

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02016/178374

発行日 平成30年2月22日 (2018. 2. 22)

(43) 国際公開日 平成28年11月10日 (2016. 11. 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	4 B 0 6 3
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/04 (2006. 01)	A 6 1 P 35/04	4 C 0 8 6
A 6 1 P 17/00 (2006. 01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 13/08 (2006. 01)	A 6 1 P 13/08	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2017-516587 (P2017-516587)	(71) 出願人	503360115 国立研究開発法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2016/062757	(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(22) 国際出願日	平成28年4月22日 (2016. 4. 22)	(74) 代理人	100094400 弁理士 鈴木 三義
(31) 優先権主張番号	特願2015-93980 (P2015-93980)	(74) 代理人	100147267 弁理士 大概 真紀子
(32) 優先日	平成27年5月1日 (2015. 5. 1)	(72) 発明者	深見 希代子 東京都八王子市堀之内1 4 3 2 - 1 学校 法人東京薬科大学内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	佐藤 礼子 東京都八王子市堀之内1 4 3 2 - 1 学校 法人東京薬科大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍細胞の悪性化抑制剤及び抗腫瘍剤

(57) 【要約】

本発明は、腫瘍細胞の転移性能獲得又はアポトーシス抵抗性獲得といった悪性化を抑制するための抑制剤及び抗腫瘍剤を提供する。本発明は、Z i c 5 遺伝子の機能を抑制又は阻害する物質を有効成分とし、腫瘍細胞の転移性能獲得又はアポトーシス抵抗性獲得を抑制又は阻害する、腫瘍細胞の悪性化抑制剤；ヒト以外の動物の腫瘍細胞の悪性化を抑制する方法であって、Z i c 5 遺伝子の機能を抑制又は阻害することにより、腫瘍細胞の転移性能獲得又はアポトーシス抵抗性獲得を抑制又は阻害する、腫瘍細胞の悪性化抑制方法；Z i c 5 遺伝子の機能を抑制又は阻害する物質を有効成分とし、前立腺がんの治療に用いられる、抗腫瘍剤；並びに、Z i c 5 遺伝子の発現量からなる、腫瘍細胞の悪性度マーカーである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Z i c 5 遺伝子の機能を抑制又は阻害する物質を有効成分とし、腫瘍細胞の転移性能獲得又はアポトーシス抵抗性獲得を抑制又は阻害する、腫瘍細胞の悪性化抑制剤。

【請求項 2】

前記 Z i c 5 遺伝子の機能を抑制又は阻害する物質が、Z i c 5 遺伝子を標的とする s i R N A である、請求項 1 に記載の腫瘍細胞の悪性化抑制剤。

【請求項 3】

前記 Z i c 5 遺伝子の機能を抑制又は阻害する物質が、Z i c 5 タンパク質と E - カドヘリンをコードする遺伝子のプロモーター配列との相互作用を阻害する物質、Z i c 5 タンパク質の核内局在を阻害する物質、又は Z i c 5 タンパク質を分解する物質である、請求項 1 に記載の腫瘍細胞の悪性化抑制剤。

10

【請求項 4】

前記腫瘍細胞が、メラノーマ細胞又は前立腺がん細胞である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の腫瘍細胞の悪性化抑制剤。

【請求項 5】

前記腫瘍細胞が、B R A F 阻害剤耐性を有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の腫瘍細胞の悪性化抑制剤。

【請求項 6】

ヒト以外の動物の腫瘍細胞の悪性化を抑制する方法であって、

20

Z i c 5 遺伝子の機能を抑制又は阻害することにより、腫瘍細胞の転移性能獲得又はアポトーシス抵抗性獲得を抑制又は阻害する、腫瘍細胞の悪性化抑制方法。

【請求項 7】

Z i c 5 遺伝子の機能の抑制又は阻害を、R N A 干渉により、Z i c 5 遺伝子の発現を阻害することにより行う、請求項 6 に記載の腫瘍細胞の悪性化抑制方法。

【請求項 8】

Z i c 5 遺伝子の機能を抑制又は阻害する物質を有効成分とし、メラノーマの治療に用いられる、抗腫瘍剤。

【請求項 9】

B R A F 阻害剤耐性を有するメラノーマ、又は B R A F 阻害剤への治療適性のないメラノーマの治療に用いられる、請求項 8 に記載の抗腫瘍剤。

30

【請求項 10】

Z i c 5 遺伝子の機能を抑制又は阻害する物質を有効成分とし、前立腺がんの治療に用いられる、抗腫瘍剤。

【請求項 11】

前記 Z i c 5 遺伝子の機能を抑制又は阻害する物質が、Z i c 5 遺伝子を標的とする s i R N A である、請求項 8 ~ 10 のいずれか一項に記載の抗腫瘍剤。

【請求項 12】

Z i c 5 遺伝子の発現量からなる、腫瘍細胞の悪性度マーカー。

【請求項 13】

被検腫瘍細胞の Z i c 5 遺伝子の発現量をマーカーとし、
被検腫瘍細胞の Z i c 5 遺伝子の発現量が多いほど、悪性度が高いと評価する、腫瘍細胞の悪性度の評価方法。

40

【請求項 14】

前記被検腫瘍細胞が原発性腫瘍細胞であり、前記被検腫瘍細胞の Z i c 5 遺伝子の発現量が、所定の閾値以上である場合に、前記被検腫瘍細胞が転移性能又はアポトーシス抵抗性を獲得したリスクが高いと評価する、請求項 13 に記載の腫瘍細胞の悪性度の評価方法。

【請求項 15】

Z i c 5 遺伝子の発現量からなり、メラノーマ又は前立腺がんを検出する、腫瘍マーカー

50

一。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、腫瘍細胞の転移性能獲得又はアポトーシス抵抗性獲得といった悪性を抑制するための抑制剤及び抗腫瘍剤に関する。

本願は、2015年5月1日に、日本に出願された特願2015-93980号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

【背景技術】

【0002】

悪性黒色腫（メラノーマ）は、メラニン産生細胞であるメラノサイトががん化した悪性腫瘍である。早期発見により治癒が可能であるが、遠隔性転移を起こした症例における5年生存率は約10%と低く、有効な治療法が確立されていない（例えば、非特許文献1及び2参照。）。また、症例の約60～70%以上でBRAF^{V600E}遺伝子変異が確認されている。BRAF（MAPK経路のMAPKKK）が下流のMEK（MAPK経路のMAPK）をリン酸化して活性化し、活性化されたMEKによりさらに下流のERK（MAPK経路のMAPK）がリン酸化されて活性化することにより、増殖、生存、浸潤、転移に関わる多くのタンパク質が活性化される（例えば、非特許文献3参照。）。BRAF^{V600E}の変異によりBRAFが恒常的かつ強力に活性化していることが、メラノーマの原因の1つであり、現在では、変異型BRAFに対する選択的な阻害剤（PLX4032、vemurafenib）を用いた臨床試験が行われ、高い奏効率が確認されている。しかし、BRAF遺伝子のスプライシングバリエーションの発現や、間質細胞から分泌される肝細胞増殖因子（HGF）の発現など、様々な機構により、BRAF阻害剤に対する薬剤耐性が生じ、その効果は限定的であることが報告されている（例えば、非特許文献4～6参照。）。

10

20

【0003】

上皮性のがんが転移能を獲得する原因の1つとして、上皮間葉形質転換（Epithelial Mesenchymal Transition; EMT）が知られている。EMTは、上皮系の細胞が間葉系細胞の形質を獲得する現象であり、EMTを生じると、上皮細胞間接着分子であるE-カドヘリンの発現量が減少することが知られている。また、EMTは、Snail、Slug、Twistなどの転写因子によって制御されていることが明らかになっており、これらの因子がE-カドヘリンなどの発現を制御し、EMTを引き起こすことが知られている（例えば、非特許文献7参照。）。

30

【0004】

メラノーマにおいても、転移のある症例で多くのEMT関連遺伝子の発現が変化しており、EMTプログラムの亢進が転移の原因の一つであることが示唆されている（例えば、非特許文献8参照。）。また、BRAF変異をもつメラノーマにおいて、BRAFの恒常的活性化によりZeb1、Twist1などの転写因子が発現誘導され、これらの因子によるE-カドヘリンの発現抑制が生じ、メラノーマの増悪が引き起こされるといふEMT様の現象が確認されている（例えば、非特許文献9参照。）。E-カドヘリンの発現レベルは多くのメラノーマにおいて低下しており、E-カドヘリンの発現が低下している症例において再発率が有意に上昇することが報告されている（例えば、非特許文献10参照。）。これらの知見から、E-カドヘリンの発現低下とメラノーマの増悪との関連が示唆されている。

40

【0005】

一方で、EMTはがんだけでなく、初期胚発生時にも必須の現象であり、原腸陥入や神経冠細胞の分化に関与している。神経冠細胞は、背側神経管の一部でEMTを起こし、上皮組織から乖離することで移動能を獲得し、末梢神経系、グリア細胞、衛星細胞、メラノサイト、象牙芽細胞、頭蓋顔面軟骨などに分化する。神経冠細胞のEMTにおいても、Snail、Slug、Twistなどの転写因子によりE-カドヘリンの発現低下が引き

50

起こされている（例えば、非特許文献 7 及び 11 参照。）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】Aamdal et al., European Journal of Cancer, 2011, vol.47, Suppl 3, p.S336-S337.

【非特許文献 2】Blank et al., Cancer Immunology, Immunotherapy, 2011, vol.60, p.1359-1371.

【非特許文献 3】Cangol et al., FEBS Journal, 2009, vol.277(1), p.2-27.

【非特許文献 4】Poulikakos et al., Nature, 2011, vol.480, p.387-390.

【非特許文献 5】Price et al., Journal of Clinical Oncology 2011, vol.29(19), p.2675-2682.

【非特許文献 6】Villanueva et al., Cancer Research, 2011, vol.71, p.7137.

【非特許文献 7】Thiery et al., Cell, 2009, vol.139, p.871-890.

【非特許文献 8】Alonso et al., Cancer Research, 2007, vol.67(7), p.3450-3460.

【非特許文献 9】Caramel et al., Cancer Cell, 2013, vol.24, p.466-480.

【非特許文献 10】Andersen et al., Modern Pathology, 2004, vol.17, p.990-997.

【非特許文献 11】Acloque et al., Journal of Clinical Investigation, 2009, vol.119, p.1438-1449.

【非特許文献 12】Satow et al., Gastroenterology, 2012, vol.142(3), p.572-581.

【非特許文献 13】Kanemaru et al., Nature Communications, 2012, vol.3, p.963.

【非特許文献 14】Arozarena et al., Cancer Cell, 2011, vol.19, p.45-57.

【非特許文献 15】Sanz-Moreno et al., Cancer Cell, 2011, vol.20, p.229-245.

【非特許文献 16】Hirano et al., Biochemical Pharmacology, 2013, vol.86(10), p.1419-1429.

【非特許文献 17】Ishiguro et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, vol.324, p.302-307.

【非特許文献 18】Dennis et al., Genome Biology, 2003, vol.4(5), p.P3.

【非特許文献 19】Hess et al., Cancer Research, 2005, vol.65, p.9851-9860.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、腫瘍細胞の転移性能獲得又はアポトーシス抵抗性獲得といった悪性を抑制するための抑制剤及び抗腫瘍剤を提供することを主たる目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、鋭意研究した結果、腫瘍細胞において Zic5 (Zic family member 5 (odd-paired homolog, Drosophila)) 遺伝子の発現を抑制することにより、E-カドヘリンの発現量低下が抑制されること、Zic5 タンパク質が E-カドヘリンの転写因子として機能することを見出し、本発明を完成させた。

【0009】

すなわち、本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤、腫瘍細胞の悪性化抑制方法、抗腫瘍剤、腫瘍細胞の悪性度マーカー、腫瘍細胞の悪性度の評価方法、及び腫瘍マーカーは、下記 [1] ~ [15] である。

[1] Zic5 遺伝子の機能を抑制又は阻害する物質を有効成分とし、腫瘍細胞の転移性能獲得又はアポトーシス抵抗性獲得を抑制又は阻害する、腫瘍細胞の悪性化抑制剤。

[2] 前記 Zic5 遺伝子の機能を抑制又は阻害する物質が、Zic5 遺伝子を標的とする siRNA である、前記 [1] の腫瘍細胞の悪性化抑制剤。

[3] 前記 Zic5 遺伝子の機能を抑制又は阻害する物質が、Zic5 タンパク質と E-カドヘリンをコードする遺伝子のプロモーター配列との相互作用を阻害する物質、Zic

10

20

30

40

50

c 5 タンパク質の核内局在を阻害する物質、又は Z i c 5 タンパク質を分解する物質である、前記 [1] の腫瘍細胞の悪性化抑制剤。

[4] 前記腫瘍細胞が、メラノーマ細胞又は前立腺がん細胞である、前記 [1] ~ [3] のいずれかの腫瘍細胞の悪性化抑制剤。

[5] 前記腫瘍細胞が、B R A F 阻害剤耐性を有する、前記 [1] ~ [4] のいずれかの腫瘍細胞の悪性化抑制剤。

[6] ヒト以外の動物の腫瘍細胞の悪性化を抑制する方法であって、Z i c 5 遺伝子の機能を抑制又は阻害することにより、腫瘍細胞の転移性能獲得又はアポトーシス抵抗性獲得を抑制又は阻害する、腫瘍細胞の悪性化抑制方法。

[7] Z i c 5 遺伝子の機能の抑制又は阻害を、R N A 干渉により、Z i c 5 遺伝子の発現を阻害することにより行う、前記 [6] の腫瘍細胞の悪性化抑制方法。

[8] Z i c 5 遺伝子の機能を抑制又は阻害する物質を有効成分とし、メラノーマの治療に用いられる、抗腫瘍剤。

[9] B R A F 阻害剤耐性を有するメラノーマ、又は B R A F 阻害剤への治療適性のないメラノーマの治療に用いられる、前記 [8] の抗腫瘍剤。

[1 0] Z i c 5 遺伝子の機能を抑制又は阻害する物質を有効成分とし、前立腺がんの治療に用いられる、抗腫瘍剤。

[1 1] 前記 Z i c 5 遺伝子の機能を抑制又は阻害する物質が、Z i c 5 遺伝子を標的とする s i R N A である、前記 [8] ~ [1 0] のいずれかの抗腫瘍剤。

[1 2] Z i c 5 遺伝子の発現量からなる、腫瘍細胞の悪性度マーカー。

[1 3] 被検腫瘍細胞の Z i c 5 遺伝子の発現量をマーカーとし、被検腫瘍細胞の Z i c 5 遺伝子の発現量が多いほど、悪性度が高いと評価する、腫瘍細胞の悪性度の評価方法。

[1 4] 前記被検腫瘍細胞が原発性腫瘍細胞であり、前記被検腫瘍細胞の Z i c 5 遺伝子の発現量が、所定の閾値以上である場合に、前記被検腫瘍細胞が転移性能又はアポトーシス抵抗性を獲得したリスクが高いと評価する、前記 [1 3] の腫瘍細胞の悪性度の評価方法。

[1 5] Z i c 5 遺伝子の発現量からなり、メラノーマ又は前立腺がんを検出する、腫瘍マーカー。

【発明の効果】

【 0 0 1 0 】

本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤及び抗腫瘍剤は、腫瘍細胞における E - カドヘリンの発現量低下を抑制し、転移性能獲得又はアポトーシス抵抗性獲得といった悪性化を抑制することができる。本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤等は、B R A F ^{V 6 0 0 E} 変異を有する腫瘍細胞や、B R A F 阻害剤 v e m u r a f e n i b に対する薬剤耐性を獲得した腫瘍細胞に対しても悪性化抑制作用及び抗腫瘍作用を有することから、腫瘍治療に非常に有効な新規薬剤である。

また、腫瘍細胞の Z i c 5 遺伝子の発現量は、腫瘍細胞の悪性度マーカーとして有用であり、よって本発明に係る腫瘍細胞の悪性度の評価方法は、転移性腫瘍の早期発見や、薬剤耐性獲得のリスク評価に有用である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

【図 1】実施例 1 において、各細胞の G A P D H を内部標準とした Z i c 5 遺伝子の発現量の定量結果を示した図である。

【図 2】実施例 1 において、ヒトメラノーマ臨床検体を、抗 Z I C 5 抗体を用いて免疫組織染色した染色像である。

【図 3】実施例 1 において、図 3 の染色像について、染色強度に基づいて Z i c 5 遺伝子の発現量をスコア化した結果を示した図である。

【図 4】実施例 2 において、Z i c 5 遺伝子安定発現株と F l a g 安定発現株のウェスタンブロット像である。

10

20

30

40

50

【図5】実施例2において、Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株のGAPDHを内部標準としたCDH1遺伝子(E-カドヘリンをコードする遺伝子)のmRNAの相対発現量の測定結果を示した図である。

【図6】実施例2において、RNA干渉によるZic5遺伝子発現を抑制した場合の、Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株のGAPDHを内部標準としたCDH1遺伝子のmRNAの相対発現量の測定結果を示した図である。

【図7】実施例2において、siZIC5#1、siZIC5#2、siNeg#1、又はsiNeg#2を導入したSK-MEL-28細胞とA375細胞のGAPDHを内部標準としたZic5遺伝子及びCDH1遺伝子のmRNAの相対発現量の測定結果を示した図である。

【図8】実施例3において、Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株の、Transwell Migrationアッセイの移動細胞数の計数結果(上段)と、ウェスタンブロット像(下段)である。

