

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-14288
(P2014-14288A)

(43) 公開日 平成26年1月30日(2014.1.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	2G045
C07K 7/08 (2006.01)	C07K 7/08	4B024
C07K 14/47 (2006.01)	C07K 14/47	4C084
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	4H045
A61K 38/00 (2006.01)	A61K 37/02	

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-152395 (P2012-152395)
(22) 出願日 平成24年7月6日(2012.7.6)

(71) 出願人 304020177
国立大学法人山口大学
山口県山口市吉田1677-1
(74) 代理人 100107984
弁理士 廣田 雅紀
(74) 代理人 100102255
弁理士 小澤 誠次
(74) 代理人 100096482
弁理士 東海 裕作
(74) 代理人 100120086
弁理士 ▲高▼津 一也
(74) 代理人 100131093
弁理士 堀内 真

最終頁に続く

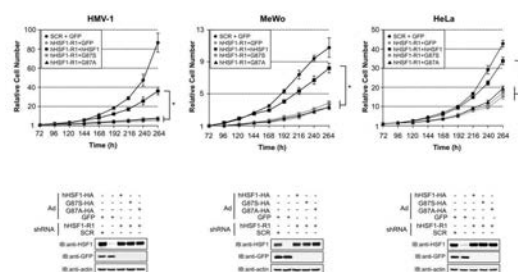
(54) 【発明の名称】 HSF1とRPA1との相互作用阻害ペプチド

(57) 【要約】

【課題】HSF1が、がん治療のターゲットとして大きな注目を集めているが、現在なおHSF1の活性を抑える物質は見出されていない。本発明の課題は、HSF1とRPA1との相互作用阻害活性を有する物質や、かかる物質を含んでなるHSF1とRPA1との相互作用阻害剤や、かかる物質を含んでなる抗腫瘍剤や、かかる物質を非ヒト動物に投与することを特徴とする腫瘍の予防・治療法や、抗腫瘍剤のスクリーニング方法を提供することにある。

【解決手段】HSF1のwing領域がRPA1のssDNA結合ドメインと相互作用することを見出した。さらに、HSF1におけるwing領域のアミノ酸置換や、RPA1のssDNA結合ドメインのアミノ酸置換により、HSF1とRPA1との複合体の形成、つまりHSF1とRPA1との相互作用を阻害すると、腫瘍細胞の一つであるメラノーマ細胞の増殖が顕著に抑制されることを見出し、本発明を完成した。

【選択図】図6



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (A) ~ (F) のいずれかのペプチド又はその塩。

(A) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるペプチド；

(B) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、配列番号 1 の 4 番目のグリシン残基を除く、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ H S F 1 (heat shock factor 1) と R P A 1 (replication protein A 1) との相互作用阻害活性を有するペプチド；

(C) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ H S F 1 と R P A 1 との相互作用阻害活性を有するペプチド；

(D) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるペプチド；

(E) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ H S F 1 と R P A 1 との相互作用阻害活性を有するペプチド；

(F) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 85% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ H S F 1 と R P A 1 との相互作用阻害活性を有するペプチド；

【請求項 2】

ペプチドが、H S F 1 の w i n g 領域と R P A 1 の s s D N A 結合ドメインとの相互作用阻害活性を有することを特徴とする請求項 1 記載のペプチド又はその塩。

【請求項 3】

以下の (A) ~ (F) のいずれかのペプチドをコードする D N A 。

(A) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるペプチド；

(B) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、配列番号 1 の 4 番目のグリシン残基を除く、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ H S F 1 (heat shock factor 1) と R P A 1 (replication protein A 1) との相互作用阻害活性を有するペプチド；

(C) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ H S F 1 と R P A 1 との相互作用阻害活性を有するペプチド；

(D) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるペプチド；

(E) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ H S F 1 と R P A 1 との相互作用阻害活性を有するペプチド；

(F) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 85% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ H S F 1 と R P A 1 との相互作用阻害活性を有するペプチド；

【請求項 4】

請求項 3 記載の D N A を含み、かつ H S F 1 と R P A 1 との相互作用阻害活性を有するペプチドを発現することができる組換えベクター。

【請求項 5】

請求項 1 又は 2 記載のペプチド又はその塩を含んでなる H S F 1 と R P A 1 との相互作用阻害剤。

【請求項 6】

請求項 1 又は 2 記載のペプチド又はその塩を含んでなる抗腫瘍剤。

【請求項 7】

請求項 1 又は 2 記載のペプチド又はその塩に特異的に結合する抗体。

【請求項 8】

請求項 1 又は 2 記載のペプチド又はその塩を非ヒト動物に投与することを特徴とする腫瘍の予防・治療法。

【請求項 9】

次の工程 (A)、(B) を順次備えたことを特徴とする、抗腫瘍剤のスクリーニング方法。

。

10

20

30

40

50

(A) H S F 1 と R P A 1 とを、被検物質の存在下に接触させ、H S F 1 と R P A 1 との相互作用阻害活性を検出する工程；

(B) 対照と比較して前記相互作用阻害活性が高い被検物質を選択する工程；

【請求項 10】

H S F 1 と R P A 1 との接触が、H S F 1 の w i n g 領域と R P A 1 の s s D N A 結合ドメインとの接触であることを特徴とする、請求項 9 記載のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、H S F 1 (heat shock factor 1) と R P A 1 (replication protein A 1) と 10

の相互作用阻害活性を有するペプチドおよびこのペプチドをコードする D N A や、かかる D N A を含んだ組換えベクターや、かかるペプチドを含んでなる H S F 1 と R P A 1 との相互作用阻害剤や、かかるペプチドを含んでなる抗腫瘍剤や、かかるペプチドに特異的に結合する抗体や、かかるペプチドを非ヒト動物に投与することを特徴とする腫瘍の予防・治療法や、抗腫瘍剤のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞は、細胞内のタンパク質の質と量を一定に保つ機構、つまりタンパク質ホメオスタシスの維持機構を有しており、維持機構は、主に、タンパク質が正しくフォールディング 20
するのを介助する過程と、ミスフォールディングを行ったタンパク質を分解する過程からなる。この細胞内タンパク質のミスフォールディングに対する緩衝作用の容量は、タンパク質ホメオスタシス容量とよばれ、老化、神経疾患等のタンパク質ミスフォールディング病、さらにはがんの発症と密接に関連していることが分ってきた。タンパク質ホメオスタシス容量の重要な調節機構の 1 つが熱ショック応答である。この応答は、タンパク質毒性を持つストレスに対して、タンパク質フォールディングや分解を担う熱ショックタンパク質である H S P (heat shock protein)、及び、非 H S P タンパク質の誘導を特徴とし、熱ショック因子である H S F (heat shock factor) により転写のレベルで調節される。

H S F は哺乳動物細胞において 3 種類 (H S F 1、H S F 2、H S F 4) が明らかにされているが、このうち、H S F 1 が、はじめてがん治療のターゲットとして示唆されたのは前立腺がんにおけるその発現上昇の発見にさかのぼる (非特許文献 1)。この発見は特定のがんにおける H S F 1 発現量とがんとの相関関係を示したものであり、特別な例と考えられていた。しかし、2007 年の D a i らの発見により、H S F 1 はがん治療のターゲットとして大きな注目を集めることとなった (非特許文献 2)。彼らは、様々ながん細胞株の増殖が H S F 1 ノックダウンにより顕著に抑制されることを示し、がん細胞の増殖が H S F 1 に依存することを示した。ここで重要なことは、正常な細胞増殖は H S F 1 のノックダウンの影響を受けず、これはがん細胞に特異的な作用であったことである。発明者らも、新しくメラノーマ細胞株の増殖が H S F 1 に依存することを明らかにした (非特許文献 3)。つまり、H S F 1 をターゲットとしてがん細胞の増殖を抑制する化合物を見いだすことができれば、がんの治療に大きく貢献できると考えられた。その後、大規模な 40
臨床解析が行われ、乳がんや肝細胞がんの患者組織でも H S F 1 の活性化ががん細胞の悪性度と関連することが明らかとなってきた (非特許文献 4、5)。

【0003】

しかしながら、今日まで H S F 1 の活性を特異的に抑制する物質は見つかっていない。一般に、このような物質のスクリーニング方法として、熱ストレスを暴露した後の熱ショック遺伝子プロモーターを持つレポーターによるレポーターアッセイ法で調べるが、転写機構全般に作用する、あるいは他の経路に作用して細胞毒性がある場合などがあり、従来のスクリーニング系で H S F 1 を特異的にターゲットとする物質の同定が困難となっているのが現状である。近年、発明者らは、H S F 1 と R P A 1 (replication protein A 1) の複合体はヌクレオソーム構造をとる D N A にアクセスすることを明らかにしたが (非 50

特許文献 6)、この複合体とがん細胞の増殖との関係は全く明らかにされていなかった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】Hoang et al. Am. J. Pathol. 156, 857-864, 2000

【非特許文献 2】Dai et al. Cell 130, 1005-1018, 2007

【非特許文献 3】Nakamura et al. J. Dermatol. Sci. 60, 187-192, 2010

【非特許文献 4】Santagata et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 118 no.45, 18378-18383, 2011

【非特許文献 5】Fang et al. Cancer 118 no.7, 1782-1794, 2012

10

【非特許文献 6】藤本ら、第 34 回日本分子生物学会年会プログラム p161, 2011

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

H S F 1 が、がん治療のターゲットとして大きな注目を集めているが、現在なお H S F 1 の活性を抑える物質は見出されていない。本発明の課題は、H S F 1 と R P A 1 との相互作用阻害活性を有する物質や、かかる物質を含んでなる H S F 1 と R P A 1 との相互作用阻害剤や、かかる物質を含んでなる抗腫瘍剤や、かかる物質を非ヒト動物に投与することを特徴とする腫瘍の予防・治療法や、抗腫瘍剤のスクリーニング方法を提供することにある。

20

【課題を解決するための手段】

【0006】

H S F 1 の活性を抑える物質の開発が急がれる中で、本発明者らは、H S F 1 に相互作用するタンパク質とがんとの関係に着目し、H S F 1 の *winged helix-turn-helix* 型の DNA 結合ドメイン (DNA-binding domain:DBD) のうち、*wing* 領域が R P A 1 の *single-strand DNA* (ssDNA) 結合ドメインと相互作用することを見出した。さらに、H S F 1 における *wing* 領域のアミノ酸置換や、R P A 1 の *ssDNA* 結合ドメインのアミノ酸置換により、H S F 1 と R P A 1 との複合体の形成、つまり H S F 1 と R P A 1 との相互作用を阻害すると、腫瘍細胞の一つであるメラノーマ細胞の増殖が顕著に抑制されることを見出し、本発明を完成するに至った。

