

(43) 国際公開日
2007年12月21日 (21.12.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/145365 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) A61K 45/00 (2006.01)
 A61K 31/7088 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
 A61K 38/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
 A61K 39/395 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2007/062362

(22) 国際出願日: 2007年6月13日 (13.06.2007)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願2006-164890 2006年6月14日 (14.06.2006) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人自治医科大学 (JICHI MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒3290498 栃木県下野市薬師寺 3 3 1 1 - 1 Tochigi (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 石川和宏 (ISHIKAWA, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒3290498 栃木県下野市薬師寺 3 3 1 1 - 1 学校法人自治医科大学

内 Tochigi (JP). 石井秀始 (ISHII, Hideshi) [JP/JP]; 〒3290498 栃木県下野市薬師寺 3 3 1 1 - 1 学校法人自治医科大学内 Tochigi (JP). 市村恵一 (ICHIMURA, Keiichi) [JP/JP]; 〒3290498 栃木県下野市薬師寺 3 3 1 1 - 1 学校法人自治医科大学内 Tochigi (JP).

(74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19階 Tokyo (JP).

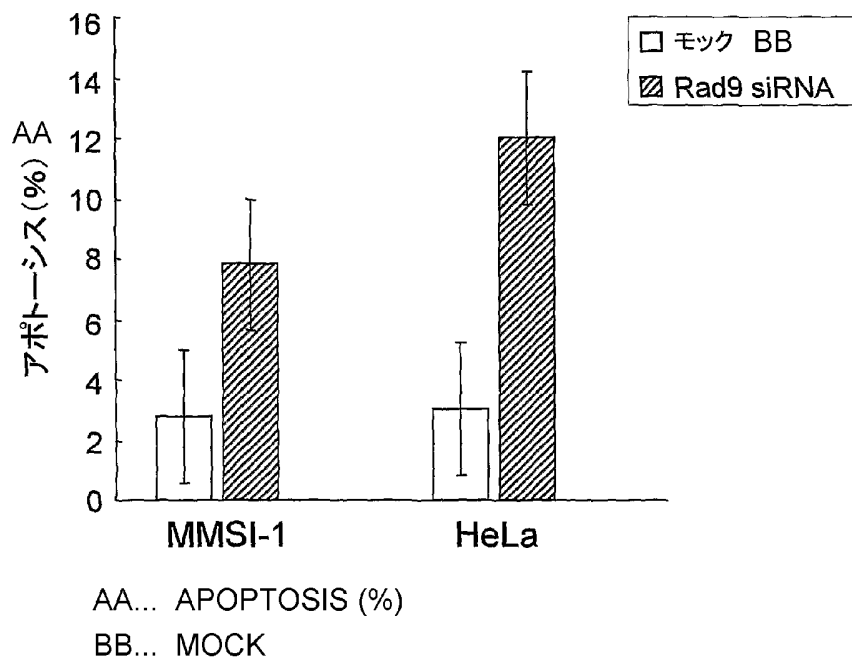
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,

[続葉有]

(54) Title: THERAPEUTIC AGENT FOR CANCER AND METHOD FOR SCREENING FOR THE SAME

(54) 発明の名称: 癌治療薬及びそのスクリーニング法



(57) Abstract: Disclosed is a method for screening for a therapeutic agent for cancer, comprising the steps of adding a candidate substance to a test system in the presence of a cancer gene product Rda9 and a cancer suppressor gene product p53 and selecting a biologically active substance capable of controlling the binding between Rda9 and p53. Also disclosed is a therapeutic agent for cancer, which controls the binding between Rda9 and p53.

[続葉有]

WO 2007/145365 A1



SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: この発明は、試験系において、癌遺伝子産物Rad9と癌抑制遺伝子産物p53との存在下で薬剤候補を添加すること、Rda9とp53との結合を制御することができる生物活性薬剤を選抜することを含む、癌治療薬をスクリーニングするための方法、並びに、前記結合を制御可能にする癌治療薬に関する。

明 細 書

癌治療薬及びそのスクリーニング法

技術分野

本発明は、癌治療薬に関する。具体的には、本発明は、癌遺伝子 Rad9 の機能を制御し、これによって癌抑制遺伝子 p53 の活性を亢進させる癌治療用組成物に関する。

本発明はまた、そのような癌治療用薬剤をスクリーニングする方法に関する。

背景技術

細胞周期チェックポイントは、細胞周期事象の適正な順番を維持するシグナル伝達経路である。DNA が損傷を受けるか、或いは複製が阻害された後、細胞応答は、進化的に保存されたシグナル伝達経路の活性化によって起こる。この経路は、細胞周期の進行を遅らせ、かつ損傷 DNA の修復を誘導する。これらのシグナル伝達経路は蛋白質センサーを含み、このセンサーは、異常な DNA 構造を認識しキナーゼを活性化し、これによってリン酸化カスケードを誘発し、最終的に細胞周期停止及び DNA 修復に導く（非特許文献 1）。この細胞周期監視機構がうまくいかないと、ゲノムが不安定になり、ついには、哺乳動物において癌が形成される（非特許文献 2）。

ヒト Rad9(hRad9)蛋白質は、Schizosaccharomyces pombe Rad9 のヒトホモログであり、チェックポイント rad 遺伝子(rad1⁺, rad3⁺, rad9⁺, rad17⁺, rad26⁺及び hus1⁺)の構成員である。これらの rad 遺伝子類は、S 期(DNA 修復)及び G2 期(DNA 損傷)チェックポイントに必要なものである（非特許文献 3）。

Rad9 は当初酵母の放射線照射に対する感受性を制御する因子として同定された。DNA に損傷が生じると Rad9 は同じくチェックポイント蛋白質である Rad1 及び Hus1 と三量体を形成し DNA の損傷部位を取り囲み、損傷修復のシグナルを下流の因子に伝達する。その際、Rad9 の C 末端にある 9 箇所以上のリン酸化部位でのリン酸化がシグナル伝達に重要と考えられている（非特許文献 4）。Rad9 はまた、

DNA polymerase β を活性化し、損傷修復に関与する一方、抗アポトーシス蛋白 Bcl-2 や Bcl-xL と抑制的に結合しアポトーシスを誘導する(非特許文献 5 及び 6)。チェックポイントとは DNA 損傷の認識から細胞周期調節までのメカニズムを指すが、Rad9 は、チェックポイントから、損傷修復とアポトーシスの相反する経路の分岐点に存在し機能する分子であることが示唆される。しかしながら、特にヒトにおいては解明されていない未知の部分が多く存在している。

Rad9 の癌におけるデータとして Rad9 遺伝子が第 11 番染色体長腕 13 領域に位置していることが挙げられる。この領域には少なくとも 4 種の癌遺伝子が存在すると考えられているが、これまで 2 種の癌遺伝子が同定されているのみである。また、臨床的に頭頸部癌、食道癌、乳癌ではこの領域の遺伝子増幅がしばしば認められ、遺伝子増幅により生存率が低下するとの証拠がある(非特許文献 7)。しかし、遺伝子増幅により癌遺伝子が過剰発現し、生存率の低下につながるとされているものの、遺伝子増幅と発癌あるいは癌細胞増殖の関連の詳細は不明である。また、現在のところ Rad9 が臨床的に生存率に関与するという証拠もない。

p53 の遺伝子はヒトの癌の 60%以上になんらかの変異を認めるという他に類を見ない重要な癌抑制遺伝子である。DNA が損傷を受けた場合、損傷を認識後、p53 蛋白質が増加又は活性化し、種々の遺伝子の転写を通じてアポトーシスの誘導、細胞周期抑制、細胞分裂抑制、DNA 複製、損傷修復等に関与し、ゲノムの安定性をもたらす(非特許文献 8)。したがって p53 の機能を制御することで癌の増殖、転移の抑制が可能になると考えられる。

p53 の転写標的の中でも公知の機能として重要なものが P21 遺伝子である。p53 が P21 プロモーターにある p53 結合部位に結合することで P21 の発現が誘導され、CyclinE 及び cdk2 の抑制と、細胞周期を抑制し、損傷を修復する時間的猶予が与えられる(非特許文献 9、10 及び 11)。p53 は、細胞周期の進行の負の調節因子であり、かつ細胞周期の G1 期から S 期への移行を制御する(非特許文献 12)。一方、hRad9 は、P21 プロモーターの p53 コンセンサス DNA 結合配列に特異的に結合し、転写レベルで P21 を調節する(非特許文献 13)。

さらに、Rad9 と細胞周期蛋白質 PP5 との結合を利用した生物活性薬剤のスクリーニング法が特許文献 1 に記載されている。

さらにまた、特許文献 2 に、ATM、ATR、又は ATM もしくは ATR により調節される蛋白質の活性化が AIM3 の結合によって仲介されることが記載されている。ATM もしくは ATR により調節される蛋白質には、p53、RAD9 などの多数の物質が含まれている。

hRad9 は、細胞周期の制御に関与することが示唆されるが、その機能や機序は実際のところ不明であるし、また、上記の p53 経路における Rad9 の関与もまたこれまで不明である。

特許文献 1 米国特許出願第 200302211546A1 明細書

特許文献 2 米国特許出願第 20060046250A1 明細書

非特許文献 1 G. K. Dasika ら、Oncogene 18:7883-7899, 1999

非特許文献 2 C. Lengauer ら、Nature 396:643-649, 1998

非特許文献 3 E. Stewart ら、Curr. Opin. Cell Biol. 8:781-787, 1996

非特許文献 4 R. P. St Onge ら、J. Biol. Chem. 278: 26620-26628, 2003

非特許文献 5 M. N. Toueille ら、Nucleic Acids Res. 32: 3316-3324, 2004

非特許文献 6 K. Komatsu ら、Nat. Cell Biol. 2: 1-6, 2000

非特許文献 7 H. Tsuda ら、Cancer Res. 49: 3104-8, 1989

非特許文献 8 A. J. Levine, Cell 88: 323-331, 1997

非特許文献 9 W. S. El-Deiry ら、Cell 75: 817-825, 1993

非特許文献 10 J. Harper ら、Cell 75: 805-816, 1993

非特許文献 11 A. Noda ら、Exp. Cell Res. 211: 90-98, 1994

非特許文献 12 M. B. Kastan ら、Cell 71:587-597, 1992

非特許文献 13 Y. Yin ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 15:8864-8869, 2004

発明の開示

本発明は、Rad9 と p53 との生物学的な相互作用を明らかにし、癌治療に利用することを目的とする。

本発明者らは、Rad9 の機能が、意外にも、ある種の蛋白質結合活性を通して発揮されること、その具体的な蛋白質結合標的が p53 であることを見出し、Rad9 と p53 との結合の制御が、P21 の転写を介したチェックポイント制御に関連するとい

う証拠を得て、本発明を完成させた。この一連の研究から、次のような結果を得た。

(1) RNA 干渉(RNAi)、或いは変異型 Rad9 との競合反応、を用いて Rad9 を抑制すると、P21 mRNA の発現が増強した。

(2) ルシフェラーゼアッセイにより、Rad9 の導入が P21 プロモーター活性を抑制した。

(3) 免疫沈降により、Rad9 が p53 と直接結合した。

(4) Rad9 が P21 遺伝子のプロモーター領域の p53 結合部位に結合し、紫外線照射によりその結合は増加した。

(5) 紫外線照射後の Rad9 のフォーカス (focus) 形成から、Rad9 の C 末端のリン酸化が DNA 損傷に対する Rad9 の反応に重要であった。

上記の結果から、これまで詳細が不明であった、DNA 損傷後の Rad9 の活性化から p53 経路を経て細胞のアポトーシス誘導に至る経路が示され、細胞の DNA 損傷が修復に向かうか、或いはアポトーシスによる細胞死に向かうかの決定に関与していることが明らかになった。

本発明は、要約すると、以下の特徴を有する。

本発明は、第 1 の態様において、試験系において、癌遺伝子産物 Rad9 と癌抑制遺伝子産物 p53 との存在下で薬剤候補を添加すること、Rad9 と p53 との結合を制御することができる生物活性薬剤を選抜することを含む、癌治療薬をスクリーニングするための方法を提供する。

本発明の実施形態によれば、前記薬剤候補は、小分子、核酸、ペプチド、蛋白質、糖類及び脂質からなる群から選択される。

本発明の別の実施形態によれば、前記系は、真核及び原核生物由来の細胞を含む。

本発明の別の実施形態によれば、前記制御は、抑制又は亢進のいずれかである。

本発明の別の実施形態によれば、前記薬剤候補は、Rad9 と p53 との結合領域を中和する抗体である。

本発明の別の実施形態によれば、前記薬剤候補は、Rad9 と p53 との結合領域に由来する 5 以上のアミノ酸残基を有する Rad9 蛋白質断片又はその変異体である。

本発明の別の実施形態によれば、前記薬剤候補は、Rad9 遺伝子の転写及び発現を抑制するアンチセンス核酸、RNAi 核酸、又はその核酸を含むベクターDNA である。

本発明はまた、第2の態様において、Rad9 蛋白質の生物機能又は Rad9 遺伝子の発現を制御し、これによって Rad9 と p53 との結合を増強又は抑制して p53 の活性を抑制又は増強することができる、かつ Rad9 遺伝子、その転写産物又は翻訳産物と相互作用する生物活性薬剤を含む、癌を治療するための医薬組成物を提供する。

本明細書中で使用する「Rad9 遺伝子、その転写産物又は翻訳産物と相互作用する」なる用語は、細胞内の Rad9 遺伝子、その転写物又は翻訳産物と直接的に作用して Rad9 蛋白質又は遺伝子の生物機能や発現をポジティブに又はネガティブに制御することを意味する。したがって、本発明の医薬組成物の有効成分には、以下に例示するものが包含され、例えば米国特許出願第 20060046250A1 明細書に記載される AIM3 蛋白質、その変異体、及びそれらをコードする核酸は含まれない。

本発明の実施形態によれば、前記薬剤は、Rad9 に対する抗体又は抗体フラグメントである。

本発明の別の実施形態によれば、前記薬剤は、Rad9 遺伝子の転写及び発現を抑制するアンチセンス核酸又は該核酸を含むベクターDNA である。

本発明の別の実施形態によれば、前記薬剤は、Rad9 遺伝子の転写及び発現を抑制する RNAi 核酸又は該核酸を含むベクターDNA である。

本発明の別の実施形態によれば、前記薬剤は、Rad9 と p53 との結合領域に由来する5以上のアミノ酸残基を有する Rad9 蛋白質断片又はその変異体である。

本発明の別の実施形態によれば、前記薬剤は、リポソームに封入されている。

本発明に係る用語は、以下の定義を含む。

本明細書で使用する「Rad9」は、哺乳動物、好ましくはヒト由来の Rad9 蛋白質又はそれをコードする核酸（すなわち、ゲノム DNA、mRNA、cDNA など）を指す。Rad9 遺伝子は癌遺伝子の1つであり、また、Rad9 は、DNA に損傷が生じたときに、DNA 損傷の修復を指令する蛋白質であるし、或いは、抗アポトーシス蛋白質と抑制的に結合したときに、細胞のアポトーシス（プログラムされた細胞死）を誘導