【図9】実施例3において、siZIC5#1、siZIC5#2、siNeg#1、又はsiNeg#2を導入したSK-MEL-28細胞とA375細胞の、Transwell Migrationアッセイの移動細胞数の計数結果(上段)と、ウェスタンブロット像(下段)である。

【図10】実施例3において、siZIC5#1、siZIC5#2、siNeg#1、又はsiNeg#2を導入したA375細胞の、Transwell Invasionアッセイの浸潤細胞数の計数結果を示した図である。

【図11】実施例3において、Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株の、ROCK阻害剤(Y27632)処理下又は未処理下の、Transwell Migrationアッセイの移動細胞数の計数結果を示した図である。

【図12】実施例3において、siZIC5#1、siZIC5#2、siNeg#1、又はsiNeg#2を導入したA375細胞とSK-MEL-28細胞の細胞数を経時的に測定した結果を示した図である。

【図13】実施例3において、MTTアッセイによってZic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株の生存細胞の相対数の測定結果を示した図である。

【図14】実施例3において、各細胞のsubG1期にある細胞の割合(%)を示した図である。

【図15】実施例4において、各細胞を皮下移植されたヌードマウスの腫瘍組織の大きさ(A)及び重量(B)の経時的变化を示した図である。

【図16】実施例4において、shNeg株、shZic5-1株又はshZic5-2株を注入したヌードマウスにおける肺転移能を測定した結果を示した図である。

【図17】実施例5において、EMSAにおいて用いた3種のプローブの塩基配列のアラインメント図である。

【図18】実施例5において、EMSAの電気泳動したゲルをHRP標識ストレプトアビジンで染色した染色像である。

【図19】実施例5において、クロマチン免疫沈降法において、マウスIgG又は抗HA抗体で沈降させたDNAの相対量の測定結果を示した図である。

【図20】実施例5において、ルシフェラーゼレポーターアッセイの結果を示した図である。

【図21】実施例5において、変異導入前のE-カドヘリンプロモーター領域(pCDH1)と一塩基置換変異を導入した変異体GBSmut及びM5mutの塩基配列のアラインメント図である。

【図22】実施例5において、変異導入前のpCDH1と、変異体GBSmut及びM5mutとのルシフェラーゼレポーターアッセイの結果を示した図である。

【図23】実施例6において、siZIC5又はsiNegを導入したA375細胞及びHT144細胞におけるPDGFD遺伝子の相対mRNA発現量の測定結果を示した図である。

10

20

30

40

50

【図24】実施例6において、Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株のPDGF D遺伝子の相対mRNA発現量の測定結果を示した図である。

【図25】実施例6において、siPDGF D # 1、siPDGF D # 2、又はsiNeg # 1を導入したA375細胞の細胞数を経時的に測定した結果を示した図である。

【図26】実施例6において、siZIC5又はsiNegを導入したA375細胞及びHT144細胞におけるITGA6遺伝子の相対mRNA発現量の測定結果を示した図である。

【図27】実施例6において、Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株のITGA6遺伝子の相対mRNA発現量の測定結果を示した図である。

【図28】実施例6において、ラットIgG又は抗ITGA6抗体で処理したA375細胞の相対細胞数の測定結果を示した図である。 10

【図29】実施例6において、Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株の細胞に、siPDGF D # 1又はsiNeg # 1を導入した細胞のTranswell Migrationアッセイの相対移動細胞数の測定結果を示した図である。

【図30】実施例7において、PLX4032処理後又はDMSO処理のZic5遺伝子安定発現株及びFlag安定発現株の相対細胞数の測定結果を示した図である。

【図31】実施例7において、BRA F阻害剤PLX4032処理後又はDMSO処理のZic5遺伝子安定発現株及びFlag安定発現株のAnnexin Vポジティブ細胞の割合(%)の測定結果を示した図である。

【図32】実施例7において、siNeg、siZIC5、siPDGF D、又はsiITGA6を導入したA375細胞のPLX4032処理後又はDMSO処理におけるAnnexin Vポジティブ細胞の割合(%)の測定結果を示した図である。 20

【図33】実施例7において、siNeg、siZIC5、siPDGF D、又はsiITGA6を導入したA375細胞をPLX4032処理後又はDMSO処理における相対細胞数の測定結果を示した図である。

【図34】実施例7において、ラットIgG又は抗ITGA6抗体で処理したA375細胞のPLX4032処理後又はDMSO処理におけるAnnexin Vポジティブ細胞の割合(%)の測定結果を示した図である。

【図35】実施例7において、siNeg又はsiPDGF Dを導入したZic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株(左図)、及びラットIgG又は抗ITGA6抗体で処理したZic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株(右図)の、PLX4032処理におけるAnnexin Vポジティブ細胞の割合(%)の測定結果を示した図である。 30

【図36】実施例7において、siNeg又はsiZIC5を導入したA375細胞のMEK阻害剤UO126処理後、若しくはオキサリプラチン処理後又はDMSO処理におけるAnnexin Vポジティブ細胞の割合(%)の測定結果を示した図である。

【図37】実施例8において、5種類のVemurafenib耐性株(vemR-1~5)とA375細胞を、各濃度のPLX4032で48時間処理した後の相対細胞数の測定結果を示した図である。

【図38】実施例8において、PLX4032処理後又はDMSO処理した後のvemR-1~5細胞及びA375細胞のウェスタンブロット像である。 40

【図39】実施例8において、siNeg、siZIC5、又はsiPDGF Dを導入したvemR-1~5細胞及びA375細胞の相対細胞数の測定結果を示した図である。

【図40】実施例9において、3種類のVemurafenib耐性株(vemR-1~3)とHT144細胞を、各濃度のPLX4032で48時間処理した後の相対細胞数の測定結果を示した図である。

【図41】実施例9において、PLX4032処理後又はDMSO処理した後のvemR-1~3細胞及びHT144細胞のウェスタンブロット像である。

【図42】実施例9において、siNeg、siZIC5、siPDGF D、又はsiITGA6を導入したvemR-1~3細胞及びHT144細胞の相対細胞数の測定結果を示した図である。 50

【図43】実施例10において、ヒト前立腺がん臨床検体を、抗ZIC5抗体を用いて免疫組織染色した染色像を、染色強度に基づいてZic5遺伝子の発現量をスコア化した結果を示した図である。

【図44】実施例10において、siZIC5#1、siZIC5#2、siNeg#1、又はsiNeg#2を導入したDU145細胞の相対細胞数の測定結果を示した図である。

【図45】実施例10において、siZIC5#1又はsiNeg#1を導入したDU145細胞又はPC細胞におけるAnnexin Vポジティブ細胞の割合(%)の測定結果を示した図である。

【図46】実施例10において、siZIC5#1又はsiNeg#1を導入したDU145細胞におけるZic5遺伝子、PDGFD遺伝子、及びITGA6遺伝子の相対mRNA発現量の測定結果を示した図である。

【図47】実施例10において、siPDGFD#1、siPDGFD#2、又はsiITGA6#1を導入したDU145細胞の相対細胞数の測定結果を示した図である。

【図48】実施例10において、siPDGFD#1、siPDGFD#2、又はsiITGA6#1を導入した後、docetaxel処理後又はDMSO処理したDU145細胞におけるAnnexin Vポジティブ細胞の割合(%)の測定結果を示した図である。

【図49】実施例11において、siPDGFD又はsiNegを導入したA375細胞のウェスタンブロット像である。

【図50】実施例11において、hPDGFD過剰発現株とpcDNA株のウェスタンブロット像である。

【図51】実施例11において、FAK阻害剤処理後のA375細胞のウェスタンブロット像である。

【図52】実施例11において、STAT3阻害剤処理後のA375細胞のウェスタンブロット像である。

【図53】実施例11において、IL-6処理後のA375細胞のウェスタンブロット像である。

【図54】実施例12において、siNeg#1、siNeg#2、siZIC5#1、又はsiPDGFD#1を導入したvemR-3細胞のAnnexin Vポジティブ細胞の割合(%)の測定結果を示した図である。

【図55】実施例12において、siZIC5#1又はsiPDGFD#1を導入し、さらにBRAf阻害剤PLX4032処理したvemR-3細胞のウェスタンブロット像である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明及び本願明細書において、「腫瘍細胞の悪性化」は、腫瘍細胞が、転移性能を獲得したり、アポトーシス抵抗性等の薬剤耐性を獲得する現象を意味する。

【0013】

本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤は、Zic5遺伝子の機能を抑制又は阻害する物質を有効成分とし、腫瘍細胞の転移性能獲得又はアポトーシス抵抗性獲得を抑制又は阻害することを特徴とする。Zic5遺伝子がコードするZic5タンパク質は、E-カドヘリンをコードする遺伝子(CDH1遺伝子)のプロモーター領域中の配列GGGCGGTに結合することにより、E-カドヘリンの発現を制御する。Zic5遺伝子の発現量が多くなるほど、E-カドヘリンの発現が抑制され、EMTが生じ、転移性能やアポトーシス抵抗性を獲得しやすくなる。逆に、Zic5遺伝子の発現を抑制することにより、E-カドヘリンの発現量の低下が抑制され、EMTが生じにくくなる。このため、本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤を腫瘍細胞内に導入することによって、EMTを抑制し、悪性化を抑制できる。Zic5タンパク質がCDH1遺伝子の転写因子としての機能を有することは、本願発明者らによって初めて見出された知見である。なお、Zic5タンパクは、

10

20

30

40

50

E - カドヘリン以外のタンパク質をコードする遺伝子の転写因子としても機能する可能性があり、当該タンパク質の発現を制御することによっても腫瘍細胞の悪性化が抑制されている可能性がある。

【0014】

Z i c 5 遺伝子の機能の抑制又は阻害は、Z i c 5 遺伝子の発現を阻害することによって達成できる。すなわち、本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤の有効成分であるZ i c 5 遺伝子の機能を抑制又は阻害する物質としては、RNA干渉等により、Z i c 5 遺伝子の発現自体を抑制させる作用を有する物質が挙げられる。当該物質としては、例えば、Z i c 5 遺伝子のcDNAの部分領域(RNAi(RNA干渉)標的領域)のセンス鎖とアンチセンス鎖からなる二本鎖構造を有するs i R N A (small interfering RNA)、s h R N A (short hairpin RNA)又はm i R N A (micro RNA)が挙げられる。また、標的である腫瘍細胞内において、s i R N A等を生産させることができるRNAi誘導ベクターであってもよい。s i R N A、s h R N A、m i R N A、及びRNAi誘導ベクターの作製は、標的とするZ i c 5 遺伝子のcDNAの塩基配列情報から、常法により設計し製造することができる。また、RNAi誘導ベクターは、市販の各種RNAiベクターの塩基配列に、RNAi標的領域の塩基配列を挿入することによって作製することもできる。

10

【0015】

本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤の有効成分としては、Z i c 5 タンパク質に直接又は間接的に結合することによって、Z i c 5 タンパク質がC D H 1 遺伝子のプロモーター配列に結合することを抑制又は阻害する物質であってもよい。当該物質としては、特に限定されるものではなく、核酸、ペプチド、タンパク質、低分子化合物のいずれであってもよい。

20

【0016】

Z i c 5 タンパク質に結合してZ i c 5 タンパク質とC D H 1 遺伝子のプロモーター配列との相互作用を阻害する核酸としては、例えば、C D H 1 遺伝子のプロモーター配列中のZ i c 5 タンパク質との結合領域(G G G C G G T)と同一又は相同性の高い塩基配列を有する核酸分子(いわゆる、デコイ核酸)が挙げられる。デコイ核酸としては、DNAであってもよく、RNAであってもよい、また、1本鎖核酸であってもよく、2本鎖核酸であってもよい。生体内での安定性に優れることから、デコイ核酸としては、2本鎖DNAが好ましい。

30

【0017】

Z i c 5 タンパク質に結合してZ i c 5 タンパク質とC D H 1 遺伝子のプロモーター配列との相互作用を阻害するタンパク質としては、例えば、抗Z I C 5 抗体が挙げられる。当該抗体としては、モノクローナル抗体でもよく、ポリクローナル抗体でもよい。また、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等の人工的に合成された抗体であってもよい。これらの抗体は、常法により製造することができる。

【0018】

また、本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤の有効成分としては、Z i c 5 タンパク質の核内局在を阻害する物質であってもよい。Z i c 5 タンパク質の核内局在が阻害されると、Z i c 5 タンパク質はC D H 1 遺伝子のプロモーター配列と結合できず、C D H 1 遺伝子の転写因子としての機能が阻害される。Z i c 5 タンパク質の核内局在を阻害する物質としては、Z i c 5 タンパク質の核内への移行を阻害する物質であってもよく、核外への排出を促進する物質であってもよい。核内移行を阻害する物質としては、例えば、Z i c 5 タンパク質と、Z i c 5 タンパク質の核内移行シグナルを被覆するように結合する物質が挙げられる。当該物質としては、タンパク質やペプチドであってもよく、低分子化合物であってもよい。

40

【0019】

本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤の有効成分としては、Z i c 5 タンパク質を分解する物質であってもよい。Z i c 5 タンパク質自体が分解されることにより、その機能は

50

阻害される。Z i c 5 タンパク質を分解する物質としては、Z i c 5 タンパク質を直接分解する分解酵素であってもよく、タンパク質分解酵素の基質になるようにポリユビキチン等の各種標識を行う物質であってもよい。

【0020】

本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤は、経口投与、静注、鼻腔又は口腔への直接投与、経皮投与等の各種投与形態に適した剤型に、常法により製剤化できる。当該剤型としては、錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、チュアブル剤、シロップ剤、液剤、懸濁剤、注射剤、含嗽剤、噴霧剤、貼付剤、軟膏剤等が挙げられる。

【0021】

本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤は、有効成分であるZ i c 5 遺伝子の機能を抑制又は阻害する物質に加えて、各種添加剤を含有していてもよい。当該添加剤としては、賦形剤、結合剤、滑沢剤、湿潤剤、溶剤、崩壊剤、溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、等張化剤、安定化剤、緩衝剤、防腐剤、抗酸化剤、矯味矯臭剤、着色剤等が挙げられる。これらの添加剤としては、薬学上許容される物質であって、医薬の製剤化に使用されているものの中から適宜選択して使用することができる。

10

【0022】

本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤をヒトやヒト以外の動物に投与し、Z i c 5 遺伝子の機能を抑制又は阻害することにより、腫瘍細胞の転移性能獲得又はアポトーシス抵抗性獲得を抑制又は阻害し、これらの動物の腫瘍細胞の悪性化を抑制することができる。当該動物としては、特に限定されるものではなく、ヒトであってもよく、ヒト以外の動物であってよい。非ヒト動物としては、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、サル、イヌ、ネコ、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等の哺乳動物や、ニワトリ、ウズラ、カモ等の鳥類等が挙げられる。

20

【0023】

本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤は、様々な腫瘍細胞に対して悪性化を抑制できる。標的とされる腫瘍細胞は、転移性がん由来の腫瘍細胞であってもよいが、悪性化抑制効果が十分に発揮できることから、原発性がん由来の腫瘍細胞であることが好ましい。

【0024】

本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤により標的とされる腫瘍細胞の種類は特に限定されるものではなく、皮膚がん、前立腺がん、甲状腺がん、肺がん、乳がん、肝臓がん、膵臓がん、胆管がん、副腎がん、胃がん、大腸がん、腎臓がん、子宮頸がん、子宮体がん、卵巣がん、膀胱がん、脂肪肉腫、線維肉腫、平滑筋肉腫、黄紋筋肉腫、滑膜肉腫、悪性末梢神経腫瘍、骨肉腫、軟骨肉腫、白血病、リンパ腫、骨髄腫等の細胞が挙げられる。本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤が治療剤として用いられる腫瘍細胞としては、元々E - カドヘリンの発現量の多い上皮性細胞に由来する腫瘍細胞であることが好ましく、Z i c 5 遺伝子の発現量も多いことから皮膚がん細胞又は前立腺がん細胞が好ましく、メラノーマ細胞又は前立腺がん細胞がより好ましい。特に、本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤は、v e m u r a f e n i b 等のB R A F 阻害剤に対する耐性を有する腫瘍細胞やB R A F 阻害剤への治療適性のない(すなわち、B R A F ^{V 6 0 0 E} 変異を有さない)腫瘍細胞に対しても悪性化抑制作用を奏することから、これらの腫瘍細胞を有する腫瘍の治療に好適に用いられる。

30

40

【0025】

メラノーマ等の皮膚がんや前立腺がんにおいては、Z i c 5 遺伝子の機能を抑制又は阻害することにより、悪性化が抑制できるだけでなく、腫瘍細胞の増殖も抑制できる。このため、Z i c 5 遺伝子の機能を抑制又は阻害する物質は、メラノーマ等の皮膚がんや前立腺がんの治療に用いられる抗腫瘍剤の有効成分として用いることもできる。当該Z i c 5 遺伝子の機能を抑制又は阻害する物質としては、本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤の有効成分と同様のものが使用できる。特に、本発明に係る抗腫瘍剤は、従来、有効な治療剤がなかったB R A F 阻害剤耐性を有するメラノーマや、B R A F 阻害剤への治療適性のないメラノーマに対し、非常に有効な治療剤である。