30

【0007】

すなわち、本発明は、(1)(A)配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるペプチド；(B)配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、配列番号 1 の 4 番目のグリシン残基を除く、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ H S F 1 (heat shock factor 1) と R P A 1 (replication protein A 1) との相互作用阻害活性を有するペプチド；(C)配列番号 1 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 90% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ H S F 1 と R P A 1 との相互作用阻害活性を有するペプチド；(D)配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるペプチド；(E)配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ H S F 1 と R P A 1 との相互作用阻害活性を有するペプチド；(F)配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 85% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ H S F 1 と R P A 1 との相互作用阻害活性を有するペプチド；のいずれかのペプチド又はその塩や、(2)ペプチドが、H S F 1 の *wing* 領域と R P A 1 の *ssDNA* 結合ドメインとの相互作用阻害活性を有することを特徴とする上記(1)記載のペプチド又はその塩に関する。

40

【0008】

また、本発明は、(3)(A)配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるペプチド；(B)配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、配列番号 1 の 4 番目のグリシン残基を除く、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ H S F 1 (heat shock factor 1) と R P A 1 (replication protein A 1) との

50

相互作用阻害活性を有するペプチド；(C)配列番号1に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつHSF1とRPA1との相互作用阻害活性を有するペプチド；(D)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるペプチド；(E)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつHSF1とRPA1との相互作用阻害活性を有するペプチド；(F)配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも85%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつHSF1とRPA1との相互作用阻害活性を有するペプチド；のいずれかのペプチドをコードするDNAや、(4)上記(3)記載のDNAを含み、かつHSF1とRPA1との相互作用阻害活性を有するペプチドを発現することができる組換えベクターに関する。

10

【0009】

さらに、本発明は、(5)上記(1)又は(2)記載のペプチド又はその塩を含んでなるHSF1とRPA1との相互作用阻害剤や、(6)上記(1)又は(2)記載のペプチド又はその塩を含んでなる抗腫瘍剤や、(7)上記(1)又は(2)記載のペプチド又はその塩に特異的に結合する抗体や、(8)上記(1)又は(2)記載のペプチド又はその塩を非ヒト動物に投与することを特徴とする腫瘍の予防・治療法に関する。

【0010】

また、本発明は、(9)(A)HSF1とRPA1とを、被検物質の存在下に接触させ、HSF1とRPA1との相互作用阻害活性を検出する工程；(B)対照と比較して前記相互作用阻害活性が高い被検物質を選択する工程；を順次備えたことを特徴とする、抗腫瘍剤のスクリーニング方法や、(10)HSF1とRPA1との接触が、HSF1のwing領域とRPA1のssDNA結合ドメインとの接触であることを特徴とする、上記(9)記載のスクリーニング方法に関する。

20

【発明の効果】

【0011】

本発明によると、HSF1とRPA1との相互作用を阻害することができるペプチドを提供することができ、また、HSF1とRPA1との相互作用体が腫瘍細胞の増殖にも関与することが明らかになったことから、前記ペプチドは抗腫瘍剤として用いることができる。さらに、HSF1とRPA1との相互作用部位が明らかになったことから、従来は細胞を用いたレポーターアッセイによるスクリーニング系であったものを、特異的なタンパク質相互作用をターゲットとするスクリーニング系にすることで、多くの化合物ライブラリーからの抗腫瘍剤のスクリーニングが短時間で可能となる。

30

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】マウスRPA1の野生型及び欠損変異体とヒトHSF1との相互作用を調べた図である。上段は大腸菌で合成したGST-マウスRPA1の野生型(GST-RPA1)、及び欠損変異体(N1-N5, C1-C4)の構造を示し、数字はアミノ酸の位置を示す。下段はウエスタンブロッティングを行った結果を示す。

【図2】ヒトHSF1の野生型及び欠損変異体とマウスRPA1との相互作用を調べた図である。上段は合成したGST-HSF1の野生型(GST-HSF1)、及び欠損変異体N1-N3, C1-C3)のアミノ酸領域を示し、数字はアミノ酸の位置を示す。図中、DBDはDNA binding domain(DNA結合ドメイン)、HRはhydrophobic heptad repeat(疎水性7アミノ酸繰り返し)、DHRはdownstream of HR-C(HR-Cの下流)を意味する。下段はウエスタンブロッティングを行った結果を示す。

40

【図3】上段Aは、RPA1はヒトHSF1とともにHSF4と相互作用するがHSF2とは相互作用しないことを示す図である。下段Bは、ヒトHSF1、HSF2、HSF4のDNA結合ドメインのアミノ酸配列の比較を示す図である。

【図4】ヒトHSF1はwing領域を介してマウスRPA1と相互作用することを示す図である。Aは、HEK293細胞へhHSF1-HAあるいはその変異体の発現ベクタ

50

ーを導入して細胞抽出液を作製し、その後抗H A抗体を用いて免疫沈降を行い、沈降したタンパク質を用いて抗R P A抗体、あるいは抗H A抗体でウエスタンブロッティングを行った結果を示す図である。Bは、ゲルシフトアッセイによるD N A活性を示す図である。Cは、真核細胞H S F 1のD N A結合ドメインのアミノ酸配列を比較した結果を示す。

【図5】H S F 1 - R P A 1複合体は遺伝子発現を調節することを示す図である。Aは、マウス胎児線維芽細胞(M E F)において、m H S F 1又はm R P A 1それぞれの遺伝子ノックダウン後にD N Aマイクロアレイ解析を行った結果を示す。Bは、ノックダウンによって発現が2.0倍以下となる顕著な33遺伝子を示す。Cは、発現変化が顕著な5つの遺伝子についてH S F 1 - R P A 1複合体への依存性を詳細に解析した結果を示す。

【図6】H S F 1 - R P A 1相互作用はがん細胞の増殖に必要であることを示す図である。H M V - 1細胞、ヒトメラノーマ細胞株であるM e W o及びH e 1 a細胞においてH S F 1をノックダウンした後、h H S F 1又はh H S F 1の変異体を再導入した場合の細胞増殖結果を示す。

【図7】マウスを用いて、H S F 1 - R P A 1相互作用と腫瘍形成の関係を示す図である。Aは、代表的な腫瘍を形成したマウス及び摘出した腫瘍の写真(28日後)を2個体ずつ示し、Bは、腫瘍の容量変化の時間経過を示し、(*印は有為差を示す($p < 0.01$ 、A N O V A検定))、Cは、腫瘍の重量(28日後)を示す。B a rは平均値を示す。

【図8】H S F 1のw i n g領域あるいはR P A 1のs s D N A結合ドメインA - Bを含むポリペプチドはH S F 1 - R P A 1相互作用に対して競合することを示す図である。Aは、E L I S A法によりH S F 1 - H i sとG S TあるいはG S T - R P A 1の相互作用を定量化した結果を示し、Bは、H S F 1 - H i sとG S T - R P A 1の相互作用に対するリコンビナントR P A 1(228 - 391)あるいはその変異体R P A 1 - A r o A(228 - 391)の競合活性を調べた結果であり、横軸の数字はG S T - R P A 1とR P A 1(228 - 391)あるいはR P A 1 - A r o A(228 - 391)のモル比を示す。Cは、E L I S A法によりR P A 1 - H i sとH S F 1 - H i sの相互作用を定量化した結果を示し、Dは、R P A 1 - H i sとH S F 1 - H i sの相互作用に対するリコンビナントH S F 1 - D B D - H i sあるいはその変異体H S F 1 - D B D G 8 7 S - H i sの競合活性を調べた結果を示す。横軸の数字はH S F 1 - H i sとH S F 1 - D B D - H i sあるいはH S F 1 - D B D G 8 7 S - H i s R P A 1(228 - 391)のモル比を示す。Eは、R P A 1 - H i sとH S F 1 - H i sの相互作用に対する合成ポリペプチドH S F 1 - w i n gあるいはその変異体H S F 1 - w i n g - m u(ともに13アミノ酸からなる)の競合活性を調べた結果を示す。横軸の数字はH S F 1 - w i n gあるいはH S F 1 - w i n g - m uのモル比を示す。B、D、Eともに*は $P < 0.01$ を示している。

【図9】H S F 1 - R P A 複合体による遺伝子発現制御の分子機構を示す図である。ストレスを受けていない正常な細胞内には主に非D N A結合型の単量体H S F 1が存在するが、一部(数パーセント)はD N A結合型の三量体も存在する。この三量体H S F 1は単独ではH S Eと一過性に結合しても、ヌクレオソームの存在のために安定に結合できない。しかし、H S F 1 - R P A複合体はヒストンシャペロンF A C Tやクロマチン再構成因子であるB R G 1複合体を引き込むことでヌクレオソームを除き、安定に結合できる。その結果、H S F 1の活性化ドメインを介して転写開始前複合体とともにR N AポリメラーゼIIが引き込まれて構成的な転写が進行する。がん細胞ではこの構成的な転写に依存して細胞が増殖できる。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明のペプチドとしては、(A)配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるペプチド、(B)配列番号1に示されるアミノ酸配列において、配列番号1の4番目のグリシン残基を除く1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるペプチドからなり、かつH S F 1とR P A 1との相互作用阻害活性を有するペプチド、(C)配列番号1に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつH S F 1とR P A 1との相互作用阻害活性を有するペプチド、

10

20

30

40

50

(D) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるペプチド、(E) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ H S F 1 と R P A 1 との相互作用阻害活性を有するペプチド、(F) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 85% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ H S F 1 と R P A 1 との相互作用阻害活性を有するペプチドであれば、特に限定されない。

ここで、「H S F 1 と R P A 1 の相互作用阻害活性を有するペプチド」は、H S F 1 と R P A 1 の相互作用を阻害する活性を有するペプチドであれば、その具体的な作用機構は特に限定されないが、H S F 1 の *w i n g* 領域と R P A 1 の *s s D N A* 結合ドメインとの相互作用阻害活性を有することが好ましく、H S F 1 の 87 位のグリシンと R P A 1 の *s s D N A* 結合ドメインとの相互作用阻害活性を有することがより好ましく、H S F 1 の 87 位のグリシンと R P A 1 の 238 位若しくは 269 位との相互作用阻害活性を有することが特に好ましい。また、本発明において「相互作用」とは、「タンパク質分子間での非共有結合による複合体形成」を意味する。

10

【0014】

本発明における配列番号 1 に示されるアミノ酸配列は、ヒト H S F 1 タンパク質の 84 位から 96 位のアミノ酸配列に相当し、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列は、ヒト R P A 1 タンパク質の 228 位から 391 位のアミノ酸配列に相当する。