する蛋白質である。

本明細書で使用する「p53」は、その遺伝子が癌抑制遺伝子であり、DNA が損傷を受けた場合、p53 蛋白質が増加又は活性化し、種々の遺伝子の転写を通じてアポトーシスの誘導、細胞周期抑制、細胞分裂抑制、DNA 複製、損傷修復等に関与し、ゲノムの安定性をもたらすという生物機能を有しており、それゆえ、p53 の機能を制御することで癌の増殖、転移の抑制が可能になる。p53 は、P21 遺伝子の発現誘導を制御しており、詳しくは、P21 プロモーター領域にある p53 結合部位に p53 が結合することによって、P21 の転写が開始され P21 の発現が誘発される。p21 は、サイクリン依存性キナーゼ阻害分子であり、細胞周期の抑制に導く。

本発明は、Rad9 蛋白質が p53 蛋白質と結合して p53 の機能を制御しているという新しい知見に基づいており、このような結合の制御を通して、p53 が関与する生物機能、例えば DNA 複製又は DNA 損傷修復、アポトーシス、細胞分裂抑制などの制御、或いは、p53 依存性 P21 遺伝子の発現の制御、ひいては、細胞周期の抑制へと導いて DNA 損傷の修復、そしてゲノムの安定化が達成される。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2006-164890 号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図 1 は、P21 遺伝子発現産物の発現に及ぼす UV 誘導性作用を示す。具体的には、UV 照射後の P21 mRNA 及び p21 蛋白質の経時変化を示す。293 細胞を、 $20\text{J}/\text{m}^2$ の UV で処理し、処理後図示された 0～72 時間の種々の時間に細胞を回収した。図 1A は、RNA を抽出し、RT-PCR を行い、P21 mRNA 対 G3PDH の比をデンシトメトリーで算出した結果を示す。図 1B は、蛋白質を抽出し、抗 P21 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った結果を示す。

図 2 は、P21 トランスアクチベーションに対する hRad9 野生型又は突然変異体発現の影響を示す。図 2A は、野生型 Rad9 プラスミド又はリン酸化欠損型 Rad9 プラスミドでトランスフェクトされた 293 細胞の細胞溶解物を使用して行ったウエスタンブロッティング(WB)の結果を示す。図 2B は、P21 プロモーター-ルシフェラーゼレポーター系を利用した hRad9 による P21 転写アッセイの結果を示す。

相対活性は Firefly 対 Renille の比として図示した。各カラムは、次のように同時トランスフェクトされた 293 細胞を意味する。カラム 1, pUC19 及び pGL3Basic; カラム 2, pUC19 及び WWP-Luc-P21 プロモーター; カラム 3, hHus1 及び WWP-Luc-P21 プロモーター (P21-Luc); カラム 4, hRad1 及び WWP-Luc-P21 プロモーター; カラム 5, 野生型 Rad9 及び WWP-Luc-P21 プロモーター; カラム 6, Rad9-S272A 及び WWP-Luc-P21 プロモーター; カラム 7, Rad9-8A 及び WWP-Luc-P21 プロモーター; カラム 8, Rad9-9A 及び WWP-Luc-P21 プロモーター; カラム 9, P53 及び WWP-Luc-P21 プロモーター; カラム 10, 野生型 Rad9 及び p53 及び WWP-Luc-P21 プロモーター; カラム 11, Rad9-S272A 及び p53 及び WWP-Luc-P21 プロモーター; カラム 12, Rad9-8A 及び P53 及び WWP-Luc-P21 プロモーター; カラム 13, Rad9-9A 及び P53 及び WWP-Luc-P21 プロモーター。

図 3 は、siRNA を利用した hRad9 及び p53 のノックダウン実験の結果を示す。図 3A は、示された抗体を使用したウエスタンブロット分析の結果を示す。ECL シグナルは、デンシトメーターで検出され、また、強度比は図に示されている。図 3B は、siRNA を用いた hRad9 のノックダウン実験の結果を示す。hRad9 及び P53 を siRNA (それぞれ siRad9 又は siP53) を使用してノックダウンし、UV で処理した、或いは処理しなかった。細胞を回収したのち、RNA を抽出し、RT-PCR を用いて P21 mRNA をアッセイした。P21 mRNA 対 G3PDH の比をデンシトメトリー法で算出し、図示した。

図 4 は、hRad9 と p53 との間の相互作用を示す。図 4A は、293 細胞の細胞溶解物を、材料と方法に記載したように、免疫沈降に使用した。抗 c-kit 抗体を、免疫沈降の陰性コントロールとして使用した。図 4B は、FLAG で標識された野生型 Rad9 プラスミド又はリン酸化欠損型 Rad9 プラスミドでトランスフェクトされた 293 細胞の細胞溶解物を使用して免疫沈降を行ったときの結果を示す。抗 FLAG 抗体による免疫沈降及び抗 p53 抗体によるイムノブロットを示す。図 4C は、UV に曝露したあとの Rad9/p53 複合体の経時変化を示す。293 細胞を 20J/m²UV で処理し、処理後 0~72 時間目の時間に細胞を回収した。その後、293 細胞の細胞溶解物を用いて免疫沈降を行った。上のパネルは、抗 p53 抗体による免疫沈降及び抗 hRad9 抗体による免疫ブロットを示す。中のパネルは、抗 hRad9 抗体による免疫

沈降及び抗 p53 抗体によるイムノブロットを示す。下のパネルは、抗 hRad9 抗体による免疫沈降及び抗リン酸化 p53 (ser-15) 抗体によるイムノブロットを示す。

図 5 は、hRad9 によるプロモーター結合が UV 照射後に増大することを示す。図 5A は、処理された又は処理されない 293 細胞からの核抽出物を用いて EMSA を行った結果を示す。レーン 1、核抽出物を含まず、下流 p53 コンセンサス DNA 結合配列を含む 30bp オリゴ；レーン 2、処理なしの、核抽出物；レーン 3、競合体として冷 30bp オリゴを添加した核抽出物；レーン 4、抗 p53 抗体を添加した核抽出物；レーン 5、抗 hRad9 抗体を添加した核抽出物；レーン 6、UV 処理の 6 時間後の核抽出物；レーン 7、抗 p53 抗体を添加した、UV 処理の 6 時間後の核抽出物；レーン 8、抗 hRad9 抗体を添加した、UV 処理の 6 時間後の核抽出物。図 5B, C, D, E は、P21 プロモーター部位の ChIP アッセイ結果を示す。293 細胞を野生型 Rad9 プラスミド又はリン酸化欠損型 Rad9 プラスミドでトランスフェクトし、UV 処理あり又は UV 処理なしで細胞を回収した。その後、抗 hRad9 抗体又は抗 p53 抗体を使用する ChIP アッセイを行った。免疫沈降 DNA 対インプット DNA の比をデンストメトリーで算出し、グラフに示した。図 5B は、抗 hRad9 抗体で免疫沈降する ChIP アッセイを示し、DNA は P21 下流結合部位に対するプライマーで増幅される。図 5C は、抗 p53 抗体による免疫沈降を示し、DNA は P21 下流結合部位に対するプライマーで増幅される。図 5D は、抗 hRad9 抗体による免疫沈降を示し、DNA は P21 上流部位に対するプライマーで増幅される。図 5E は、抗 p53 抗体による免疫沈降を示し、DNA は P21 上流部位に対するプライマーで増幅される。

図 6 は、DNA 損傷応答における hRad9 の役割を示す。図 6A は、UV 誘導核フォーカス中の γ H2AX 及び Rad9 のコロニー化を示す。図 6B は、UV 処理後の hRad9 のフォーカス形成率を示す。293 細胞を野生型 Rad9 プラスミド又はリン酸化 Rad9 プラスミドをトランスフェクトし、UV 処理の 1 時間後に 4% パラホルムアルデヒドで固定した。免疫蛍光染色を行い、hRad9 のフォーカス形成をもつ細胞の割合を分析した。図 6C は、リン酸化 Chk1 とアポトーシスの経時変化を示す。20J/m² の UV で 293 細胞を処理し、処理後 0~72 時間目の種々の時間で細胞を回収した。抗リン酸化 Chk1 (Ser-317) 抗体及び抗 Chk1 抗体を用いるウエスタンブロッティングを行った。リン酸化 Chk1 (Ser-317) 対全 Chk1 の比をデンストメトリーで算出し図

示した。並行して、DAPI で細胞を染色したのち、アポトーシスを計数し、アポトーシスをもつ細胞の割合を示した。リン酸化 p53 (Ser-15)、P21 mRNA (図 1A) 及び p21 蛋白質 (図 1B) もまた示されている。図 6D は、p53 依存性 p21 活性化のモジュレーションの様式を示す。DNA を外因性遺伝子毒素、非スケジュール複製などで損傷したのち、ATR/ATM、又は γ H2AX 及び 9-1-1 複合体のフォーカス、により損傷が感受性となる。p53 は蓄積し、hRad9 との関連する P21 プロモーターの p53 コンセンサス配列と結合する。P21 は、リン酸化 hRad9 により十分に転写され、DNA 損傷の 1~3 時間後にチェックポイント応答が活性化される。これに対して、P21 転写は、リン酸化欠損状態の hRad9 で阻害され、細胞周期停止が抑制され、アポトーシスの誘導に導く。Rad9 の C 末端リン酸化は、Chk1 の活性化の役割を演じると推定され、Chk1 の活性は、DNA 損傷又はアポトーシスの 24 時間後に G2/M チェックポイントの活性化を誘導する。

図 7 は、Rad9 と p53 との結合領域に由来する 5 以上のアミノ酸残基を有する Rad9 蛋白質断片である変異型 (mt1、mt2、mt3、mt4 及び mt5) Rad9 の、該野生型 (WT) Rad9 の前記結合領域における、存在位置を示す概略図 (図 7A)、並びに、各変異型 Rad9 発現プラスミド (レポーター遺伝子 FLAG を含む) を MRC5 細胞に導入したときの変異型 (mt1~mt5) Rad9 の発現を示すウエスタンブロット (図 7B) である。図中、PCNA フォールド (fold) は核内増殖抗原 (Proliferating Cell Nuclear Antigen) 様構造を表し、モック (mock) は、野生型又は変異型 Rad9 発現プラスミドを含まないコントロールを表す。

図 8 は、MRC5 細胞に野生型 (WT) Rad9 又は変異型 (mt1~mt5) Rad9 発現プラスミドを導入したときの、p53-Rad9 結合 (図 8A) 及び p21 発現の変化 (図 8B) を示す。図中、モック (mock) は、野生型又は変異型 Rad9 発現プラスミドを含まないコントロールを表し、IB はイムノブロット、IP は免疫沈降をそれぞれ表す。

図 9 は、癌細胞への野生型 Rad9 又は変異型 (mt1~mt5) Rad9 発現プラスミドの導入時の該細胞のアポトーシスの割合 (%) を示す。癌細胞として、図 9A は頭頸部扁平上皮癌細胞株 MMSI-1 を使用したときの結果を、図 9B は子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞を使用したときの結果をそれぞれ示す。図中、モック (mock) は、野生型又は変異型 Rad9 発現プラスミドを含まないコントロールを表す。

図 10 は、頭頸部扁平上皮癌細胞株 MMSI-1 又は子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞に、Rad9 siRNA（配列番号 18）を導入したときの該細胞のアポトーシスの割合（％）を示す。図中、モック (mock) は、野生型又は変異型 Rad9 発現プラスミドを含まないコントロールを表す。

図 11 は、MRC5 細胞に、抗癌剤エトポシド (VP16)、カンプトテシン (CPT)、シスプラチン (CDDP) 又はドキソルビシン (DOX) を投与したときの、免疫沈降法によって測定された p53-Rad9 結合の変化を示す。図中、モック (mock) は、野生型又は変異型 Rad9 発現プラスミドを含まないコントロールを表し、IB はイムノブロット、IP は免疫沈降をそれぞれ表す。

図 12 は、抗 Rad9 抗体による p53-Rad9 結合の変化を示す。図中、GST はグルタチオン S 転スフェラーゼを表し、+ は、実験系（レーン 1、2 及び 3）に含まれた図に示した物質を表す。

発明を実施するための最良の形態

本発明を、添付の図面を参照しながらさらに説明する。

本発明者らは、ヒト胎児腎系球体細胞株である 293 細胞を用いて、紫外線 (UV) 照射後、p53 の活性化の指標である Ser15 のリン酸化と、p53 の転写標的の P21 の mRNA の経時変化を検討した。p53 のリン酸化は照射 5 分後に亢進し、12 時間後まで高値を示し、一方 P21 mRNA は紫外線照射後 30 分から 3 時間で発現の上昇を認めた（図 1）。これらより、細胞内では DNA 損傷 5 分後から 1 時間後にチェックポイントが活性化することが示唆された。

P21 プロモーター活性化における Rad9 とリン酸化の役割を調べるために、293 細胞に p53 のプラスミド、或いは Rad9 のプラスミドを導入し、ルシフェラーゼアッセイで P21 プロモーター活性を測定した。その結果、p53 を発現させるとコントロール（カラム 1）に比較して P21 のプロモーター活性が著明に上昇した（カラム 3）のに対し、Rad9 を単独で発現させた細胞（カラム 2）では P21 プロモーター活性の上昇が低く抑えられた（図 2）。一方、p53 と Rad9 の両者を発現させるとその中間の活性を示した（カラム 4）。これらのことから、Rad9 は p53 と競合する形で p21 を活性化すると考えられる。

また、9 つある Rad9 のリン酸基の一つ Ser272 に変異をつくったプラスミドと p53 をともに強発現させた場合 (カラム 5)、Ser272 以外の 8 カ所を変異させたプラスミドと p53 を共に発現させた場合 (カラム 6)、9 カ所のリン酸基全てを変異させたプラスミドと p53 を共に発現させた場合 (カラム 7)、いずれも野生型 (WT) の Rad9 と P53 の強発現に比較して P21 の転写は低く抑えられた (図 2)。これらより、Rad9 はリン酸化を通じて p53 と関連し、機能している可能性が示唆された。

つぎに、RNA 干渉 (RNAi) を用いて Rad9 あるいは p53 をノックダウン (knockdown) し、RT-PCR で P21 mRNA の発現を検討した。コントロール (カラム 1、4) に比較して p53 の siRNA 導入では P21 mRNA の発現抑制を認めた (カラム 2、5) のに対し、Rad9 siRNA 導入後は P21 mRNA の上昇を認めた (カラム 3、6) (図 3)。従って Rad9 は P21 の転写に関し抑制的に働くことが示唆された。