50

【0026】

Z i c 5 遺伝子の発現量が多い腫瘍細胞ほど、E - カドヘリンの発現が抑制され、E M T が生じ、悪性化しやすくなる。逆に、Z i c 5 遺伝子の発現量が少ない腫瘍細胞ほど、E - カドヘリンの発現量が低下せず、E M T が生じ難く、悪性化し難い。このため、腫瘍細胞のZ i c 5 遺伝子の発現量は、悪性度マーカーとして有用である。すなわち、被検腫瘍細胞のZ i c 5 遺伝子の発現量をマーカーとし、Z i c 5 遺伝子の発現量に基づいて、当該被検腫瘍細胞の悪性度を評価することができる。

【0027】

例えば、被検腫瘍細胞のZ i c 5 遺伝子の発現量が多いほど、悪性度が高いと評価することができる。逆に、被検腫瘍細胞のZ i c 5 遺伝子の発現量が少ないほど、悪性度が低いと評価することができる。また、被検腫瘍細胞のZ i c 5 遺伝子の発現量を、予め設定された閾値と比較し、当該被検腫瘍細胞の悪性度を評価してもよい。Z i c 5 遺伝子の発現量が、予め設定された閾値よりも多い場合には被検腫瘍細胞の悪性度は高いと評価し、予め設定された閾値よりも少ない場合には被検腫瘍細胞の悪性度は低いと評価する。例えば、被検腫瘍細胞が原発性腫瘍細胞であり、当該被検腫瘍細胞のZ i c 5 遺伝子の発現量が、所定の閾値以上である場合に、当該被検腫瘍細胞が転移性能又はアポトーシス抵抗性を獲得したりリスクが高いと評価することができる。

【0028】

当該閾値は、Z i c 5 遺伝子の発現量の測定方法の種類等を考慮して、また必要な予備検査等を行うことにより、適宜設定することができる。例えば、その他の検査方法の結果から、悪性化していないことが確認されている腫瘍細胞や非腫瘍細胞の細胞群（非悪性化群）のZ i c 5 遺伝子の発現量の測定値と、転移性能又はアポトーシス抵抗性を獲得していることが確認されている腫瘍細胞の細胞群（悪性化群）のZ i c 5 遺伝子の発現量の測定値とを比較することにより、両群を識別するための閾値を適宜設定することができる。

【0029】

被検腫瘍細胞のZ i c 5 遺伝子の発現量は、m R N A レベルで測定してもよく、タンパク質レベルで測定してもよい。Z i c 5 遺伝子の発現量の測定方法としては、細胞中の標的タンパク質量又は標的のm R N A 量を定量的又は半定量的に測定可能な方法であれば特に限定されるものではなく、検体中のm R N A やタンパク質の検出に用いられる公知の方法の中から、適宜選択して用いることができる。各方法は常法により行うことができる。

【0030】

Z i c 5 遺伝子のm R N A 量は、Z i c 5 遺伝子のm R N A とハイブリダイズし得るプローブを用いたハイブリダイゼーション法により検出してもよく、Z i c 5 遺伝子のm R N A とハイブリダイズし得るプライマーとポリメラーゼを用いた核酸増幅反応を利用した方法により検出してもよい。その他、市販されている検出用キット等を利用することもできる。例えば、被検腫瘍細胞から抽出した総R N A を鋳型として逆転写反応を行うことによりc D N A を合成した後、得られたc D N A を鋳型としてP C R (P o l y m e r a s e C h a i n R e a c t i o n) 等を行い、得られた増幅産物量を測定することによって、Z i c 5 遺伝子のm R N A 量を定量できる。増幅産物量は、ゲルやキャピラリー電気泳動等で特異的に分離した後、それを検出することにより定量的に測定することができる。また、P C R に代えてリアルタイムP C R 等の半定量的P C R を行うことにより、Z i c 5 遺伝子のm R N A の検出と同時にその定量を簡便に行うことができる。

【0031】

Z i c 5 タンパク質量は、Z i c 5 タンパク質と特異的に結合する抗体（抗Z I C 5 抗体）を用いて測定することができる。例えば、抗Z I C 5 抗体を一次抗体とした免疫染色を行い、染色の有無や染色強度に基づいて、被検腫瘍細胞中におけるZ i c 5 の発現の有無や発現強度を調べる。当該免疫染色は、酵素標識した抗体を用いる酵素抗体染色法であってもよく、蛍光標識した抗体を用いる蛍光抗体染色法であってもよい。また、被検腫瘍細胞のZ i c 5 タンパク質量は、被検腫瘍細胞から調製された細胞抽出液中のタンパク質を、S D S - P A G E 等により分離させた後、ウェスタンブロット法等により定量的に測

10

20

30

40

50

定することができる。

【0032】

メラノーマ細胞や前立腺がん細胞は、がん化する前の細胞に比べてZic5遺伝子の発現量が多い。このため、Zic5遺伝子の発現量は、メラノーマ又は前立腺がんを検出することを特徴とする腫瘍マーカーとしても有用である。例えば、Zic5遺伝子の発現量が、予め設定された閾値よりも多い場合には被検細胞はメラノーマ細胞又は前立腺がん細胞であると評価し、予め設定された閾値よりも少ない場合には被検細胞はがん化していない細胞であると評価する。例えば、その他の検査方法の結果から、がん化していないことが確認されている細胞の細胞群（正常細胞群）のZic5遺伝子の発現量の測定値と、メラノーマ細胞であることが確認されている細胞の細胞群（メラノーマ細胞群）のZic5

10

【実施例】

【0033】

次に実施例等を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。なお、動物実験は、学校法人東京薬科大学において、倫理委員会の承認の下、動物実験の研究ガイドラインを遵守して行われた。

【0034】

<細胞培養>

以下の実施例において、使用した細胞の培養は以下の通りに行った。

20

メラノーマ細胞株である4種類の細胞株（SK-MEL-28細胞、Colo829細胞、HT144細胞、及びA375細胞）、及び前立腺がん細胞株であるDU145細胞は、ATCC（American Type Culture Collection）より分譲されたものを用いた。前立腺がん細胞株であるPC3細胞は、JCRB細胞バンク（独立行政法人医薬基盤研究所）より分譲されたものを用いた。HEK293細胞とHela細胞は、非特許文献12に記載のものを用いた。これらの細胞は、37℃、5%CO₂存在下、10%ウシ胎児血清を含有させたRPMI 1640培地（インビトロジェン社製）中で培養した。

【0035】

[実施例1]

がん細胞の悪性化と個体発生時に重要な役割を果たすEMTの共通性に着目し、神経冠の発生に關与する遺伝子群に対するヒト型siRNAライブラリーを作製し、RNA干渉法を利用して、BRA^{V600E}変異を有するメラノーマ細胞株におけるE-カドヘリンの発現抑制作用を有する遺伝子を探索した。

30

【0036】

<RNA干渉による、E-カドヘリン発現量に対する影響の測定>

まず、神経冠細胞の形成・分化に必須であり、かつ、がん細胞における詳細な分子機構が解明されていない遺伝子を26個選別し、各遺伝子についてそれぞれRNA干渉を行い、E-カドヘリンの発現量に対する影響を調べた。具体的には、各遺伝子に対して2種類のsiRNA（キアゲン社製）をそれぞれ導入した細胞のE-カドヘリンを、蛍光免疫染色法により検出し、その発現量を定量した。この結果、26個の遺伝子のうち、Zic5、BMPER、TES、SULF1、SULF2、及びSOX10の6個の遺伝子が、siRNA導入により発現を抑制した細胞において、SK-MEL-28細胞及びColo829細胞の両方において、E-カドヘリンの発現量が、ネガティブコントロールsiRNAを導入した細胞に比べて1.5倍以上に上昇した。

40

【0037】

<ウェスタンブロット法によるZic5遺伝子の発現確認>

メラノーマ及びメラノサイトにおけるZic5遺伝子の発現量をタンパク質レベルで確認するため、メラノーマ細胞株であるA375細胞、HT144細胞、COLO829細胞、及びSK-MEL-28細胞、並びにヒト正常メラノサイト（NHM）におけるZic5遺伝子の発現量を、ウェスタンブロット法によって調べた。GAPDH（glyc

50

raldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase) を内部コントロールとして使用した。ウェスタンブロット法は、抗 Z I C 5 抗体 (A v i v a s y s t e m s b i o l o g y 社製) 及び抗 G A P D H 抗体 (C e l l S i g n a l i n g 社製) を用いて、カネマルらの方法 (非特許文献 1 3 参照。) に準じて行った。

【 0 0 3 8 】

各細胞の G A P D H を内部標準とした Z i c 5 タンパク質の発現量の定量結果を図 1 に示す。図 1 中、下段が各細胞のウェスタンブロットの結果であり、上段がウェスタンブロットで検出された各バンドの染色強度に基づいて算出された Z i c 5 タンパク質の発現量 (相対値) である。その結果、 Z i c 5 遺伝子の発現量は、ヒト正常メラノサイトに比べて、全てのメラノーマ細胞株において高いことが確認できた。

10

【 0 0 3 9 】

< ヒトメラノーマ組織切片の Z I C 5 染色 >

また、ヒトメラノーマの患者組織切片であって、良性母斑 (B e n i g n n e v u s) の組織切片 1 8 枚、がん組織部位 (M e l a n o m a) の組織切片 5 6 枚、及び転移部位 (M e t a s t a s i s) の組織切片 2 6 枚が含まれている組織マイクロアレイ (U S B i o m a x 社から購入) に対して、抗 Z I C 5 抗体 (A v i v a s y s t e m s b i o l o g y 社製) を用いて免疫組織染色を行い、ヒトメラノーマ臨床検体における Z i c 5 タンパク質の発現を調べた。免疫染色像を、図 2 の上段に示す。この結果、良性母斑に比べて、がん組織部位や転移部位では、 Z i c 5 遺伝子の発現レベルが有意に亢進していることがわかった。

20

【 0 0 4 0 】

また、各組織切片の染色像を、染色強度に基づいて 4 段階 (0 ~ 3) にスコア化した。各スコアの染色強度を図 2 下段に示し、各スコアの結果を図 3 に示す。図 3 の左図は、良性母斑、がん組織部位、及び転移部位の染色像の Z i c 5 発現量スコアであり、図 3 の右図は、ステージごとの Z i c 5 発現量スコアである。この結果、 Z i c 5 遺伝子の発現は、メラノーマのステージが進行するほど高くなる傾向がみられた。

【 0 0 4 1 】

これらの結果から、スクリーニングにより得た候補遺伝子 Z i c 5 は、 E - カドヘリンの発現を制御し、メラノーマの進行に關与する可能性が示唆された。

【 0 0 4 2 】

[実施例 2]

メラノーマ細胞における Z i c 5 遺伝子の役割を解明するため、メラノーマ細胞株 S K - M E L - 2 8 細胞を用いて、 Z i c 5 遺伝子安定過剰発現株を作製し、転移関連遺伝子について調べた。

30

【 0 0 4 3 】

< Z i c 5 遺伝子安定発現株の作製 >

まず、ヒト Z i c 5 遺伝子の O R F の c D N A を P C R により増幅し、得られた増幅産物を発現用プラスミドベクター p F l a g - C M V - 4 (S i g m a 社製) にサブクローニングし、 F l a g 標識された Z I C 5 (F l a g - Z I C 5) を発現するための発現ベクター (F l a g - Z I C 5 発現ベクター) を調製した。得られた F l a g - Z I C 5 発現ベクターを、リポフェクタミン試薬「リポフェクタミン 2 0 0 0 」 (インビトロジェン社製) を用い、製品添付のプロトコールに従って S K - M E L - 2 8 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後の細胞を薄く播き、 8 0 0 μ g / m L の G 4 1 8 (インビトロジェン社製) を含有する培地中で 1 0 日間培養し、 Z i c 5 遺伝子安定発現株を選抜した。

40

対照として、 F l a g - Z I C 5 発現ベクターに代えて F l a g ペプチドのみを発現させる空ベクター (p F l a g - C M V - 4) を用いた以外は同様にしてトランスフェクション及び G 4 1 8 選抜を行い、 F l a g 安定発現株を得た。

【 0 0 4 4 】

Z i c 5 遺伝子安定発現株と F l a g 安定発現株 (コントロール細胞) の細胞の形態を

50

、顕微鏡観察により調べたところ、Z i c 5 遺伝子安定発現株は、コントロール細胞と比較して樹状突起の数が減少していることが観察された（図示せず。）。

【 0 0 4 5 】

< ウェスタンブロット法による E - カドヘリン発現量の測定 >

Z i c 5 遺伝子安定発現株と F l a g 安定発現株の E - カドヘリンのタンパク質量を、G A P D H を内部標準としたウェスタンブロット法により測定した。ウェスタンブロット法は、抗 F l a g 抗体（S i g m a 社製）、抗 E - カドヘリン抗体（B D バイオサイエンス社製）、及び抗 G A P D H 抗体（C e l l S i g n a l i n g 社製）を用いて、カネマルらの方法（非特許文献 1 3 参照。）に準じて行った。測定は、2 回の独立した試行により行った。

10

【 0 0 4 6 】

各抗体により染色されたバンドを図 4 に示す。上段（「F l a g」）が抗 F l a g 抗体で染色されたバンドであり、中段（「E - c a d」）が抗 E - カドヘリン抗体で染色されたバンドであり、下段（「G A P D H」）が抗 G A P D H 抗体で染色されたバンドである。F l a g - Z I C 5 が発現している Z i c 5 遺伝子安定発現株（図中、「F l a g - Z I C 5」）では、コントロール細胞（図中、「p F l a g」）に比べて顕著に E - カドヘリンの発現が抑制されていた。

【 0 0 4 7 】

< q R T - P C R による E - カドヘリン量の測定 >

Z i c 5 遺伝子安定発現株と F l a g 安定発現株の C D H 1 遺伝子（E - カドヘリンをコードする遺伝子）の m R N A 量を、q R T - P C R により測定した。G A P D H 遺伝子の m R N A 量を内部標準とした。測定は、2 回の独立した試行により行った。

20

まず、各細胞の総 R N A を回収し、これを鋳型として逆転写反応を行い、c D N A を合成した。総 R N A の回収には市販のキット「ReliaPrep RNA Cell Miniprep System」（プロメガ社製）を用い、逆転写反応には市販のキット「High Capacity cDNA Reverse Transcription kit」（アプライドバイオシステムズ社製）を用い、それぞれ製品添付のプロトコールに従って行った。

次いで、得られた c D N A を鋳型とし、リアルタイム P C R を行った。リアルタイム P C R は、市販のキット「THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix」（東洋紡社製）とサーマルサイクラー「CFX96」（バイオ・ラッド社製）を用いて行った。使用したプライマーを表 1 に示す。

30

【 0 0 4 8 】

【表 1】

プライマー	塩基配列	配列番号
<i>CDH1</i> (E-cadherin) フォワード	GGACTTTGGCGTGGGCCAGG	1
<i>CDH1</i> (E-cadherin) リバース	CCCTGTCCAGCTCAGCCCGA	2
<i>GAPDH</i> フォワード	AGCCTCCCGCTTCGCTCTCT	3
<i>GAPDH</i> リバース	CCAGGCGCCCAATACGACCA	4

40

【 0 0 4 9 】

各細胞の C D H 1 遺伝子の m R N A 量は、G A P D H 遺伝子の m R N A 量によりノーマライズした。Z i c 5 遺伝子安定発現株と F l a g 安定発現株の C D H 1 遺伝子の m R N A の相対発現量の平均値（n = 3）を図 5 に示す。この結果、Z i c 5 遺伝子安定発現株では、E - カドヘリンの発現が減少することが示された。

【 0 0 5 0 】

< Z i c 5 遺伝子発現抑制の E - カドヘリン発現量への影響 >

Z i c 5 遺伝子安定発現株と F l a g 安定発現株の Z i c 5 遺伝子を R N A 干渉により抑制した場合の C D H 1 遺伝子の m R N A 量を、q R T - P C R により測定した。

Z i c 5 遺伝子安定発現株と F l a g 安定発現株に対して、表 2 に記載の s i Z I C 5

50

2 又はネガティブコントロール *siRNA* (*siNeg* # 1) を実施例 1 と同様にして導入した。*siRNA* 導入後の細胞の *CDH1* 遺伝子の *mRNA* 量を、*GAPDH* 遺伝子の *mRNA* 量を内部標準とし、前記と同様にして *qRT-PCR* により測定した。

【 0 0 5 1 】

【 表 2 】

siRNA	標的配列	配列番号
siZic5 #1	AAGATTCGAGGCTGTGACAAA	5
siZic5 #2	GGCTGTGACAAATCCTACA	6
siNeg #1	AATTCTCCGAACGTGTCACGT	7
siNeg #2	ATCCGCGCGATAGTACGTA	8

10

【 0 0 5 2 】

各細胞の *CDH1* 遺伝子の *mRNA* の相対発現量の平均値 ($n = 3$) を図 6 に示す。この結果、*Zic5* 遺伝子安定発現株における *E-カドヘリン* の発現減少は、*RNA* 干渉による *Zic5* 遺伝子発現抑制により回復することが示された。

【 0 0 5 3 】

< 内在性の *ZIC5* の機能 >

内在性の *ZIC5* の役割を明らかにするため、メラノーマ細胞株 *SK-MEL-28* 細胞と *A375* 細胞を用いて、*RNA* 干渉による *Zic5* 遺伝子の発現抑制の影響を検討した。

