

(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2007-112724  
(P2007-112724A)

(43) 公開日 平成19年5月10日(2007.5.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B O 2 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	4 C O 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5	4 C O 8 6
審査請求 未請求 請求項の数 15 O L		(全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2005-303676 (P2005-303676)	(71) 出願人 504173471 国立大学法人 北海道大学 北海道札幌市北区北8条西5丁目8番地
(22) 出願日 平成17年10月18日(2005.10.18)	(74) 代理人 100107984 弁理士 廣田 雅紀
特許法第30条第1項適用申請有り 平成17年7月1日 財団法人寿原記念財団発行の「第18回(平成15年度)寿原記念財団 助成金による研究成果報告書」に発表	(74) 代理人 100102255 弁理士 小澤 誠次
	(72) 発明者 瀧本 将人 北海道札幌市北区北15条西七丁目 国立大学法人北海道大学遺伝子病制御研究所内
	(72) 発明者 ユリ ウラタ 北海道札幌市北区北15条西七丁目 国立大学法人北海道大学遺伝子病制御研究所内
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子、及び、該遺伝子産物をターゲットとした癌細胞の増殖・分裂阻止

(57) 【要約】

【課題】癌細胞の増殖・分裂を阻止及び/又は細胞死を誘導する方法、該方法に用いられる癌細胞の選択的増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導剤、及び、癌の治療及び/又は予防剤のスクリーニング方法を提供すること。

【解決手段】本発明は、癌細胞中における癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子の発現を抑制することにより癌細胞の増殖・分裂を阻止及び/又は細胞死を誘導する。癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をターゲットとして癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導物質或いは癌の治療及び/又は予防剤のスクリーニングを行う。癌・精巢抗原タンパク質遺伝子の発現を抑制するには、d s R N A による R N A 干渉法が用いられる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

癌細胞中における癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子の発現を抑制することにより癌細胞の増殖・分裂を阻止及び/又は細胞死を誘導することを特徴とする癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導方法。

## 【請求項 2】

癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子の発現の抑制が、D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質の mRNA に対する RNA 干渉により行われることを特徴とする請求項 1 記載の癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導方法。

10

## 【請求項 3】

癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質の mRNA に対する RNA 干渉が、癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質の mRNA に対する標的特異的 RNA 分子の癌細胞内への導入によりなされることを特徴とする請求項 2 記載の癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導方法。

## 【請求項 4】

癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質の mRNA に対する標的特異的 RNA 分子が、二本鎖 RNA 分子であることを特徴とする請求項 3 記載の癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導方法。

20

## 【請求項 5】

癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質の mRNA に対する標的特異的 RNA 分子が、配列表の配列番号 1 及び該 RNA 鎖の相補配列からなる二本鎖 RNA 分子、配列表の配列番号 2 及び該 RNA 鎖の相補配列からなる二本鎖 RNA 分子、又は、配列表の配列番号 3 及び該 RNA 鎖の相補配列からなる二本鎖 RNA 分子であることを特徴とする請求項 4 記載の癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導方法。

30

## 【請求項 6】

癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質の mRNA に対する標的特異的 RNA 分子からなる癌細胞の選択的増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導剤。

## 【請求項 7】

標的特異的 RNA 分子が、二本鎖 RNA 分子であることを特徴とする請求項 6 記載の癌細胞の選択的増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導剤。

## 【請求項 8】

二本鎖 RNA 分子からなる、癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質の mRNA に対する標的特異的 RNA 分子が、配列表の配列番号 1 及び該 RNA 鎖の相補配列からなる二本鎖 RNA 分子、配列表の配列番号 2 及び該 RNA 鎖の相補配列からなる二本鎖 RNA 分子、又は、配列表の配列番号 3 及び該 RNA 鎖の相補配列からなる二本鎖 RNA 分子であることを特徴とする請求項 7 記載の癌細胞の選択的増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導剤。

40

## 【請求項 9】

癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質を発現する細胞に、被検物質を導入して、癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導について評価することを特徴とする癌細胞の

50

増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導物質のスクリーニング方法。

【請求項10】

癌・精巣抗原タンパク質D40 或いはCASC5、又は、該癌・精巣抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質を発現する細胞が、癌・精巣抗原タンパク質D40 或いはCASC5、又は、該癌・精巣抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質を発現する癌動物細胞であることを特徴とする請求項9記載の癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導物質のスクリーニング方法。

【請求項11】

癌・精巣抗原タンパク質D40 或いはCASC5、又は、該癌・精巣抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質を発現する細胞が、癌・精巣抗原タンパク質D40 或いはCASC5、又は、該癌・精巣抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子を導入した動物細胞であることを特徴とする請求項9記載の癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導物質のスクリーニング方法。

10

【請求項12】

癌・精巣抗原タンパク質D40 或いはCASC5、又は、該癌・精巣抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子が、遺伝子データベースGen Bankにアクセションナンバー、BAC05691、NP733468又はAAF97513として登録されているアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であることを特徴とする請求項11記載の癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導物質のスクリーニング方法。

20

【請求項13】

癌・精巣抗原タンパク質D40 或いはCASC5、又は、該癌・精巣抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子が、遺伝子データベースGen Bankにアクセションナンバー、AB022190、NM170589、又はAF248041として登録されている塩基配列を有する遺伝子であることを特徴とする請求項11記載の癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導物質のスクリーニング方法。