【0015】

本発明のペプチドには、1) 配列番号 1 の 4 番目のグリシン (ヒト H S F 1 タンパク質の 87 位に相当するグリシン) 残基を除くアミノ酸配列において 1 若しくは数個、好ましくは 1 ~ 2 個、より好ましくは 1 個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるペプチドや、2) 配列番号 2 の 11 番目若しくは 42 番目のフェニルアラニン (ヒト R P A 1 タンパク質の 238 位若しくは 269 位に相当するフェニルアラニン) を除くアミノ酸配列において 1 若しくは数個、好ましくは 1 ~ 20 個、より好ましくは 1 ~ 5 個、中でも 1 ~ 3 個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるペプチドからなり、H S F 1 と R P A 1 との相互作用を阻害する活性を有するものも含まれ、これらペプチドは、当該アミノ酸配列情報や当該アミノ酸をコードする塩基配列の情報に基づいて当業者であれば適宜調製又は取得することができる。

20

【0016】

本発明のペプチドの取得・調製方法は特に限定されず、本発明のペプチドは、化学合成したペプチドでも、D N A 組換え技術により作製した組み換えペプチドの何れでもよい。化学合成によりペプチドを調製する場合には、例えば、F m o c 法 (フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、t B o c 法 (t - ブチルオキシカルボニル法) 等の化学合成法に従って本発明のペプチドを合成することができる。また、各種の市販のペプチド合成機を利用して本発明のペプチドを合成することもできる。D N A 組換え技術によりペプチドを調製する場合には、該ペプチドをコードする塩基配列からなる D N A を好適な発現系に導入することにより本発明のペプチドを調製することができる。

30

【0017】

本発明のペプチドは、必要に応じて、マーカータンパク質及び/又はペプチドタグを結合させ、融合ペプチドとすることができる。マーカータンパク質としては、従来知られているマーカータンパク質であれば特に制限されるものではなく、例えば、アルカリフォスファターゼ、H R P 等の酵素、抗体の F c 領域、G F P 等の蛍光物質などを具体的に挙げることができ、またペプチドタグとしては、H A、F L A G、M y c 等のエピトープタグや、G S T、マルトース結合タンパク質、ビオチン化ペプチド、オリゴヒスチジン等の親和性タグなどの従来知られているペプチドタグを具体的に例示することができる。

40

かかる融合ペプチドは、常法により作製することができ、N i - N T A と H i s タグの親和性を利用した本発明のペプチドの精製や、本発明のペプチドの検出や、本発明のペプチドに対する抗体の定量や、その他当該分野の研究用試薬としても有用である。

【0018】

50

本発明においてペプチドの塩としては、薬理学上許容される塩であれば特に制限されるものではなく、本発明のH S F 1とR P A 1との相互作用を阻害する活性を有するペプチドの塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機塩；酢酸塩、クエン酸塩等の有機酸塩；ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩等を例示することができる。

【0019】

本発明のDNAは、(A)配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるペプチド、(B)配列番号1に示されるアミノ酸配列において、配列番号1の4番目のグリシン残基を除く1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるペプチドからなり、かつH S F 1とR P A 1との相互作用阻害活性を有するペプチド、(C)配列番号1に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつH S F 1とR P A 1との相互作用阻害活性を有するペプチド、(D)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるペプチド、(E)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつH S F 1とR P A 1との相互作用阻害活性を有するペプチド、(F)配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも85%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつH S F 1とR P A 1との相互作用阻害活性を有するペプチド、のいずれかのペプチドをコードするDNAであれば特に限定されない。ここで、「H S F 1とR P A 1の相互作用阻害活性を有するペプチド」は、前述した通りである。

本発明のDNAの取得方法や調製方法は特に限定されるものでなく、本明細書中に開示した配列番号1又は配列番号2に示されるアミノ酸配列情報に基づいて適当なプローブやプライマーを調製し、それらを用いて当該DNAが存在することが予測されるcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより目的のDNAを単離する、あるいは常法に従って化学合成により調製することができる。

【0020】

具体的には、常法に従ってcDNAライブラリーを調製し、次いで、このライブラリーから、本発明のDNAに特有の適当なプローブをその塩基配列情報に基づいて作製し、かかるプローブを用いて所望クローンを選抜することにより、本発明のDNAを取得することができる。上記cDNAの起源としては、ヒト、マウス、ラット等の動物由来の各種の細胞または組織を例示ことができ、また、これらの細胞又は組織からの全RNAの分離、mRNAの分離や精製、cDNAの取得とそのクローニングなどはいずれも常法に従って実施することができる。本発明のDNAをcDNAライブラリーからスクリーニングする方法は、例えば、モレキュラークローニング第2版に記載の方法等、当業者により常用される方法を挙げることができる。

【0021】

本発明のDNAとして、上記(A)~(F)のいずれかのペプチドをコードする限りは、配列番号3に示される塩基配列において、1若しくは数個の塩基の置換、欠失、挿入、又は付加された塩基配列を有し、かつH S F 1とR P A 1との相互作用阻害活性を有するペプチドをコードするDNAや、配列番号3に示される塩基配列と90%以上同一性を有し、かつH S F 1とR P A 1との相互作用阻害活性を有するペプチドをコードするDNAや、配列番号3に示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつH S F 1とR P A 1との相互作用阻害活性を有するペプチドをコードするDNAや、配列番号4に示される塩基配列において、1若しくは数個の塩基の置換、欠失、挿入、又は付加された塩基配列を有し、かつH S F 1とR P A 1との相互作用阻害活性を有するペプチドをコードするDNAや、配列番号4に示される塩基配列と85%以上同一性を有し、かつH S F 1とR P A 1との相互作用阻害活性を有するペプチドをコードするDNAや、配列番号3に示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつH S F 1とR P A 1との相互作用阻害活性を有するペプチドをコードするDNAを挙げることができるが、好ましくは配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるペプチドをコードするヒト由来のDNAの塩基配列である配列番号3に示す

DNAや、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるペプチドをコードするヒト由来のDNAの塩基配列である配列番号4に示すDNAを挙げることができる。

【0022】

上記「1若しくは数個の塩基が置換、欠失、挿入、又は付加された塩基配列」とは、例えば1~20個、好ましくは1~15個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個の任意の数の塩基が置換、欠失、挿入、又は付加された塩基配列を意味する。

また、上記「ストリンジентな条件下でハイブリダイズし、かつHSF1とRPA1との相互作用阻害活性を有するペプチドをコードするDNA」とは、DNA又はRNAなどの核酸をプローブとして使用し、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランクハイブリダイゼーション法、あるいはサザンロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAであって、かつHSF1とRPA1との相互作用阻害活性を有するペプチドをコードするDNAを意味する。

ハイブリダイゼーションは、モレキュラークローニング第2版等に記載されている方法に準じて行うことができ、ストリンジентな条件下でハイブリダイズすることができるDNAとしては、プローブとして使用するDNAの塩基配列と一定以上の相同性を有するDNAが挙げることができ、例えば60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するDNAを好適に例示することができる。

【0023】

本発明の組換えベクターとしては、前記本発明のDNAを1種以上含み、かつHSF1とRPA1との相互作用阻害活性を有するペプチドを発現する組換えベクターであれば特に制限されない。本発明の組換えベクターは、本発明のDNAを発現ベクターに適切にインテグレートすることにより構築することができ、本発明の遺伝子を適切なプロモーターの下流につないだコンストラクトを好適に例示することができる。

発現ベクターとしては、宿主細胞において自立複製可能であるものや、あるいは宿主細胞の染色体中へ組込み可能であるものが好ましく、また、本発明のDNAを発現できる位置にプロモーター、エンハンサー、ターミネーター等の制御配列を含有しているものを好適に使用することができる。発現ベクターとしては、動物細胞用発現ベクター、酵母用発現ベクター、細菌用発現ベクター等を用いることができるが、動物細胞用発現ベクターを用いた組換えベクターが好ましい。

【0024】

動物細胞用の発現ベクターとして、例えば、pcDNA3 (Stratagene社製)、pCMV-FLAG6a (Sigma-Aldrich社製)、pEGFP-C3 (Clontech社製)、pcDM8 (フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平3-22979; Cytotechnology, 3, 133, 1990]、pAS3-3 (特開平2-227075)、pCDM8 [Nature, 329, 840, 1987]、pcDNA1/Amp (Invitrogen社製)、pREP4 (Invitrogen社製)、pAGE103 [J.Biochem., 101, 1307, 1987]、pAGE210等を例示することができる。

動物細胞用のプロモーターとしては、例えば、サイトメガロウイルス(ヒトCMV)のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SRプロモーター等を挙げることができる。

【0025】

酵母用の発現ベクターとして、例えば、YEp13(ATCC37115)、YEp24(ATCC37051)、Ycp50(ATCC37419)、pHS19、pHS15等を例示することができる。

酵母用のプロモーターとしては、例えば、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF1プロモーター、CUP1プロモーター等のプロモーターを挙げることができる。

【0026】

細菌用の発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2(いずれもベリンガーマンハイム社より市販)、pGEX4T(AmershamBioscience社製)、pKK233-2(Pharmacia社

10

20

30

40

50

製)、pSE280(Invitrogen社製)、pGEMEX-1(Promega社製)、pQE-8(QIAGEN社製)、pQE-30(QIAGEN社製)、pKYP10(特開昭58-110600)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669, 1984]、PLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277, 1989]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306, 1985]、pBluescript IISK(+), pBluescript IISK(-)(Stratagen社製)、pTrs30(FERM BP-5407)、pTrs32(FERM BP-5408)、pGEX(Pharmacia社製)、pET-3(Novagen社製)、pTerm2(US4686191、US4939094、US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pUC18 [Gene, 33, 103(1985)]、pUC19 [Gene, 33, 103(1985)]、pSTV28(宝酒造社製)、pSTV29(宝酒造社製)、pUC118(宝酒造社製)、pQE-30(QIAGEN社製)等が挙げられる。

細菌用のプロモーターとしては、例えば、trpプロモーター(P trp)、lacプロモーター(P lac)、PLプロモーター、PRプロモーター、PSEプロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーター等を挙げることができる。

10

【0027】

本発明のHSF1とRPA1との相互作用阻害剤としては、本発明のペプチドを含むものであれば特に制限されず、本発明のペプチドを有効成分として含むものでもよい。必要に応じて、その他の成分などを適宜選択することができる。

【0028】

本発明の抗腫瘍剤としては、上記本発明のHSF1とRPA1との相互作用阻害剤を含んでなるものであれば特に制限されず、「抗腫瘍剤」には、抗腫瘍組成物が含まれ、予防剤、予後改善剤、治療剤、再発防止剤も含まれる。さらに、本発明の抗腫瘍剤を有効成分として含むものでもよい。