20

各細胞に対して、表 2 に記載の *siZIC5* # 1、*siZIC5* # 2、*siNeg* # 1、又は *siNeg* # 2 を実施例 1 と同様にして導入した。*siRNA* 導入後の細胞の *Zic5* 遺伝子、*CDH1* 遺伝子、*TYRP1* 遺伝子、*TYR* 遺伝子、及び *MMP2* 遺伝子の *mRNA* 量を、*GAPDH* 遺伝子の *mRNA* 量を内部標準とし、前記と同様にして *qRT-PCR* により測定した。なお、*Zic5* 遺伝子の *mRNA* 量の定量には、表 3 に記載のプライマーを使用した。

【 0 0 5 4 】

【 表 3 】

プライマー	塩基配列	配列番号
<i>ZIC5</i> フォワード	CACCAGTGACAAGCCCTACT	9
<i>ZIC5</i> リバース	GAGTAACCAAGGGGTCCTGG	10

30

【 0 0 5 5 】

siZIC5 # 2 又は *siNeg* # 2 を導入した細胞の透過光画像を比較したところ、*Zic5* 遺伝子の発現抑制により、*A375* 細胞の形態変化が観察された (図示せず。)

。

また、各細胞の *Zic5* 遺伝子、*CDH1* 遺伝子、*TYRP1* 遺伝子、*TYR* 遺伝子、及び *MMP2* 遺伝子の *mRNA* の相対発現量の平均値 ($n = 3$) を調べた (図示せず。)。各細胞の *Zic5* 遺伝子及び *CDH1* 遺伝子の測定結果を図 7 に示す。*SK-MEL-28* 細胞と *A375* 細胞のいずれにおいても、*siZIC5* # 1 又は *siZIC5* # 2 を導入した細胞では *Zic5* 遺伝子の *mRNA* の相対発現量は顕著に減少していることが確認された。また、*siZIC5* # 1 又は *siZIC5* # 2 を導入した細胞では、*CDH1* 遺伝子、*TYRP1* 遺伝子、及び *TYR* 遺伝子の発現上昇と *MMP2* 遺伝子の発現低下が引き起こされていた。これらの結果から、*Zic5* 遺伝子は、メラノーマ細胞において、*E-カドヘリン* の抑制、細胞の脱分化の促進、細胞外基質分解酵素 (*MMP2*) の発現亢進を引き起こす因子であると考えられた。

40

【 0 0 5 6 】

50

[実施例 3]

Z I C 5 により引き起こされた E - カドヘリンの発現低下、脱分化、細胞外基質分解酵素 (M M P 2) の発現亢進は、いずれも転移性メラノーマの特徴である。従って、次に、Z I C 5 がメラノーマ細胞の悪性形質である、運動能、浸潤能、増殖能に与える影響について検討を行った。

【 0 0 5 7 】

< スクラッチアッセイ >

運動能を調べるため、無血清条件下でのスクラッチアッセイを行った。

具体的には、Z i c 5 遺伝子安定発現株と F l a g 安定発現株を培養し、コンフルエントの細胞を黄色チップの先端で削った (スクラッチ) 後、無血清培地中で培養した。スクラッチから 2 4 時間経過後の細胞では、F l a g 安定発現株細胞と比較し、Z i c 5 遺伝子安定発現株では、移動細胞数が増加していた (図示せず。) 。

10

【 0 0 5 8 】

< T r a n s w e l l M i g r a t i o n アッセイ >

運動能を調べるため、血清入り条件下における T r a n s w e l l M i g r a t i o n アッセイを行った。

具体的には、Z i c 5 遺伝子安定発現株と F l a g 安定発現株を、孔径 8 μ m のインサート (B D バイオサイエンス社製) を入れた 2 4 ウェルプレートにまき、1 0 % F B S 含有 R P M I 1 6 4 0 培地中で培養し、移動した細胞数を計数した。計数結果を図 8 (上段) に示す。この結果、F l a g 安定発現株に比べて、Z i c 5 遺伝子安定発現株では、移動細胞数が有意に増加していた。

20

【 0 0 5 9 】

メラノーマの運動性の亢進に重要な因子として、M y o s i n l i g h t c h a i n 2 (M L C 2) が知られている。M L C 2 はリン酸化を受け活性化し、アクチン収縮を促進することによって細胞運動を促進していることが知られている (非特許文献 1 4 及び 1 5 参照。) 。そこで、各細胞のリン酸化 M L C 2 (p p M L C 2) 、M L C 2 、及び G A P D H のタンパク質量を、ウェスタンブロット法により測定した。ウェスタンブロット法は、抗 p p M L C 2 抗体、抗 M L C 2 抗体、及び抗 G A P D H 抗体 (いずれも C e l l S i g n a l i n g 社製) を用いて、カネマルらの方法 (非特許文献 1 3 参照。) に準じて行った。

30

【 0 0 6 0 】

各細胞のウェスタンブロットの結果を図 8 の下段に示す。この結果、Z i c 5 遺伝子安定発現株では、F l a g 安定発現株に比べて M L C 2 のリン酸化が亢進していることが明らかになった。

【 0 0 6 1 】

内在性の Z i c 5 遺伝子を s i R N A により発現抑制した際のメラノーマ細胞の運動能について、T r a n s w e l l M i g r a t i o n アッセイを行い検証した。具体的には、メラノーマ細胞株 S K - M E L - 2 8 細胞と A 3 7 5 細胞に、表 2 に記載の s i Z I C 5 # 1、s i Z I C 5 # 2、s i N e g # 1、又は s i N e g # 2 を実施例 1 と同様にして導入した。各 s i R N A を導入した細胞に対して、前記と同様にして T r a n s w e l l M i g r a t i o n アッセイを行い、移動した細胞数を計数した。計数結果を図 9 (上段) に示す。この結果、両細胞とも、Z i c 5 遺伝子の発現抑制により細胞移動率の減少が観察された。また、S K - M E L - 2 8 細胞に s i R N A を導入した細胞について、p p M L C 2、M L C 2、及び G A P D H のタンパク質量を、ウェスタンブロット法により測定した。S K - M E L - 2 8 細胞のウェスタンブロットの結果を図 9 の下段に示す。この結果、Z i c 5 遺伝子の発現抑制により p p M L C 2 の減少も確認された。

40

【 0 0 6 2 】

< T r a n s w e l l I n v a s i o n アッセイ >

T r a n s w e l l I n v a s i o n アッセイを、6 0 μ L (2 . 5 m g / m L) の B D M a t r i g e l B a s e m e n t M e m b r a n e M a t r i x G r o

50

w t h F a c t o r R e d u c e d (B D バイオサイエンス社製) が添加された細胞培養インサートを用いて、ヒラノらの方法 (非特許文献 1 6) の方法に準じて行った。マトリゲルに浸潤した細胞数を計数した。計数結果を図 1 0 に示す。この結果、Z i c 5 遺伝子の発現抑制による細胞浸潤率の低下が観察された。

【 0 0 6 3 】

< M L C 2 リン酸化抑制下における T r a n s w e l l M i g r a t i o n アッセイ >

M L C 2 リン酸化抑制の細胞移動性に対する影響を調べた。具体的には、Z i c 5 遺伝子安定発現株と F l a g 安定発現株に対して、R O C K 阻害剤 (Y 2 7 6 3 2) 処理をした状態又は未処理の状態、前記の通り T r a n s w e l l M i g r a t i o n アッセイを行い、移動した細胞数を計数した。計数結果を図 1 1 に示す。この結果、Z i c 5 遺伝子の過剰発現による移動細胞の増加は、R O C K 阻害剤処理による M L C 2 リン酸化の抑制によって部分的に抑制できた。

10

【 0 0 6 4 】

また、各細胞の p p M L C 2、M L C 2、及び G A P D H のタンパク質を、前記と同様にウエスタンブロット法により測定した。この結果、R O C K 阻害剤未処理の Z i c 5 遺伝子安定発現株で検出された p p M L C 2 のバンドが、R O C K 阻害剤処理の Z i c 5 遺伝子安定発現株ではほとんど検出されず、R O C K 阻害剤処理により、Z i c 5 遺伝子安定発現株で亢進していた M L C 2 のリン酸化は、R O C K 阻害剤処理により抑制されていた (図示せず。)。

これらの結果から、Z I C 5 はメラノーマ細胞の運動能を促進する因子であり、その一因として M L C 2 のリン酸化の亢進があることが明らかになった。

20

【 0 0 6 5 】


< 細胞増殖アッセイ >

細胞増殖アッセイを行い、Z i c 5 遺伝子の細胞増殖に対する影響について検討した。

細胞増殖アッセイは、ウェルあたり 1, 0 0 0 ~ 2, 0 0 0 個の細胞となるように 9 6 ウェルプレートにまいた A 3 7 5 細胞及び S K - M E L - 2 8 細胞に、表 2 に記載の s i Z I C 5 # 1、s i Z I C 5 # 2、s i N e g # 1、又は s i N e g # 2 を実施例 1 と同様にして導入した。各 s i R N A を導入した細胞の細胞数を、経時的に測定した。細胞数の計数は、細胞核をヘキスト 3 3 3 4 2 (同仁化学研究所製) 染色し、各ウェルの総細胞数を I N C e l l A n a l y z e r 2 0 0 0 (G E ヘルスケア社製) により計数した。各細胞の細胞数の平均値 (n = 3) を図 1 2 に示す。この結果、A 3 7 5 細胞及び S K - M E L - 2 8 細胞のいずれにおいても、Z I C 5 # 1 又は s i Z I C 5 # 2 を導入した細胞では、細胞の増殖が鈍く、Z i c 5 遺伝子の発現抑制によりメラノーマ細胞の増殖率が低下することが明らかになった。また、同じ傾向が、C o l o 8 2 9 細胞と H T 1 4 4 細胞においても観察された (図示せず。)。

30

【 0 0 6 6 】

また、Z i c 5 遺伝子安定発現株と F l a g 安定発現株を 9 日間培養し、経時的に M T T アッセイを行い、生存している細胞の相対数を測定した。測定結果を図 1 3 に示す。図中、「」は、細胞がコンフルエントになった時点を示す。この結果、Z i c 5 遺伝子安定発現株では、細胞密度が高くなっても増え続ける現象が観察された。

40

【 0 0 6 7 】

< 細胞周期解析 >

Z i c 5 遺伝子が、細胞周期に与える影響について、A 3 7 5 細胞に表 2 に記載の s i Z I C 5 # 2 又は s i N e g # 2 を実施例 1 と同様にして導入した細胞に対して、細胞周期解析を行うことにより調べた。

細胞周期解析は、まず、2 4 時間無血清培地で培養した後、1 0 % F B S 含有培地で 2 4 時間培養した。次いで、細胞を固定して P I (p r o p i d i u m i o d i d e) 染色した後、フローサイトメトリー解析 (S H 8 0 0 , ソニー社製) を行った。得られたデータは、解析ソフトウェア F l o w J o (トミーデジタルバイオロジー社製) により解析した。この結果、Z i c 5 遺伝子の発現が抑制された細胞では、s u b G 1 期の細胞が増

50

大していた。shZIC5 # 1 又は shNeg # 1 を導入した細胞でも同様の結果が得られた。subG1 期の細胞数の割合 (%) を図 14 に示す。統計学的差異は、Student's t-test (***: P < 0.001、**: P < 0.01、*: P < 0.05) により求めた。

【0068】

これらの結果から、Zic5 遺伝子はメラノーマ細胞の増殖に促進的に働く因子であることが明らかになった。

【0069】

[実施例 4]

ここまでの結果より、Zic5 遺伝子がメラノーマ細胞の細胞増殖、移動能、浸潤能を促進することが確認されたため、生体内におけるメラノーマの増殖・転移について検討を行った。

【0070】

< shZic5 株及び shNeg 株の作製 >

転移能の高い A375 細胞に、Zic5 遺伝子に対する shRNA 導入プラスミドを安定的に組み込んだ shZic5 株、ネガティブコントロール shRNA 導入プラスミドを組み込んだネガティブコントロール株 (shNeg 株) を作製した。

shNeg 株は、A375 細胞に、shRNA 発現用ベクターである pSIREN-RetroQ-ZsGreen (クロンテック社製) を導入し、shZic5-1 株又は shZic5-2 株は、pSIREN-RetroQ-ZsGreen に下記表 4 に記載の塩基配列を標的とする Zic5 用 shRNA を組み込んだものを導入した。shRNA の導入は、プラスミドの導入と同様にして行った。shRNA を導入した細胞を限界希釈後、GFP 陽性クローンを単離し、安定発現株とした。

【0071】

【表 4】

shRNA	標的配列	配列番号
shZIC5-1	GGCTGTGACAAATCCTACA	11
shZIC5-2	GATTCGAGGCTGTGACAAA	12

【0072】

< 生体内における Zic5 遺伝子の発現抑制とヒトメラノーマ細胞の増殖及び転移 >

10,000,000 個の shNeg 株、shZic5-1 株又は shZic5-2 株を 0.1 mL の PBS で懸濁した細胞懸濁液を、5 週齢の Balb/c nu/nu マウス (クレア社から購入) の皮下に注射した。皮下注射後、3~4 日ごとに、形成された腫瘍組織の大きさ (V) を下記式に基づいて計測した。式中、「A」は腫瘍組織の最大径であり、「B」は腫瘍組織の最小径である。

$$V = 1/2 (A \times B^2)$$

【0073】

測定結果を図 15 に示す。図 15 (A) は計測された腫瘍組織の大きさ V の結果であり、図 15 (B) は移植から 34 日目の腫瘍組織の重量である。統計学的差異は、Dunnnett's multiple comparison of means test (***: P < 0.001) により求めた。この結果、shZic5-1 株又は shZic5-2 株を移植した場合には、生体内腫瘍組織がほとんど大きくなり、顕著な腫瘍増殖率の抑制が確認された。また、摘出した腫瘍の重さを測定した結果、shNeg 株と比較して shZic5-1 株及び shZic5-2 株において、腫瘍重量が著しく低下していることが明らかとなった。すなわち、Zic5 遺伝子の発現を抑制することにより、生体内においても腫瘍の増殖が抑制されることがわかった。

【0074】

< 肺転移能の測定 >

shNeg 株、shZic5-1 株又は shZic5-2 株を、6 週齢の Balb/c

10

20

30

40

50

nu / nuヌードマウス(クレア社から購入)の尾静脈に注射して移植し、移植から2.5か月目に、肺転移能を調べた。具体的には、肺に形成された結節の数を測定した。さらに、マウス肺におけるヒトメラノーマ細胞の浸潤度を定量するため、マウス肺組織中のヒトGAPDH遺伝子のmRNA量を測定した。なお、ヒトGAPDH遺伝子のmRNA量は、qRT-PCRにより測定し、マウスGAPDH遺伝子のmRNA量によってノーマライズした。

【0075】

測定結果を図16に示す。図16(A)は、肺に形成された結節の数を測定した結果であり、図16(B)は、これらの肺における、マウスGAPDH遺伝子のmRNA量によってノーマライズされたヒトGAPDH遺伝子のmRNA量の測定結果を示す。統計学的差異は、Mann-Whitney's U-testにより求めた。この結果、肺における腫瘍形成数は、shZic5-1株又はshZic5-2株を移植したマウスにおいて著しく減少していた。また、マウス肺に含まれるヒトGAPDH遺伝子のmRNA量は、shNeg株と比較し、shZic5-1株又はshZic5-2株を注入したマウスで有意な減少が見られた。これらの結果から、ZIC5は、メラノーマ細胞の転移を促進する因子であることが示唆された。

10

【0076】

[実施例5]

ZIC5はC2H2タイプのジンクフィンガードメインを持つZic familyに属しており、このファミリーにはZic1-5が存在している。Zic1-3は転写因子としての機能やターゲット遺伝子が報告されているが、Zic4とZic5については転写因子としての機能やターゲット遺伝子についての報告がない。しかし、マウスZic5ジンクフィンガードメイン(Zic5 ZF)は、他のZicと同様にGli binding sequence (GBS)やいくつかのGBS変異導入配列に結合する能力があることが示されている(非特許文献17参照)。

20

【0077】

ZIC5により発現変動する遺伝子のプロモーター領域について検討したところ、E-カドヘリンのプロモーター領域にマウスZic5 ZFが結合する配列GGGCGGTが存在していた。そこで、ZIC5がE-カドヘリンプロモーターに結合し、転写調節する可能性について、ゲルシフトアッセイ(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)により検証した。

30

【0078】

図17に、EMSAに用いたオリゴヌクレオチドプローブの塩基配列のアラインメント図を示す。図中、四角で囲まれた領域が推定ジンクフィンガードメイン結合配列である。また、図中、「M5」は、GBSに一塩基置換変異をいれたもの、「pCDH1」はヒトCDH1遺伝子のプロモーター領域(E-カドヘリンプロモーター)、である。

【0079】

<EMSA>

具体的には、まず、ヒトZIC5のジンクフィンガードメインを、下記表5に記載の塩基配列からなるフォワードプライマー及びリバースプライマーによってPCR増幅し、pGEX-6P(アマシャム・ファルマシア社製)にサブクローニングし、GSTと融合したZIC5 ZF(GST-ZIC5 ZF)発現用ベクターを調製した。当該GST-ZIC5 ZFを大腸菌BL21株に導入し、発現させたGST-ZIC5 ZFをグルタチオンセファロースビーズ(GEヘルスケア社製)を用いて精製した。

40

【0080】

【表5】

プライマー	塩基配列	配列番号
ZIC5-ZF フォワード	CCCGGATCCGTGAATCACGTCACGGTGGAG	13
ZIC5-ZF リバース	CCCCTCGAGTTAGCAGTGAATCTTCATGTGCTTCC	14