【請求項14】

動物細胞が、樹立された癌細胞株であることを特徴とする請求項11～13のいずれか記載の癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導物質のスクリーニング方法。

【請求項15】

癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導物質のスクリーニングが、癌の治療及び/又は予防剤のスクリーニングであることを特徴とする請求項9～14のいずれか記載のスクリーニング方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌細胞中における癌・精巣抗原タンパク質D40 或いはCASC5、又は、該癌・精巣抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子の発現を抑制することにより、癌細胞の増殖・分裂を阻止及び/又は細胞死を誘導する方法、該方法に用いられる癌細胞の選択的増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導剤、及び、癌・精巣抗原タンパク質D40 或いはCASC5、又は、該癌・精巣抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をターゲットとした癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導物質、或いは癌の治療及び/又は予防剤のスクリーニング方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

精巣は数多くの精巣特異的遺伝子を発現するが(Reprod. Fertility & Develop. 7, 69 5-704, 1995; Int. J. Develop. Biol. 40, 379-83, 1996)、それらの殆どは全くあるいは極く稀にしか一般の腫瘍では活性化しないと報告されている(Biochem. Biophys. Res. Comm. 241, 653-657, 1997)。しかし最近の研究により、癌と正常精巣両者に発現する

50

遺伝子群が同定され、それらの中には、宿主に免疫応答を引き起こすものがあり、癌・精巣抗原 (cancer-testis antigen: CT 抗原) と呼ばれている。また、癌・精巣抗原遺伝子に対して相同的な塩基配列をもつが、精巣のみならず両性の生殖器官において表現されている遺伝子も知られている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 10757-62, 1998; Cancer Res. 59, 1445-8, 1999; J. Biol. Chem. 273, 17618-25, 1998)。

#### 【0003】

癌・精巣抗原をコードする遺伝子を含めた上記の遺伝子は癌・精巣関連遺伝子と称される。癌患者に免疫反応を惹起する抗原をコードする癌・精巣関連遺伝子としては、MAGE、BAGE、GAGE、LAGE、SSX等の遺伝子が知られている (Science 254, 1643-7, 1991; Immunity 2, 167-75, 1995; J. Exp. Med. 182, 689-98, 1995; Int. J. Cancer 76, 903-8, 1998; Int. J. Cancer 72, 965-71, 1997; Cancer Res. 56, 4766-72, 1996)。

#### 【0004】

これまで知られている殆どの癌・精巣関連遺伝子は、ヒトX染色体に存在する。例えば、MAGEサブファミリーはX染色体の4つの領域、Xq28、Xq21.3、Xq26及びXq11.23 (Immunogenet. 40, 360-9, 1994; Cancer Res. 58, 743-52, 1998; Genomics 59, 161-7, 1999) に存在する。また、SSX遺伝子はXq11.2 (Nature Genet. 7, 502-8, 1994) に、LAGE1とNY-ESO-1はXq28 (Cancer J From Scientific American 5: 16-17, 1999; Intl J Cancer 76, 903-908, 1998) に、またGAGE遺伝子はXp11.2 - Xp11.4 (Cancer Res. 59, 3157-3165, 1999) の間に存在する。しかし、最近、第1染色体に存在することが知られるシナプトネマル複合タンパク質 (SCP1) は癌・精巣関連遺伝子群の一員であることが示され (EMBO J. 11, 5091-5100, 1992)、また同時にこれはHOM-TES-14遺伝子 (Cytogen Cell Genet 78, 103-104, 1997; Proc Natl Acad Sci USA 95, 5211-5216, 1998) と同一であることも明らかにされている。

#### 【0005】

本発明者は、最近、癌・精巣関連遺伝子についての研究の中から、癌・精巣抗原タンパク質D40を発現する遺伝子を見出し、該遺伝子をクローニングした (特開2002-85071号公報)。該癌・精巣抗原タンパク質D40を発現する遺伝子は、正常組織の中では精巣のみに高発現するが、一方で、癌においては種々の組織・細胞由来の多くの培養癌細胞や肺癌などのヒト原発癌においても高頻度に発現していることが明らかとなった。該癌・精巣抗原タンパク質D40を発現する遺伝子は、非喫煙者に比べ喫煙者由来の肺癌に高頻度に発現している。また、高分化度の肺癌に比べ、低分化度の肺癌において該D40を発現する遺伝子の発現頻度は優位に高いことが示されている。

#### 【0006】

しかし、これまで、該D40を発現する遺伝子が、多くのヒト組織・臓器由来の癌細胞株と原発癌に高頻度に発現し、正常組織では精巣のみに高発現していることが知られているだけで、該遺伝子及び該遺伝子の発現産物である癌・精巣抗原タンパク質D40の癌細胞における機能については、これまで殆んど知られていなかった。