20

【0029】

本発明の抗腫瘍剤の対象となる「がん」としては、特に制限されないが、例えば食道がん、胃がん、大腸がん、直腸がん、肝臓がん、すい臓がん、胆のう・胆管がん等の消化器がん；悪性黒色腫；肺がん；乳がん；卵巣がん；子宮がん；腎がん；前立腺がん等を例示することができる。このように幅広い「がん」が対象となることは、これまでにHSF1の活性阻害が、乳腺上皮細胞、子宮頸部上皮細胞、前立腺上皮細胞、末梢神経鞘細胞、腎上皮細胞、色素細胞等の様々なヒトがん由来の細胞株の増殖を顕著に抑制すること、及びヒト前立腺がん、乳がん、肝細胞がんの組織でHSF1の活性が増強していることが明らかとなっていることから裏付けられる。つまり、HSF1の活性の増強が多くのがんの発症および進展を促進しているためである。一般に、がん細胞は細胞内タンパク質の代謝が亢進していると考えられており、タンパク質ホメオスタシスの維持を担うHSF1の働きを増強を必要としていると考えられているため、本発明が様々な「がん」の抗腫瘍剤となりうる。

30

【0030】

これらの抗腫瘍剤を用いる場合は、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を添加することができる。これら治療剤は、経口的又は非経口的に投与することができ、例えば、粉末、顆粒、錠剤、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例えば、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射剤として非経口投与することができ、上記ペプチドを2種類以上用いてもよい。

40

【0031】

本発明の抗体としては、上記本発明のペプチド又はその塩に特異的に結合する抗体であれば特に制限はされず、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等の免疫特異的な抗体を具体的に挙げることができ、これらは本発明のペプチドを抗原として用いて常法により作製することができるが、その中でもモノクローナル抗体がその特異性の点でより好ましい。

本発明の抗体は、HSF1とRPA1との相互作用部位に特異的に結合することにより、HSF1とRPA1との相互作用を特異的に阻害することが考えられる。また、本発明の抗体は、上記本発明のペプチドとの抗原抗体反応により、組織細胞、血清などにおける

50

H S F 1 又は R P A 1 遺伝子にかかわる疾患の検出に用いることができる。本発明の抗体を用いた免疫学的測定には、例えば R A 法、E L I S A 法、F R E T 法等公知の免疫学的測定法を用いることができる。

【 0 0 3 2 】

また、本発明の抗体は、慣用のプロトコルを用いて、動物（好ましくはヒト以外）に本発明のペプチドを含むその断片、又は本発明のペプチドを膜表面に発現した細胞を投与することにより産生され、例えばモノクローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたらす、ハイブリドーマ法（Nature 256, 495-497, 1975）、トリオーマ法、ヒト B 細胞ハイブリドーマ法（Immunology Today 4, 72, 1983）oyobiEBV-h aiburido-mahou (MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, 77-96, Alan R.Liss, In c., 1985) など任意の方法を用いることができる。 10

【 0 0 3 3 】

本発明の腫瘍の予防・治療法は、上記本発明の H S F 1 と R P A 1 との相互作用阻害剤を非ヒト動物に投与する方法であり、異なる態様の腫瘍の予防・治療法として本発明の H S F 1 と R P A 1 との相互作用阻害剤をヒトに投与する方法を挙げることができる。

投与方法としては、注射（静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内等）、経口、経皮、吸入などを挙げることができ、これらの投与方法に応じて適宜製剤化することができる。また、選択し得る剤形も特に限定されず、例えば注射剤（溶液、懸濁液、乳濁液、用時溶解用固形剤等）、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤、リポ化剤、軟膏剤、ゲル剤、外用散剤、スプレー剤、吸入散剤等から広く選択することができる。また、これらの製剤調製にあたり、慣用の賦形剤、安定化剤、結合剤、滑沢剤、乳化剤、浸透圧調整剤、pH 調整剤、その他着色剤、崩壊剤等、通常医薬に用いられる成分を使用することができる。また、投与量も適宜選択することができる。 20

【 0 0 3 4 】

本発明の抗腫瘍剤のスクリーニング方法は、（A）H S F 1 と R P A 1 とを、被検物質の存在下に接触させ、H S F 1 と R P A 1 との相互作用阻害活性を検出する工程；（B）対照と比較して前記相互作用阻害活性が高い被検物質を選択する工程；を順次備えていれば特に制限されないが、H S F 1 と R P A 1 との接触が、H S F 1 の w i n g 領域と R P A 1 の s s D N A 結合ドメインとの接触であることが好ましく、H S F 1 の 8 7 位のグリシンと R P A 1 の s s D N A 結合ドメインとの接触であることがより好ましく、H S F 1 の 8 7 位のグリシンと R P A 1 の 2 3 8 位若しくは 2 6 9 位のフェニルアラニンとの接触であることが特に好ましい。 30

このような本発明のスクリーニング方法によれば、抗腫瘍剤を効率良くスクリーニングすることができる。被検物質の存在下で、H S F 1 と R P A 1 との相互作用阻害活性を検出する方法としては、例えば、E L I S A 法や F R E T 法を挙げることができる。

【 0 0 3 5 】

上記 E L I S A 法を用いる検出方法を以下に示す。

1) ライブラリーの化合物をリコンビナントタンパク質とともに一定の濃度で E L I S A 用の 9 6 ウェルプレートに添加し、吸光度を測定して H S F 1 と R P A 1 の相互作用と競合する活性があるかどうかを調べ、次に、競合活性を認めたものについて、濃度を変えて活性を調べる方法が挙げられる。 40

2) ヒトメラノーマ細胞（H M V - 1、M e W o）は、H S F 1 のノックダウンによる細胞増殖が顕著に阻害される。この細胞に、H S F 1 - R P A 1 相互作用への競合活性をもつ化合物を添加して、細胞増殖を評価する方法、あるいはヌードマウスにヒトメラノーマ細胞等を接種して腫瘍を作らせる実験系を用いて、マウスに化合物を投与して腫瘍増殖を i n v i v o で評価する方法が挙げられる。

【 0 0 3 6 】

また、F R E T 法を用いる検出方法を以下に示す。

1) H i s - H S F 1、及び G S T - R P A 1 の精製リコンビナントタンパク質を準備し、テルビウム（T b）標識抗 H i s 抗体で H S F 1 を色素標識し、アロフィコシアニン（ 50

A P C) 標識抗 G S T 抗体で R P A 1 を色素標識する。そして、T b と A P C との蛍光相互作用を、T e c a n インフィニット M 1 0 0 0 モノクロメーター方式プレートリーダーを用いて検出装置で取得する。H S F 1 と R P A 1 のリコンビナントタンパク質は、相互作用部位を含むいくつかの断片を作成し、蛍光相互作用が最適なものを同定することで T R - F R E T 法を確立する。次に、化合物ライブラリーの中から蛍光相互作用を阻害するものをスクリーニングする。

2) がん細胞の増殖における活性の評価は E L I S A 法のとおりに行うことができる。

【 0 0 3 7 】

以下に、実施例を用いて本発明を詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

【 実施例 1 】

【 0 0 3 8 】

[H S F 1 - R P A 1 複合体の形成領域]

これまでに、本発明者らは、H S F 1 と R P A 1 との相互作用による H S F 1 - R P A 1 複合体が存在し、ヌクレオソーム構造をとる D N A に結合できることを明らかにしている (藤本ら、「H S F 1 - R P A 1 複合体はヌクレオソーム構造をとる D N A にアクセスする」、第 3 4 回日本分子生物学会年会プログラム p161, 2011)。今回、H S F 1 と R P A 1 とがどの領域を介して相互作用するかを以下の方法により詳細に検討した。

【 0 0 3 9 】

(1) 発現ベクターの構築

大腸菌での G S T 融合タンパク質の発現ベクターを構築するために、h H S F 1 (A C C E S S I O N 番号 ; N M _ 0 0 5 5 2 6 X M _ 9 3 7 7 1 8 、 V E R S I O N 番号 ; N M _ 0 0 5 5 2 6 . 2 G I : 1 3 2 6 2 6 7 7 2) 、 h H S F 1 の変異体 (H S F 1 - N 1 、 H S F 1 - N 2 、 H S F 1 - N 3 、 H S F 1 - C 1 、 H S F 1 - C 2 、 H S F 1 - C 3) (配列番号 5 ~ 1 1) 、 マウス R P A 1 (m R P A 1) 、 m R P A 1 の変異体 (R P A 1 - N 1 、 R P A 1 - N 2 、 R P A 1 - N 3 、 R P A 1 - N 4 、 R P A 1 - N 5 、 R P A 1 - C 1 、 R P A 1 - C 2 、 R P A 1 - C 3 、 R P A 1 - C 4) (配列番号 1 2 ~ 2 1) 。 の c D N A を p G E X - 2 T ベクター (G E H e a l t h c a r e 社製) へ挿入したまた、C 末端にヒスチジン (H i s) 標識したタンパク質の発現ベクターの構築のために、c D N A を p E T 2 1 a (N o v a g e n 社製) へ挿入した。

【 0 0 4 0 】

(2) 共沈降

発現ベクターを導入された大腸菌にイソプロピル - D - チオガラクトピラノシド (I P T G) を 0 . 2 m M または 0 . 4 m M となるように加え、3 7 ° C で 2 時間または 2 5 ° C で 1 0 時間インキュベートし、リコンビナントタンパク質を誘導した。その抽出液から、Glutathione Sepharose 4B (G E H e a l t h c a r e 社製) 、あるいは Ni Sepharose 6 Fast Flow (G E H e a l t h c a r e 社製) のアフィニティークラムを用いて G S T あるいは H i s 標識されたリコンビナントタンパク質を精製した。それらを N T バッファー (5 0 m M T r i s - H C l , p H 7 . 5 , 1 5 0 m M N a C l , 1 m M E D T A , 0 . 5 % N P 4 0 , 1 m M P M S F , 1 μ g / m l l e u p e p t i n , 1 μ g / m l s t a t i n) の中で混合し、Glutathione Sepharose 4B カラムで G S T 融合タンパク質とともに共沈降する H i s 標識タンパク質を H S F 1 、 H S F 2 、 H S F 4 、あるいは R P A 1 によるウエスタンブロッティングにより検出した。沈降してきた G S T タンパク質は G S T 抗体 (s c - 3 3 6 1 3 、 S a n t a C r u z 社製) を用いたウエスタンブロッティングにより検出した。

【 0 0 4 1 】

(3) H S F 1 と R P A 1 との共沈降結果

大腸菌で合成した G S T - マウス R P A 1 の野生型 (G S T - R P A 1) 、及び G S T - マウス R P A 1 欠損変異体 (G S T - N 1 ~ N 5 、 G S T - C 1 ~ C 4) を精製し、同じく大腸菌で合成して精製したヒト H S F 1 (H S F 1 - H i s) を混合し、Glutathione-sepharose 4B カラムで G S T 融合 R P A 1 タンパク質を沈降し、H S F 1 - H i s が共