50

【0081】

精製したGST-ZIC5 ZFを、図17に記載の塩基配列からなり、ビオチン標識されたオリゴヌクレオチドからなる3種のプローブ(北海道システムサイエンス社製)(配列番号15~17)とそれぞれ結合バッファー(40mM Tris-HCl、pH8.0、7mM MgCl₂、3mM DTT、0.1mg/mL ウシ血清アルブミン、90mM NaCl、及び150ng poly(dI-dC))中でインキュベートし、形成された複合体を6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動(泳動バッファー:0.5×TBEバッファー(pH8))により分離した。分離した複合体は、HRP(西洋ワサビパーオキシダーゼ)標識したストレプトアビジンで検出した。電気泳動したゲルをHRP標識ストレプトアビジンで染色して検出したバンドパターンを図18に示した。

10

【0082】

図18に示すように、ヒトZic5 ZFは、マウスZic5 ZFと同様にGBSには結合するが変異を導入したM5には結合しないことが明らかになった。さらに、予想Zic5 ZF結合配列を含むE-カドヘリンプロモーター配列との結合も確認できた。この結果、ヒトZic5 ZFも、マウスZic5 ZFと同様の特性があり、E-カドヘリンプロモーター領域中の配列に結合し得ることが明らかになった。

【0083】

<クロマチン免疫沈降(ChIP)法>

次に、細胞内でヒトZic5(全長)がE-カドヘリンプロモーター領域に結合することを確認するため、ChIP法を行った。

20

具体的には、HeLa細胞にHAタグ標識Zic5(Zic5-HA)を強制発現させた後、1%ホルムアルデヒド溶液にて4、3時間処理して細胞を固定させた後、グリシンを終濃度125mMとなるように添加して10分間置き、反応を終了させた。次いで、当該細胞を2%FBS含有PBSで洗浄した後に、ライシスバッファー(5mM PIPES(pH8.0)、85mM KCl、0.5% NP-40)で可溶化し、得られたライセートにMNase(タカラ社製)を添加して30分間、37で処理した。MNase処理後のライセートを10,000rpmで4、10分間遠心分離処理し、上清を回収した。

当該上清をChIP希釈用バッファー(50mM Tris-HCl(pH8)、167mM NaCl、1.1% Triton X-100)で希釈した後、マウスIgG又は抗HA抗体(シグマ社製)を添加し、4で一晩、免疫沈降を行った。形成された免疫複合体をプロテインA/Gビーズで回収し、RIPAバッファー(100mM Tris-HCl(pH8.0)、300mM NaCl、2mM EDTA(pH8.0)、2% Triton X-100、0.2% SDS、0.2% デオキシコール酸ナトリウム)とLiClバッファー(10mM Tris-HCl(pH8.0)、0.25M LiCl、1mM EDTA(pH8.0)、0.5% NP-40、0.5% デオキシコール酸ナトリウム)で洗浄した。得られたタンパク質-DNA複合体は、65で4時間加熱処理して逆クロスリンクし、次いでプロテイナーゼK処理した後、PCR精製キット(キアゲン社製)によりDNAを精製した。得られたDNAサンプルは、表6に記載のプライマーを用いてPCR増幅して定量した。ネガティブコントロールは、E-カドヘリンと同染色体上で下流に存在する領域とした。

30

40

【0084】

【表6】

プライマー	塩基配列	配列番号
pCDH1 フォワード	TAGAGGGTCACCGCTCTAT	18
pCDH1 リバース	ATTGGCTGAGGGTTCACCTG	19
ネガティブコントロールフォワード	GCAGTGGGATAGGAGCAGAC	20
ネガティブコントロールリバース	CCGTGGCTACTGGATGTGTC	21

50

【 0 0 8 5 】

定量結果を図 1 9 (左図)に、各 DNA の電気泳動図を図 1 9 (右図)に、それぞれ示す。この結果、Z i c 5 - H A を強制発現させた細胞に対して抗 H A 抗体で免疫沈降を行ったサンプルでのみ、E - カドヘリンプロモーター領域の共沈が確認できた。E - カドヘリンと同染色体上で下流に存在するネガティブコントロール領域の DNA は検出されなかったことから、Z i c 5 - H A と E - カドヘリンプロモーター領域の共沈の特異性が確認できた。

【 0 0 8 6 】

< ルシフェラーゼレポーターアッセイ >

実際に Z I C 5 が E - カドヘリンプロモーターの活性を制御するかを調べるために、E - カドヘリンプロモーター下にルシフェラーゼを繋いだプラスミドを作製し、ルシフェラーゼアッセイを行った。

具体的には、まず、下記表 7 に記載の p C D H 1 フォワードプライマーと p C D H 1 リバースプライマーとを用いて C D H 1 プロモーター領域を P C R 増幅し、p G L 3 - b a s i c ベクター (プロメガ社製) の X h o I - N c o I 領域にサブクローニングして、ルシフェラーゼレポーターコンストラクト (p C D H 1 - L u c) を作製した。また、インターナルコントロールとして、R e n i l l a l u c i f e r a s e の p h R L - T K プラスミド (プロメガ社製) を用いた。

【 0 0 8 7 】

H E K 293 細胞に、p C D H 1 - L u c と p h R L - T K を、リポフェクタミン 2 0 0 0 (インビトロジェン社製) を用いてトランジェントに発現させた。ルシフェラーゼ活性は、D u a l - l u c i f e r a s e R e p o r t e r A s s a y S y s t e m (プロメガ社製) を用いて測定した。統計学的差異は、S t u d e n t ' s t - t e s t (* * * : P < 0 . 0 0 1、* * : P < 0 . 0 1、* : P < 0 . 0 5) により求めた。測定結果 (n = 3) を図 2 0 に示す。この結果、E - カドヘリンプロモーターの活性は Z i c 5 強制発現下では低下することが示された。

【 0 0 8 8 】

Z I C 5 による E - カドヘリンプロモーター活性の抑制が図 1 7 で示した予想 Z I C 5 結合配列を介して行われているのかを検証するために、E - カドヘリンプロモーターの予想 Z i c 5 結合配列中に一塩基置換変異を導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。図 2 1 に、導入した一塩基置換変異の塩基配列を示す。変異体 G B S - m u t は Z i c 5 Z F が結合することが確認されている変異体であり、変異体 M 5 - m u t は Z i c 5 Z F が結合しないことが確認されている変異体である。レポーターコンストラクトに、図 2 1 に示す一塩基置換変異を導入した変異体 G B S m u t 及び M 5 m u t を、表 7 に記載のプライマーを用いて作製した。

【 0 0 8 9 】

【表 7】

プライマー	塩基配列	配列番号
pCDH1 フォワード	CACACTCGAGCACCACTGCACTCCAGCTTGG	22
pCDH1 リバース	CTCCAAGGGCCCATGGCTGG	23
M5mut フォワード	CTCCGGGGCTCACCTGGCT	24
M5mut リバース	GCATCACCCCCCGTACCGCTGATTGGCTGAG	25
GBSmut フォワード	CTCCGGGGCTCACCTGGCT	26
GBSmut リバース	GCACCACCCCCCGTACCGCTGATTGGCTGAG	27

【 0 0 9 0 】

作製した変異体を用いて、前記と同様にしてルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。測定結果 (n = 3) を図 2 2 に示す。この結果、Z I C 5 の強制発現により G B S - m u t を導入したプロモーターの活性は抑制されたが、M 5 - m u t を導入したプロモ-

ターの活性は抑制されなかった。以上の結果より、ZIC5はE-カドヘリンプロモーター上のGGGCGGT配列を認識して結合し、そのプロモーター活性を抑制することが明らかとなった。

【0091】

[実施例6]

以上の結果より、ZIC5がE-カドヘリンの発現を調節する転写因子として機能することが明らかになったが、E-カドヘリンの発現制御だけではZIC5によるメラノーマの形質変化を説明できない。そこで、ZIC5による遺伝子発現変化を網羅的に調べるために、マイクロアレイ解析を行った。

【0092】

10

<マイクロアレイ解析>

A375細胞又はSK-MEL-28細胞に、表2に記載のsiZIC5又はsiNegを実施例1と同様にして導入した。siRNA導入から48時間後に細胞を回収し、RNAを抽出した。各サンプルのトータルRNA1μgを用いて、GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix社製)に対して、製品添付のプロトコールに従ってマイクロアレイを行った。定量のノーマライズは、アレイデータから得られたRNA発現量に従って行った。ヒートマップ可視化はMeV (MultiExperiment Viewer)を用いて行った。経路解析は、DAVID (非特許文献18)を用いて行った。

【0093】

20

A375細胞及びSK-MEL-28細胞においてZic5を発現抑制した際に、どちらの細胞においても1.5倍以上発現上昇する遺伝子は913個、半分以下に発現低下する遺伝子は302個同定された。これらの変動遺伝子が関連する現象について調べるため、経路解析を行ったところ、Glioma、Focal adhesion、Tight junctionに関連する遺伝子が多く含まれていることが分かった(図示せず)。

【0094】

<Focal adhesion関連因子との関係の解析>

Focal adhesionにおいて活性化されるFocal adhesion kinase (FAK)のリン酸化はメラノーマの悪性度と関連づけられているため(非特許文献19参照)、ZIC5によるFAKの変化を検証した。さらに、Zic5発現抑制による変動遺伝子の中でFocal adhesionに関連する遺伝子の中から、ITGA6 (Integrin, alpha 6)とPDGFD (platelet derived growth factor D)に着目し、細胞内における変化を調べた。具体的には、siZIC5又はsiNegを導入したA375細胞について、ウェスタンブロットにより、リン酸化FAK (pFAK)、総FAK (FAK)、ITGA6、pro-PDGFD、及び -アクチンの量を調べた。ウェスタンブロットは、抗pFAK抗体 (Signalway Antibody社製)、抗FAK抗体 (Acris社製)、抗 -アクチン抗体 (シグマ社製)、抗ITGA6抗体 (GeneTex社製)、及び抗PDGFD抗体 (Santa Cruz社製)を用いた以外は前記と同様にして行った。この結果、Zic5発現抑制細胞においては、FAKのリン酸化が著しく減少していることが明らかになった。また、ITGA6とpro-PDGFDの発現量も減少している傾向が観察された(図示せず)。

30

40

【0095】

A375細胞及びHT144細胞に、表2に記載のsiZIC5又はsiNegを実施例1と同様にして導入した場合のPDGFD遺伝子の発現量を、表10に示すプライマーを用いてqRT-PCRを行うことにより調べた。各細胞のPDGFD遺伝子のmRNA量は、ACTB (-アクチン)遺伝子のmRNA量によりノーマライズした。PDGFD遺伝子の相対mRNA発現量 (siNegを導入した細胞の発現量を1とする) (n=3)を算出した結果を図23に示す。統計学的差異は、Student's t-te

50

s t (* * * : P < 0 . 0 0 1 , * * : P < 0 . 0 1 , * : P < 0 . 0 5) により求めた。この結果、P D G F D の遺伝子発現は、Z i c 5 遺伝子発現抑制により著しく減少した。

【 0 0 9 6 】

また、Z i c 5 遺伝子安定発現株と F l a g 安定発現株の細胞における P D G F D 遺伝子の発現量を同様にして調べた。P D G F D 遺伝子の相対 m R N A 発現量 (s i N e g # 1 を導入した細胞の発現量を 1 とする。) (n = 3) を算出した結果を図 2 4 に示す。統計学的差異は、D u n n e t t ' s m u l t i p l e c o m p a r i s o n o f m e a n s t e s t (* * * : P < 0 . 0 0 1) により求めた。この結果、Z i c 5 遺伝子安定発現株における P D G F D 遺伝子の相対 m R N A 発現量は、F l a g 安定発現株と比較して高く、Z i c 5 遺伝子過剰発現により、P D G F D の遺伝子発現が亢進することが確認された。

10

【 0 0 9 7 】

また、A 3 7 5 細胞及び S K - M E L - 2 8 細胞に、表 1 に記載の s i N e g # 1 と、表 8 に記載の s i P D G F D # 1 及び s i P D G F D # 2 とを実施例 1 と同様に導入し、P D G F D 遺伝子の発現抑制の影響を調べた。この結果、いずれの細胞においても、s i P D G F D # 1 又は s i P D G F D # 2 を導入した細胞では形態が変化していた (図示せず。) 。すなわち、メラノーマ細胞株における P D G F D の発現抑制は細胞の形態変化を誘発することがわかった。

20

【 0 0 9 8 】

【 表 8 】

siRNA	標的配列	配列番号
siPDGFD #1	CAGGAATTACTCGGTCAATAT	28
siPDGFD #2	AAGGTATATCATCAACTTCTA	29
siITGA6 #1	CACGCGGATCGAGTTTGATAA	30

【 0 0 9 9 】

また、s i R N A 導入後の各細胞の細胞数を経時的に計数し、s i R N A 導入後 1 日目の細胞数を 1 とした相対細胞数を算出し、増殖性を調べた。この結果、s i P D G F D を導入した細胞では、s i Z i c 5 を導入した細胞と同様に、細胞増殖が抑制されており、メラノーマ細胞株における P D G F D 遺伝子の発現抑制により、細胞増殖が抑制されることがわかった (図示せず。) 。P D G F D 遺伝子の発現抑制による細胞増殖の抑制は、C o l o 8 2 9 細胞及び H T 1 4 4 細胞においても観察された (図示せず。) 。さらに、A 3 7 5 細胞については、各細胞の細胞周期を調べた。各細胞の G 1 期、S 期、及び G 2 M 期にある細胞の割合の平均値 (S D) (%) を表 9 に示す。統計学的差異は、D u n n e t t ' s m u l t i p l e c o m p a r i s o n o f m e a n s t e s t (* * * : P < 0 . 0 0 1 , * * : P < 0 . 0 1 , * : P < 0 . 0 5) により求めた。この結果、A 3 7 5 細胞では、P D G F D 遺伝子の発現抑制により、S 期と G 2 M 期の細胞の割合が減少していた。

30

40

【 0 1 0 0 】

【 表 9 】

	siNeg (%)	siPDGFD#1 (%)	siPDGFD#2 (%)
G1	65.9 (4.5)	71.6 (0.23)	74 (0.55) *
S	10.2 (1)	8.1 (0.38) *	6.6 (0.49) **
G2M	20.7 (1.6)	18.6 (0.25)	17.7 (0.58) *

【 0 1 0 1 】

また、s i P D G F D # 1 、 s i P D G F D # 2 、 又は s i N e g # 1 を導入した A 3

50

75細胞について、細胞数を継時的に計数した。各細胞の、siNeg#1を導入した細胞数を1とした相対細胞数を図25に示す。統計学的差異は、Dunnett's multiple comparison of means test (**: $P < 0.01$ 、*: $P < 0.05$)により求めた。この結果、A375細胞では、PDGFD遺伝子の発現抑制により、細胞増殖率の低下が引き起こされた。

【0102】

A375細胞及びHT144細胞に、表2に記載のsiZIC5又はsiNegを実施例1と同様にして導入した場合のITGA6遺伝子の発現量を、表10に示すプライマーを用いてqRT-PCRを行うことにより調べた。各細胞のITGA6遺伝子のmRNA量は、ACTB(-アクチン)遺伝子のmRNA量によりノーマライズした。ITGA6遺伝子の相対mRNA発現量(siNegを導入した細胞の発現量を1とする。)($n = 3$)を算出した結果を図26に示す。統計学的差異は、Student's t-test (***: $P < 0.001$ 、**: $P < 0.01$ 、*: $P < 0.05$)により求めた。この結果、ITGA6の遺伝子発現は、Zic5遺伝子発現抑制により著しく減少した。

10

【0103】

また、Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株の細胞におけるITGA6遺伝子の発現量を同様にして調べた。ITGA6遺伝子の相対mRNA発現量(siNeg#1を導入した細胞の発現量を1とする。)($n = 3$)を算出した結果を図27に示す。この結果、Zic5遺伝子安定発現株におけるITGA6遺伝子の相対mRNA発現量は、Flag安定発現株と比較して高く、Zic5遺伝子過剰発現により、ITGA6の遺伝子発現が亢進することが確認された。

20

【0104】

また、A375細胞にラットIgG又は抗ITGA6抗体の抗体溶液($20 \mu\text{g}/\text{mL}$)で72時間処理した後の細胞数を計数した。ラットIgGで処理した細胞の細胞数を1とした相対細胞数($n = 3$)の結果を図28に示す。統計学的差異は、Student's t-test (***: $P < 0.001$ 、**: $P < 0.01$ 、*: $P < 0.05$)により求めた。この結果、抗ITGA6抗体によりITGA6を中和した細胞では、細胞増殖の低下が引き起こされた。また、siITGA6の導入によりITGA6遺伝子の発現を抑制した細胞でも、細胞増殖の低下が引き起こされた(図示せず)。一方で、ITGA6遺伝子の発現抑制は、細胞移動率にはさほど影響は観察されなかった(図示せず)。

30

【0105】

また、ヒトITGA6遺伝子のcDNAをプラスミドpcDNAに組み込んだhITGA6発現用ベクターをトランスフェクションし、G418処理により選抜したhITGA6過剰発現株と、空ベクターであるpcDNAをトランスフェクションし、G418処理により選抜したpcDNA株(ネガティブコントロール)に対して、表2に記載のsiZIC5又はsiNegを実施例1と同様にして導入した場合の細胞数を計数した。この結果、hITGA6過剰発現株では、siZIC5導入による細胞数の低下を部分的に回復することが示された(図示せず)。