#### 【0007】

【特許文献1】特開2002-85071号公報。

【非特許文献1】Reprod. Fertility & Develop. 7, 695-704, 1995。

【非特許文献2】Int. J. Develop. Biol. 40, 379-83, 1996。

【非特許文献3】Biochem. Biophys. Res. Comm. 241, 653-657, 1997。

【非特許文献4】Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 10757-62, 1998。

【非特許文献5】Cancer Res. 59, 1445-8, 1999。

【非特許文献6】J. Biol. Chem. 273, 17618-25, 1998。

【非特許文献7】Science 254, 1643-7, 1991。

【非特許文献8】Immunity 2, 167-75, 1995。

【非特許文献9】J. Exp. Med. 182, 689-98, 1995。

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 1 0】Int. J. Cancer 76, 903-8, 1998。
- 【非特許文献 1 1】Int. J. Cancer 72, 965-71, 1997。
- 【非特許文献 1 2】Cancer Res. 56, 4766-72, 1996。
- 【非特許文献 1 3】Immunogenet. 40, 360-9, 1994
- 【非特許文献 1 4】Cancer Res. 58, 743-52, 1998。
- 【非特許文献 1 5】Genomics 59, 161-7, 1999。
- 【非特許文献 1 6】Nature Genet. 7, 502-8, 1994。
- 【非特許文献 1 7】Cancer J From Scientific American 5: 16-17, 1999。
- 【非特許文献 1 8】Intl J Cancer 76, 903-908, 1998。
- 【非特許文献 1 9】Cancer Res. 59, 3157-3165, 1999。
- 【非特許文献 2 0】EMBO J. 11, 5091-5100, 1992。
- 【非特許文献 2 1】Cytogen Cell Genet 78, 103-104, 1997。
- 【非特許文献 2 2】Proc Natl Acad Sci USA 95, 5211-5216, 1998

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の課題は、癌細胞中における癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子をターゲットとして、癌細胞の増殖・分裂を阻止及び/又は細胞死を誘導する方法、該方法に用いられる癌細胞の選択的増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導剤、及び、癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をターゲットとした癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導物質或いは癌の治療及び/又は予防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】

【0009】

本発明者は、本発明者が先にクローニングした癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 を発現する遺伝子及び該遺伝子の発現産物である癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 (特開 2 0 0 2 - 8 5 0 7 1 号公報)の機能について、鋭意検討する中で、該遺伝子の発現が、細胞の増殖・分裂と深く係わっており、癌細胞中における該遺伝子の発現を抑えることにより、癌細胞の分裂に異常が生じ、結果として癌細胞の死と、強い増殖阻止が起こることを見出し、本発明を完成するに至った。

30

【0010】

すなわち、本発明は、癌細胞中における癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子の発現を抑制することにより癌細胞の増殖・分裂を阻止及び/又は細胞死を誘導し、癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死を誘導する方法からなる。本発明において、癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質を発現する遺伝子は、多くのヒト原発癌に発現する一方で、精巢以外の正常組織の中では発現が認められないことから、該遺伝子の発現を抑制することにより、癌細胞に選択的に増殖・分裂を阻止することが可能となる。

40

【0011】

本発明において、癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子の発現を抑制するには、D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシング変異体タンパク質の mRNA に対する RNA 干渉により行うことができる。該 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質の mRNA に対する RNA 干渉は、二本鎖 RNA 分子のような、D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質

50

の mRNA に対する標的特異的 RNA 分子を癌細胞内へ導入することにより行うことができる。該二本鎖 RNA 分子としては、配列表の配列番号 1 及び該 RNA 鎖の相補配列からなる二本鎖 RNA 分子、配列表の配列番号 2 及び該 RNA 鎖の相補配列からなる二本鎖 RNA 分子、又は、配列表の配列番号 3 及び該 RNA 鎖の相補配列からなる二本鎖 RNA 分子を挙げることができる。

#### 【0012】

また、本発明は、癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質を発現する細胞に、被検物質を導入して、癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導について評価することにより、癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導物質、或いは癌の治療及び/又は予防剤をスクリーニングする方法よりなる。該癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質を発現する細胞としては、癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質を発現する癌動物細胞、或いは、癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子を導入した動物細胞を用いることができ、該動物細胞としては樹立された癌細胞株を用いることができる。

10

#### 【0013】

癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子としては、遺伝子データベース Gen Bank にアクセスナンバー、B A C 0 5 6 9 1、N P 7 3 3 4 6 8 又は A A F 9 7 5 1 3 として登録されているアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子、或いは、遺伝子データベース Gen Bank にアクセスナンバー、A B 0 2 2 1 9 0、N M 1 7 0 5 8 9、又は A F 2 4 8 0 4 1 として登録されている塩基配列を有する遺伝子を挙げることができる。該癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導物質のスクリーニングにより、癌の治療及び/又は予防剤のスクリーニングを行うことができる。

20

#### 【0014】

すなわち具体的には本発明は、(1) 癌細胞中における癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子の発現を抑制することにより癌細胞の増殖・分裂を阻止及び/又は細胞死を誘導することを特徴とする癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導方法や、(2) 癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子の発現の抑制が、D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質の mRNA に対する RNA 干渉により行われることを特徴とする前記(1)記載の癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導方法や、(3) 癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質の mRNA に対する RNA 干渉が、癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質の mRNA に対する標的特異的 RNA 分子の癌細胞内への導入によりなされることを特徴とする前記(2)記載の癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導方法や、(4) 癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質の mRNA に対する標的特異的 RNA 分子が、二本鎖 RNA 分子であることを特徴とする前記(3)記載の癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導方法や、(5) 癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質の mRNA に対する標的特異的 RNA 分子が、配列表の配列番号 1 及び該 RNA 鎖の相補配列からなる二本鎖 RNA 分子、配列表の配列番号 2 及び該 RNA 鎖の相補配列から