さらに、p53 と Rad9 の直接的な相互作用の有無を確認するために免疫沈降を行った。その結果、Rad9 と p53 は直接結合し、また紫外線照射後の経時変化を検討すると両者の結合自体には大きな変化がないものの、結合している p53 の Ser15 でのリン酸化は 5 分から 6 時間で亢進した (図 4)。従って、p53 と Rad9 は DNA 損傷のない時点で既に結合しているが、損傷応答により結合している蛋白がリン酸化修飾を受け、機能的な調節を受けていると考えられた。

頭頸部癌細胞株 (MMSI-1) で免疫組織染色を行ったところ、コントロールの 293 細胞に比較して頭頸部癌細胞株 (MMSI-1) では、Rad9 は核に強い発現を認めた。また、Rad9 と同じ領域に遺伝子を持つ CyclinD1 も強い発現を認めた。一方、P21 はごく軽度の発現を認めるのみであった。これらの結果からも頭頸部癌においては Rad9 の強発現とチェックポイント異常があることが示唆された。

以上の事実から、Rad9 は p53 と相互作用しながら P21 を競合的に、かつ抑制的に制御していると考えられた。DNA 損傷を認識した後、通常の状態では Rad9 はリン酸化修飾を受けながら p53 を制御し、P21 の転写を通じてチェックポイントの活性化と損傷修復へ働くと考えられる。公知の事実として、Rad9 のリン酸化によりチェックポイント蛋白 Chk-1 が活性化することも知られている。一方 Rad9 がリン酸化されない状態、すなわち細胞の損傷が大きな状態では、P21 の転写がより一層抑制され、細胞周期が進行すると共にアポトーシスへ誘導すると考えられる。

従って、Rad9 はリン酸化修飾を通じて p53 と相互作用し、DNA 損傷を受けた細胞の生と死を運命付ける重要な機能を持つといえる (図 6D)。

さらにまた、Rad9 のリン酸化部位に変異のある Rad9 を 293 細胞に導入し、アポトーシスの誘導を検討した。ウエスタンブロッティング (Western blotting) でプラスミドの発現を確認した。野生型 (WT) に比較して 9 カ所のリン酸化部位を変異させたプラスミド (Rad9-9A) では、泳動度の大きな Rad9 が強く発現しているのが確認できた。紫外線照射 24 時間後でのアポトーシスは約 2 倍 (WT 6.5%、Rad9-9A 12.5%) となり、Rad9 の制御によりアポトーシスの誘導が促進することが示唆された。

要約すると、Rad9 と p53 とは、各蛋白質がリン酸化されるか否かに関わらず、結合するが、この結合を通して、Rad9 は、p53 の生物学的作用 (もしくは生物学的活性) を抑制的に調節している。Rad9 がリン酸化されない状態で、Rad9 が p53 と結合すると、P21 の転写が抑制され、かつ細胞周期が進行し、細胞のアポトーシスが誘導される。一方、細胞の DNA 損傷に伴って Rad9 がリン酸化されると、チェックポイント蛋白質である Chk1 が活性化されてチェックポイントが活性化され、並びに、Rad9 と p53 の結合が阻害、抑制又は解離すると、P21 の転写が増大し、細胞周期の抑制が起こり、これらの事象により DNA 損傷の修復へと導かれる。

本発明は、DNA が損傷を受けたとき、Rad9 と p53 との結合を制御することによって、すなわち、今回得られた (Rad9 が p53 を抑制的に制御する) 知見から、癌遺伝子 Rad9 と癌抑制遺伝子 p53 の結合を阻害、抑制又は解離することによって、癌抑制遺伝子 p53 の活性は強く発揮されることが期待され、癌医療のための診断方法、治療方法の開発へ応用可能となる。例えば、正常細胞が、紫外線、放射線などの有害な高エネルギー線の影響下で DNA 損傷を受けたとき、ゲノムを安定化し癌化を防止する該 DNA 損傷の修復のために本発明を利用することができるし、或いは、細胞が例えば癌細胞であるときには、本発明によりアポトーシスを誘導することができる。

したがって、Rad9 と p53 との結合を制御する物質は、それが抑制的であろうと亢進的であろうと、癌の治療薬として有用である。本発明は、以下に説明するように、そのような癌治療薬の新規スクリーニング法を提供するとともに、抗体 (例

例えば、Rad9 と p53 との結合領域を中和する抗 Rad9 抗体又は抗 p53 抗体など)、核酸 (例えば、Rad9 遺伝子の発現 (或いは、転写及び翻訳) を抑制する、アンチセンス核酸、RNAi 核酸、これらの核酸をコードする DNA を発現可能に含むベクターなど)、或いは、Rad9 の p53 結合領域の模倣体 (例えば、該結合領域由来の 5 以上、好ましくは 8 以上、より好ましくは 10 以上のアミノ酸を含む Rad9 蛋白質断片、その変異体など)、などを含む癌治療のための医薬組成物を提供する。

<癌治療薬のスクリーニング>

本発明は、その第 1 の態様において、試験系において、癌遺伝子産物 Rad9 と癌抑制遺伝子産物 p53 との存在下で薬剤候補を添加すること、Rad9 と p53 との結合を制御することができる生物活性薬剤を選抜することを含む、癌治療薬をスクリーニングするための方法を提供する。

本発明では、Rad9 と p53 との結合を生じさせることが可能な *in vitro* 試験系であれば、いずれの試験系も使用できる。このような試験系の 1 つの例は、Rad9 蛋白質と p53 蛋白質を用意し、生理的 pH (pH7~7.5、通常 7.4)、塩類含有緩衝液中、室温~約 37℃の温度で両蛋白質を混合するような系である。緩衝液は、例えばリン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝塩水 (PBS) などであるが、これに限定されない。緩衝液は、蛋白質を安定化する物質、例えばグリセロール、糖類、Rad9-p53 結合に影響しない他の蛋白質、ポリペプチド又はペプチドなどを含んでもよい。

Rad9 は、哺乳動物由来の Rad9、好ましくはヒト Rad9 である。ヒト Rad9 のヌクレオチド及びアミノ酸配列は、GenBank 登録番号 NM_004584 (配列番号 1 及び 2 参照) に示されており、ヒト Rad9 は 392 アミノ酸から構成されている。ヒト以外の哺乳動物の Rad9 は、例えばマウス Rad9 (NM_011237)、ラット Rad9 (NM_001030042) などを含む。本発明の方法で使用可能な Rad9 は、ヒト Rad9 が好ましいが、ヒト Rad9 のヌクレオチド又はアミノ酸配列と 80%以上、85%以上、好ましくは 90%以上、より好ましくは 95%以上、97%以上、98%以上、99%以上の同一性を有する、かつヒト p53 と結合可能である、ヒト Rad9 ホモログ、変異体又は類似体であってもよい。

Rad9 は、リン酸化されていてもよいし、或いはリン酸化されていなくてもよい。

Rad9 のリン酸化は、リン酸化酵素、例えばプロテインキナーゼ C δ (K. Yoshida ら、EMBO J. 2003, 22:1431-1441)、ATR(P. Roos-Mattjus ら、J. Biol. Chem. 2003, 278: 24428-24437)、cdc2(R. P. St. Onge ら、J. Biol. Chem. 2003, 278: 26620-26628)などによって行うことができる。

p53 は、哺乳動物由来の p53、好ましくはヒト p53 である。ヒト p53 のヌクレオチド及びアミノ酸配列は、GenBank 登録番号 NM_000546 (配列番号 3 及び 4 参照)に示されており、ヒト p53 は 394 アミノ酸から構成されている。ヒト以外の哺乳動物の p53 は、例えばマウス p53 (NM_011640)、ラット p53 (NM_030989)などを含む。本発明の方法で使用可能な p53 は、ヒト p53 が好ましいが、ヒト p53 のヌクレオチド又はアミノ酸配列と 80%以上、85%以上、好ましくは 90%以上、より好ましくは 95%以上、97%以上、98%以上、99%以上の同一性を有する、かつヒト Rad9 と結合可能である、ヒト p53 ホモログ、変異体又は類似体であってもよい。

Rad9 及び p53 蛋白質の合成は、公知の遺伝子組換え技術を用いて、例えば次のようにして行うことができる。

ヒト Rad9 をコードする cDNA のクローニングは、例えば B. Howard ら、(A human homolog of the *Schizosaccharomyces pombe* rad9+ checkpoint control gene) Proc Natl Acad Sci U S A. 1996, 93(24): 13890-13895 に記載されている。具体的には、ヒト胎児脳(human infant brain; GenBank 登録番号 R18275R18275)から cDNA ライブラリーを作製し、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によってヒト Rad9 cDNA を増幅することができる。Howard ら (上記)によれば、PCR は、1 μ g の DNA; 100pmol のプライマー; 0.2mM の各 dNTP (N=A, C, G, T); 2.5 ユニットの Taq ポリメラーゼ; 1.5mM MgCl₂; 及び 1 \times Taq 緩衝液 (BRL); 全量 100 μ l を用いる、95°C で 5 分のプレインキュベーションのあと、94°C で 1 分 (変性), 57°C で 30 秒 (アニーリング), 72°C で 2 分 (伸長) を 1 サイクルとして 35 サイクル、その後 72°C 10 分の最終伸長からなる。

ヒト p53 をコードする cDNA のクローニング及び発現は、例えば E. Harlow ら、(Molecular cloning and in vitro expression of a cDNA clone for human cellular tumor antigen p53) Mol Cell Biol. 1985, 5(7):1601-1610、及び G. Matlashewski ら、(Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression

of the human p53 gene)EMBO J. 1984, 20:3257-3262 によって記載される手法によって行うことができる。簡単に説明すると、例えば Harlow ら（上記）によって記載されるように、A431 細胞(human epithelial carcinoma cell line)由来の cDNA ライブラリーからクローン化するか、或いは、配列番号 3 に示される p53 のヌクレオチド配列に基づいて作製されたプライマーを用いた PCR によって上記 cDNA ライブラリーから増幅することができる。PCR 条件は、上記と同様である。

蛋白質合成のために、適当なベクター/宿主系を用いる DNA 発現が利用できる。ベクターに Rad9 又は p53 をコードする DNA を挿入し、適当な宿主細胞に導入し、適当な培地にて培養し発現させる。必要に応じて、前記コード DNA の 5' 末端にシグナルペプチドをコードする DNA を連結することができる。また、前記 DNA のいずれかの末端には、ヒスチジンタグ（例えば H6～H10 タグ）、緑色蛍光蛋白質（GFP）、ルシフェラーゼなどのタグや蛍光性、発光性蛋白質をコードする DNA を連結し、目的蛋白質の精製を容易にすることができる。

ベクターは、細菌系ベクター、酵母系ベクター、真菌系ベクター、昆虫系ベクター、植物系ベクター及び動物系（例えば哺乳動物系、鳥類系など）ベクターを含む。ベクターの例は、pUC 系、pBluescript 系、pBR 系などのプラスミド、ファージ、コスミド、ウイルスベクター、例えばバキュロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなど、Ti プラスミドベクター/アグロバクテリウム系などを含み、市販のベクターを好ましく使用できる。ベクターには、制御配列（例えばプロモーター、エンハンサーなど、例えば SV40 初期プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、P21 遺伝子プロモーター、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターなど）、選択マーカー（例えばネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子などの薬剤耐性遺伝子、LEU2、TRP1、HIS4、ADE2 などの栄養要求性相補遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子など）、リボソーム結合部位又はシャインーダルガルノ配列、複製起点、ターミネーター、マルチプルクローニングサイト、ポリ A シグナルなどのエレメントを適宜選択して含むことができる。

宿主細胞は、例えば大腸菌、枯草菌、シュードモナス菌などの細菌、酵母菌（例えばサッカロマイセス属、ピチア属、メタノール資化性酵母など）、担子菌、昆虫

細胞（例えば Sf 細胞など）、植物細胞、哺乳動物細胞（例えば 293 細胞、CHO、COS、BHK、HeLa など）を含む。

宿主細胞の形質転換は、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、マイクロインジェクション法、ボンバードメント法、プロトプラスト又はスフェロプラスト法、リポフェクション法、ウイルス感染法などの公知の方法で行うことができる。

別の試験系には、真核細胞、例えば上に例示したような、酵母細胞、昆虫細胞、動物細胞、好ましくは哺乳動物細胞、より好ましくはヒト由来の正常細胞系統又は腫瘍細胞系統を使用する系が含まれる。或いは、原核細胞、例えば大腸菌、枯草菌、シュードモナス属細菌なども使用可能である。

真核又は原核細胞を使用する試験系の場合、例えば、Rad9 及び p53 をコードする DNA を上に例示したようなベクターに発現可能に組み込み、このベクターを細胞に導入し、これらの蛋白質をコードする DNA を同時発現しうるようにした系が含まれる。各 DNA は、異なるベクターに別個に組み込まれてもよいし、或いは、同一のベクターに同時発現しうるような形態で組み込まれてもよい。ベクターには、上と同様のエレメントを含むことができる。エレメントとして、少なくともプロモーター、複製起点、ターミネーター、選択マーカー、マルチプルクロニングサイト及びリボソーム結合部位を含むことが好ましい。細胞を使用する試験系は、上記のように形質転換又はトランスフェクションされた細胞を適当な培地で培養することを含む。

真核細胞を使用する試験系の別の例は、Rad9 及び p53 をコードするゲノム DNA を含む発現ベクターを用いる相同組換え法によって細胞ゲノムに導入して得られた系である。ここで、ゲノム DNA とは、Rad9 又は p53 遺伝子を指し、エクソンとイントロンから構成される。この場合、使用する細胞は、前記ゲノム DNA が由来する細胞と同種のものが好ましい。すなわち、ヒト Rad9 及び p53 ゲノム DNA であればヒト細胞系統を使用し、マウス Rad9 及び p53 ゲノム DNA であればマウス細胞系統を使用するのがよい。SV40、サイトメガロウイルスなどのウイルス由来の強力プロモーターの制御下に前記ゲノム DNA を配置し、或いは放射線、光又は化学物質誘導性プロモーター（例えば、

www.nirs.go.jp/report/nirs_news/200410/hik01p.html ;
unit.aist.go.jp/rcg/rcg-gb/sg2.html など) の制御下に前記ゲノム DNA を配置し、随意に転写を起こすことができるような系がより好ましい。また、このような細胞には、紫外線や放射線の照射によって DNA 損傷を起こしたときに P21 の転写レベルが変化するようなヒトやマウス由来の細胞系統が含まれる。このような細胞には、例えばヒト MRC5 細胞 (ヒト肺線維芽細胞株 ; ATCC CCL-171)、マウス NIH 3T3 細胞などが含まれる。