40

【0106】

また、Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株の細胞に、表1に記載のsiNeg#1と表8に記載のsiPDGFD#1を実施例1と同様にして導入した細胞について、実施例2と同様にしてTranswell Migrationアッセイを行い、移動細胞数を計数した。移動細胞数は、総生存細胞数でノーマライズした。各細胞の、siNeg#1を導入した細胞の移動細胞数を1とした相対細胞数($n = 3$)を図29に示す。統計学的差異は、Tukey's multiple comparison of means test (**: $P < 0.01$ 、*: $P < 0.05$)により求めた。この結果、siPDGFD#1を導入した細胞では、Zic5遺伝子の過剰発現による細胞移動数の増加が完全に抑制されていた。この結果から、ZIC5は、PDGFDの発現を介して細胞移動を制御していることが示唆された。

50

【0107】

また、表1に記載の *siNeg* # 1、表8に記載の *siPDGFD* # 1、*siPDGFD* # 2、*siITGA6* # 1を実施例1と同様にして導入した細胞に対して、pFAK、総FAK、及び -アクチンの量をウェスタンブロットにより調べた。この結果、PDGFDやITGA6の発現抑制は、*Zic5*の発現抑制と同様にFAKのリン酸化を低下させたことから、Focal adhesionへの関与が確認できた(図示せず。)

【0108】

【表10】

プライマー	塩基配列	配列番号
<i>ACTB</i> (β -Actin)フォワード	GCCCTGGCACCCAGCACAAT	31
<i>ACTB</i> (β -Actin)リバース	GGAGGGGCCGGACTCGTCAT	32
<i>PDGFD</i> フォワード	AAGATTTCCAACCCGCAGCA	33
<i>PDGFD</i> リバース	TCCAGAGCATCCGCAATCAG	34
<i>ITGA6</i> フォワード	GAGCCGTGGTTTTGCTGAAG	35
<i>ITGA6</i> リバース	TGCCACCCATCCTTGTTGAG	36

10

【0109】

[実施例7]

*ZIC5*が、BRAf阻害剤(PLX4032, vemurafenib)(Selleckchem社製)に対する感受性に変化を与えるかについて、検証を行った。

20

【0110】

具体的には、まず、SK-MEL-28細胞を用いて、前記と同様にして*Zic5*遺伝子安定発現株とFlag安定発現株(コントロール細胞)を製造した。

*Zic5*遺伝子安定発現株とFlag安定発現株に対して、それぞれ、PLX4032を終濃度10 μ Mで48時間処理し、処理後の細胞数を計数した。なお、PLX4032はDMSOに溶解させた溶液として用い、等量のDMSOを添加したもの(DMSO処理)をコントロールとした。Flag安定発現株をPLX4032処理した細胞(図中、「PLX4032」欄が「+」、以下の実施例において同様)又はDMSO処理した細胞(図中、「PLX4032」欄が「-」、以下の実施例において同様)の細胞数を1とした相対細胞数($n=3$)の結果を図30に示す。統計学的差異は、tukey's multiple comparison of means test (**: $P < 0.01$ 、*: $P < 0.05$)により求めた。この結果、PLX4032処理による細胞数の低下は、*Zic5*遺伝子安定発現株では緩和された。また、これらの細胞について、PLX4032処理後のアポトーシス細胞の割合をFITC標識Annexin V(MBL社製)を用いて検出した。各細胞におけるAnnexin Vポジティブ細胞(Annexin Vで染色された細胞)の割合(%)($n=3$)の結果を図31に示す。この結果、PLX4032処理によるアポトーシスの誘導は、*Zic5*遺伝子過剰発現により有意に減少することが示された。

30

【0111】

なお、Annexin Vポジティブ細胞の割合は、次のようにして測定した。まず、各細胞にFITC標識Annexin V(MBL社製)とヘキスト33342を添加して40分間インキュベートした。次いで、インキュベート後の細胞の染色状態を、イメージングサイトメーター「IN Cell Analyzer 2000」(GEヘルスケア社製)のDAPIフィルターとFITCフィルターを使用して解析した。DAPI染色された全細胞(DAPIポジティブ細胞)に対するAnnexin Vで染色された細胞(Annexin Vポジティブ細胞)の割合(%)は、IN Cell Analyzer Workstation 3.7(GEヘルスケア社製)により決定した。統計学的差異は、tukey's multiple comparison of means test (**: $P < 0.01$ 、*: $P < 0.05$)により求めた。

40

50

【0112】

次に、内在性のZIC5、及び下流因子であるPDGFD及びITGA6の発現抑制が、PLX4032による細胞増殖の低下やアポトーシスの誘導に及ぼす影響について検討した。まず、A375細胞に、表1に記載のsiNeg、siZIC5、表8に記載のsiPDGFD、又はsiITGA6を実施例1と同様にして導入した後、DMSO又はPLX4032溶液(5 μ MにDMSOに溶解させた溶液)で48時間処理した。次いで、処理後の細胞にFITC標識Annexin V(MBL社製)とヘキスト33342を添加して40分間インキュベートした。インキュベート後の各細胞におけるAnnexin Vポジティブ細胞の割合(%) (n=3)の結果を図32に示し、siNegを導入した細胞の細胞数を1とした相対細胞数(n=3)の結果を図33に示す。なお、Annexin Vポジティブ細胞の割合の統計学的差異は、Dunnett's multiple comparison of means test (***: P<0.001、** : P<0.01、* : P<0.05)により求めた。この結果、PLX4032によるアポトーシスの誘導は、Zic5、PDGFD、ITGA6の発現抑制により相乗的に亢進されること、及びPLX4032処理による細胞数の減少は、Zic5、PDGFD、ITGA6の発現抑制により促進されること、が明らかになった。Colo829細胞においても、同様の結果が得られた(図示せず)。

10

【0113】

また、A375細胞を、ラットIgG又は抗ITGA6抗体の抗体溶液(20 μ g/mL)と共に、DMSO又はPLX4032溶液(10 μ Mに溶解させた溶液)で48時間処理した。処理後の各細胞におけるAnnexin Vポジティブ細胞の割合(%) (n=3)の結果を図34に示す。統計学的差異は、Student's t-test (***: P<0.001)により求めた。この結果、抗ITGA6抗体によりITGA6を中和した細胞において、PLX4032と相乗的にアポトーシスを誘導できることが明らかになった。また、siZIC5及びsiPDGFDをそれぞれ導入した細胞においても、PLX4032と相乗的にアポトーシスを誘導できた(図示せず)。

20

【0114】

また、実施例6で作製したZic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株に、表1に記載のsiNeg又は表8に記載のsiPDGFDを実施例1と同様にして導入した細胞と、ラットIgG又は抗ITGA6抗体の抗体溶液(20 μ g/mL)を添加した細胞を、それぞれPLX4032溶液(5 μ MにDMSOに溶解させた溶液)で48時間処理した。これらの細胞のAnnexin Vポジティブ細胞の割合(%) (n=3)の結果を図35に示す。統計学的差異は、Tukey's multiple comparison of means test (**: P<0.01、* : P<0.05)により求めた。この結果、Zic5遺伝子の過剰発現によるアポトーシスの抑制作用は、PDGFDを発現抑制することによって完全になくなること(図35(左図)、ITGA6の中和抗体処理により部分的になくなること(図35(右図))が明らかになった。

30

【0115】

また、A375細胞に、表2に記載のsiNeg又はsiZIC5を実施例1と同様にして導入した後、DMSO、U0126(Cell Signaling社製)溶液(10 μ MにDMSOに溶解させた溶液)、又はオキサリプラチン(シグマアルドリッチ社製)溶液(20 μ MにDMSOに溶解させた溶液)で48時間処理した。処理後の各細胞におけるAnnexin Vポジティブ細胞の割合(%) (n=3)の結果を図36に示す。統計学的差異は、Tukey's multiple comparison of means test (**: P<0.01、* : P<0.05)により求めた。この結果、Zic5によるアポトーシスの抑制作用は、MEK阻害剤であるU0126や白金剤であるオキサリプラチンで処理した細胞でも、PLX4032処理の場合と同様の結果が得られた。

40

【0116】

また、A375細胞に、表1に記載のsiNeg、siZIC5、表8に記載のsiP

50

D G F D、s i I T G A 6 を実施例 1 と同様にして導入した後、D M S O 又は P L X 4 0 3 2 溶液 (5 μ M に溶解させた溶液) で 2 4 時間処理した後における、リン酸化 S t a t 3 (p S t a t 3)、総 S t a t 3 (S t a t 3)、及び β -アクチンの量をウェスタンブロットにより調べた。この結果、P L X 4 0 3 2 処理の有無にかかわらず、Z I C 5 又は I T G A 6 のノックダウンによって S t a t 3 のリン酸化が抑制されたが、P D G F D がノックダウンされた細胞では、P L X 4 0 3 2 処理の場合のみ S t a t 3 のリン酸化が抑制された (図示せず)。

【 0 1 1 7 】

実施例 6 で作製した Z i c 5 遺伝子安定発現株と F l a g 安定発現株を、D M S O、又は S t a t 3 阻害剤 W P 1 0 6 6 (サンタクルズ社製) 溶液 (1 0 μ M に溶解させた溶液) で 2 4 時間処理したところ、Z i c 5 によるアポトーシスの抑制作用は、S t a t 3 阻害剤処理により完全に抑制された (図示せず)。

10

【 0 1 1 8 】

これらの結果から、Z I C 5 は、下流因子 P D G F D や I T G A 6 による S t a t 3 の活性化を介して、メラノーマ細胞のアポトーシスを抑制し、薬剤耐性に寄与すると考えられ、これらの分子の抑制が治療効果の向上につながることを期待できる。

【 0 1 1 9 】

[実施例 8]

次に、生じてしまった V e m u r a f e n i b 耐性株に対して、Z i c 5 遺伝子及び下流因子 P D G F D、I T G A 6 が治療標的になる可能性を検討した。

20

【 0 1 2 0 】

まず、A 3 7 5 細胞を用いて V e m u r a f e n i b 耐性株を 5 種類 (v e m R - 1 ~ 5) 作製した。各細胞株を、V e m u r a f e n i b (P L X 4 0 3 2) 0、2、又は 4 μ M で 4 8 時間処理した後の細胞数を計数し、P L X 4 0 3 2 未処理 (P L X 4 0 3 2 濃度が 0 μ M) の場合の細胞数を 1 とする相対細胞数を算出した。結果を図 3 7 に示す。v e m R - 1 ~ 5 では、A 3 7 5 細胞よりも、P L X 4 0 3 2 処理による細胞の減少幅が小さく、V e m u r a f e n i b 耐性を有することが確認された。

【 0 1 2 1 】

v e m R - 1 ~ 5 細胞及び A 3 7 5 細胞に対して、D M S O 又は P L X 4 0 3 2 溶液 (5 μ M に溶解させた溶液) で 4 8 時間処理した後における、リン酸化 A K T (S e r 4 7 3) (p A K T)、総 A K T (A K T)、リン酸化 E R K 1 / 2 (T h r 2 0 2 / 2 0 4) (p E R K)、総 E R K 1 / 2 (E R K)、及び β -アクチンの量をウェスタンブロットにより調べた。ウェスタンブロットは、抗 p A K T 抗体 (C e l l S i g n a l i n g 社製)、抗 A K T 抗体 (C e l l S i g n a l i n g 社製)、抗 p E R K 抗体 (C e l l S i g n a l i n g 社製)、抗 E R K 抗体 (C e l l S i g n a l i n g 社製)、及び抗 β -アクチン抗体 (シグマ社製) を用いた以外は前記と同様にして行った。結果を図 3 8 に示す。この結果、v e m R - 1 ~ 5 細胞では、E R K の再活性化が観察された。

30

【 0 1 2 2 】

v e m R - 1 ~ 5 細胞及び A 3 7 5 細胞に対して、表 1 に記載の s i N e g、s i Z I C 5、又は表 8 に記載の s i P D G F D を実施例 1 と同様にして導入した。s i R N A 導入から 3 日後の各細胞の細胞数を計数し、A 3 7 5 細胞に s i N e g を導入した細胞の細胞数を 1 とした場合の相対細胞数 (n = 3) を算出した。統計学的差異は、S t u d e n t ' s t - t e s t (* * * : P < 0 . 0 0 1、* * : P < 0 . 0 1、* : P < 0 . 0 5) により求めた。結果を図 3 9 に示す。いずれの細胞においても、s i R N A 導入により Z I C 5 又は P D G F D の発現を抑制すると、細胞数が減少し、増殖率が低下した。

40

【 0 1 2 3 】

[実施例 9]

H T 1 4 4 細胞を用いて、同様にして V e m u r a f e n i b 耐性株を 3 種類 (v e m R - 1 ~ 3) 作製した。各細胞株を、V e m u r a f e n i b (P L X 4 0 3 2) 0、4

50

、又は8 μ Mで48時間処理した後の細胞数を計数し、PLX4032未処理(PLX4032濃度が0 μ M)の場合の細胞数を1とする相対細胞数を算出した。結果を図40に示す。

【0124】

vemR-1~3細胞及びHT144細胞に対して、DMSO又はPLX4032溶液(5 μ MにDMSOに溶解させた溶液)で48時間処理した後における、pAKT、AKT、pERK、ERK、及び -アクチンの量を実施例8と同様にしてウェスタンブロットにより調べた。結果を図41に示す。この結果、vemR-1~3細胞では、AKTとERKの両方の再活性化が観察された。

【0125】

vemR-1~3細胞及びHT144細胞に対して、表1に記載のsiNeg、siZIC5、表8に記載のsiPDGFD、siITGA6を実施例1と同様にして導入した。siRNA導入から3日後の各細胞の細胞数を計数し、HT144細胞にsiNegを導入した細胞の細胞数を1とした場合の相対細胞数($n=3$)を算出した。統計学的差異は、Dunnett's multiple comparison of means test (***: $P < 0.001$)により求めた。結果を図42に示す。いずれの細胞においても、siRNA導入によりZIC5、PDGFD、又はITGA6の発現を抑制すると、細胞数が減少し、増殖率が低下した。

【0126】

実施例8及び実施例9の結果から、メラノーマ治療において生じてしまったBRAF阻害剤耐性細胞に対しても、Zic5、PDGFD、ITGA6の抑制が治療に有効であることが示唆された。

【0127】

[実施例10]

<ヒト前立腺がんにおけるZic5遺伝子の発現>

データベース検索により、Zic5遺伝子の発現が転移性前立腺がんにおいて亢進していることが示唆されていた(GDS2546)。そのため、ヒト前立腺がんの臨床組織におけるZic5遺伝子の発現について、免疫組織染色法により検討した。具体的には、ヒト前立腺がんの組織切片73枚、非前立腺がんの組織切片7枚(いずれも、US Biomax社から購入)に対して、抗ZIC5抗体(Aviva systems biology社製)を用いて免疫組織染色を行った。各臨床組織切片の抗Zic5抗体による染色像を、染色強度に基づいて4段階(0~3)にスコア化した。図43に、非がん切片とがん切片のスコア(左図)、グリーソン分類によるグレード3、4、又は5の切片のスコア(中図)、グレード2又は3の切片のスコア(右図)を示す。統計学的差異は、非がん切片とがん切片のスコアはMann-Whitney's U-testにより、グリーソン分類及びグレードにより分類した切片のスコアはFisher's exact testにより、それぞれ求めた。この結果、非がん部とがん部ではその発現に有意な差が見られなかったが、グレードの進行した前立腺がんにおいてZic5遺伝子の発現が亢進していることが示唆された。

【0128】

<ヒト前立腺がんにおけるZic5遺伝子の発現抑制の影響>

ヒト前立腺がん細胞株DU145細胞を用いてZic5発現抑制の影響を調べた。

まず、DU145細胞に、表2に記載のsiZIC5#1、siZIC5#2、siNeg#1、又はsiNeg#2を実施例1と同様にして導入し、導入後0、2、又は3日後の細胞数を計数した。各細胞の相対細胞数(導入後0日目(導入前)の細胞の細胞数を1とする。)($n=3$)を算出した結果を図44に示す。統計学的差異は、Tukey's multiple comparison of means test (***: $P < 0.001$ 、** : $P < 0.01$ 、* : $P < 0.05$)により求めた。この結果、DU145細胞では、siRNA導入によるZic5遺伝子発現抑制により、細胞増殖率が低下することが明らかになった。

10

20

30

40

50

【0129】

D U 1 4 5 細胞又は P C 細胞に、表 2 に記載の s i Z I C 5 # 1 又は s i N e g # 1 を実施例 1 と同様にして導入し、導入後の細胞について実施例 7 と同様にして F I T C 標識 A n n e x i n V (M B L 社製) を用いて染色し、各細胞における A n n e x i n V ポジティブ細胞の割合 (%) (n = 3) を算出した。統計学的差異は、S t u d e n t ' s t - t e s t (* * * : P < 0 . 0 0 1 、 * * : P < 0 . 0 1 、 * : P < 0 . 0 5) により求めた。結果を図 4 5 に示す。この結果、s i Z I C 5 # 1 導入細胞では A n n e x i n V ポジティブ細胞の割合が増大しており、Z i c 5 遺伝子発現抑制によりアポトーシスが誘導されることも明らかになった。