30

40

50

なる二本鎖RNA分子であることを特徴とする前記(4)記載の癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導方法からなる。

【0015】

また本発明は、(6)癌・精巢抗原タンパク質D40 或いはCASC5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質のmRNAに対する標的特異的RNA分子からなる癌細胞の選択的増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導剤や、(7)標的特異的RNA分子が、二本鎖RNA分子であることを特徴とする前記(6)記載の癌細胞の選択的増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導剤や、(8)二本鎖RNA分子からなる、癌・精巢抗原タンパク質D40 或いはCASC5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質のmRNAに対する標的特異的RNA分子が、配列表の配列番号1及び該RNA鎖の相補配列からなる二本鎖RNA分子、配列表の配列番号2及び該RNA鎖の相補配列からなる二本鎖RNA分子、又は、配列表の配列番号3及び該RNA鎖の相補配列からなる二本鎖RNA分子であることを特徴とする前記(7)記載の癌細胞の選択的増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導剤からなる。

10

【0016】

さらに本発明は、(9)癌・精巢抗原タンパク質D40 或いはCASC5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質を発現する細胞に、被検物質を導入して、癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導について評価することを特徴とする癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導物質のスクリーニング方法や、(10)癌・精巢抗原タンパク質D40 或いはCASC5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質を発現する細胞が、癌・精巢抗原タンパク質D40 或いはCASC5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質を発現する癌動物細胞であることを特徴とする前記(9)記載の癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導物質のスクリーニング方法や、(11)癌・精巢抗原タンパク質D40 或いはCASC5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質を発現する細胞が、癌・精巢抗原タンパク質D40 或いはCASC5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子を導入した動物細胞であることを特徴とする前記(9)記載の癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導物質のスクリーニング方法や、(12)癌・精巢抗原タンパク質D40 或いはCASC5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子が、遺伝子データベースGen Bankにアクセッションナンバー、BAC05691、NP733468 又はAAF97513として登録されているアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であることを特徴とする前記(11)記載の癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導物質のスクリーニング方法や、(13)癌・精巢抗原タンパク質D40 或いはCASC5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子が、遺伝子データベースGen Bankにアクセッションナンバー、AB022190、NM170589、又はAF248041として登録されている塩基配列を有する遺伝子であることを特徴とする前記(11)記載の癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導物質のスクリーニング方法や、(14)動物細胞が、樹立された癌細胞株であることを特徴とする前記(11)~(13)のいずれか記載の癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導物質のスクリーニング方法や、(15)癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導物質のスクリーニングが、癌の治療及び/又は予防剤のスクリーニングであることを特徴とする前記(9)~(14)のいずれか記載のスクリーニング方法からなる。

20

30

40

【発明の効果】

【0017】

従来より、抗癌剤の開発において、癌細胞の増殖・分裂を抑える薬剤は種々開発されているが、多くは、癌細胞のみならず、正常細胞に対しても作用し、結果として重篤な副作

50

用の問題が生じていた。本発明において、ターゲットとしている癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子は、多くのヒト原発癌に発現している一方で、精巢以外の正常組織の中では発現が認められないことから、本発明の方法によって、該遺伝子の発現を特異的に抑制することにより、副作用の問題を回避して、癌細胞を選択的に、その増殖・分裂を阻止することが可能となる。

**【 0 0 1 8 】**

また、癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子は、多くのヒト原発癌に発現していることから、本発明の方法により、該遺伝子の発現を抑え、癌細胞の増殖・分裂を阻止することにより、多くのヒト原発癌の予防及び/又は治療を可能とする。特に、肺癌では、分化度の低い(より悪性の)癌、及び喫煙者由来の癌において癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質の発現頻度が高いことから、特にこれらの癌の予防及び/又は治療への本発明の方法の適用が期待される。

10

**【 0 0 1 9 】**

更に、本発明においては、本発明において見出した、癌細胞の増殖・分裂の阻止に關与する癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をターゲットとして、癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導物質をスクリーニングすることにより、多種の癌に対する治療及び/又は予防剤の開発が可能となる。

20

**【 発明を実施するための最良の形態 】****【 0 0 2 0 】**

本発明は、癌細胞中における癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子の発現を抑制することにより癌細胞の増殖・分裂を阻止及び/又は細胞死を誘導し、癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導を行う方法よりなる。本発明において、ターゲットとなる癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 をコードする遺伝子については、既に、本発明者がクローニングし、その塩基配列を明らかにしている(特開 2 0 0 2 - 8 5 0 7 1 号公報)。癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 の遺伝子は、転写後、オルタネティブ スプライシング(alternative splicing)により、複数の mRNA となり、それらは、複数の cDNA としてクローニングされている。したがって、癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 には、複数のスプライシングアイソフォームタンパク質がある。それらは、例えば、C A S C 5 / A F 1 5 q 1 4 / K I A A 1 5 7 0 として知られている。癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 のアミノ酸配列については、本発明者が、既に、その構造を明らかにしている(特開 2 0 0 2 - 8 5 0 7 1 号公報)。

30

**【 0 0 2 1 】**

また、癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質の配列情報については、遺伝子データベース Gen Bank へ、アクセッションナンバー、B A C 0 5 6 9 1、N P 7 3 3 4 6 8 又は A A F 9 7 5 1 3 としてアクセスすることにより得ることができ、該アミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子の配列情報については、遺伝子データベース Gen Bank へ、アクセッションナンバー、A B 0 2 2 1 9 0、N M 1 7 0 5 8 9、又は A F 2 4 8 0 4 1 としてアクセスすることにより得ることができる。