本発明で使用可能な試験系は、上記細胞のライセート (溶解物) であってもよい。

上で述べたような遺伝子組換え技術の具体的手法は、例えば J. Sambrook ら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; F.M. Ausubel ら, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc, 2003 などに詳細に記載されており、本発明において利用可能である。

本発明の方法では、上記の試験系で、薬剤候補の存在下で、Rad9 と p53 を同時発現させ、これらの蛋白質間の結合の抑制又は亢進を測定する。

薬剤候補は、例えば、Rad9 遺伝子、その転写産物又は翻訳産物と相互作用し、これによって Rad9 と p53 との結合を制御することが予想される物質から選択され、特に限定されないが、例えば小分子 (好ましくは有機小分子)、核酸、ペプチド、蛋白質、糖類、脂質などからなる群から選択されうる。

薬剤候補の例は、Rad9 と p53 との結合を抑制又は阻害する抗体、例えば前記結合に関わる領域を中和する抗体を含む。このような抗体は、Rad9 又は p53 に対する抗体又はその抗体フラグメントであり、Rad9 と p53 との結合を抑制又は阻害することが可能であるものを選抜する。抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ペプチド抗体又はそれらのフラグメント (Fab、(Fab')₂ など)、或いは合成抗体 (例えば Fv、scFv など) などである。抗体又は抗体フラグメントの作製は、公知の方法で行うことができる。

ポリクローナル抗体は、蛋白質又はポリペプチド又はペプチドを、フロイントアジュバント又は非フロイントアジュバント、アルミニウム化合物 (例えば alum) などのアジュバントと一緒に乳化形態で、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、マウス、ラッ

トなどの非ヒト哺乳動物に免疫し、約2週間置きにブーストし、血中の抗体力価を確認したのち、放血し、抗血清を得ることができる。必要に応じて、抗血清をさらに、硫酸分画、イオン交換カラムクロマトグラフィーなどで処理し、IgG画分を得ることができる。

モノクローナル抗体は、上記のようにマウスなどの非ヒト動物に免疫したのち、脾臓、脾臓細胞又はリンパ節を摘出し、リンパ球とミエローマ細胞との融合を行い、ハイブリドーマを作製する。HAT培地で抗体産生ハイブリドーマを選択し、非ヒト動物の腹腔内に移植するか、或いはハイブリドーマを適当な動物細胞培養に供して、ハイブリドーマを培養し、腹水又は培養液からモノクローナル抗体を回収し、抗体力価又は親和性（結合定数又は解離定数）を測定する。

ヒト抗体は、公知のヒト抗体産生哺乳動物（例えば KM マウス（キリンビール/メダレックス社）、Xeno マウス（アブジェニックス社）、ヒト抗体産生ウシ（キリンビール/ヘマテック社）など）に免疫し、抗血清から得ることができる。

ヒト化抗体は、遺伝子組換え技術を用いて、マウス抗体の可変領域由来の相補性決定領域（complementaritydetermining region; CDR）をコードする DNA と、ヒト可変領域をコードする DNA とを結合し、ベクターに組み込み、哺乳動物細胞に形質転換して得ることができる（例えば、Kettleborough, C.A. ら Protein Engng., 4, 773-783, 1991; Maeda, H., Human Antibodies and Hybridoma, 2, 124-134, 1991; Gorman, S.D. ら Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 88, 4181-4185, 1991; Tempest, P.R., Bio / Technology, 9, 266-271, 1991; Co, M.S. ら Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 88, 2869-2873, 1991; Cater, P. ら Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 89, 4285-4289, 1992; Co, M.S. ら J. Immunol., 148, 1149-1154, 1992; 及び Sato, K., ら Cancer Res., 53, 851-856, 1993 など）。

薬剤候補の別の例は、Rad9 と p53 との結合領域に由来する 5 以上、8 以上、10 以上或いは 15 以上、例えば 20 以上、30 以上、50 以上、100 以上、150 以上、200 以上のアミノ酸残基を有する Rad9 蛋白質断片又はその変異体である（図 7A）。このような断片は、p53 への結合について Rad9 蛋白質と拮抗可能なアンタゴニスティックな（ポリ）ペプチド又は作用性アゴニスティック（ポリ）ペプチドである。なお、変異体は、該 Rad9 蛋白質断片の配列において 1～5 個、1～4 個、1～3

個、1～2個又は1個のアミノ酸残基の置換、欠失又は付加からなる変異を含むペプチドである。或いは、変異体は、該 Rad9 蛋白質断片の配列と 80%以上、85%以上、好ましくは 90%以上、95%以上、より好ましくは 97%以上、98%以上の同一性を有する配列を含むペプチドである。例えば、置換は、構造的、疎水的又は電気的性質が類似したアミノ酸間の保存的アミノ酸置換が望ましい。保存的アミノ酸置換には、例えば酸性アミノ酸（グルタミン酸、アスパラギン酸）、塩基性アミノ酸（リシン、アルギニン、ヒスチジン）、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン）、非極性の疎水性アミノ酸（グリシン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、プロリン）、或いは、極性の非荷電性アミノ酸（セリン、トレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン）間の置換が含まれる。

薬剤候補のさらに別の例は、Rad9 遺伝子の転写及び発現を抑制するアンチセンス核酸、RNAi 核酸、又はその核酸を含むベクターDNA である。

アンチセンス核酸は、Rad9 mRNA 配列に相補的な RNA 又は DNA 或いはその断片である。Rad9 mRNA 配列は、例えば配列番号 2 によってコードされるヌクレオチド配列、又は配列番号 1 に示されるコード領域のヌクレオチド配列、に対応する RNA 配列である。断片のサイズは、15 塩基以上から全長未満であり、好ましくは 25 塩基から 100 塩基である。

RNAi（RNA 干渉）核酸は、Rad9 遺伝子の発現を抑制する小分子 RNA であり、例えば siRNA (small interfering RNA)、miRNA (micro RNA) などを含む。これらの RNAi 核酸は、そのサイズが 18～25 塩基であり、二本鎖 RNA からなる。siRNA は、Rad9 遺伝子に対応する mRNA の部分配列及びその相補的配列からなり、一方、miRNA は、Rad9 遺伝子の遺伝子間領域（非コード領域、例えばイントロン領域）に対応する部分配列及びその相補的配列からなる。前駆体 miRNA は、センス鎖とアンチセンス鎖の間にステムループ配列（例えば天然 miRNA 由来の配列）を含むことができる。これらの核酸は、標的 RNA の切断又は標的 RNA の翻訳抑制を行う活性を有している。Rad9 遺伝子の配列又は遺伝子間配列に基づいて種々の配列を、例えば D. M. Dykxhoorn ら、Nature Rev. Mol. Cell Biol., 77:7174-7181, 2003 が記載するような標的部位の選択法（例えば、約 50%GC 含量となる配列、開始コドンから 50

～100 塩基下流の配列など)に従って推定し、DNA/RNA 合成装置を用いて合成することができる。或いは、Rad9 遺伝子配列をヌクレアーゼでランダムに切断したのち、cDNA を合成し、さらに RNA を合成して得られる核酸ライブラリーでもよい。

siRNA 又は miRNA は、それをコードする DNA を含む発現ベクターの形態であってもよい。このようなベクターは、タカラバイオ、コスモバイオ、Evrogen 社、Invitrogen 社などから市販されており、このベクターに Rad9 siRNA 又は miRNA をコードする DNA を組み込むことによって薬剤候補を作製することができる (例えば、pSINsi、pBAsi、pU6-siRNA、pH1-siRNA、p2FP-RNA など)。このようなベクターには、CMV(cytomegarovirus)/E プロモーター又は SV40 初期プロモーター、カナマイシン耐性遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子、ポリ A シグナル、停止コドン、複製起点などのエレメントが含まれる。

RNAi に関しては、実験医学「RNAi のサイエンス」Vol. 22, No. 4, 2004, 羊土社 ; 蛋白質核酸酵素 vol. 46, No. 10:1381-1386, 2001, 三共出版 ; 現代化学, 2006 年 4 月, 56-60, 東京化学同人 (東京、日本) などに記載されている。

さらに別の薬剤候補には、小分子が含まれる。そのような小分子は、薬剤として知られている又は知られていない物質が含まれる。薬剤として公知の物質には、市販された又は市販されていない抗癌剤、例えばアルキル化薬 (例えばシクロホスファミド、メルファラン、イソホスファミド、シクロホスファミド、ブスルファンなど)、代謝拮抗薬 (例えばメトトレキサート、フルオロウラシル、テガフル、シタラビン、ヒドロキシカルバミドなど)、抗生物質系 (例えばドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシン、ブレオマイシン、イダルビシンなど)、植物アルカロイド系 (例えばビンクリスチン、ビンデシン、パクリタキセルなど)、白金製剤 (例えばシスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチンなど) などが含まれる。本発明の方法において、例えば、細胞として種々の異なる初代癌細胞又は腫瘍細胞株を使用するとき、どの抗癌剤が、どのタイプの癌に有効であるかを推定することができし、或いは非癌細胞を使用するときにも、Rad9-p53 結合の減少を指標にして抗癌効果のある薬剤を選抜することができる (図 11)。

生物活性薬剤の選抜は、Rad9 と p53 の結合又はその結合レベルを検出又は定量することによって行うことができる。例えば、試験系から経時的にサンプリング

し、細胞の場合には細胞溶解後に、(非変性ポリアクリルアミドゲル)電気泳動、ウエスタンブロッティングなどの手法によって結合レベルの検出、定量を行うことができる。検出のために、抗Rad9抗体及び抗p53抗体を使用することができる。これらの抗体は、Alexis社、BD Biosciences社、Cell Signaling Technology社などから入手可能である。或いは、試験系が細胞を含む場合、紫外線などの照射によりDNA損傷を引き起したのち、P21の転写レベルを測定することによって候補薬剤を選抜することができる。この方法は、P21の活性化がp53依存性であるという知見に基づいている(W.S. El-Deiryら、Cell 75: 817-825, 1993)。Rad9とp53の間の結合を抑制する薬剤は、p53依存性P21活性化を増大し、これによってDNA損傷の修復に導く。対照的に、この結合を亢進する薬剤は、P21活性化を抑制し、Rad9の非リン酸化状態でアポトーシスを誘導する。この場合は、試験系の細胞が例えば腫瘍細胞であれば、そのアポトーシスが起るため、生細胞数をカウントすることによって薬剤を評価することも可能である。

<医薬組成物>

本発明はまた、Rad9蛋白質の生物機能又はRad9遺伝子の発現を制御し、これによってRad9とp53との結合を増強又は抑制してp53の活性を抑制又は増強することができる、かつRad9遺伝子、その転写産物又は翻訳産物と相互作用する生物活性薬剤を含む、癌を治療するための医薬組成物を提供する。

有効成分としての薬剤の例は、(1)Rad9に対する抗体又は抗体フラグメント、(2)Rad9遺伝子の転写及び発現を抑制するアンチセンス核酸又は該核酸を含むベクターDNA、(3)Rad9遺伝子の転写及び発現を抑制するRNAi核酸又は該核酸を含むベクターDNA、(4)Rad9とp53との結合領域に由来する5以上のアミノ酸残基を有するRad9蛋白質断片又はその変異体を含む。

上記の(1)から(4)の薬剤の例及び作製は、上述のとおりである。

薬剤の例は、Rad9に対するヒト抗体又はヒト化抗体である。このような抗体は、Rad9とp53との結合領域のエピトープを認識する抗体であることが好ましく、Rad9に対する抗体の中から、上記の試験系を用いて、結合を抑制する抗体を選択することによって容易に得ることができる。

薬剤の別の例は、Rad9とp53との結合領域に由来する5以上、好ましくは8以

上、10 以上又は 15 以上、例えば 20 以上、30 以上、50 以上、100 以上、150 以上、200 以上のアミノ酸残基を有する Rad9 蛋白質断片、或いはその変異体である。このような断片は、p53 との結合について、Rad9 と競合的に p53 に結合しうるペプチド又はポリペプチドである。Rad9 を適当なプロテアーゼで切断してランダムなペプチド又はポリペプチドを作製し、上記試験系に掛けて、Rad9 と p53 との結合を抑制するアンタゴニスティックな（ポリ）ペプチド、或いは Rad9 と類似の活性をもつアゴニスティックな（ポリ）ペプチドを選択することができる。Rad9 蛋白質断片の例は、配列番号 41 の塩基配列によってコードされるポリペプチド（変異型(mt1)Rad9)、配列番号 42 の塩基配列によってコードされるポリペプチド（変異型(mt2)Rad9)、配列番号 43 の塩基配列によってコードされるポリペプチド（変異型(mt3)Rad9)、配列番号 44 の塩基配列によってコードされるポリペプチド（変異型(mt4)Rad9)、配列番号 45 の塩基配列によってコードされるポリペプチド（変異型(mt5)Rad9）などを含む。さらに、変異体は、該 Rad9 蛋白質断片の配列において 1～5 個、1～4 個、1～3 個、1～2 個又は 1 個のアミノ酸残基の置換、欠失又は付加からなる変異を含むペプチドである。或いは、変異体は、該 Rad9 蛋白質断片の配列と 80%以上、85%以上、好ましくは 90%以上、95%以上、より好ましくは 97%以上、98%以上の同一性を有する配列を含むペプチドである。置換の例は、上記の保存的置換を含む。

薬剤のさらに別の例は、Rad9 遺伝子の転写及び発現を抑制するアンチセンス核酸又は該核酸を含むベクターDNA、或いは、Rad9 遺伝子の転写及び発現を抑制する RNAi 核酸又は該核酸を含むベクターDNA である。上記のとおり、これらの RNAi 核酸は、そのサイズが約 18～約 25 塩基であり、二本鎖 RNA からなる siRNA や miRNA を包含する。siRNA は、Rad9 遺伝子に対応する mRNA の部分配列及びその相補的配列からなり、一方、miRNA は、Rad9 遺伝子の遺伝子間領域に対応する部分配列及びその相補的配列からなり、ヘアピン構造を有する。これらの核酸は、標的 RNA の切断又は標的 RNA の翻訳抑制を行う活性を有している。Rad9 遺伝子の配列又は遺伝子間配列（例えば配列番号 41～45 に示される塩基配列）に基づいて種々の配列を、例えば D. M. Dykxhoorn ら、Nature Rev. Mol. Cell Biol., 77:7174-7181, 2003 が記載するような標的部位の選択法（例えば、約 50%GC 含量となる配列、

開始コドンから 50～100 塩基下流の配列など）に従って推定し、DNA/RNA 合成装置を用いて合成することができる。

siRNA の例は、限定されないが、以下の配列に対応するオリゴヌクレオチドである。

5' -GCCATCACTTTCTGCCTCAAGGAAT-3' (配列番号 13)