【0130】

D U 1 4 5 細胞に、表 2 に記載の s i Z I C 5 # 1 又は s i N e g # 1 を実施例 1 と同様にして導入し、導入後の各細胞の Z i c 5 遺伝子、P D G F D 遺伝子、及び I T G A 6 遺伝子の m R N A 発現量を、実施例 6 と同様にして q R T - P C R を行うことにより調べた。各細胞の Z i c 5 遺伝子等の m R N A 発現量は、A C T B (- アクチン) 遺伝子の m R N A 発現量によりノーマライズした。各遺伝子の相対 m R N A 発現量 (s i N e g # 1 を導入した細胞の発現量を 1 とする。) (n = 3) を算出した結果を図 4 6 に示す。統計学的差異は、S t u d e n t ' s t - t e s t (* * * : P < 0 . 0 0 1 、 * * : P < 0 . 0 1 、 * : P < 0 . 0 5) により求めた。この結果、P D G F D 遺伝子及び I T G A 6 の遺伝子発現は、Z i c 5 遺伝子発現抑制により著しく減少した。

【0131】

D U 1 4 5 細胞に、表 8 に記載の s i P D G F D # 1 、 s i P D G F D # 2 、又は s i I T G A 6 # 1 を実施例 1 と同様にして導入し、導入後 0 、 2 、又は 3 日後の細胞数を計数した。各細胞の相対細胞数 (導入後 0 日目 (導入前) の細胞の細胞数を 1 とする。) (n = 3) を算出した結果を図 4 7 に示す。統計学的差異は、t u k e y ' s m u l t i p l e c o m p a r i s o n o f m e a n s t e s t (* * * : P < 0 . 0 0 1 、 * * : P < 0 . 0 1 、 * : P < 0 . 0 5) により求めた。この結果、D U 1 4 5 細胞の細胞増殖率は、s i R N A 導入による P D G F D 遺伝子発現抑制によって低下したが、I T G A 6 遺伝子発現抑制によってはほとんど影響しなかった。

【0132】

さらに、D U 1 4 5 細胞に、表 8 に記載の s i P D G F D # 1 、 s i P D G F D # 2 、又は s i I T G A 6 # 1 を実施例 1 と同様にして導入した後、D M S O 、又は d o c e t a x e l (シグマアルドリッチ社製) 溶液 (5 n M に溶解させた溶液) で 2 4 時間処理した。処理後の各細胞における A n n e x i n V ポジティブ細胞の割合 (%) (n = 3) の結果を図 4 8 に示す。統計学的差異は、t u k e y ' s m u l t i p l e c o m p a r i s o n o f m e a n s t e s t (* * * : P < 0 . 0 0 1 、 * * : P < 0 . 0 1 、 * : P < 0 . 0 5) により求めた。この結果、Z i c 5 及び P D G F D のノックダウンでは、d o c e t a x e l により誘導されるアポトーシスが顕著に増大していた。I T G A 6 のノックダウンでは、さほどの影響は観察されなかった。

【0133】

これらの結果から、前立腺がん細胞において、Z i c 5 遺伝子の下流で P D G F D 遺伝子や I T G A 6 遺伝子の発現が制御されていること、P D G F D 遺伝子の発現抑制は細胞増殖率を低下させること、Z i c 5 遺伝子及び P D G F D 遺伝子の発現抑制は、D o c e t a x e l によるアポトーシス誘導を亢進すること、が明らかになった。これらのことから、Z i c 5 遺伝子及び P D G F D 遺伝子の抑制は、前立腺がんの治療に対しても有効であることが示唆された。

【0134】

[実施例 1 1]

P D H F D 遺伝子の発現やその下流のシグナル因子である F A K 及び S T A T 3 等の活性が、Z i c 5 遺伝子の発現に与える影響を調べた。

【0135】

10

20

30

40

50

< PDGFD 遺伝子の発現抑制の Zic5 遺伝子に対する影響 >

A375 細胞に、表 1 に記載の siNeg と表 8 に記載の siPDGFD を実施例 1 と同様にして導入して RNA 干渉を行い、得られた細胞について、PDGFD 遺伝子と Zic5 遺伝子の発現量を、GAPDH を内部標準としたウェスタンブロット法により測定した。ウェスタンブロット法は、抗 ZIC5 抗体 (Aviva systems biology 社製)、抗 PDGFD 抗体 (Santa Cruz 社製)、及び抗 GAPDH 抗体 (Cell Signaling 社製) を用いて、カネマルらの方法 (非特許文献 13 参照。) に準じて行った。

【0136】

各抗体により染色されたバンドを図 49 に示す。上段 (「ZIC5」) が抗 ZIC5 抗体で染色されたバンドであり、中段 (「pro-PDGFD」) が抗 PDGFD 抗体で染色されたバンドであり、下段 (「GAPDH」) が抗 GAPDH 抗体で染色されたバンドである。siPDGFD 導入により pro-PDGFD の発現が抑制された細胞では、ZIC5 の発現も抑制されていた。

10

【0137】

< PDGFD 遺伝子の過剰発現の Zic5 遺伝子に対する影響 >

ヒト PDGFD 遺伝子の cDNA をプラスミド pcDNA に組み込んだ hPDGFD 発現用ベクターをトランスフェクションし、G418 処理により選抜した hPDGFD 過剰発現株と、空ベクターである pcDNA をトランスフェクションし、G418 処理により選抜した pcDNA 株 (ネガティブコントロール) について、ウェスタンブロットにより、リン酸化 FAK (pFAK)、リン酸化 STAT3 (pSTAT3)、総 STAT3 (STAT3)、ZIC5、pro-PDGFD、及び α -アクチンの量を調べた。ウェスタンブロットは、抗 pFAK 抗体 (Signalway Antibody 社製)、抗 pSTAT3 抗体 (Cell Signaling 社製)、STAT3 抗体 (BD Biosciences 社製)、抗 ZIC5 抗体 (Aviva systems biology 社製)、抗 PDGFD 抗体 (Santa Cruz 社製)、及び抗 α -アクチン抗体 (シグマ社製) を用いた以外は前記と同様にして行った。

20

【0138】

各抗体により染色されたバンドを図 50 に示す。この結果、hPDGFD 過剰発現株においては、pro-PDGFD のみならず ZIC5 の発現も著しく亢進していることが明らかになった。

30

【0139】

< FAK 阻害剤処理の Zic5 遺伝子に対する影響 >

A375 細胞を、FAK 阻害剤 I (Calbiochem 社製) 濃度が 0、1、2.5、又は 5 μ M である培地中で 24 時間処理した後、ウェスタンブロットにより、ZIC5、pro-PDGFD、pERK、及び α -アクチンの量を調べた。ウェスタンブロットは、抗 ZIC5 抗体 (Aviva systems biology 社製)、抗 PDGFD 抗体 (Santa Cruz 社製)、抗 pERK 抗体 (Cell Signaling 社製)、及び抗 α -アクチン抗体 (シグマ社製) を用いた以外は前記と同様にして行った。

40

【0140】

各抗体により染色されたバンドを図 51 に示す。この結果、FAK 阻害剤処理により、pERK 量には変化が見られなかったが、ZIC5 と pro-PDGFD は、FAK 阻害剤の濃度依存的に発現量の低下が確認された。

【0141】

< Stat3 阻害剤処理の Zic5 遺伝子に対する影響 >

A375 細胞を、Stat3 阻害剤 WP1066 (サンタクルズ社製) 濃度が 0、1、1.5、2、2.5、3、又は 4 μ M である培地中で 24 時間処理した後、ウェスタンブロットにより、ZIC5、pro-PDGFD、pSTAT3、STAT3、及び GAPDH の量を調べた。ウェスタンブロットは、抗 ZIC5 抗体 (Aviva system

50

s biology社製)、抗PDGFD抗体(Santa Cruz社製)、抗pSTAT3抗体(Cell Signaling社製)、STAT3抗体(BD Biosciences社製)、及び抗GAPDH抗体(Cell Signaling社製)を用いた以外は前記と同様にして行った。

【0142】

各抗体により染色されたバンドを図52に示す。この結果、Stat3阻害剤処理により、STAT3量は変化せず、pSTAT3量は、Stat3阻害剤の濃度依存的に発現量の低下が確認された。さらに、pro-PDGFD量とZIC5量も、pSTAT3と同様に、Stat3阻害剤の濃度依存的に発現量が低下した。

【0143】

<IL-6処理のZic5遺伝子に対する影響>

A375細胞を、インターロイキン-6(IL-6)(Novus Biologicals社製)濃度が0、10、又は20ng/mLである培地中で24時間処理した後、ウェスタンブロットにより、ZIC5、pro-PDGFD、pSTAT3、STAT3、及びGAPDHの量を調べた。ウェスタンブロットは、抗ZIC5抗体(Aviva systems biology社製)、抗pERK抗体(Cell Signaling社製)、抗pSTAT3抗体(Cell Signaling社製)、STAT3抗体(BD Biosciences社製)、及び抗GAPDH抗体(Cell Signaling社製)を用いた以外は前記と同様にして行った。

【0144】

各抗体により染色されたバンドを図53に示す。この結果、IL-6処理により、STAT3量及びpERK量は変化せず、pSTAT3量は、IL-6の濃度依存的に発現量の増大が確認された。さらに、ZIC5量も、pSTAT3と同様に、IL-6の濃度依存的に発現量が増大した。

【0145】

これらの結果から、ZIC5により正に制御されるPDGFD、FAK、STAT3のシグナルは、ZIC5の発現を正に制御していることが示唆され、これらの因子が、ポジティブフィードバックループを形成していることが示唆された。

【0146】

[実施例12]

実施例8で作製したVemurafenib耐性株(vemR-3細胞)について、ZIC5及びPDGFDの発現抑制の影響を調べた。

【0147】

<ZIC5及びPDGFDの発現抑制のアポトーシスへの影響>

vemR-3細胞に、表1に記載のsiNeg#1、siNeg#2、表2に記載のsiZIC5#1、又は表8に記載のsiPDGFD#1を、それぞれ実施例1と同様にして導入してRNA干渉を行い、得られた細胞について、実施例7と同様にしてアポトーシス細胞の割合をFITC標識Annexin V(MBL社製)を用いて検出した。各細胞におけるAnnexin Vポジティブ細胞の割合(%) (n=3)の結果を図54に示す。この結果、siZIC5#1を導入した細胞とsiPDGFD#1を導入した細胞の両方とも、Annexin Vポジティブ細胞の割合が顕著に増大しており、vemR-3細胞では、ZIC5の発現を抑制したり、PDGFDの発現を抑制することによってアポトーシスが誘導されることがわかった。

【0148】

<ZIC5及びPDGFDの発現抑制とERKの活性化への影響>

vemR-3細胞に、表1に記載のsiNeg#1、siNeg#2、表2に記載のsiZIC5#1、又は表8に記載のsiPDGFD#1を、それぞれ実施例1と同様にして導入してRNA干渉を行い、得られた細胞について、実施例7と同様にしてBRAF阻害剤PLX4032処理又はDMSO処理を行った後に、ウェスタンブロット法によりpERKの量を調べた。ウェスタンブロット法は、抗ZIC5抗体(Aviva systems

10

20

30

40

50

ms biology社製)、抗PDGFD抗体(Santa Cruz社製)、抗pERK抗体(Cell Signaling社製)、抗ERK抗体(Cell Signaling社製)、及び抗GAPDH抗体(Cell Signaling社製)を用いて、カネマルらの方法(非特許文献13参照。)に準じて行った。

【0149】

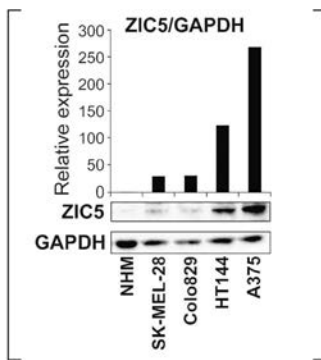
各抗体により染色されたバンドを図55に示す。図中、「PLX4032処理」が、「+」はPLX4032処理を行った細胞の結果を、「-」はDMSO処理を行った細胞の結果を、それぞれ示す。また、「siZIC5」が、「+」はsiZIC5#1を導入した細胞の結果を、「-」はsiNeg#1を導入した細胞の結果をそれぞれ示す。「siPDGFD」が、「+」はsiPDGFD#1を導入した細胞の結果を、「-」はsiNeg#2を導入した細胞の結果をそれぞれ示す。vemR-3細胞では、PLX4032処理によるERKの不活性化(pERK量の減少)は引き起こされなかったが、ZIC5の発現を抑制したり、PDGFDの発現を抑制すると、pERK量が低下した。

10

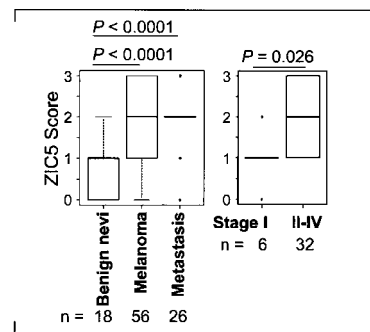
【0150】

これらの結果から、ZIC5/PDGFDが形成するポジティブフィードバックシグナルが、Vemurafenib耐性株におけるMEK/ERKシグナルの異常活性化に寄与していると考えられた。

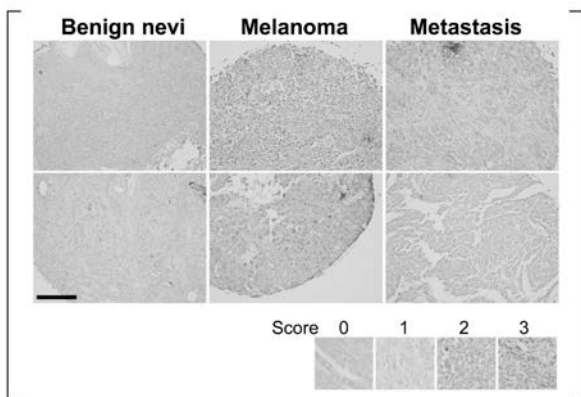
【図1】



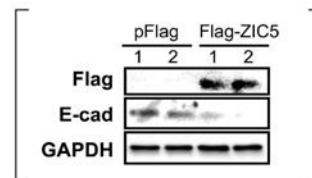
【図3】



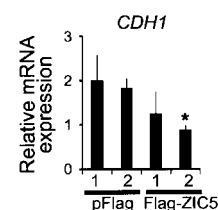
【図2】



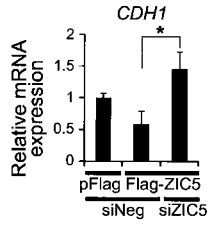
【図4】



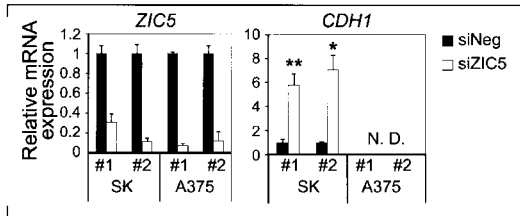
【図5】



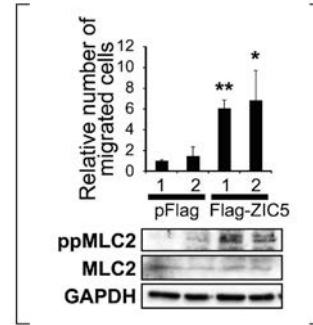
【 図 6 】



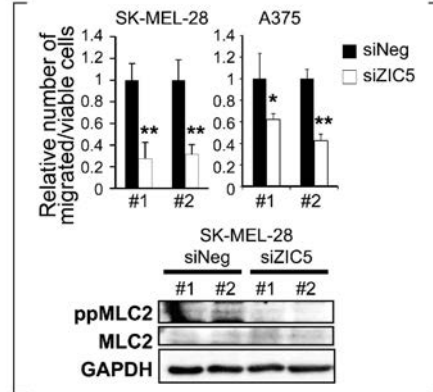
【 図 7 】



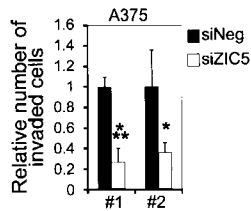
【 図 8 】



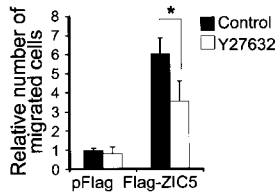
【 図 9 】



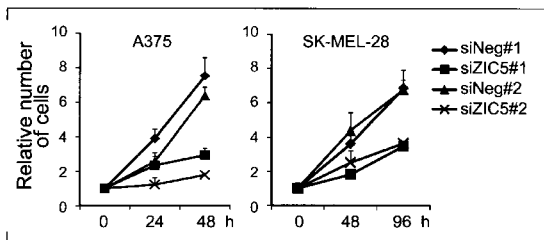
【 図 1 0 】



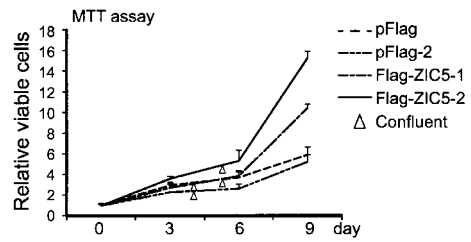
【 図 1 1 】



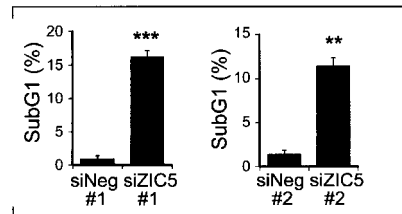
【 図 1 2 】



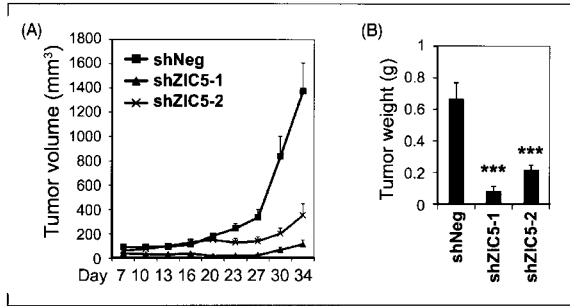
【 図 1 3 】



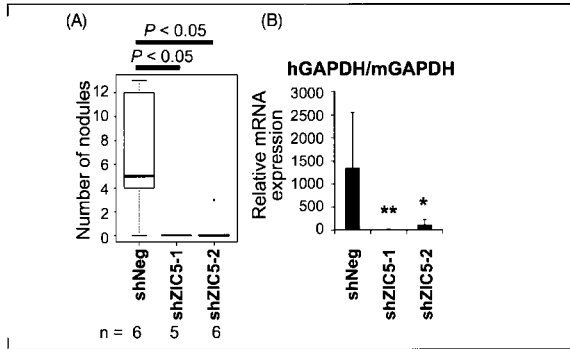
【 図 1 4 】



【 15 】



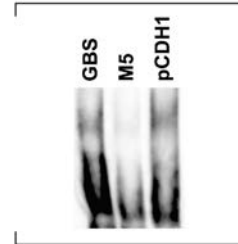
【 16 】



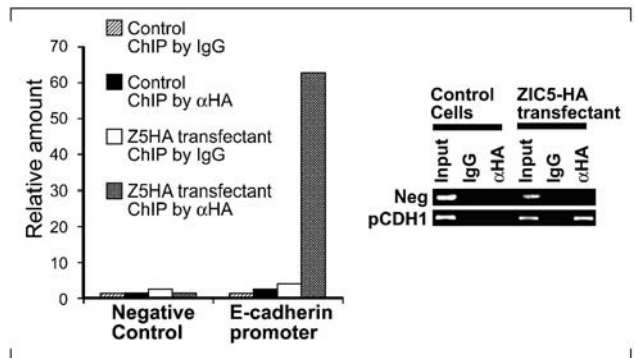
【 17 】

GBS; GATCCTGTGATTTTCGTCTTGGGTGCTCTCCCTCG
 M5; GATCCTGTGATTTTCGTCTTGGGTGATCTCCCTCG
 pCDH1; TCAGCCAATCAGCGGTACGGGGGGCGGTGCCTCCG