40

**【 0 0 2 2 】**

本発明において、該癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子の発現を抑制する方法としては、D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質の mRNA に対する RNA 干渉により行うことができる。癌・精巢抗原タンパク質 D 4 0 或いは C A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タン

50



パク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子の発現を、D40  
或いはCASC5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタ  
ンパク質のmRNAに対するRNA干渉法により抑制するには、D40或いはCASC5  
、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質のmRNA  
に対する標的特異的RNA分子を、合成法等を用いて構築し、該標的特異的RNA分子  
を癌細胞内へ導入することにより行うことができる。

#### 【0023】

該癌・精巢抗原タンパク質D40或いはCASC5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質  
のスプライシングアイソフォームタンパク質のmRNAに対する標的特異的RNA分子と  
しては、有利には、二本鎖RNA分子を用いることができ、本発明において特に有利に用  
いる二本鎖RNA分子としては、配列表の配列番号1 (SenseRNA:gguaaaaguc ccuagaaat  
t)及び該RNA鎖の相補配列からなる二本鎖RNA分子、配列表の配列番号2 (SenseRNA:  
ggacgaaagu guacagaaat t)及び該RNA鎖の相補配列からなる二本鎖RNA分子、又は、  
配列表の配列番号3 (SenseRNA:ggaaaaacu uggguguuut t)及び該RNA鎖の相補配列から  
なる二本鎖RNA分子を用いることができる。

10

#### 【0024】

RNA干渉法により遺伝子を抑制する方法自体は、公知の方法に従って、実施するこ  
とができる。本発明において利用する、RNA干渉(或いは、RNAi、RNA interference)  
とは、アンチセンスRNAや、アンチセンスRNAとセンスRNAとが互いに結合  
して形成された二本鎖RNA(RNA二重鎖: dsRNA)を細胞内へ導入することによ  
って、該dsRNAと相同な配列を持つmRNAが分解され、遺伝子の発現を抑制する  
という現象が引き起こされるが、このdsRNA等の導入によって遺伝子の発現が抑制され  
る現象をいい、本発明においては、該RNA干渉を利用する。すなわち、アンチセンスR  
NAは、DNAより転写されるmRNA(センスRNA)に対し、その遺伝情報が裏返し  
となった転写物のことを意味し、このアンチセンスRNAは、標的遺伝子からつくられる  
mRNAと構造的に相補性を有しているので、両者は互いに結合して二本鎖RNA(ds  
RNA)を形成する。このように、言わば“フタ”をかぶされたmRNAは、特異的RN  
A分解酵素によって分解され、タンパク質合成の場への移行ができなくなり、本来の遺  
伝子の機能が抑制される。本発明は、かかる遺伝子機能の抑制を利用する。

20

#### 【0025】

二本鎖RNA(dsRNA)等の細胞内への導入によって、dsRNAと相同な配列を  
持つ遺伝子の発現が抑制される現象であるRNA干渉は、1998年に線虫(Caenorhabd  
itis elegans)で初めて発見されて以来、多くの報告がなされており(Nature 391, 806-  
811,1998; Nature 411, 494-498, 2001; Science, 296,550-553, 2002; Genes Dev 16, 9  
48-958, 2002)、種々の方法が開示されている(WO99/32619号公報; WO00  
/44895号公報; 特開2004-166577号公報; 特開2005-34008号  
公報; 特表2004-519458号公報)。本発明において、RNA干渉により遺伝子  
の発現を抑制するには、これら公知の方法を用いて、適宜、実施することができる。

30

#### 【0026】

また、本発明は、癌・精巢抗原タンパク質D40或いはCASC5、又は、該癌・精巢  
抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質を発現する細胞に、被検物質  
を導入して、癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導について評価すること  
により、癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導物質をスクリーニングする方  
法からなる。該スクリーニング方法においては、癌・精巢抗原タンパク質D40或いはC  
ASC5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質を  
発現する細胞、或いは、該細胞を構築することにより行うことができる。癌・精巢抗原  
タンパク質D40或いはCASC5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシング  
アイソフォームタンパク質を発現する細胞としては、癌・精巢抗原タンパク質D40或  
いはCASC5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタン  
パク質を発現する癌動物細胞を挙げることができる。

40

50

## 【0027】

また、癌・精巢抗原タンパク質D40 あるいはCASC5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質を発現する細胞としては、癌・精巢抗原タンパク質D40 あるいはCASC5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子を導入した動物細胞を挙げることができる。該癌・精巢抗原タンパク質D40 あるいはCASC5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質を発現する細胞を構築するに際して、癌・精巢抗原タンパク質D40 あるいはCASC5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質のアミノ酸配列については、遺伝子データベースGen Bankから、アクセッションナンバー、BAC05691、NP733468又はAAF97513として、及び、癌・精巢抗原タンパク質D40 あるいはCASC5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列については、遺伝子データベースGen Bankから、アクセッションナンバー、AB022190、NM170589、又はAF248041として得ることができる。

