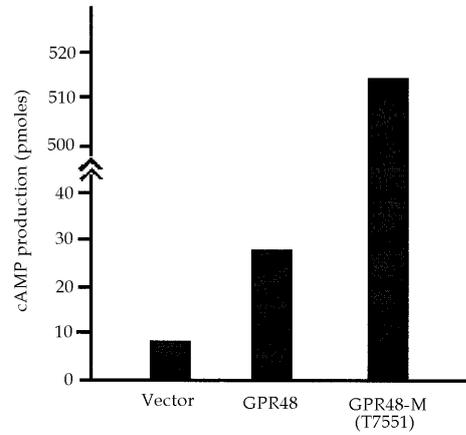
【 1 6 】



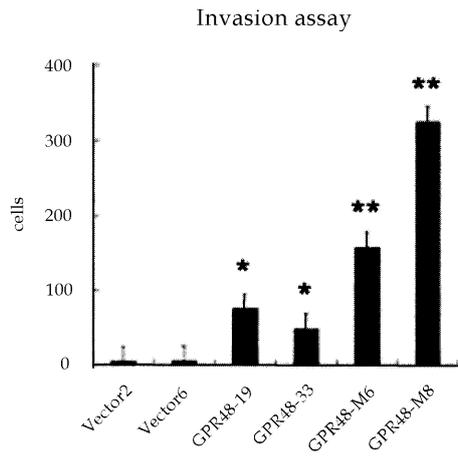
【 1 5 】



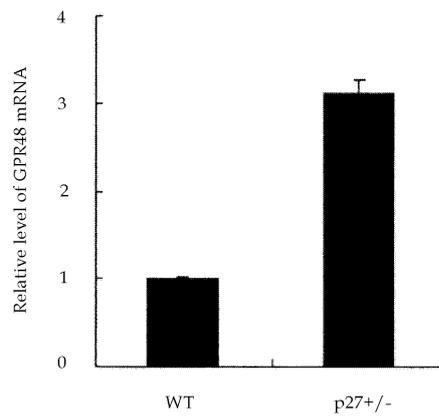
【 1 7 】



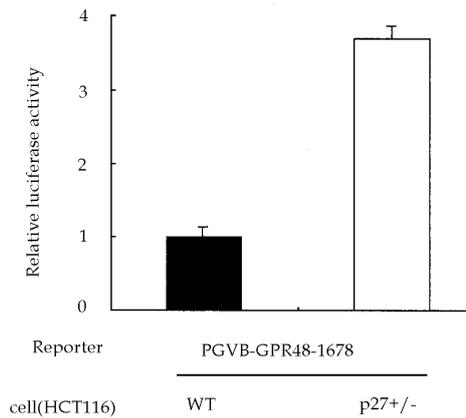
【 1 8 】



【 2 0 】

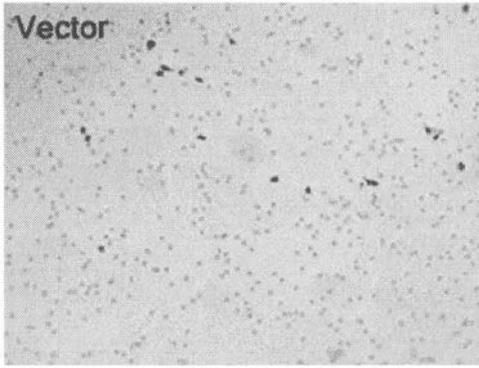