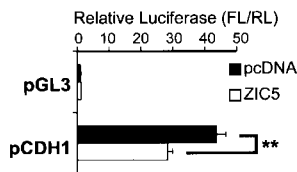
【 18 】



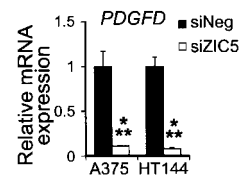
【 19 】



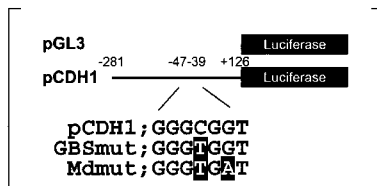
【 20 】



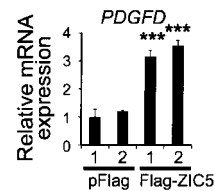
【 23 】



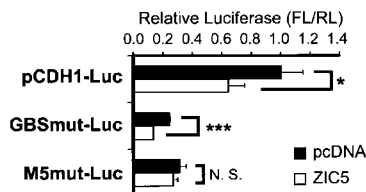
【 21 】



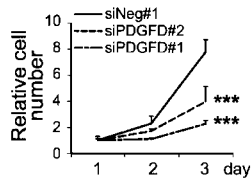
【 24 】



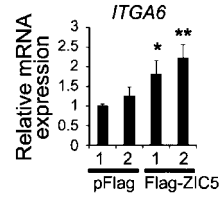
【 22 】



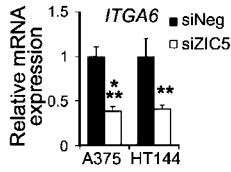
【 図 2 5 】



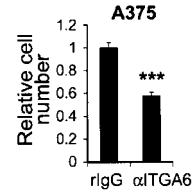
【 図 2 7 】



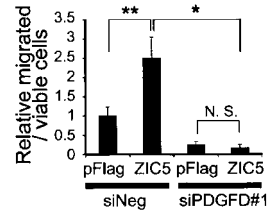
【 図 2 6 】



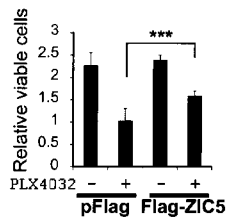
【 図 2 8 】



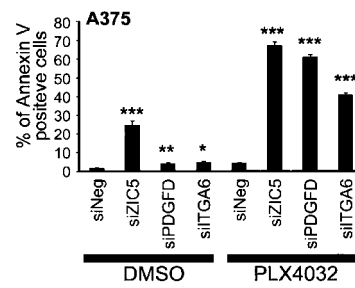
【 図 2 9 】



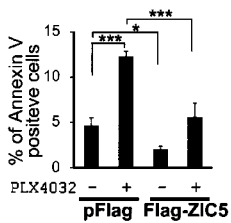
【 図 3 0 】



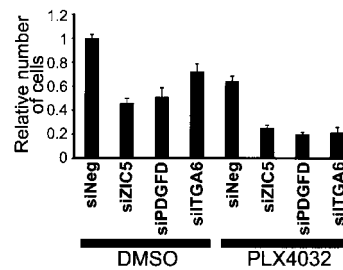
【 図 3 2 】



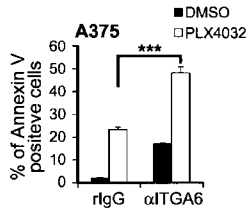
【 図 3 1 】



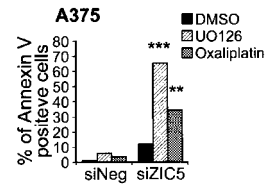
【 図 3 3 】



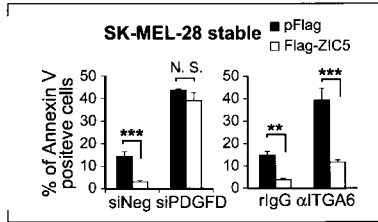
【 3 4 】



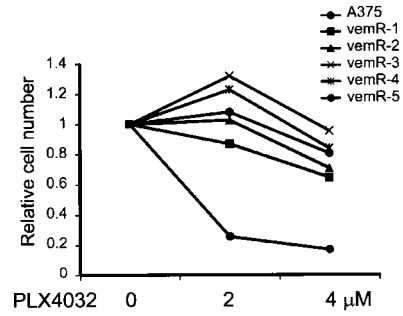
【 3 6 】



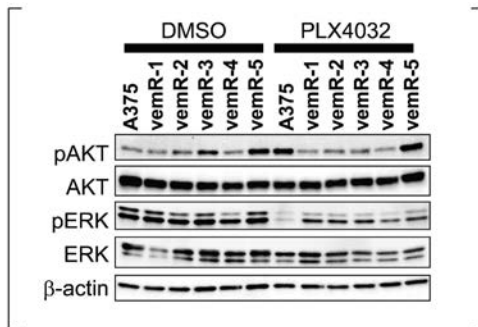
【 3 5 】



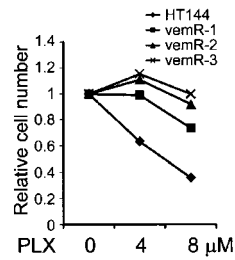
【 3 7 】



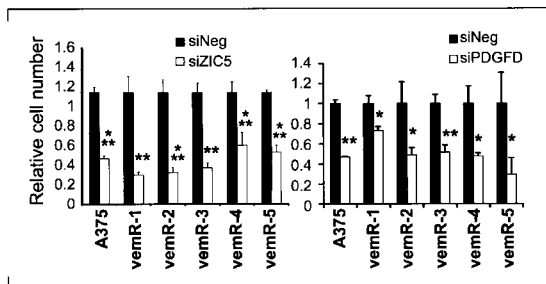
【 3 8 】



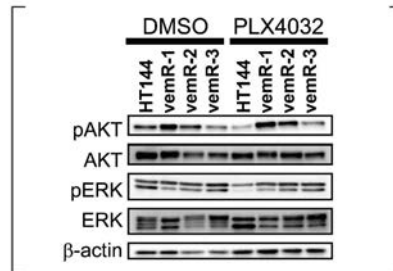
【 4 0 】



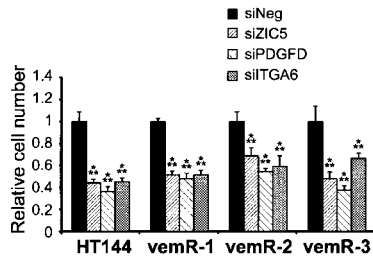
【 3 9 】



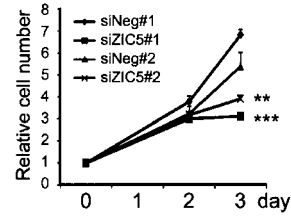
【 4 1 】



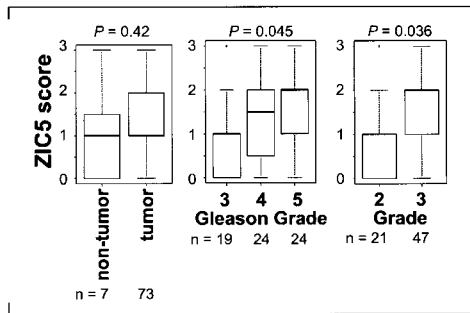
【 図 4 2 】



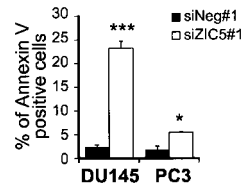
【 図 4 4 】



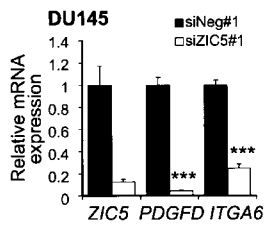
【 図 4 3 】



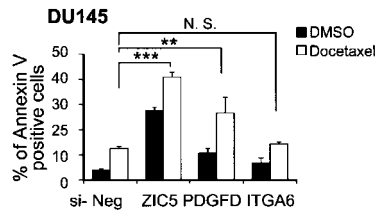
【 図 4 5 】



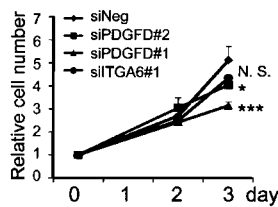
【 図 4 6 】



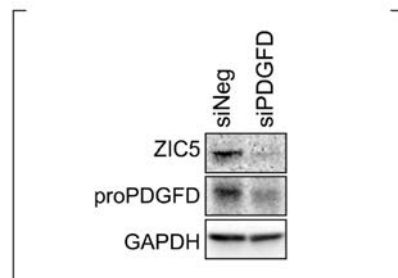
【 図 4 8 】



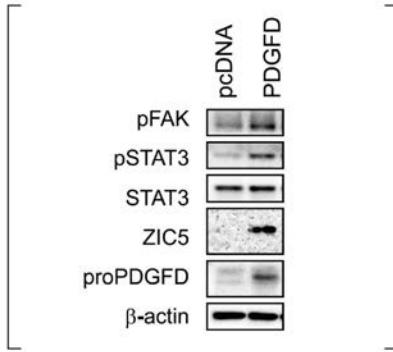
【 図 4 7 】



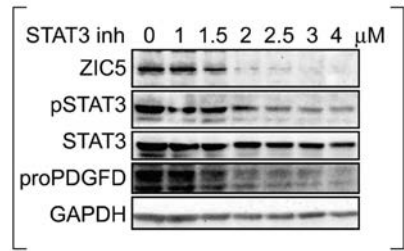
【 図 4 9 】



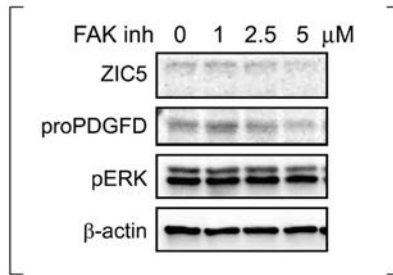
【 図 5 0 】



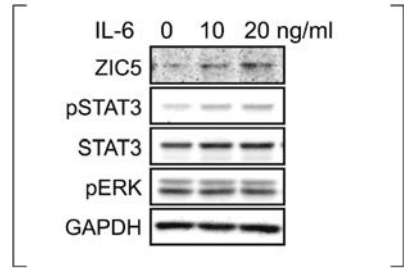
【 図 5 2 】



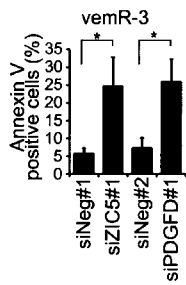
【 図 5 1 】



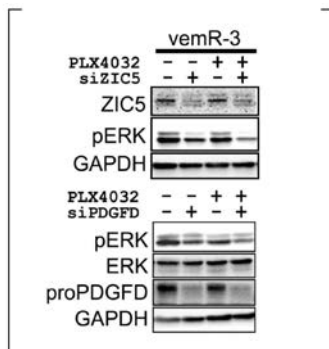
【 図 5 3 】



【 図 5 4 】



【 図 5 5 】



【配列表】

2016178374000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/062757

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K45/00(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P13/08(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/04(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i		
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) A61K45/00, A61K31/713, A61K48/00, A61P13/08, A61P17/00, A61P35/00, A61P35/04, A61P43/00		
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 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), UniProt/GeneSeq, CiNii, Japio-GPG/FX		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	JP 2009-502115 A (Oncotherapy Science, Inc.), 29 January 2009 (29.01.2009), claims; paragraphs [0007], [0021], [0022], [0067], [0167] to [0171], [0234] & US 2009/0317392 A1 paragraphs [0006], [0020] to [0022], [0071], [0183] to [0191], [0252]	1-3, 6, 7, 12-14/5/4, 8-11, 15
X/Y/A	WO 2014/062845 A1 (UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION), 24 April 2014 (24.04.2014), abstract; paragraphs [0008], [0032]; examples 1, 2 & US 2015/0275307 A1	12/5/1-4, 6-11, 13-15
<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	"T"
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"
"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)	"Y"
"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	
Date of the actual completion of the international search 21 June 2016 (21.06.16)		Date of mailing of the international search report 05 July 2016 (05.07.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/062757

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	ARUGA, J., et al., Expression of ZIC family genes in meningiomas and other brain tumors, BMC Cancer. 2010, Vol.10, No.79, pp.1-10, Abstract	12-14/1-11, 15
A	JP 2014-509515 A (Eisai R & D Management Co., Ltd.), 21 April 2014 (21.04.2014), & WO 2012/129100 A1	1-15
A	Zen KAWAUCHI et al., "Daichogan Saibo ni Okeru vitaminD Receptor Izonteki na E-cadherin no Hatsugen Yudo ni PIP kinase Ibeta ga Kan'yo suru", Journal of Japanese Biochemical Society Shoroku CD, 2009, page 4P-269	1-15

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2016/062757	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P13/08(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/04(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i			
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. A61K45/00, A61K31/713, A61K48/00, A61P13/08, A61P17/00, A61P35/00, A61P35/04, A61P43/00			
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。 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2016年 日本国実用新案登録公報 1996-2016年 日本国登録実用新案公報 1994-2016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) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN); UniProt/GeneSeq, CiNii, Japio-GPG/FX			
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 請求項の番号	
X/ Y/ A	JP 2009-502115 A (オンコセラピー・サイエンス株式会社) 2009.01.29 特許請求の範囲、段落[0007]、段落[0021]、段落[0022]、段落[0067]、 段落[0167] - 段落[0171]、段落[0234] & US 2009/0317392 A1, [0006]、[0020]-[0022]、[0071]、 [0183]-[0191]、[0252]	1-3, 6, 7, 12-1 4/5/ 4, 8-11, 15	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> 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 21.06.2016		国際調査報告の発送日 05.07.2016	
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) 佐々木 大輔	4C 3962
		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 1 6 / 0 6 2 7 5 7
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 請求項の番号
X/Y/ A	WO 2014/062845 A1 (UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION) 2014.04.24 Abstract、段落 [0008]、段落 [0032]、Example 1、Example 2 & US 2015/0275307 A1	12/5/ 1-4, 6-11, 13- 15
X/ A	ARUGA, J., et al., Expression of ZIC family genes in meningiomas and other brain tumors, BMC Cancer. 2010, Vol. 10, No. 79, pp. 1-10, Abstract	12-14/ 1-11, 15
A	JP 2014-509515 A (エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメ ント株式会社) 2014.04.21, & WO 2012/129100 A1	1-15
A	河内 全, 他, 大腸癌細胞における vitaminD レセプター依存的な E-cadherin の発現誘導に PIP kinase IIbeta が関与する, 生化学 抄 録 CD, 2009, p. 4P-269	1-15

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 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K 31/713	(2006.01)	A 6 1 K	31/713	
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
C 1 2 Q 1/68	(2018.01)	C 1 2 Q	1/68	Z N A A
C 1 2 Q 1/04	(2006.01)	C 1 2 Q	1/04	

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

Fターム(参考) 4B063 QA07 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QQ58 QR56 QS34
 4C084 AA13 AA17 NA14 ZA811 ZA812 ZA891 ZA892 ZB261 ZB262 ZC021
 ZC022
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA81 ZA89 ZB26 ZC02

(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。