## 【0028】

本発明において、癌・精巢抗原タンパク質D40 あるいはCASC5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質を発現する細胞の構築に際して該遺伝子を宿主動物細胞に導入するには、上記遺伝子の配列情報に基づき、公知の方法を用いて行うことができる(特開2002-85071号公報)。本発明において、癌・精巢抗原タンパク質D40 あるいはCASC5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質を発現する細胞の構築に用いる宿主細胞の好ましい例としては、HeLa、293、PC-10(肺癌)のような動物細胞の樹立された癌細胞核を挙げることができる。

## 【0029】

癌・精巢抗原タンパク質D40 あるいはCASC5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子を宿主細胞へ導入するには、適宜、公知の方法を用いることができる、例えば、Davisら(BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986)及びSambrookら(MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション(transvection)、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープローディング(scrape loading)、弾丸導入(ballistic introduction)、感染等により行うことができる。

## 【0030】

本発明の癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導物質のスクリーニング方法は、上記のようにして構築した癌・精巢抗原タンパク質D40 あるいはCASC5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質を発現する細胞に、被検物質を導入して、癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導について評価することにより行うことができる。該癌細胞の増殖・分裂の阻止及び/又は細胞死の誘導物質のスクリーニングにおける評価から、癌の治療及び/又は予防剤のスクリーニングを行うことができる。

## 【0031】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

## 【実施例1】

## 【0032】

(タンパク質D40をノックダウンすることによる細胞増殖抑制)

増殖中の細胞では、D40 mRNAの発現量は高く、増殖を停止させると急激に低下する。タンパク質レベルにおいても、HeLa、293、PC10(肺癌)等のヒト培養株

細胞で、増殖状態とタンパク質 D 4 0 の発現レベルとの相関が認められる。そこで、タンパク質 D 4 0 の発現を抑制することで、細胞の増殖・分裂に対する変化を検討した。

【 0 0 3 3 】

(合成 dsRNA を用いた細胞増殖抑制)

化学合成した二本鎖 RNA ( dsRNA ) を用いて、トランジェント ( transient ) な系で、D 4 0 に対する RNA i を試みた。タンパク質 D 4 0 をコードする遺伝子の塩基配列の中から、約 2 0 base からなる 3 箇所の配列を選び、dsRNA を合成した ( 配列表の配列番号 1 ~ 3 及び該 RNA 鎖の相補配列 ) 。これらを Oligofectamine と混合後に、HeLa 細胞に 4 時間接触させてトランスフェクションした ( リポフェクション法 ) 。4 8 時間後に、タンパク質の発現を検討したところ、コントロールの dsRNA をトランスフェクションした場合に比べ、タンパク質 D 4 0 の発現の約 8 0 % の低下を認め、また、細胞増殖能が低下していることが観察された。7 2 時間後の生細胞数と死細胞数とを棒グラフで表した結果を、図 1 に示す。また、4 8 時間後、及び、7 2 時間後の細胞の増殖割合、細胞死の割合を、それぞれ図 2 及び図 3 に示す。

10

【 0 0 3 4 】

更に、FACS ( Fluorescent activated cell sorter ) により、D 4 0 dsRNA をトランスフェクションされた細胞の細胞周期を解析したところ、トランスフェクション後、4 8 時間では、G 1 の細胞に比べ、G 2 / M 期の細胞が相対的に増加していることが観察された。7 2 時間後の細胞を Propidium Iodine ( PI ) 染色し、FACS で細胞周期の分布を解析した結果を、図 4 ( Control dsRNA ) 及び図 5 ( D40 dsRNA ) に示す。図中、縦軸は、PI の蛍光の強さを示し、横軸は細胞数を示す。図に示されるように、コントロールの dsRNA を導入された HeLa 細胞に比べ、D 4 0 dsRNA を導入された細胞では、G 1 期 ( M 2 ) の細胞が減少し、subG 1 期 ( M 1 ) の細胞数が増えている。これは、タンパク質 D 4 0 の発現低下のため、G 2 / M 期 ( M 4 ) の 4 倍体の細胞が分裂できず ( M 2 の低下 ) に細胞死に陥った ( M 1 の増加 ) ことを示している。上記、実験から、タンパク質 D 4 0 が細胞分裂において重要な役割を担っていることが示された。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 5 】