10

20

30

40

50

沈降するかどうか調べた (GST-pull down assay)。沈降してきたタンパク質複合体を SDS-PAGE で分離し、抗 HSF1 抗体 (- m H S F 1 j) または抗 GST 抗体 (sc-33613、Santa Cruz社製) を用いてウエスタンブロッティングを行った。抗 HSF1 抗体は、以下の文献の記載に従って作成した (Fujimoto et al., J. Biol. Chem.283, 29961-29970, 2008)。

図1上段に大腸菌で合成した GST-マウス RPA1 の野生型 (GST-RPA1)、及び欠損変異体 (GST-N1~N5, GST-C1~C4) の構造を示し、図1下段にウエスタンブロッティングの結果を示す。ウエスタンブロッティングの結果より、N4、N5、C3、C4では抗 HSF1 抗体によるバンドが検出されず、HSF1 が共沈降していなかった。従って、図1のC4の右下に記載した横線に示すように、マウス RPA1 の1本鎖DNA結合ドメイン (ssDNA結合ドメイン) A-Bにおける228位から391位のアミノ酸がヒト HSF1 と相互作用することが明らかとなった。

【0042】

次に、大腸菌で合成した GST-ヒト HSF1 の野生型 (GST-HSF1)、及び GST-ヒト HSF1 の欠損変異体 (GST-N1~N3、C1~C3) を精製し、同じく大腸菌で合成して精製したマウス RPA1 (RPA1-His) を混合し、Glutathione-sepharose 4Bカラムで GST融合 HSF1 タンパク質を沈降し、RPA1-His が共沈降するかどうか調べた。沈降してきたタンパク質複合体を SDS-PAGE で分離し、抗 RPA1 抗体 (sc-28304、Santa Cruze社製) または抗 GST 抗体 (sc-33613、Santa Cruz社製) を用いてウエスタンブロッティングを行った。

図2上段に合成した GST-HSF1 の野生型 (GST-HSF1)、及び欠損変異体 N1-N3, GST-C1~C3) の構造を示し、図2下段にウエスタンブロッティングの結果を示す。ウエスタンブロッティングの結果より、N1、N2、N3では抗 RPA1 抗体によるバンドが検出されず、RPA1 が共沈降していなかった。従って、図2のC3の下側に記載した横線に示すように、ヒト HSF1 の DNA 結合ドメイン (DBD) における1位から120位のアミノ酸がマウス RPA1 と相互作用することが明らかとなった。

【0043】

[HSF1 と RPA1 との相互作用領域の特定]

HSF1 と RPA1 との相互作用領域をさらに特定するために、他の HSF 群との相互作用を調べた。

【0044】

(1) マウス RPA1 とヒト HSF1 (h H S F 1)、ヒト HSF2 (h H S F 2)、ヒト HSF4 (h H S F 4) との相互作用

大腸菌で合成した GST、マウス RPA1 の野生型 (GST-RPA1)、及び欠損変異体 (GST-N5) を精製し、同じく大腸菌で合成して精製したヒト HSF1 (H S F 1 - H i s)、HSF2 (H S F 2 - H i s)、HSF4 (H S F 4 - H i s) を混合し、Glutathione-sepharose 4Bカラムを用いて GST-pull down assay を行った。沈降してきたタンパク質複合体を SDS-PAGE で分離し、抗 HSF1 抗体 (- m H S F 1 j)、抗 HSF2 抗体 (- m H S F 2 - 4)、抗 HSF4 抗体 (- h H S F 4 b) を用いてウエスタンブロッティングを行った。 - m H S F 1 j、 - m H S F 2 - 4 及び - h H S F 4 b については、以下の文献の記載に従って作成した (Fujimoto et al., J. Biol. Chem. 283, 29961-29970, 2008)。

結果を図3上段Aに示す。マウス RPA1 はヒト HSF1 と共にヒト HSF4 とは相互作用するが、ヒト HSF2 とは相互作用しないことが明らかとなった。

【0045】

(2) HSF1 の DNA 結合ドメインのアミノ酸配列比較

次に、ヒト HSF1、HSF2、HSF4 の DNA 結合ドメインのアミノ酸配列を比較した。図3下段Bにおいて、すべてで一致するアミノ酸を黒背景、2つのみで一致するアミノ酸を灰色背景で示し、ヘリックス (H1-H3)、シート (1-4)、84

10

20

30

40

50

位から96位の13アミノ酸からなるwing領域、linkerを示す。数字はアミノ酸の位置を示す。ドットで示すアミノ酸の位置は、HSF1とHSF4で一致するが、HSF2とは異なるものを示す。

真核細胞のHSF群のDNA結合ドメインはwinged helix-turn-helix型の構造を持ち進化の過程でよく保存されている。そのドメインを構成するアミノ酸のうち、ヒトHSF1とヒトHSF4で一致するが、ヒトHSF2で異なるものは15カ所になる。その中から類似のアミノ酸を除いた10カ所の場所のヒトHSF1のアミノ酸をそれぞれヒトHSF2のアミノ酸に置換し(図3下段Bのドット)、HEK293細胞でのマウスRPA1との相互作用を以下の方法で調べた。

【0046】

(3) ベクターの作製

C末端にHA標識した野生型ヒトHSF1(hHSF1-HA)、変異体(E85D-HA:85位のグルタミン酸をアスパラギン酸、G87S-HA:87位のグリシンをセリン、P92Q-HA:92位のプロリンをグルタミン、G87A-HA:87位のグリシンをアラニンに置換)を挿入したヒトHSF1-HAのcDNA(配列番号22~26)をPCRにより作製し、pcDNA3.1/Neoベクター(Invitrogen社製)へ挿入して細胞での発現ベクターを構築した。

【0047】

(4) 細胞培養

本発明の実施例に用いる野生型及びHSF1-/-マウス胎児線維芽細胞(MEF)、HEK293、ヒトメラノーマ細胞株MeWo、HMV-1及び上皮系がん細胞HeLaは、10%胎児血清を含むDMEM培地中で、5%CO₂、37℃の条件下で培養した。

【0048】

(5) HEK293細胞への導入及び免疫沈降

HEK293細胞へヒトHSF1-HAあるいはその変異体の発現ベクターをリン酸カルシウム法で導入して細胞抽出液を作製した。その後抗HA抗体を用いて免疫沈降を行い、沈降したタンパク質を用いて抗RPA抗体、あるいは抗HA抗体でウエスタンブロットした。

【0049】

図4Aに示す通り、87番目のグリシンをセリンに置換すると複合体形成がなくなることがわかった。さらに、同じアミノ酸をアラニン置換しても複合体形成を認めなかった。つまり、ヒトHSF1は87番目のグリシンが存在するwing領域を介してマウスRPA1と相互作用することが示された。

【0050】

(6) ゲルシフトアッセイによるDNA活性

次に、HSF1欠損(-/-)MEF細胞(Inouye et al. J. Biol. Chem. 282, 33210-33217, 2007)へ(3)ベクターの作製に記載したcDNA(配列番号22~26)およびGFPのcDNA(配列番号27)をpShuttle-CMVベクター(Stratagene社製)へ挿入して作製したアデノウイルスベクターを用いて野生型ヒトHSF1、変異体、またはコントロールとしてGFPを発現させた。この細胞あるいは野生型MEF細胞の抽出液を作製し、³²P-HSEオリゴヌクレオチドをプローブとしてゲルシフトアッセイを行うことでDNA結合活性を調べた。HSF1の結合活性(HSF1)とフリー(free)のプローブの位置を示す。また、ウエスタンブロットによりHSF1、GFP、 α -アクチン(actin)のタンパク質量を調べた。結果を図4Bに示す。

このwing領域はDNA結合ドメインの一部であるが、その変異はDNA結合活性には影響を及ぼさないことが明らかとなった。つまり、wing領域はHSF1と相互作用する役割を特異的に担うことが強く示された。

【0051】

(7) 真核細胞HSF1のDNA結合ドメインのアミノ酸配列の比較

真核細胞HSF1のDNA結合ドメインのアミノ酸配列を比較した(図4C)。すべての

10

20

30

40

50

種で一致するアミノ酸を黒背景、一部の種で一致するアミノ酸を灰色背景で示す。h、ヒト；m、マウス；c、ニワトリ；Ce、線虫；Sc、出芽酵母。数字はアミノ酸の位置を示す。ドットで示すアミノ酸の位置は、HSF1とHSF4で一致するが、HSF2とは異なるものを示す。黒ドットは、wing領域のうちすべての種で保存されたアミノ酸（グリシン、ヒトHSF1の87番目のアミノ酸）を示す。

興味深いことに、この87番目のグリシンは、酵母からヒトまですべての種のHSF1で保存されており、HSF1-RPA複合体が真核細胞で普遍的であることを示唆する。

【実施例2】

【0052】

[HSF1-RPA1複合体の遺伝子発現制御]

HSF1-RPA1複合体が遺伝子発現制御を行っているかを明らかにする目的で、まずマウス胎児線維芽細胞(MEF)において、以下の方法によりマウスHSF1(mHSF1)又はマウスRPA1(mRPA1)それぞれの遺伝子ノックダウン後にDNAマイクロアレイ解析を行った。

【0053】

(1) RNA干渉、DNAマイクロアレイ解析、RNA定量

本発明の実施例に用いるヒトHSF1(hHSF1)、マウスHSF1(mHSF1)、そしてマウスRPA1(mRPA1)に対するショートヘアピンRNA(shRNA)のアデノウイルス発現ベクターは、以下の文献の記載に従って作製した(Fujimoto et al. Mol. Biol. Cell 21, 106-116, 2010)。MEF細胞に、作製したAd-sh-mHSF1あるいはAd-sh-mRPA1(1×10^8 pfu/ml)を2時間感染させ、新しい培地に交換して70時間維持して細胞を回収した。RNeasy Mini Kit(Qiagen社製)を用いてRNAを抽出し、GeneChip Mouse Gene 1.0 ST Array(28,853遺伝子をカバー)(Affymetrix社製)を用いて遺伝子発現解析を行った。遺伝子のfold-changeの解析には、ソフトウェアPartek Genomics Suite 6.5(Partek社製)を用いた。

遺伝子発現を確認するために、まずMEF細胞に作製したAd-sh-SCR、Ad-sh-mHSF1あるいはAd-sh-mRPA1(1×10^8 pfu/ml)を2時間感染させ、新しい培地に交換して22時間維持した。次に、Ad-GFP、Ad-hHSF1-HA、Ad-hHSF1G87S-HA、Ad-hHSF1G87A-HAを2時間感染させて新しい培地に交換して46時間維持した。これらの細胞を回収してTrizol(Invitrogen社製)を用いてRNAを回収し、以下の文献の記載に従ってRT-PCRを行った(Inouye et al. J. Biol. Chem. 282, 33210-33217, 2007)。一部の細胞からはタンパク質を抽出してウエスタンブロッティングを行った。