5' -CCATCACTTTCTGCCTCAAGGAATT-3' (配列番号 14)

5' -GAGCTTTGCAGAGTCAGCAAACCTTG-3' (配列番号 15)

5' -GCAGAGTCAGCAAACCTGAATCTTA-3' (配列番号 16)

5' -CAGAGTCAGCAAACCTGAATCTTAG-3' (配列番号 17)

5' -CAGCAAACCTGAATCTTAGCATTCA-3' (配列番号 18)

5' -CCACTTTGTCTTGGCCACACTCTCA-3' (配列番号 19)

5' -TGACTCTTACATGATCGCCATGGAA-3' (配列番号 20)

5' -GACTCTTACATGATCGCCATGGAAA-3' (配列番号 21)

5' -CATGATCGCCATGGAAACCACTATA-3' (配列番号 22)

5' -GCCTATGCCTGCTTTCTCT-3' (配列番号 23)

5' -CCTATGCCTGCTTTCTCTT-3' (配列番号 24)

5' -GCCATCACTTTCTGCCTCA-3' (配列番号 25)

5' -CCATCACTTTCTGCCTCAA-3' (配列番号 26)

5' -GCTTTGCAGAGTCAGCAA-3' (配列番号 27)

5' -GCCAATGACGACATTGACT-3' (配列番号 28)

5' -GGAAACCACTATAGGCAAT-3' (配列番号 29)

5' -GCCCTCCATTTCCCTTTCA-3' (配列番号 30)

5' -CCAAGAAGTTCCGCTCACT-3' (配列番号 31)

5' -GGAAGACAGTGAGGGTGAA-3' (配列番号 32)

本発明で使用する siRNA は、一本鎖でも二本鎖でもよく、一本鎖の場合にはアンチセンス鎖であり、二本鎖の場合にはセンス鎖とアンチセンス鎖からなる。これらの鎖は、安定性を確保するために、その 3' 末端にオーバーハング、例えば TT からなるジヌクレオチドを含むことができる。

本発明の医薬組成物における薬剤の量は、特に限定されないが、1 μ g～20mg/kg

体重である。

投与形態は、液体形態又は固体形態のいずれでもよい。固体形態には、凍結乾燥形態を含み、使用直前に、滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩液などの緩衝液、リンゲル液などに溶解してもよい。或いは、薬剤をリポソームに封入してもよい。リポソームとしては、細胞内に薬剤が移行しやすいようにするために、正電荷リポソーム（例えば正電荷コレステロールなど）が好ましく使用できる（中西守ら，蛋白質核酸酵素 Vol. 44, No. 11, 1590-1596, 1999, 共立出版（東京、日本）；T.S. Zimmermann ら，Nature Vol. 441, 111-114, 2006）。

投与する方法は、経口又は非経口投与、好ましくは非経口投与、例えば静脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、皮下投与、局所投与などを含む。局所投与としては、患部に直接注入する方法が含まれる。

医薬組成物には、有効成分のほかに、担体（例えば、希釈剤及び賦形剤）、及び添加剤を含むことができる。添加剤は、安定剤、保存剤、界面活性剤、緩衝剤、結合剤などの医薬業界で通常使用されるような剤を含む。希釈剤には、例えば、滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩液などの緩衝液、リンゲル液などを含む。

癌としては、悪性腫瘍、転移性癌などを含み、以下のものに限定されないが、例えば肺癌、胃癌、食道癌、肝臓癌、腎臓癌、口腔癌、脳腫瘍、膀胱癌、脾臓癌、大腸癌、頭頸部癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、皮膚癌、骨癌、舌癌などが含まれる。

以下に、本発明を、実施例を挙げてさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は、これらの実施例に限定されないものとする。

実施例

<材料と方法>

細胞培養

ヒト胚性腎臓由来の細胞株 293 を 10%FBS を含有する DMEM 中で培養した。UV 照射のために、60%～70%コンフルエントの単層細胞を PBS で洗浄し、殺菌ランプ (GL-15; NIPPO Electronic) が放出する UVC を照射した。対照細胞を、照射細胞

と同様に、しかし照射なしで、UVC 曝露源に取り込んだ。UV に曝露後、指定された時間に細胞を検査した。免疫蛍光染色のために、カバースリップ上で成長させた 293 細胞を 15 分間 4%パラホルムアルデヒドで固定し、2×10 分間 PBS で洗浄し、氷上で 0.5%Triton X-100 中で 5 分間透過させた。サンプルを、15%FCS 含有 PBS 中で室温、30 分間ブロックした。サンプルを、抗 γ H2AX 抗体及び抗 Rad9 抗体と一緒に 16 時間インキュベートし、3×5 分間 PBS 中で洗浄し、抗マウス Alexa Fluor488 第 2 抗体及び抗ウサギ Cy3 第 2 抗体(Molecular Probes)とともに室温、1.5 時間インキュベートした。細胞を PBS 中、3×5 分間洗浄し、4, 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI) (Vector Laboratories)で染色した。サンプルを DAKO Fluorescent Mounting Medium (DAKO)を用いて固定した。Olympus DP70 デジタルカメラと DPmanager ソフトウェアを装備した Olympus BX60 顕微鏡を用いて蛍光画像を撮った。定量分析のために、対物 100 倍の倍率で画像処理中に目視でフォーカスを数えた。単一実験では、少なくとも 100 細胞まで、細胞を計数した。アポトーシスアッセイのために、293 細胞を 20J/m² の UV に曝露した。4%ホルムアルデヒドによる固定と DAPI による染色後に、有糸分裂細胞を視覚化し、蛍光顕微鏡を用いて計数した。明瞭な凝集クロマチン及び/又は断片化核をもつ細胞がアポトーシス細胞であると決定した。

抗体及びプラスミド

マウス抗 Rad9 抗体(Alexis)、抗 Chk1 抗体、抗リン酸化 Chk1 抗体(Ser-317)及び抗 p53 抗体(BD Biosciences)、抗リン酸化 H2AX 抗体(Upstate Biotechnology)、及び抗リン酸化 p53(Ser-15)抗体(Cell Signaling Technology)を使用した。

本発明者らは、野生型 Rad9 プラスミド、及び、従来記載されたものと同じ以下の未標識 Rad9 突然変異体、すなわち、1) Rad9-S272A (先に同定された DNA 損傷誘導リン酸化部位である Ser-272 が Ala に変換された)、2) Rad9-9A (Ser-272, Ser-277, Ser-328, Ser-336, Ser-341, Ser-355, Ser-375, Ser-380 及び Ser-387 を含むすべてのリン酸化部位が、Ala 残基に変換された)、並びに、3) Rad-8A (Ser-272 を保持するがすべての残りのリン酸化部位がすべて Ala 残基に変換された)を用いた(P. Roos-Mattjus ら, (2003) J. Biol. Chem. 278, 24428-24437)。

FLAG で標識した hRad9 発現ベクターは、次の手法で作製した。FLAG で標識した

hRad9 発現ベクターを作製するために野生型、あるいはリン酸化欠損型 Rad9 プラスミドを Advantage Clontaq システム (Clontech) を用いて PCR をかけ増幅を行った。その際、5' -AAA AGC GGC CGC GCA TGA AGT GCC TGG TCA CGG G-3' (配列番号 33) および 5' -TTT TCT AGA TCA GCC TTC ACC CTC ACT GTC-3' (配列番号 34) のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いた。増幅した PCR 産物を 1%アガロースゲルで電気泳動し、ゲルを切り出しゲル精製キット (Qiagen) で精製した。精製した試料を制限酵素 NotI と XbaI で切断した後、pcDNA3.1-FLAG ベクターのクローニング部位に結合させ、FLAG で標識した hRad9 発現ベクターを作製した。

WWP-Luc-P21 プロモーターベクター (B. Vogelstein 博士から恵与された ; W. S. El-Deiry ら, (1993) Cell 75:817-825) を、ルシフェラーゼアッセイのために使用した。Hus1 及び Rad1 の発現プラスミド (S. L. Xiang ら, (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 287, 932-940) を、ルシフェラーゼアッセイのために使用した。pcDNA-p53 発現プラスミドは、J. Yokota 博士から恵与された (Y. B. Park ら, (2002) Cancer Genet. Cytogenet. 133, 105-111)。

Rad9 と p53 との結合領域に由来する Rad9 蛋白断片の発現ベクター作製法

野生型 Rad9 プラスミドを Advantage Clontaq システム (Clontech) を用いて PCR にかけ増幅を行った。その際、下記の (1) と (A) および (B) と (2)、(C) と (D)、(C) と (E)、(1) と (E) のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いた。

(1) 5' -AAAAGCGGCCGCGCATGAAGTGCCTGGTCACGGG-3' (配列番号 35)

(2) 5' -TTTTCTAGATCAGCCTTACCCTCACTGTC-3' (配列番号 36)

(A) 5' -TCCTCTCTAGAGCACATCTCAGTCACCTAGGC-3' (配列番号 37)

(B) 5' -CAGCACGCGGCCGCCCATGGTGACTGAGATGTGAC-3' (配列番号 38)

(C) 5' -AGGACCTGCGGCCGCGTAAGATCCTGATGAAGTC-3' (配列番号 39)

(D) 5' -TCCATTCTAGACATCTAAGAGTCAATGTCGTCATTGG-3' (配列番号 46)

(E) 5' -GAGTCTCTAGATGACTATGTGGCCAAGACAAAGTGG-3' (配列番号 40)

増幅した PCR 産物を 1%アガロースゲルで電気泳動し、ゲルを切り出しゲル精製キット (Qiagen) で精製した。精製した試料を制限酵素 NotI と XbaI で切断した後、上記 pcDNA3.1-FLAG ベクターのクローニング部位に結合させ、Rad9 蛋白断片発現ベクターを作製した。

増幅された PCR 産物 (Rad9 蛋白質欠失変異体をコードする DNA) は、下記の DNA 配列によってコードされている。

プライマー (1) と (A) からの PCR 産物 (配列番号 41 ; 変異型 (mt1) Rad9) :

ATGAAGTGCCTGGTCACGGGCGGCAACGTGAAGGTGCTCGGCAAGGCCGTCCACTCCCTGTCCCGCATCGGG
GACGAGCTCTACCTGGAACCTTGGAGGACGGGCTCTCCCTCCGGACGGTGAACCTCCCGCTCTGCCTAT
GCCTGCTTTCTCTTTGCCCCGCTCTTCTTCCAGCAATACCAGGACGCCACCCCTGGTCAAGGACCTGCTGCGC
TGTAAGATCCTGATGAAGTCTTTCTGTCTGTCTTCCGCTCACTGGCGATGCTGGAGAAGACGGTGGAAGAA
TGCTGCATCTCCCTGAATGGCCGGAGCAGCCGCCTGGTGGTCCAGCTGCATTGCAAGTTCGGGGTGCGGAAG
ACTCACAACCTGTCCTTCCAGGACTGTGAGTCCCTGCAGGCCGTCTTCGACCCAGCCTCGTGCCCCACATG
CTCCGCGCCCCAGCACGGGTTCTGGGGGAGGCTGTTCTGCCCTTCTCTCCTGCACTGGCTGAAGTGACGCTG
GGCATTGGCCGTGGCCGCAGGGTCATCCTGCGCAGCTACCACGAGGAGGAGGCAGACAGCACTGCCAAAGCC
C

プライマー (B) と (2) からの PCR 産物 (配列番号 42 ; 変異型 (mt2) Rad9) :

CCATGGTGACTGAGATGTGCCTTGGAGAGGAGGATTTCCAGCAGCTGCAGGCCAGGAAGGGGTGGCCATCA
CTTTCTGCCTCAAGGAATTCCGGGGGCTCCTGAGCTTTGCAGAGTCAGCAAACCTGAATCTTAGCATTCA
TTGATGCTCCAGGACAGGCCCGCCATCTTACCATCAAGGACTCTTTGCTGGACGGCCACTTTGTCTTGGCCA
CACTCTCAGACACCGACTCGCACTCCCAGGACCTGGGCTCCCCAGAGCGTCACCAGCCAGTGCCTCAGCTCC
AGGCTCACAGCACACCCACCCGGACGACTTTGCCAATGACGACATTGACTCTTACATGATCGCCATGGAAA
CCACTATAGGCAATGAGGGCTCGCGGGTGCTGCCCTCCATTTCCCTTTACCTGGCCCCCAGCCCCCAAGA
GCCCCGGTCCCCACTCCGAGGAGGAAGATGAGGCTGAGCCCAGTACAGTGCCTGGGACTCCCCACCCAAGA
AGTTCCGCTCACTGTTCTTCGGCTCCATCCTGGCCCCTGTACGCTCCCCCAGGGCCCCAGCCCTGTGCTGG
CGGAAGACAGTGAGGGTGAAGGCTGA

プライマー (C) と (D) からの PCR 産物 (配列番号 43 ; 変異型 (mt3) Rad9) :

GTAAGATCCTGATGAAGTCTTTCCTGTCTGTCTTCCGCTCACTGGCGATGCTGGAGAAGACGGTGGAAGAA
GCTGCATCTCCCTGAATGGCCGGAGCAGCCGCCTGGTGGTCCAGCTGCATTGCAAGTTCGGGGTGCGGAAGA
CTCACAACCTGTCCTTCCAGGACTGTGAGTCCCTGCAGGCCGTCTTCGACCCAGCCTCGTGCCCCACATGC
TCCGCGCCCCAGCACGGGTTCTGGGGGAGGCTGTTCTGCCCTTCTCTCCTGCACTGGCTGAAGTGACGCTGG
GCATTGGCCGTGGCCGCAGGGTCATCCTGCGCAGCTACCACGAGGAGGAGGCAGACAGCACTGCCAAAGCCA
TGGTGACTGAGATGTGCCTTGGAGAGGAGGATTTCCAGCAGCTGCAGGCCAGGAAGGGGTGGCCATCACTT

TCTGCCTCAAGGAATTCCGGGGGCTCCTGAGCTTTGCAGAGTCAGCAAACCTGAATCTTAGCATTTCATTTTG
 ATGCTCCAGGCAGGCCCGCCATCTTCACCATCAAGGACTCTTTGCTGGACGGCCACTTTGTCTTGGCCACAC
 TCTCAGACACCGACTCGCACTCCAGGACCTGGGCTCCCCAGAGCGTCACCAGCCAGTGCCTCAGCTCCAGG
 CTCACAGCACACCCACCCGACGACTTTGCCAATGACGACATTGACTCTTA

プライマー (C) と (E) からの PCR 産物 (配列番号 44; 変異型 (mt4) Rad9) :