【 図 1 】本発明の合成 dsRNA を用いた細胞増殖抑制の実施例において、7 2 時間後の生細胞数と死細胞数とを棒グラフで表した結果を、示す図である。

30

【 図 2 】本発明の合成 dsRNA を用いた細胞増殖抑制の実施例において、4 8 時間後、及び、7 2 時間後の細胞の増殖割合について示す図である。

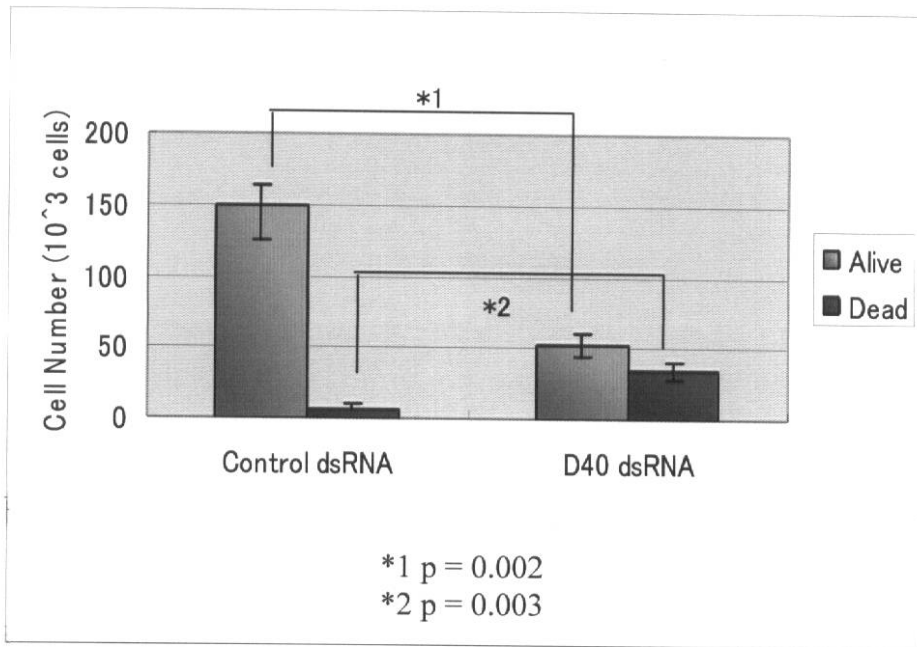
【 図 3 】本発明の合成 dsRNA を用いた細胞増殖抑制の実施例において、4 8 時間後、及び、7 2 時間後の細胞の細胞死の割合について示す図である。

【 図 4 】本発明の合成 dsRNA を用いた細胞増殖抑制の実施例において、7 2 時間後の細胞を Propidium Iodine ( PI ) 染色し、FACS で細胞周期の分布を解析した結果を、( Control dsRNA ) について示す図である。

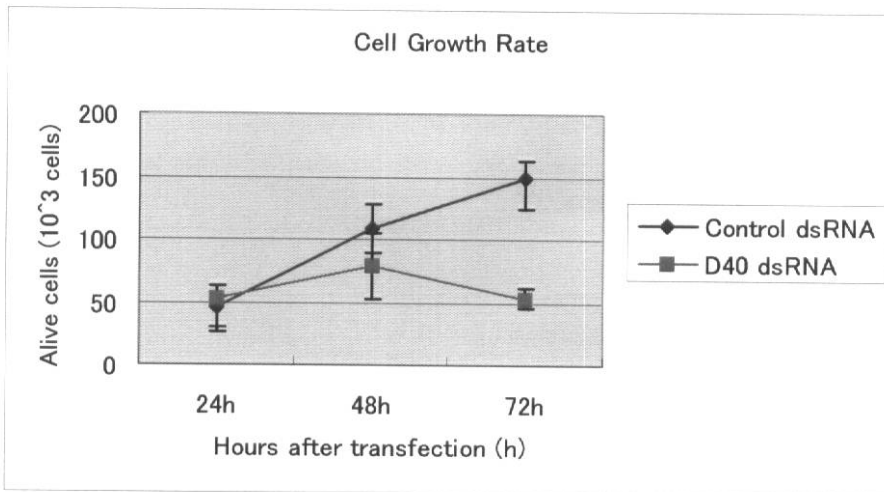
【 図 5 】本発明の合成 dsRNA を用いた細胞増殖抑制の実施例において、7 2 時間後の細胞を Propidium Iodine ( PI ) 染色し、FACS で細胞周期の分布を解析した結果を、( D40 dsRNA ) について示す図である。