【0054】

(3) 解析結果

結果を図5Aに示す。発現が1.3倍以下となるものは、mRPA1ノックダウンで1,670遺伝子、mHSF1ノックダウンで564遺伝子であった。驚くべきことに、mHSF1ノックダウンで発現低下する遺伝子のうち、70%もの遺伝子がmRPA1ノックダウンで発現低下していた。このことは、同じ遺伝子の発現をHSF1-RPA複合体が制御することを示唆している。

ノックダウンによって発現が2.0倍以下となる顕著なものは33遺伝子あり、そのうち5遺伝子(Sncaip、Lrrn4、Fmod、Abi3bp、Slc44a5)についてその発現をさらに詳細に検討した(図5B、C)。

【0055】

図5Bの遺伝子のうち発現変化が顕著な5つ(Sncaip、Lrrn4、Fmod、Abi3bp、Slc44a5)の遺伝子についてHSF1-RPA1複合体への依存性を詳細に解析した。MEF細胞にアデノウイルスを用いてマウスHSF1あるいはマウスRPA1の遺伝子ノックダウンを行った。

HSF1をノックダウンした細胞へ、やはりアデノウイルスを用いて野生型ヒトHSF1、変異型HSF1(G87S-HA、G87A-HA)、あるいはコントロールとしてGFPを発現させた。これらの細胞からRNAを抽出してRT-PCR法により遺伝子発

10

20

30

40

50

現を調べた。H S F 1、R P A 1、G F P、 - アクチンの量はウエスタンブロッティングで調べた。結果を図5 Cに示す。まず、m H S F 1あるいはm R P A 1のノックダウンは確かにそれらの遺伝子発現を低下させた。m H S F 1をノックダウンしたM E F細胞へ、h H S F 1を再導入すると発現は元のレベルまで回復した。しかし、h H S F 1 G 8 7 Sあるいはh H S F 1 G 8 7 Aの再導入は遺伝子発現を回復させることはなかった。この結果は、H S F 1 - R P A 1複合体による遺伝子発現の調節にw i n g領域を介した相互作用が必要であることが示された。

【0056】

[H S F 1とR P A 1との相互作用とがん細胞の増殖]

H S F 1 - R P A 1の特異的な相互作用とがん細胞の増殖とが関連するかを調べた。

10

(1) がん細胞の増殖と腫瘍形成

ヒトメラノーマ細胞株M e W o、H M V - 1及び上皮系がん細胞H e L aに、まずS C R (s c r a m b l e R N A)あるいはH S F 1 s h R N Aを発現するアデノウイルスベクターを2時間感染させて培地を替えて22時間維持した。次に、G F P、野生型H S F 1 (h H S F 1 - H A)、あるいは変異体 (G 8 7 S - H A、G 8 7 A - H A) のアデノウイルス発現ベクターを2時間感染させ、培地を替えて46時間維持した (この時点で合計72時間)。この細胞をまき直して時間を追って細胞数を計測した (図6上段)。*印は有為差を示す (p < 0 . 0 1、A N O V A検定)。また、ウエスタンブロッティングにより合計72時間の時点でのH S F 1、G F P、 - アクチンの発現量を調べた (図6下段)。さらに、H M V - 1細胞を用いて胸腺を持たないヌードマウスへの移植実験を行

20

【0057】

(2) がん細胞の増殖結果

ヒトメラノーマ細胞株であるM e W o、H M V - 1及び上皮系がん細胞H e L aにおいてH S F 1をノックダウンすると増殖が著しく低下したが (図6上段)、これらの細胞へh H S F 1を再導入すると増殖はかなりのレベルまで回復した。ところが、h H S F 1 G 8 7 Sあるいはh H S F 1 G 8 7 Aの再導入は細胞増殖をまったく回復させることはな

30

【0058】

(3) H M V - 1細胞を用いたヌードマウスへの移植実験結果

図7 Aは、代表的な腫瘍を形成したマウス及び摘出した腫瘍の写真 (28日後) を2個体ずつ示し、図7 Bは、腫瘍の容量変化の時間経過を示し、 (*印は有為差を示す (p < 0 . 0 1、A N O V A検定))、図7 Cは、腫瘍の重量 (28日後) を示す。B a rは平均値を示す。本実験から、マウスにおいてもヒトメラノーマ細胞の増殖にw i n g領域を介した相互作用、特に87位のグリシンを介した相互作用が必要であることが示された。個体での腫瘍形成には、細胞増殖以外にも血管形成、細胞浸潤など宿主との相互作用を含む多くの要因が関係している。この実験結果は、複合的な要因が関連するヒトのがんの進展においてH S F 1が重要な役割を担うことを強く示すだけでなく、H S F 1 - R P A 1相互作用阻害剤のがん進展への抑制効果を実証する優れた実験系を提供する。

40

【実施例3】

【0059】

[H S F 1 - R P A 1相互作用を阻害するポリペプチド]

これまでの結果から、H S F 1 - R P A 1相互作用を阻害する化合物はがん細胞の増殖を抑制できることが示された。そこで、H S F 1のw i n g領域あるいはR P A 1のs s

50

DNA結合ドメインA-Bがこのような化合物のターゲットとなりうるかを明らかにするために、ELISA法を用いてHSF1-RPA1相互作用の競合実験を行った。

【0060】

(1) ELISA法

96-ウェルプレートに精製したHSF1-His (1 μg/ウェル)を固相化し、GSTあるいはGST-RPA1 (0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 μg)を混合した。ウサギ抗GST抗体 (sc-33613、Santa Cruz社製) 及びペルオキシダーゼ結合した抗ウサギIgG抗体 (Catalog番号:55676、Cappel社製) で処理し、o-phenylenediamineを基質として発色させて吸光度 (490 nm) を測定した。競合実験を行う際は、ヒトRPA1の228位から391位のペプチドからなるRPA1であるRPA1 (228-391) あるいはヒトRPA1の238位及び269位のフェニルアラニンを変異させた変異体RPA1-AroA (228-391) をGST-RPAととともに96-ウェルプレートへ混合した。

10

一方、HSF1の一部との競合実験を行うために、96-ウェルプレートに精製したRPA1-His (1 μg/ウェル) を固相化し、HSF1-His (0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 μg) と共にHSF1-DBD (1-129)-Hisあるいはその87位のグリシンをセリンに変異させた変異体HSF1-DBDG87S-His、または配列番号1に記載の13アミノ酸からなる合成ペプチドHSF1-wingあるいは配列番号1の4番目のグリシン残基をセリンに変異させた変異体HSF1-wing-mu (純度90%以上、株式会社スクラム社委託品) を混合した。一次抗体には抗HSF1抗体を用いた。結果を図8に示す。

20

【0061】

ELISA法によりHSF1-His (1 μg) とGSTあるいはGST-RPA1 (0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 μg) の相互作用を定量化した (図8A)。図8Aから分かるように、GSTあるいはGST-RPA1は0.5 μgで定量性があった。次に、HSF1-His (1 μg) とGST-RPA1 (0.5 μg) の相互作用に対するRPA1 (228-391) あるいはその変異体RPA1-AroA (228-391) の競合活性を調べた。GST-RPA1とRPA1 (228-391) あるいはRPA1-AroA (228-391) のモル比を示す (図8B)。

また、ELISA法によりRPA1-His (1 μg) とHSF1-His (0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 μg) の相互作用を定量化した (図8C)。図8Cから分かるように、HSF1-Hisは0.5 μgで定量性があった。次に、RPA1-His (1 μg) とHSF1-His (0.5 μg) の相互作用に対するHSF1-DBD-Hisあるいはその変異体HSF1-DBDG87S-Hisの競合活性を調べた (図8D)。

30

HSF1-HisとHSF1-DBD-HisあるいはHSF1-DBDG87S-His RPA1 (228-391) のモル比を示す。さらに、RPA1-His (1 μg) とHSF1-His (0.5 μg) の相互作用に対する合成ポリペプチドHSF1-wingあるいはその変異体HSF1-wing-mu (ともに13アミノ酸からなる) の競合活性を調べた。HSF1-wingあるいはHSF1-wing-muのモル比を示す。B、D、Eともに*はP<0.01を示している (図8E)。

40

これらの結果、RPA1のssDNA結合ドメイン (アミノ酸228から391) だけでなく、13アミノ酸からなる短い合成ペプチドHSF1-wingもHSF1-RPA1相互作用と競合することが明らかとなった。この結果は、HSF1のwing領域及びRPA1のssDNA結合ドメインA-BがHSF1-RPA1相互作用を阻害する化合物のターゲットとなりうることを示している。

【0062】

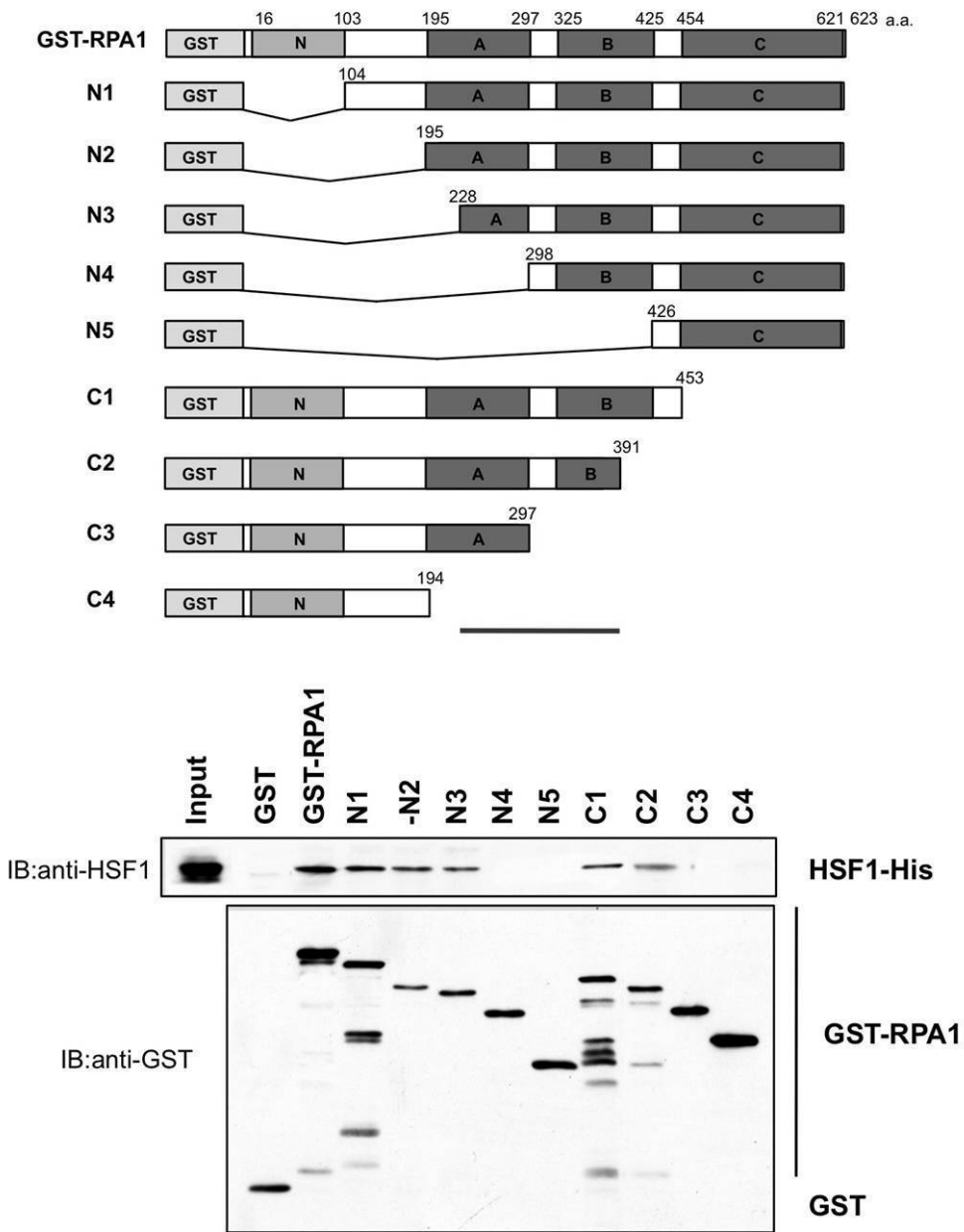
これまでの研究と本発明をまとめると、HSF1-RPA複合体はいくつかの因子を呼び込むことでヌクレオソーム構造をとるDNAに結合し、構成的な遺伝子発現を誘導する (図9)。それががん細胞の増殖を支えることが明らかとなった。