GTAAGATCCTGATGAAGTCTTTCCTGTCTGTCTTCCGCTCACTGGCGATGCTGGAGAAGACGGTGGAATAAT
 GCTGCATCTCCCTGAATGGCCGGAGCAGCCGCCTGGTGGTCCAGCTGCATTGCAAGTTCGGGGTGCGGAAGA
 CTCACAACCTGTCCTTCCAGGACTGTGAGTCCCTGCAGGCCGTCTTCGACCCAGCCTCGTGCCCCACATGC
 TCCGCGCCCCAGCACGGGTCTGGGGGAGGCTGTTCTGCCCTTCTCTCCTGCACTGGCTGAAGTGACGCTGG
 GCATTGGCCGTGGCCGCAGGGTCATCCTGCGCAGCTACCACGAGGAGGAGGCAGACAGCACTGCCAAAGCCA
 TGGTGACTGAGATGTGCCTTGGAGAGGAGGATTTCCAGCAGCTGCAGGCCAGGAAGGGGTGGCCATCACTT
 TCTGCCTCAAGGAATTCCGGGGGCTCCTGAGCTTTGCAGAGTCAGCAAACCTGAATCTTAGCATTTCATTTTG
 ATGCTCCAGGCAGGCCCGCCATCTTCACCATCAAGGACTCTTTGCTGGACGGCCACTTTGTCTTGGCCACA

プライマー (I) と (E) からの PCR 産物 (配列番号 45; 変異型 (mt5) Rad9) :

ATGAAGTGCCTGGTCACGGGCGGCAACGTGAAGGTGCTCGGCAAGGCCGTCCACTCCCTGTCCCGCATCGGG
 GACGAGCTCTACCTGGAACCTTGGAGGACGGGCTCTCCCTCCGGACGGTGAATCCTCCCGCTCTGCCTAT
 GCCTGCTTTCTCTTTGCCCGCTCTTCTTCCAGCAATACCAGGCAGCCACCCCTGGTCAGGACCTGCTGCGC
 TGTAAGATCCTGATGAAGTCTTTCCTGTCTGTCTTCCGCTCACTGGCGATGCTGGAGAAGACGGTGGAATAA
 TGCTGCATCTCCCTGAATGGCCGGAGCAGCCGCCTGGTGGTCCAGCTGCATTGCAAGTTCGGGGTGCGGAAG
 ACTCACAACCTGTCCTTCCAGGACTGTGAGTCCCTGCAGGCCGTCTTCGACCCAGCCTCGTGCCCCACATG
 CTCCGCGCCCCAGCACGGGTCTGGGGGAGGCTGTTCTGCCCTTCTCTCCTGCACTGGCTGAAGTGACGCTG
 GGCATTGGCCGTGGCCGCAGGGTCATCCTGCGCAGCTACCACGAGGAGGAGGCAGACAGCACTGCCAAAG:C
 CATGGTGACTGAGATGTGCCTTGGAGAGGAGGATTTCCAGCAGCTGCAGGCCAGGAAGGGGTGGCCATCAC
 TTTCTGCCTCAAGGAATTCCGGGGGCTCCTGAGCTTTGCAGAGTCAGCAAACCTGAATCTTAGCATTTCATTT
 TGATGCTCCAGGCAGGCCCGCCATCTTCACCATCAAGGACTCTTTGCTGGACGGCCACTTTGTCTTGGCCAC
 A

トランスフェクション

プラスミドのトランスフェクションのために、293 細胞を、製造者の説明書 (Invitrogen) にしたがって LipofectAMINE2000 を用いてトランスフェクトした。

siRNA 導入のために、ヒト Rad9 及びヒト p53 に対する二本鎖 siRNA を Santa Cruz Biotechnology から購入した。293 細胞を、24 時間間隔で 2 回、TransIT-TK0 トランスフェクション試薬(Mirus)を用いて siRNA 構築物でトランスフェクトした。示されるように、2 回目の導入後、細胞サンプルを集めた。

RT-PCR

293 細胞を UV で処理した。ISOGEN プロトコル(Nippon Gene)を用いて RNA を抽出した。1ml の ISOGEN 中で細胞を濯ぎ、室温で 5 分間インキュベートしたのち、0.2ml のクロロホルムを添加した。懸濁液を 15 秒間攪拌し、2 分間保存し、遠心により 2 相に分離した。ついで、上の水相を 0.5ml のイソプロピルアルコールと混合し、室温で 10 分間インキュベートした。遠心により RNA をペレット化し、70% (v/v) エタノールで 1 回洗浄した。RNA をジエチルピロカーボネート処理水に再懸濁し、濃度を 320nm で測定した。RT のために、5 μ g の RNA を 1 μ L のオリゴ dT、1 μ L の各 10mM dNTP、及び 6 μ L のジエチルピロカーボネート処理水と一緒に合わせた。この混合物を 65°C、5 分間インキュベートし、2 μ L の 10 \times 逆転写酵素第 1 鎖バッファー、4 μ L の 25mM MgCl₂、2 μ L の 0.1M ジチオトレイトール、1 μ L のジエチルピロカーボネート処理水、1 μ L の RN アーゼ及び 0.2 μ L の Superscript II RT と一緒にした。RT 混合物を 48°C で 50 分間、ついで 70°C で 15 分間インキュベートした。得られた cDNA を PCR で増幅した。P21 を増幅するために使用したオリゴヌクレオチドは、335bp の増幅産物について 5'-ACCCTCTCATGCTCCAGGT-3' (上流; 配列番号 5) 及び 5'-CCTTGTTCCGCTGCTAATCA-3' (下流; 配列番号 6) (E. Zapata ら, (2005) FEBS J. 272, 1343-1353)を使用した。また、G3PDH を増幅するために、オリゴヌクレオチド 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (上流; 配列番号 7) 及び 5'-TCCACCACCCTGTTGGCTGTA-3' (下流; 配列番号 8) が 451bp の増幅産物のために使用された (A. Tanaka ら, (2001) J. Autoimmun. 17, 89-98)。P21 の PCR 条件は、94°C 1 分の初期変性、その後の、94°C 8 秒、53°C 30 秒及び 72°C 1 分を含んだ。37 サイクル後、PCR 産物は通常、電気泳動で検出可能であった。G3PDH については、PCR 条件は、94°C 1 分の初期変性、その後の、94°C 10 秒、60°C 15 秒及び 72°C 1 分を含んだ。28 サイクル後、PCR 産物は通常、電気泳動で検出可能であった。各 DNA に対応するバンドの強度は、デンシトメトリー分析(Quantity One, BIO-RAD)によ

って定量された。

蛋白質研究

ウエスタンブロッティングのために、293 細胞を溶解バッファー(20mM Tris-HCl、1% Triton X100、10% グリセロール及び 0.1mM PMSF)を用いて抽出した。透明な抽出物をドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE) サンプルバッファー中で煮沸し、SDS-PAGE で分離し、ポリビニリデンジフルオリド膜に転写し、標準法でイムノブロッティングを行い、増強化学ルミネッセンスシステム(ECL, Amersham Biosciences)でシグナルを検出した。各蛋白質に対応するバンドの強度は、デンストメトリー分析(Quantity One, BIO-RAD)によって定量した。免疫沈降のために、293 細胞を IP-溶解バッファー(25mM Tris-HCl、0.2% NP40、250mM NaCl 及び 1mM EDTA)を用いて回収し、プロテイン G-Sepharose ビーズを用いて予め透明にした後の細胞溶解物の 500 μ g サンプルを、3 μ g の特異抗体と一緒に一晩インキュベートした。抗原-抗体複合体をプロテイン G-Sepharose ビーズ上に固定化し、ビーズを溶解バッファー中で5回洗浄した。結合蛋白質を煮沸で溶離し、SDS-PAGE 及びイムノブロッティングに掛けた。

プロモーター研究

ルシフェラーゼプロモーターアッセイのために、トランスフェクトした細胞を完全成長培地中で24時間培養し、ルシフェラーゼアッセイのために回収し、入手可能なプロトコル(Promega)にしたがって実施した。ルシフェラーゼ活性は、Fluoroskan Ascent FL(Termo LabSystems Oy)ルミノメーター上で測定された。電気泳動移動シフトアッセイ(EMSA)のために、p53/Rad9 結合部位を含む相補的オリゴを商業的に合成した(Invitrogen)。これらのプローブの末端を[γ -³²P]ATP で T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いてラベルした。293 細胞の核蛋白質抽出物(10 μ g)を、 2×10^5 cpm のプローブと、30mM Tris-HCl(pH7.4)、0.6mM EDTA、30mM KCl、10mM DTT、12%グリセロール及び0.1 μ g の非特異的競合体ポリ(dI-dC)(Amersham Biosciences)を含有する結合バッファー中でインキュベートした。結合反応混合物を氷上に集めて、室温、30分間インキュベートした。DNA-蛋白質複合体を5%非変性ポリアクリルアミドゲル上で分離し、ゲルを真空中で乾燥し、オートラジオグラフィーのために使用した。スーパーシフト実験のために、抗体を、4°C、20

分間核抽出物と一緒に予めインキュベートした。競合結合反応のために、200ng の冷プローブをインキュベーション中に添加した。クロマチン免疫沈降(ChIP)アッセイのために、約 1×10^6 細胞を PBS 中に再懸濁し、1%ホルムアルデヒドで 37°C 10 分間固定し、200 μ l の SDS-溶解バッファー[50mM Tris-HCl (pH8.1)、10mM EDTA、及び 1%SDS]中に再懸濁し、氷上で 10 秒間パルスを用いて 3 回音波処理してクロマチンを 200~1,000bp の平均長に破壊した。音波処理した細胞懸濁液を 13,000rpm で 10 分間遠心分離し、各上清 20 μ L を、1 μ L の 5mol/L NaCl の添加後に 65°C 4 時間過熱し、これをインプットとして使用した。上清の残部を、1 μ g の抗 Rad9 抗体 (Upstate Biotechnology) 又は抗 p53 抗体 (BD Transduction Laboratories) のいずれかを含む 300 μ L のクロマチン免疫沈降希釈バッファー [167mM NaCl、16.7mM Tris-HCl (pH8.1)、1.2mM EDTA、0.01%SDS、及び 1.1%Triton X-100]に添加した。4°C 16 時間のインキュベーション後に、混合物を、12 μ g/ml のサケ精子 DNA の存在下で 1 時間 15 μ L のプロテイン A アガロースビーズと一緒に振とうした。免疫沈降物を 4 種の異なるバッファーで洗浄し、0.1M NaHCO₃ 及び 1%SDS で溶離した。溶出物を加熱処理し、プロテイナーゼ K で消化し、フェノール/クロロホルムで抽出し、エタノール沈殿し、最後に、20 μ L の TE (pH8) に再懸濁した。PCR には、2 μ L の最終懸濁液を用い、またヒト P21^{waf1} プロモーターの種々の領域に対応するプライマーを使用した。下流 P21^{waf1} プロモータープライマーは、5' -GAGGTCAGCTGCGTTAGAGG-3' (配列番号 9) 及び 5' -TGCAGAGGATGGATTGTTCA-3' (配列番号 10) であり (G. Koutsodontis と D. Kardassis, (2004) Oncogene 23, 9190-9200)、また、上流 P21^{waf1} プロモータープライマーは、5' -CCTATGCTGCCTGCTTCCCAGGAA-3' (配列番号 11) 及び 5' -TAGCCACCAGCCTCTTCTATGCCAG-3' (配列番号 12) である (G. Koutsodontis と D. Kardassis, (2004))。

<実施例 1> P21 は UV 処理直後に活性化される

数個の従来の研究から、P21 などの p53 下流遺伝子の発現増大に導く哺乳動物細胞において、遺伝子毒性ストレスが、野生型 p53 蛋白質の安定化及び一時的蓄積を誘導することが示された (A.J. Levine, (1997) Cell 88, 323-331; W.S. El-Deiry ら, (1993) Cell 75, 817-825)。RT-PCR を用いて、初めに、P21mRNA の

発現レベルを調べた。UV での処理後、UV 照射後の種々の時間に 293 細胞を回収した。全 RNA を抽出し、cDNA を、逆転写反応を用いて合成した。得られた cDNA を PCR によって増幅し、各 DNA に対応するバンドの強度をデンシトメトリー分析によって定量した。図 1A に示されたような結果が得られた。P21mRNA 発現のレベルは、UV 照射の 30 分後に実質的に増加し、1 時間目に最大レベルに達したことが観察された。mRNA レベルは低いものであったが、UV への曝露の 72 時間後まで依然として検出可能であった。各時点に等しい蛋白質を用いて、ウエスタンブロッティングを行い、p21 蛋白質の経時変化を調べた。図 1B に示されるように、p21 の実質的な蓄積が、UV への曝露の 3 時間、12 時間及び 24 時間後に認められた。

これらの結果から、P21 転写及び p21 蛋白質蓄積が起こり、G1/S チェックポイントが UV 照射後に活性化されて、UV 誘導 DNA 損傷から細胞が保護された。これらの結果に基づいて、以下の実験は、UV 照射後 10 分と 6 時間との間の時点で行われた。

<実施例 2> P21 活性化に対する hRad9 と p53 の競合

P21 プロモーター-ルシフェラーゼレポーター系を用いて、ヒト Rad9（以下、hRad9 という）による p21 の制御の機能的態様を評価した。野生型 Rad9 プラスミドのほかに、Rad9 リン酸化突然変異体を用いて、hRad9 のリン酸化が S 期又は G2/M チェックポイント活性化のために必要であるため (P. Roots-Mattjus ら, (2003) J. Biol. Chem. 278, 24428-24437)、このリン酸化が P21 の活性化のために必要であるかどうかを調べた。野生型又はリン酸化欠損型 Rad9 の発現を確認するために、ウエスタンブロッティングを行った。

野生型 Rad9 は、低移動蛋白質画分と一緒に十分検出可能に発現されており（図 2A、レーン 2）、このことは、Rad9 のリン酸化型を示している。Rad9-S272A もまた、類似の低移動蛋白質画分とともによく発現されたことから、この蛋白質はおそらく Rad9 の異なるリン酸化状態に対応し、S272 残基でのリン酸化を欠くものであるだろう（図 2A、レーン 3）。Rad9-8A 及び Rad9-9A のトランスフェクションの結果、野生型 Rad9 と比べてリン酸化が低いものであった（図 2A、レーン 2、4 及び 5）が、このことは、リン酸化欠損型突然変異体が過剰発現されることを示している。