【 1 9 】

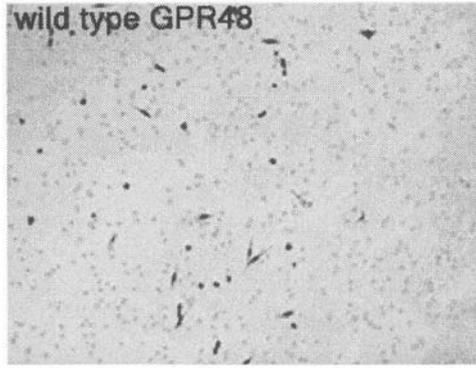


【 図 3 】

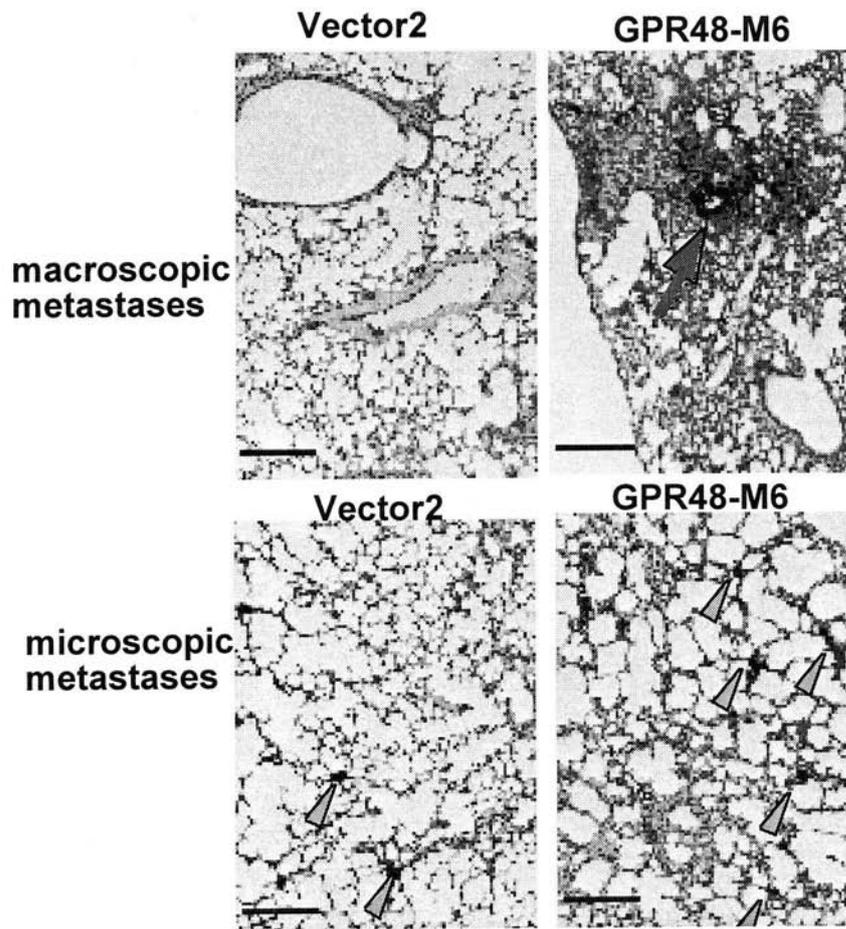
(1)



(2)

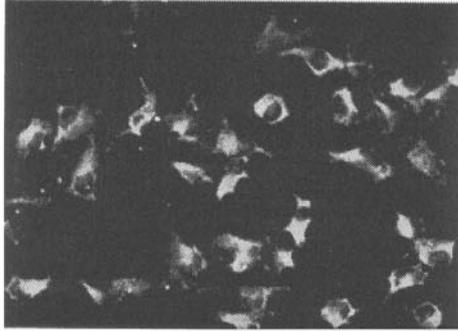


【 図 6 】



【 図 9 】

(1)

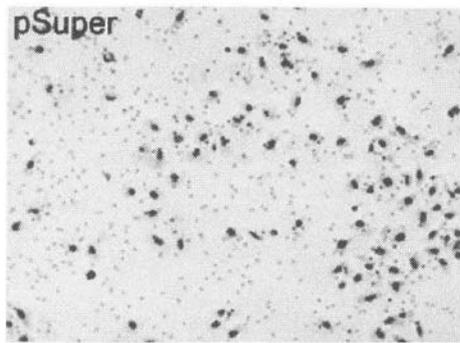


(2)