50

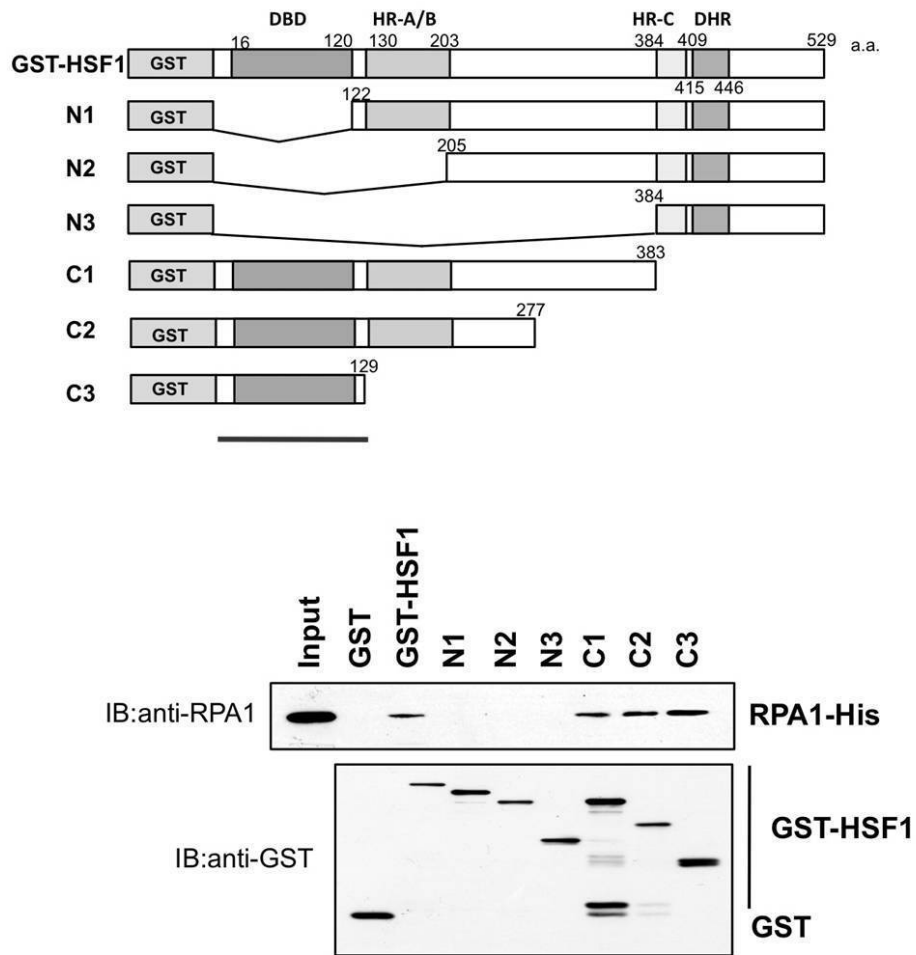
【産業上の利用可能性】**【0063】**

本発明のペプチド又はその塩は、HSF1とRPA1との相互作用を阻害することで、抗腫瘍剤や、非ヒト動物に投与することを特徴とする腫瘍の予防・治療法や、抗腫瘍剤のスクリーニング方法に利用される。