その後、ルシフェラーゼに融合した P21 のプロモーター領域(WWP-Lu-P21 プロモーター)を、293 細胞中にプラスミドを用いて同時トランスフェクションした。インサート非含有の発現ベクターがプロモーター非含有の pGL3-basic と結合する際には、バックグラウンドレベルは低い(図 2B、カラム 1)。P21 プロモーターは、転写開始部位から 5' 側約 2kb 上流領域内に少なくとも 2 つの p53 結合コンセンサス配列を含むため(W.S. EL-Deiry ら, (1995) Cancer Res. 55, 2910-2919)、p53 の過剰発現は、予想通り、ルシフェラーゼ活性を誘導した(図 2B、カラム 9)。野生型 Rad9 の過剰発現もまた、p53 ほどは強くはないが、ルシフェラーゼ活性を誘導した(図 2B、カラム 5)。p53 と野生型 Rad9 の共発現により、高レベルのルシフェラーゼ活性が誘導された(図 2B、カラム 10)が、そのレベルは、それぞれの蛋白質が過剰産生されるときに観察されたレベルの間であった。Rad9 から P21 プロモーターへの活性伝達特性は報告されている(Y. Yin ら, (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 8864-8869)が、本実験は、hRad9 が P21 の顕著な転写活性を発揮させないようであることを示した。

各リン酸化欠損型プラスミドを用いて測定されたルシフェラーゼ活性は、野生型 Rad9 を用いたときの活性に匹敵した(図 2B、カラム 5~8)。これに対して、p53 とともに共発現されたときには、リン酸化欠損型 Rad9 突然変異体を用いたときの活性は、野生型 Rad9 とともに共発現したときよりも低かった(図 2B、カラム 10~13)。このことから、hRad9 は、p53 依存性 P21 活性化に関与していることが示された。

さらに、hRad9 とは対照的に、hHus1 及び hRad1 は p53 のような強い活性を示し、これは、チェックポイント活性化における Hus1 及び Rad1 の役割(M. A. Burtelow ら, (2001) J. Biol. Chem. 276, 25903-25909; V. P. Bermudez ら, 2003 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 1633-1638)と適合し、並びに、それらが P21 の転写の活性化に間接的又は直接的な役割を果たす可能性を示唆している。

<実施例 3> 内因性 hRad9 のノックダウンが P21 の転写を増大する

紫外線(UV)への曝露に応答して P21 を転写する hRad9 の役割を定めるために、siRNA を用いて内因性 hRad9 をノックダウンした。ウエスタンブロットによる各内因性 p53 又は Rad9 蛋白質のノックダウンの確認後(図 3A)、細胞を siRNA で処

理し、20J/m² UV に曝露し、全 RNA を抽出した。RT-PCR を用いて、P21 mRNA のレベルを測定した。図 3B に示されるように、Rad9 siRNA (Santa Cruz 社 ; 製品 No. sc-36364) のトランスフェクションにより、P21 mRNA のレベルが増加した(カラム 3)が、p53 siRNA (Santa Cruz 社 ; 製品 No. cs-29435) によるトランスフェクションでは、モック処理と同程度のレベルの P21 mRNA を示した(カラム 2)。UV 処理後、モック処理細胞は、UV (-) 対照と比較して P21 mRNA の増加を示し(カラム 4)、また、p53 siRNA によるトランスフェクションの結果、P21 mRNA の明らかな低下が生じた(カラム 5)。p53 siRNA のノックダウンと対照的に、Rad9 siRNA ノックダウンにより、UV 曝露後、P21 mRNA の増加が生じた(カラム 6)。このレベルは UV (-) 実験と類似したレベルであり、このことから、Rad9 が UV 誘導 P21 応答の基本プラットフォームの付与に参与している可能性が示唆される。

上記の結果から、hRad9 のノックダウンにより P21 のトランスアクチベーションが生じることが示され、また、hRad9 が UV 照射によって誘導された DNA 損傷に応答して、P21 の p53 依存性トランスアクチベーションのモジュレーションにある役割を演じている可能性が示唆され、さらにまた、hRad9 が、ルシフェラーゼアッセイによって示されるように、P21 プロモーターの p53 結合コンセンサスを介して p53 依存性 p21 活性化との機能的連関に参与していることが示唆された。

<実施例 4> p53 と Rad9 との結合

上記の実験から得られたデータから、hRad9 は p53 依存性 P21 プロモーターの活性化を抑制すること、hRad9 のノックダウンにより p53 依存性 P21 プロモーターの活性化が刺激されることが示された。したがって、内因性 hRad9 が内因性 p53 とどのように関係しているかを調べた。

免疫沈降を行い、hRad9 が p53 と相互作用するかどうかを確認した。簡単に説明すると、293 細胞を回収し、細胞溶解物を抗 Rad9 抗体又は抗 p53 抗体と一晚インキュベートした。抗原-抗体複合体をプロテイン G セファロースビーズに固定化し、結合した蛋白質を煮沸により溶離し、SDS-PAGE 及びウエスタンブロッティングに掛けた。図 4A に示されるように、hRad9 は p53 と共に免疫沈降した。Rad9 のリン酸化が p53 との結合に影響するかを調べるために、野生型又はリン酸化欠損型 Rad9 プラスミドを 293 細胞にトランスフェクトし、免疫沈降を行った。

その結果、Rad9 が p53 と結合すること、そして、この結合は野生型である又はリン酸化欠損型突然変異体 (Rad9-S272A、Rad9-8A 及び Rad9-9A) であるに関わらないことが判明した (図 4B)。hRad9 と p53 との結合が UV 照射後一時的に変化するかどうかを確かめるために、経時変化を調べた。

図 4C に示されるように、Ser-15 での p53 のリン酸化は UV 照射後に増加したが、hRad9 との相互作用はほとんど変化がなかった。さらに、p53 の他のリン酸化部位 (Ser-6、Ser-9、Ser-20、Ser-37、Ser-46、Ser-392) も調べたが、いずれも hRad9 と p53 との相互作用に無関係であった。

上記の結果から、hRad9 と p53 との結合は、hRad9 及び p53 の各々のリン酸化に影響を及ぼさないが、これらの蛋白質の結合表面のアミノ酸残基がリン酸化事象に関与する可能性は否定できないことが示された。

<実施例 5> hRad9 のリン酸化は p53 の DNA 結合親和性に影響する

UV 処理後の P21 プロモーターの p53 コンセンサス結合部位に対する hRad9/p53 の親和性の変化を調べた。従来報告されたように、hRad9 は、P21 プロモーター中の p53 コンセンサス DNA 結合配列に特異的に結合し、転写レベルの P21 を調節する (Y. Yin ら, (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 15, 8864-8869)。本実験では、EMSA を実施し、hRad9 の p53 コンセンサス特異的結合を確認した。また、UV 処理後のプロモーター結合の変化を評価するために EMSA を行った。

そのために、従来報告されたような p53 結合配列を含むオリゴプローブを使用した (Y. Yin ら, (2004))。これらのプローブの末端を、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ でラベルした。293 細胞から抽出した核蛋白質を、結合バッファー中で、オリゴプローブとインキュベートした。ポリアクリルアミドゲル上で DNA-蛋白質複合体を分離し、ゲルをフィルムに露出した。スーパーシフト実験のために、抗体を核抽出物とブレインキュベートした。また、競合結合反応のために、インキュベーションの間に冷プローブを添加した。

図 5A に示されるように、その結果から、下流 p53 コンセンサス DNA 結合配列を含む 30bp オリゴと、293 細胞からの核抽出物とのインキュベーションによりバンドのシフトが生じたことがわかる (レーン 2)。このバンドは明らかに UV 照射後に増加した (レーン 6)。このバンドは、競合体として過剰の冷 30bp オリゴを添加

したときには排除されたことから、特異的な蛋白質-プローブ相互作用が存在することを示している（レーン 3）。また、P21 プロモーターのバンドは、抗 Rad9 抗体の添加により消失したことから、hRad9 が P21 プロモーターの p53 コンセンサス結合部位に結合することが示された（レーン 5 及び 8）。抗 Rad9 抗体の添加と対照的に、抗 p53 抗体の添加は、本実験では上記バンドの消失又はスーパーシフトがほとんどないことを示した（レーン 4 及び 7）。これらの結果は、本実験では抗 p53 抗体の特異性によるものであり、従来の研究(Y. Yin ら, (2004))で観察されたスーパーシフトとは対照的である、と推定される。

上記の結果から、hRad9 は、P21 プロモーターの p53 コンセンサス結合部位に結合すること、この結合は UV 照射に対して増加することが証明された。

p53 結合部位に対する hRad9/p53 複合体の親和性が UV 照射後に増大するかどうか、また、hRad9 のリン酸化が結合部位に対する親和性に影響を与えるかどうか、を評価するために ChIP アッセイを行った。293 細胞を野生型又はリン酸化欠損型 Rad9 プラスミドで形質転換し、UV 照射で処理するか又は未処理とした。処理後、細胞を 1 %ホルムアルデヒドで架橋し、音波処理してクロマチンを平均長 200～1,000bp に破壊した。音波処理された細胞懸濁液を、抗 Rad9 抗体又は抗 p53 抗体を含むクロマチン免疫沈降希釈バッファーに添加した。16 時間インキュベーションしたのち、混合物をプロテイン A アガロースと一緒に振とうした。免疫沈降物を溶出し、溶出物から DNA を抽出した。ヒト P21^{waf1} プロモーターの種々の領域に相当するプライマーを用いる PCR で上記 DNA を増幅した。

図 5B 及び図 5C に示されるように、上記の結果から、hRad9 と p53 は UV 処理後に増加様式で下流部位に結合すること、ただし、結合部位に対する親和性の低い Rad9-9A プラスミドでトランスフェクトされた細胞を除く全ての場合に上記結合が認められた。Rad9 の結合は、p53 の結合よりもかなり小さいように思われたが、これは、Rad9 抗体の特性の結果であると認められる。上流部位で hRad9 (図 5D) 及び p53 (図 5E) で類似の結果が得られた。これらの結果から、hRad9 のリン酸化はコンセンサス部位に対する p53 親和性の調節にある役割を演じていることが示された。

<実施例 6> hRad9 のリン酸化は DNA 損傷後のフォーカス形成に必要である

従来の研究から、DNA 損傷が生じると 9-1-1 複合体が DNA 損傷フォーカスを形成することが示されている (V. P. Bermudez ら, (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 1633-1638; M. A. Burtelow ら, (2000) J. Biol. Chem. 275, 26343-26348; I. Hirai と H. G. Wang, (2002) Biol. Chem. 277, 25722-25727)。Rad9 のリン酸化が DNA 損傷部位のフォーカス形成に影響するかを調べるために、免疫組織化学を行った。カバースリップ上で成長させた 293 細胞を 4% パラホルムアルデヒド中に固定した。FCS 中でサンプルをブロックし、抗 γ H2AX 抗体又は抗 Rad9 抗体とともに一晩インキュベートし、抗マウス Alexa488 第 2 抗体及び抗ウサギ Cy3 第 2 抗体と一緒にインキュベートした。つぎに、細胞を DAPI で染色した (図 6A)。

図 6B に示されるように、その結果から、UV 曝露の 1 時間後に、モック処理した、又は野生型 Rad9 プラスミドもしくは Rad9-S272A プラスミドをトランスフェクトした、293 細胞がそれぞれ 80%、86% 及び 80% の割合でフォーカス形成したことが示された。一方、Rad9-8A プラスミド及び Rad9-9A プラスミドをトランスフェクトした細胞は、それぞれ 34% 及び 32% でフォーカス形成した。これらの結果から、Rad9 のリン酸化は、UV 処理で DNA が損傷を受けたのち、フォーカス形成に必要であることが示された。これらのデータは、P21 転写の調節が、hRad9 のリン酸化欠損型突然変異体を使用した実験での hRad9 のフォーカス形成に類似していることを示唆した。P21 は G1/S チェックポイントに関与するが、従来の報告から、hRad9 のリン酸化が HU、IR 及び UV 処理後に S から G2 のチェックポイントにおける Chk1 活性化のために必須であることが報告されている (P. Roos-Mattjus ら, (2003) J. Biol. Chem. 278, 24428-24437)、また、Chk1 が、Ser/Thr-Gln に富むドメインに位置する 2 つの残基 (Ser-317 及び Ser-345) でリン酸化されることが報告されている (J. Bartek ら, (2004) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5, 792-804)。本実験では、UV 照射後のアポトーシス誘導の全経時変化を評価するために、Ser-317 での Chk1 のリン酸化の経時変化をウエスタンブロッティングで調べた。アポトーシスの誘導は、細胞を UV に曝露し 4% ホルムアルデヒドで固定したのち、293 細胞を使用し、かつ DAPI での蛍光染色を用いて評価した。明瞭に凝集したクロマチン及び/又は断片化した核を含む細胞がアポトーシス細胞であると決定した。

図 6C に示されるように、その結果から、Ser-317 での Chk1 のリン酸化の増大が UV 照射の 12 時間以上あとに明瞭であったことが示された。その後、UV で細胞を処理すると、アポトーシスが誘導され、UV 照射の 36 時間後に、細胞の約 21% がアポトーシスによって死滅したが、対比的に UV 未照射の細胞では 2% であった。これらの結果から、p53 のリン酸化、P21 mRNA 及び p21 蛋白質の増加が、DNA 損傷の 1~3 時間後に認められ、UV 照射の 36 時間後に明らかにアポトーシスが増大したが、これは Chk1 がリン酸化された直後であった。このことから、G1/S チェックポイントから放出された損傷細胞は、S から G2 のチェックポイントによって生存可能であり、アポトーシスの誘導を誘発し、Rad9 は G1/S でのみ、しかし S 又は G2 で、チェックポイントの広範な機能を発揮する可能性があることを示唆した。

<実施例 7> Rad9 と p53 との結合領域に由来する Rad9 蛋白断片の発現ベクターの作製

上記 Rad9 と p53 との結合領域に由来する Rad9 蛋白断片の発現ベクター作製法の項に従って、Rad9 蛋白質断片である変異型 (mt1、mt2、mt3、mt4 及び mt5) Rad9 (それぞれ配列番号 41~45 の塩基配列を有する) 発現プラスミド (レポーター遺伝子 FLAG を含む) を作製し、その発現を、変異型 (mt1~mt5) Rad9 の各々を MRC5 細胞 (ATCC CCL-171) に導入しウエスタンブロット (抗 FLAG 抗体 (SIGMA) を使用) によって確認した (図 7B)。

<実施例 8> 変異型 Rad9 が Rad9-p53 結合及び p21 発現に及ぼす影響

培養 MRC5 細胞 (10% FBS を含有する DMEM で培養) に野生型 (WT) と変異型 (mt2) Rad9 プラスミドを導入し、免疫沈降法 (抗 FLAG 抗体 (SIGMA) と抗 p53 抗体 (BD Biosciences) を使用) で p53 と Rad9 の結合を調べた。変異型 (mt2) Rad9 を導入後はコントロール (mock) に比較して p53 と内因性 Rad9 (矢印) の結合が減少した (図 8A)。