40

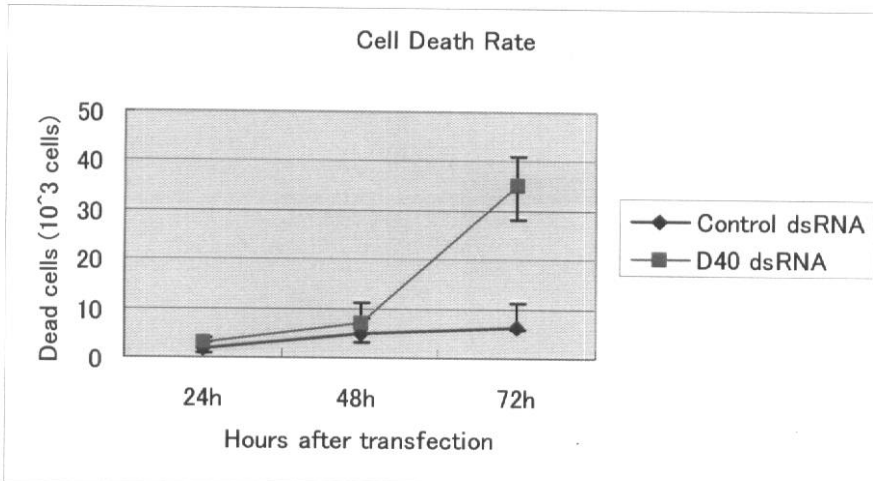
【 図 1 】



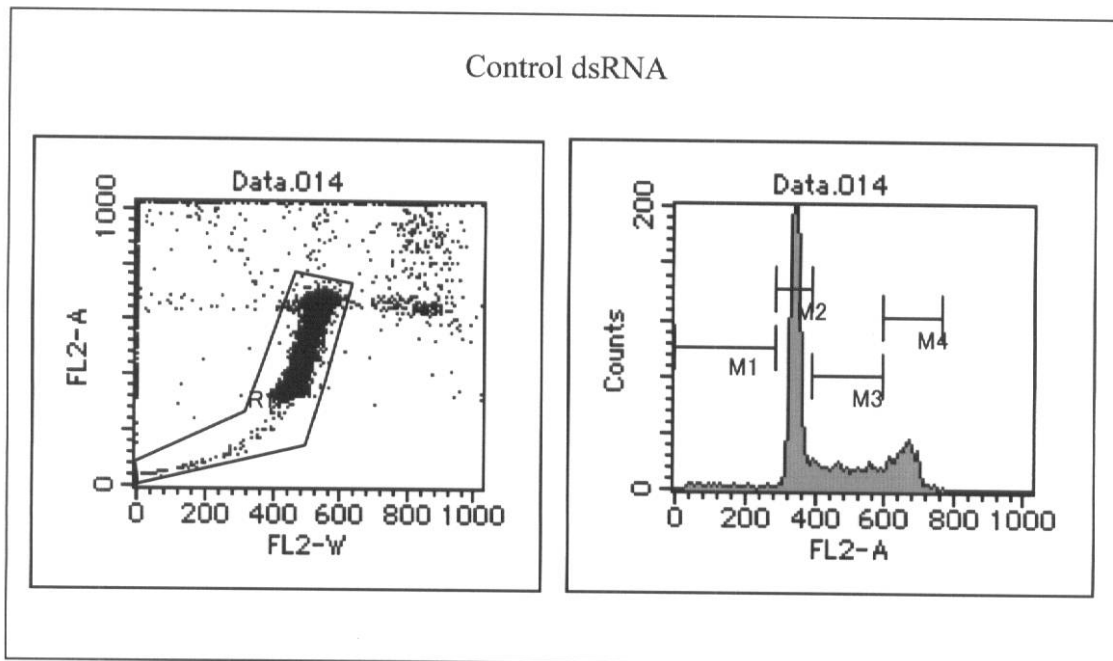
【 図 2 】



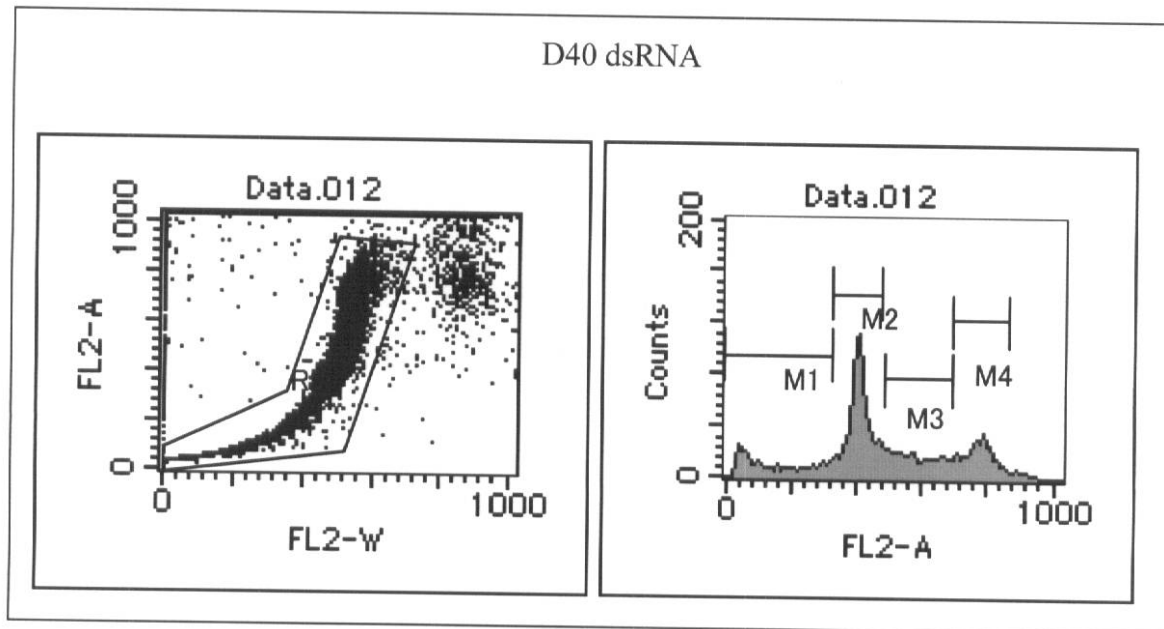
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

[2007112724000001.app](#)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>A 6 1 P 35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	35/00	
<b>G 0 1 N 33/50</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	33/50	Z
<b>G 0 1 N 33/15</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

(72)発明者 葛巻 暹

北海道札幌市北区北15条西七丁目 国立大学法人北海道大学遺伝子病制御研究所内

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA36

4B024 AA01 AA11 AA12 CA11 CA12 GA11 HA12

4B063 QA18 QQ02 QQ08 QQ20 QQ52 QR59 QR69 QR77 QR80 QS24

QS36 QX01

4C084 AA13 AA17 NA14 ZB212 ZB262

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB21 ZB26

(54)【発明の名称】D 4 0 或いはC A S C 5、又は、該癌・精巢抗原タンパク質のスプライシングアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子、及び、該遺伝子産物をターゲットとした癌細胞の増殖・分裂阻止及び細胞死の誘導方法、及び、該増殖・分裂阻止及び細胞死を誘導する物質のスクリーニング方法