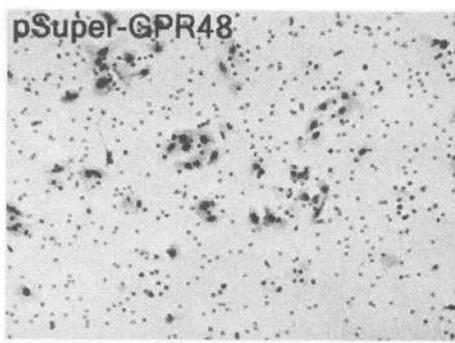


【 図 11 】

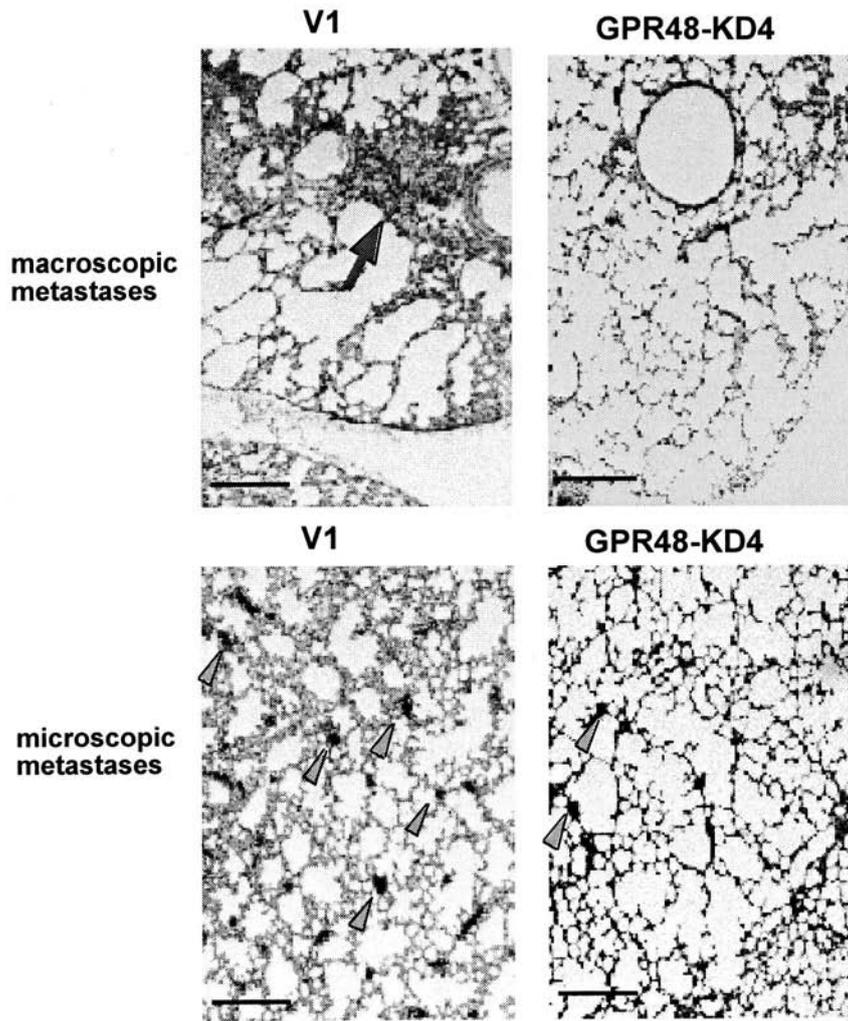
(1)



(2)



【 図 1 4 】



【 配列表 】

[2006112401000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2006/307950
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K39/395 (2006.01), A61K48/00 (2006.01), A61P35/04 (2006.01), C12Q1/02 (2006.01), C12N15/09 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K39/00-48/00, A61P1/00-43/00, C12N15/00-15/09, C12Q1/00-1/02 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 01/92297 A2 (BAYER AG.), 06 December, 2001 (06.12.01), Full text; particularly, Claims & AU 200181791 A & EP 1290030 A2 & US 2003/0139341 A1	1-5 6,7
Y	JP 2000-509024 A (Boehringer Ingelheim International GmbH.), 18 July, 2000 (18.07.00), Full text & DE 19613691 A1 & WO 97/37678 A1 & AU 9725085 A & EP 896543 A1 & US 6383733 B1 & US 2002/0127542 A1	6,7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 May, 2006 (24.05.06)		Date of mailing of the international search report 30 May, 2006 (30.05.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/307950

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LOH, E.D. et al., Molecular Characterization of a Novel Glyco-protein Hormone G-Protein-Coupled Receptor. Biochem.Biophys.Res.Comm., 2001, 282, pages 757 to 764	1-7
A	JP 2003-502012 A (Roland KREUTZER), 21 January, 2003 (21.01.03), & WO 00/44895 A1 & DE 19956568 A1 & AU 200032713 A & EP 1144623 A1 & EP 1214945 A2 & ZA 200105909 A & US 2004/0053875 A1 & US 2004/0072779 A1 & US 2004/0102408 A1 & DE 10066235 A1 & US 2005/0100907 A1 & AU 2005201044 A1 & EP 1550719 A1	1-5
A	JP 2003-125780 A (Mitsubishi Pharma Corp.), 07 May, 2003 (07.05.03), (Family: none)	6,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/307950

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/307950

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)Regarding Claims 1 to 7

There are found the following three invention groups in claims 1 to 7 of the present application:

(1) a therapeutic composition for cancer, comprising a neutralizing antibody against GPR48 as the active ingredient (the inventions of claims 1 to 3);

(2) a therapeutic composition of cancer, comprising an oligoribonucleotide capable of inhibiting the expression of GPR48, an oligoribonucleotide complementary to the oligoribonucleotide or double-stranded RNA composed of these oligoribonucleotides as the active ingredient (the inventions of claims 4 and 5); and

(3) a method for screening for a substance capable of inhibiting the metastasis/invasion capability of cancer (the inventions of claims 6 and 7).