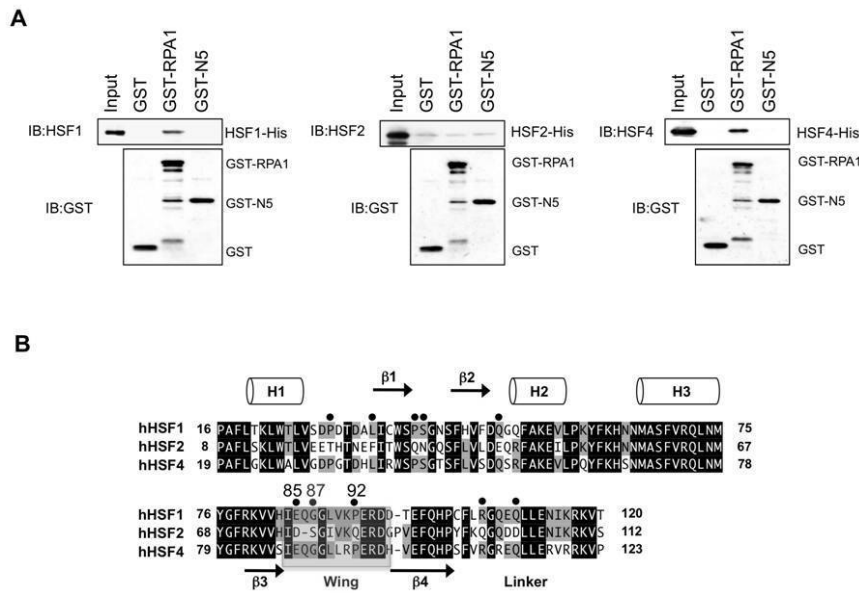
【 図 1 】



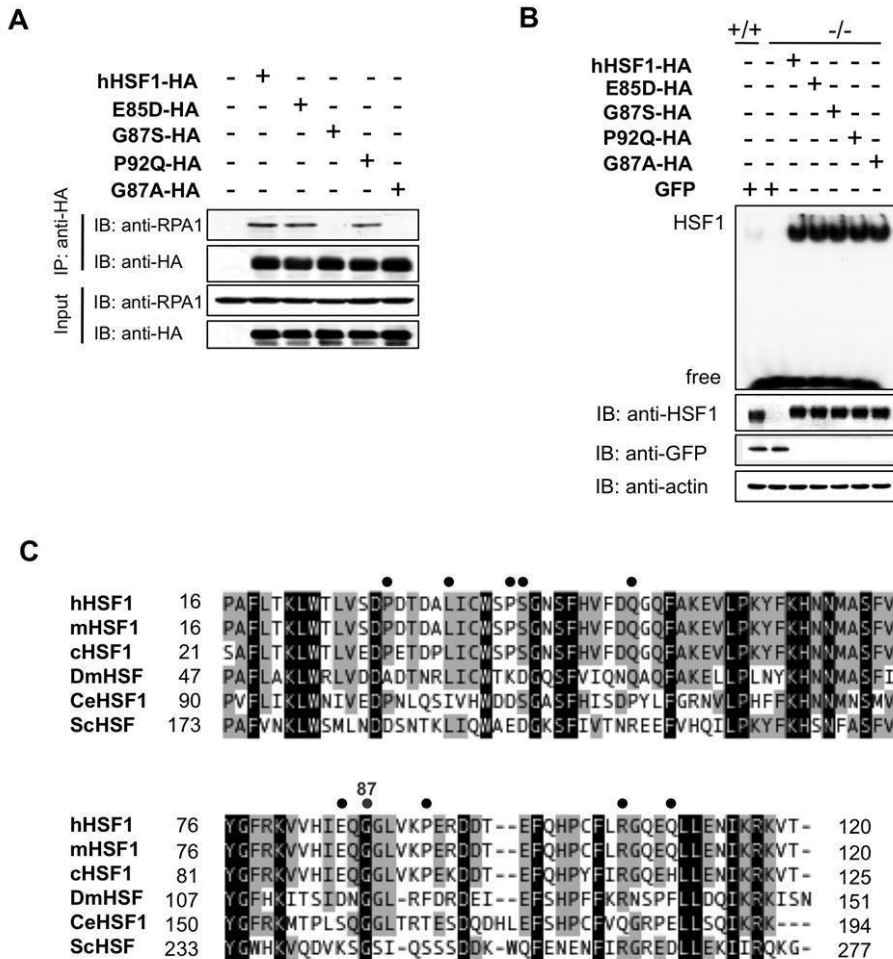
【 図 2 】



【 図 3 】

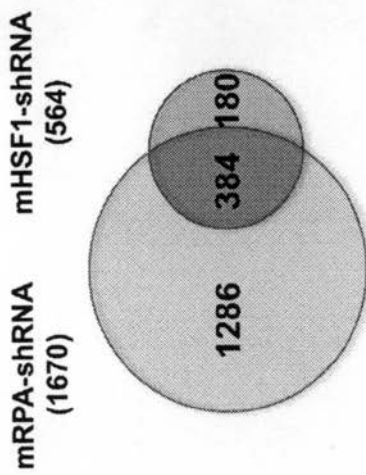


【 図 4 】

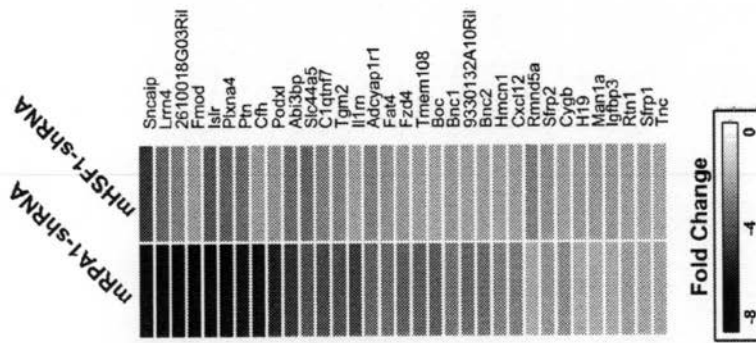


【 図 5 】

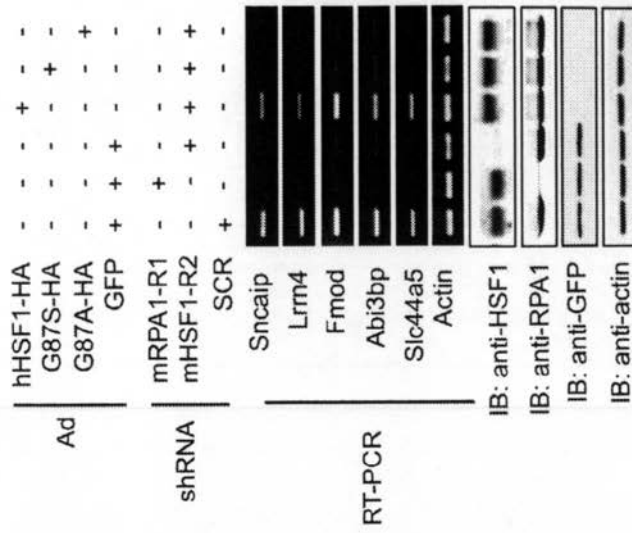
A



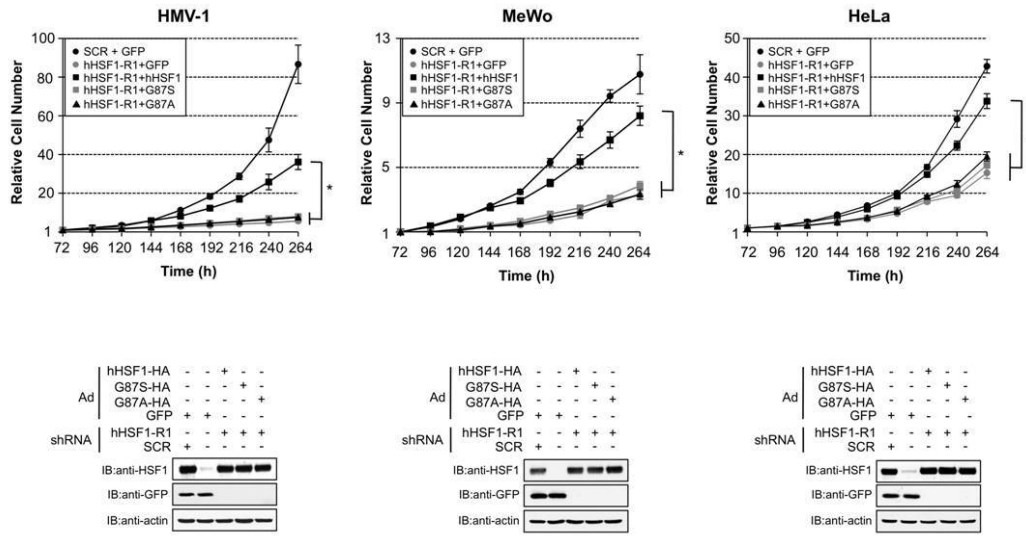
B



C

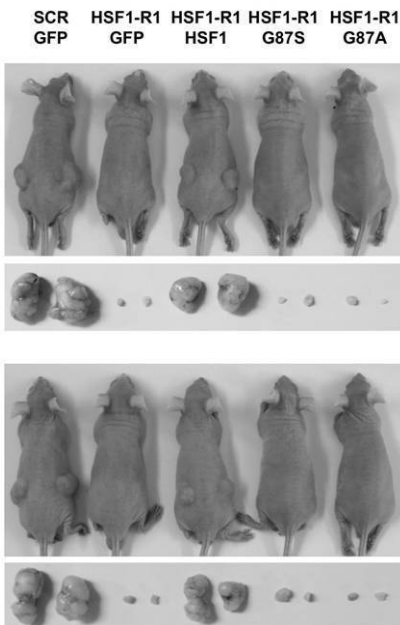


【 図 6 】

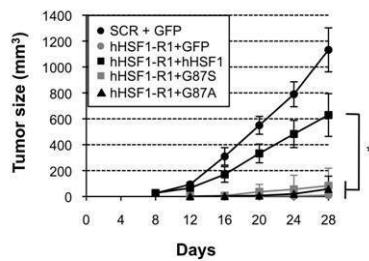


【 図 7 】

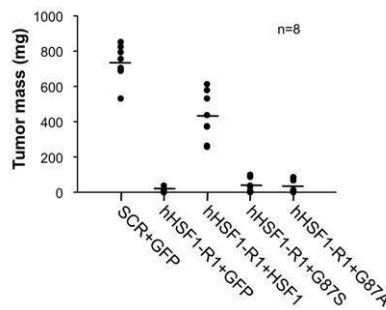
A

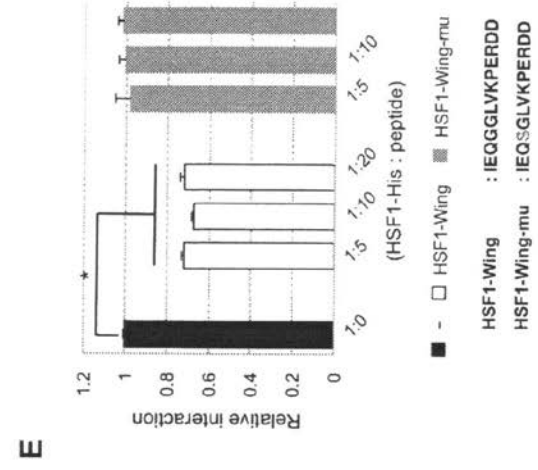
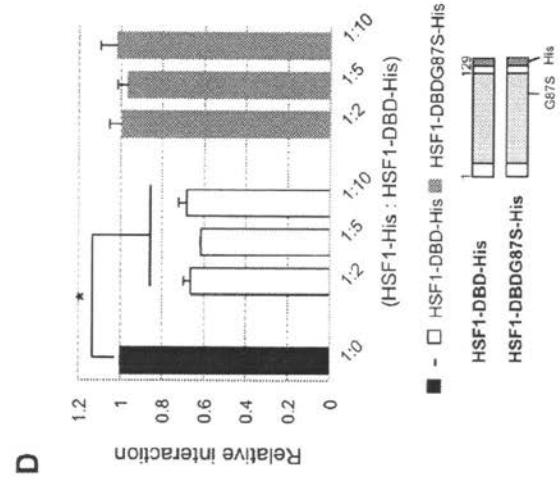
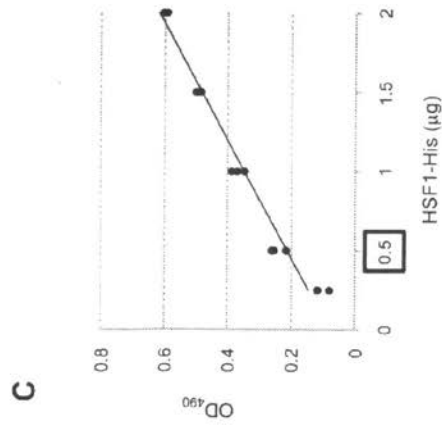
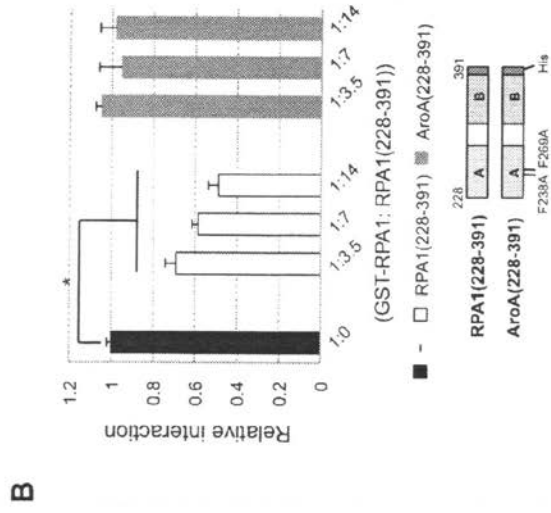
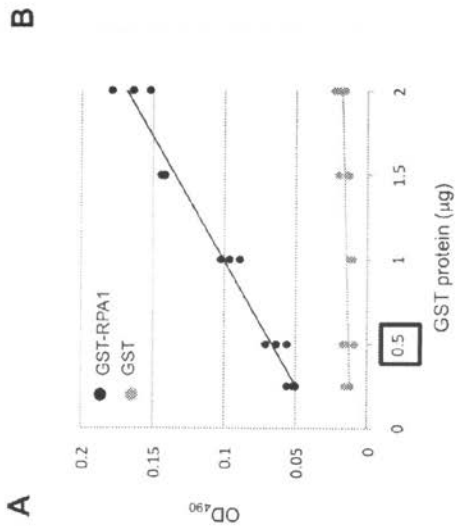


B



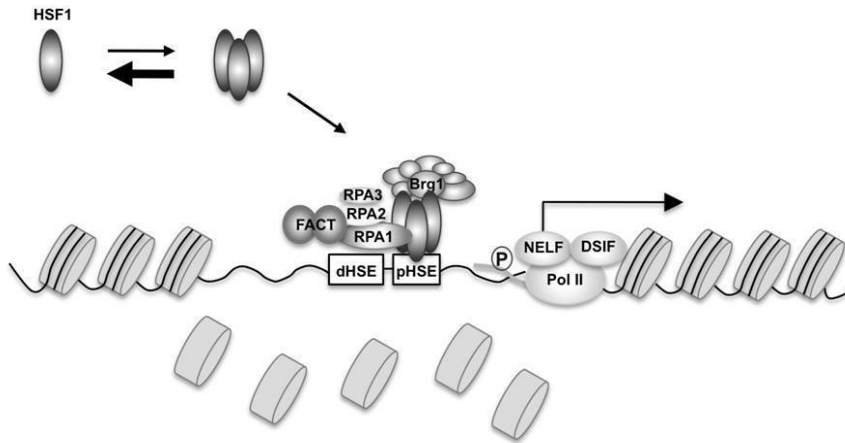
C





【 図 9 】

Mammal



【 配列表 】

2014014288000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z

(72)発明者 中井 彰
 山口県宇部市南小串1丁目1-1 国立大学法人山口大学医学部内

(72)発明者 藤本 充章
 山口県宇部市南小串1丁目1-1 国立大学法人山口大学医学部内

Fターム(参考) 2G045 DA14 DA36 FB03
 4B024 AA01 AA11 BA80 CA02 CA07 DA03 DA06 EA04
 4C084 AA02 BA01 BA08 BA18 BA22 BA23 NA14 ZB261 ZC411
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA16 BA41 CA40 EA28 EA50 FA74