Although the technical matter common to these inventions is considered to be reside in being a therapeutic composition for cancer, this matter is well known to persons skilled in the art and cannot hence be regarded as a special technical feature common to these inventions. In addition, because the active ingredients of the invention groups (1) and (2) are different from each other and GPR48 is already known, it is not considered that there is a special technical feature common to the invention groups (1) and (2).

Thus, there are found the three invention groups as mentioned above which are not so linked as to form a single inventive concept, in claims 1 to 7.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2006/307950									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K39/395 (2006.01), A61K48/00 (2006.01), A61P35/04 (2006.01), C12Q1/02 (2006.01), C12N15/09 (2006.01)											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K 39/00-48/00, A61P 1/00-43/00, C12N 15/00-15/09, C12Q 1/00-1/02											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2006年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2006年	日本国実用新案登録公報	1996-2006年	日本国登録実用新案公報	1994-2006年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2006年										
日本国実用新案登録公報	1996-2006年										
日本国登録実用新案公報	1994-2006年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS (STN), Caplus (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
X	WO 01/92297 A2 (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT) 2001.12.06, 全文参照, 特に請求の範囲, & AU 200181791 A & EP 1290030 A2	1-5									
Y	& US 2003/0139341 A1	6, 7									
Y	JP 2000-509024 A (ヘーリンガー インゲルハム インターナショナル ゲゼルシャフト ミット ベシユンクテル ハフツング) 2000.07.18, 全文参照, & DE 19613691 A1 & WO 97/37678 A1 & AU 9725085 A & EP 896543 A1 & US 6383733 B1 & US 2002/0127542 A1	6, 7									
☞ C欄の続きにも文献が列挙されている。		☞ パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 24.05.2006		国際調査報告の発送日 30.05.2006									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 荒木 英 則	4C 9736								
		電話番号 03-3581-1101 内線	3452								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 0 7 9 5 0
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	LOH, E. D., <i>et al.</i> , Molecular Characterization of a Novel Glyco- protein Hormone G-Protein-Coupled Receptor. <i>Biochem. Biophys.</i> <i>Res. Commun.</i> , 2001, 282, pp.757-764	1 - 7
A	JP 2003-502012 A (ロ-ラント・クイツァー) 2003.01.21, & WO 00/44895 A1 & DE 19956568 A1 & AU 200032713 A & EP 1144623 A1 & EP 1214945 A2 & ZA 200105909 A & US 2004/0053875 A1 & US 2004/0072779 A1 & US 2004/0102408 A1 & DE 10066235 A1 & US 2005/0100907 A1 & AU 2005201044 A1 & EP 1550719 A1	1 - 5
A	JP 2003-125780 A (三菱ウェルファーマ株式会社) 2003.05.07 (ファミリーなし)	6, 7

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2006/307950

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。
(別紙参照のこと。)

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2005年4月)

第Ⅲ欄の続き
請求の範囲1-7について

本願の請求の範囲1から7には、以下の3つの発明が記載されているものと認められる。

- 1) GPR48 に対する中和抗体を主成分とする癌治療用組成物 (請求の範囲1から3に係る発明)
- 2) GPR48 の発現を阻害するオリゴリボヌクレオチド、その相補的オリゴリボヌクレオチド、又はこれらからなる2本鎖 RNA を主成分とする癌治療用組成物 (請求の範囲4及び5に係る発明)
- 3) 癌の転移浸潤能を阻害する薬剤のスクリーニング方法 (請求の範囲6及び7に係る発明)

ここで、これらの発明に共通の技術的事項は癌治療用組成物にあるものと認められるが、当該事項は当業者に周知のものであり、これをもって共通する特別の技術的特徴ということとはできない。また、1)と2)とはその主成分が異なり、かつ、GPR48は公知のものであるから、1)と2)の間に共通する特別の技術的特徴があるものともいえない。

したがって、請求の範囲1から7には、相互に発明の単一性を有さない上記3つの発明が記載されている。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/66 (2006.01)	C 1 2 Q 1/66	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ13 QQ22 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR42
 QR50 QR55 QR62 QR77 QS25 QS28 QS34 QS36 QS39 QX02
 4C084 AA13 AA17 MA01 NA14 ZB262
 4C085 AA13 CC32 DD88 EE01 GG01
 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26
 4H045 AA11 AA30 CA40 DA75 EA20 FA74

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。