培養 MRC5 細胞に野生型 (WT)、変異型 (mt1~5) Rad9 プラスミドの各々を導入し、ウエスタンブロットで p21 遺伝子の発現を調べた。その結果、変異型 (mt2) Rad9 プラスミドを導入した場合、p21 の発現が亢進した (図 8B)。

上の結果から、変異型 (mt2) Rad9 プラスミドの導入により、p53 と内因性 Rad9

(矢印)の結合が減少するとともに p21 の発現が亢進し、造腫瘍性が減少 (2 次発癌が減少) することが示された。

<実施例 9> 癌細胞への変異型 Rad9 プラスミド導入時のアポトーシスの変化

頭頸部扁平上皮癌細胞株 MMSI-1 (10%FBS を含有する DMEM で培養) に野生型 (WT)、変異型 (mt2) Rad9 プラスミドの各々を導入し、免疫蛍光染色でプラスミドの発現を確認し、DAPI による染色でアポトーシスを検討した。その結果、コントロール(mock)に比較して特に変異型 (mt2) Rad9 プラスミドを導入した場合、アポトーシスが有意に亢進した (1.6%と 4.3%) (図 9A)。

一方、子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞 (10%FBS を含有する DMEM で培養) を用いて上記と同様の実験を行った。その結果、MMSI-1 と同様、変異型 (mt2) Rad9 プラスミドを導入するとアポトーシスが有意に亢進した (4.0%と 11.6%) (図 9B)。

上の結果から、癌細胞に変異型 (mt2) Rad9 プラスミドを導入するとき、アポトーシスが亢進し、癌細胞増殖に抑制的に働くことが示された。

<実施例 10> 癌細胞への Rad9 siRNA 導入時のアポトーシスの変化

頭頸部扁平上皮癌細胞株 MMSI-1 及び子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞に Rad9 siRNA (配列番号 18) を Lipofectamine 2000 (Invitrogen) によって導入し、DAPI による染色でアポトーシスを検討した。その結果、コントロール (モック) と比較していずれも Rad9 siRNA を導入するとアポトーシスが有意に亢進した (MMSI-1 で 2.8%と 7.8%、HeLa で 3.0%と 12.0%) (図 10)。

上の結果から、癌細胞に Rad9 siRNA を導入するとアポトーシスが亢進し、癌細胞増殖に抑制的に働くことが示された。

<実施例 11> 抗癌剤による p53-Rad9 結合の変化

培養 MRC5 細胞に、エトポシド (VP16)、カンプトテシン (CPT)、シスプラチン (CDDP)、ドキソルビシン (DOX) を投与し、4 時間後に回収、免疫沈降で内因性の p53-Rad9 結合を検討した (MRC 5 の内因性の蛋白結合を検討しました)。その結果、エトポシド、カンプトテシン、シスプラチンでは両者の結合が亢進する一方、ドキソルビシンでは両者の結合が減少した (図 11)。

したがって、ドキソルビシンにより両者の結合は減少し、結合変化による薬剤効果が期待できると考えられる。

<実施例 12> 抗 Rad9 抗体による p53-Rad9 結合の変化

[³⁵S]で標識した p53 蛋白質 ([³⁵S]p53) と GST タグを結合させた Rad9 蛋白質 (GST-Rad9) を NETN 緩衝液中で試験管内で反応させた。その結果、[³⁵S]p53 と Rad9 の結合していない GST 蛋白単独を発現させた場合は両者の結合は認められない (レーン 1) が、[³⁵S]p53 と GST-Rad9 を反応させると両者の結合が確認された (レーン 2) (図 12)。一方、GST-Rad9 を抗 Rad9 抗体で反応させた後に [³⁵S]p53 と反応させると、GST-Rad9 と [³⁵S]p53 の結合は減少した (レーン 3)。

したがって抗 Rad9 抗体を投与することにより Rad9-p53 結合は減少し、中和抗体により両者の結合制御が可能になると考えられる。

産業上の利用可能性

本発明により、Rad9 と p53 との結合の制御を通して、p53 の生物機能を制御し、これによって、例えば癌の増殖や転移の抑制が可能になる。また、このような結合を制御する、癌治療薬としての生物活性薬剤のスクリーニングも可能になる。

本発明により、Rad9 と p53 との結合の制御を通して、p53 の生物機能を制御し、これによって、例えば癌の増殖や転移の抑制が可能になる。また、このような結合を制御する、癌治療薬としての生物活性薬剤のスクリーニングも可能になる。癌のタイプの 60%以上と関わりをもつ p53 の活性を制御することが可能な薬剤は、癌治療に有用である。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

1. 試験系において、癌遺伝子産物 Rad9 と癌抑制遺伝子産物 p53 との存在下で薬剤候補を添加すること、Rad9 と p53 との結合を制御することができる生物活性薬剤を選抜することを含む、癌治療薬をスクリーニングするための方法。

2. 前記薬剤候補が、小分子、核酸、ペプチド、蛋白質、糖類及び脂質からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

3. 前記系が、真核及び原核生物由来の細胞を含む、請求項 1 に記載の方法。

4. 前記制御が、抑制又は亢進のいずれかである、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

5. 前記薬剤候補が、Rad9 と p53 との結合領域を中和する抗体である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

6. 前記薬剤候補が、Rad9 と p53 との結合領域に由来する 5 以上のアミノ酸残基を有する Rad9 蛋白質断片又はその変異体である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

7. 前記薬剤候補が、Rad9 遺伝子の転写及び発現を抑制するアンチセンス核酸、RNAi 核酸、又はその核酸を含むベクターDNA である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

8. Rad9 蛋白質の生物機能又は Rad9 遺伝子の発現を制御し、これによって Rad9 と p53 との結合を増強又は抑制して p53 の活性を抑制又は増強することができる、かつ Rad9 遺伝子、その転写産物又は翻訳産物と相互作用する生物活性薬剤を含む、癌を治療するための医薬組成物。

9. 前記薬剤が、Rad9 に対する抗体又は抗体フラグメントである、請求項 8 に記載の医薬組成物。

10. 前記薬剤が、Rad9 遺伝子の転写及び発現を抑制するアンチセンス核酸又は該核酸を含むベクターDNA である、請求項 8 に記載の医薬組成物。

11. 前記薬剤が、Rad9 遺伝子の転写及び発現を抑制する RNAi 核酸又は該核酸を含むベクターDNA である、請求項 8 に記載の医薬組成物。

12. 前記薬剤が、Rad9 と p53 との結合領域に由来する 5 以上のアミノ酸残

基を有する Rad9 蛋白質断片又はその変異体である、請求項 8 に記載の医薬組成物。

13. 前記薬剤が、リポソームに封入されている、請求項 8 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

図 1

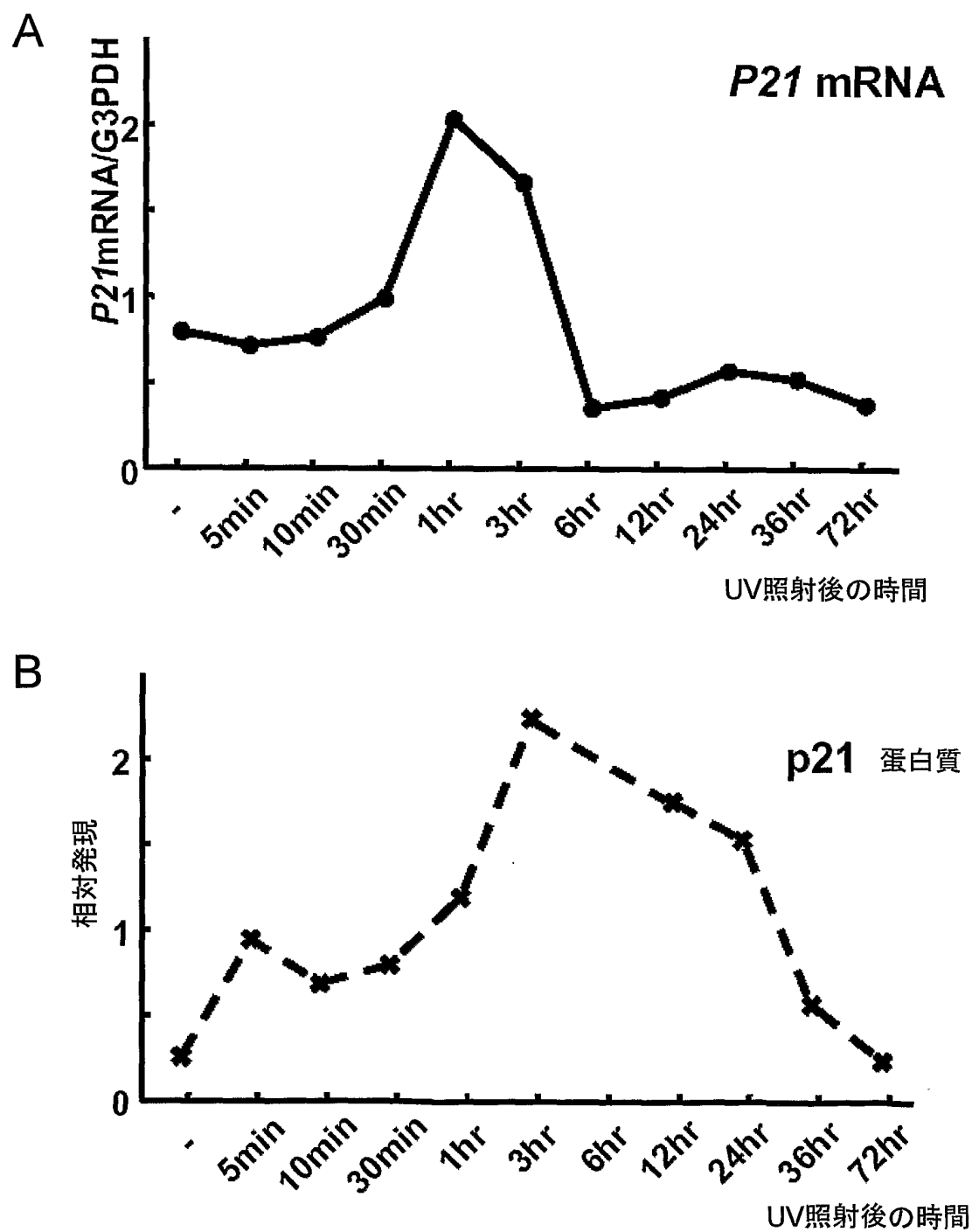
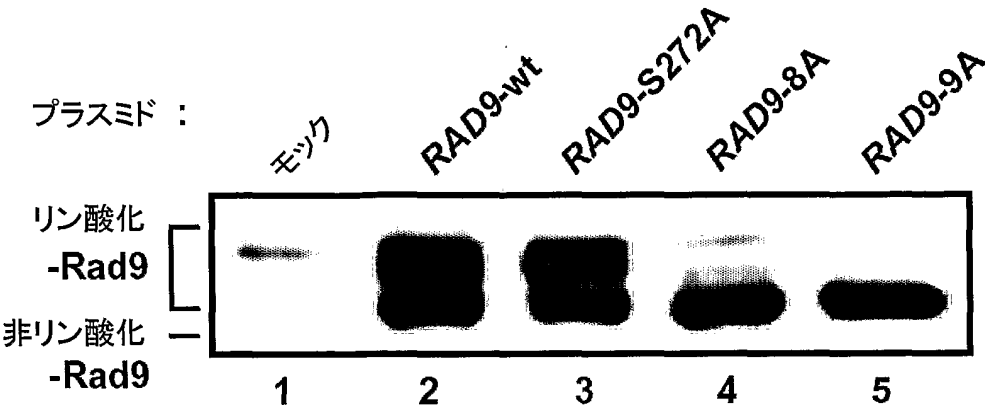


図 2

A



B

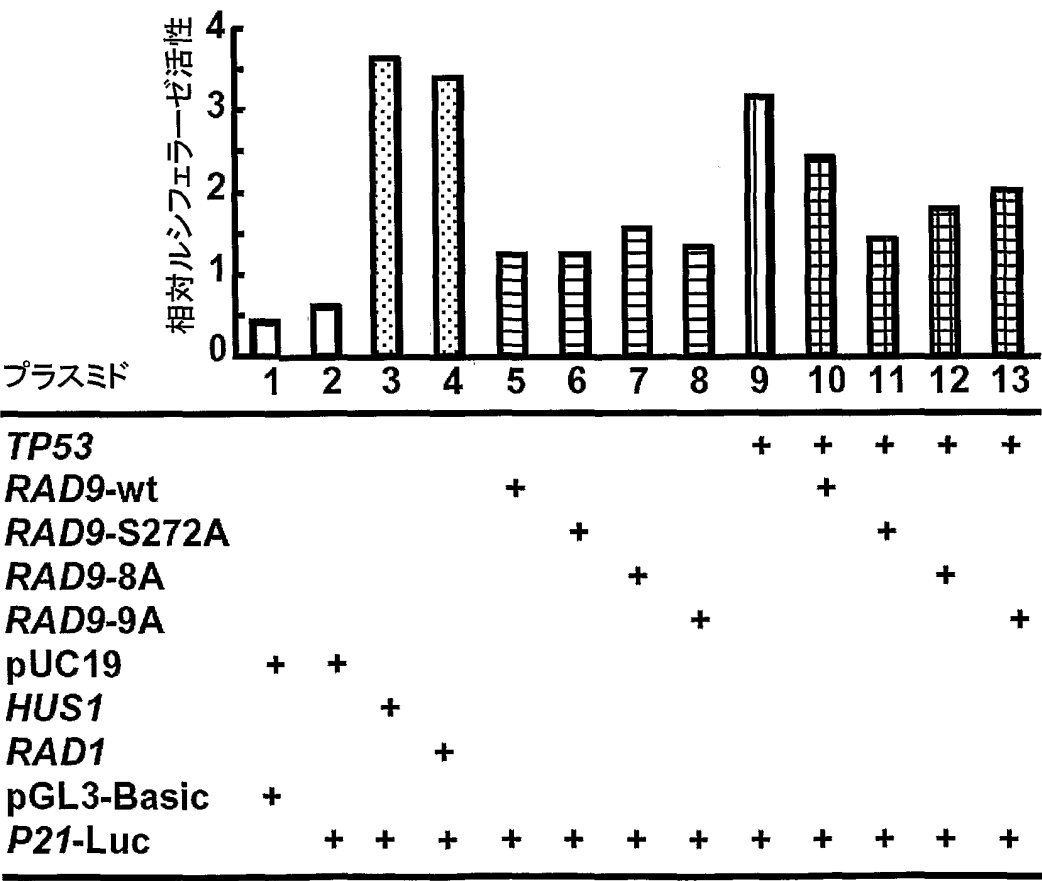


図 4

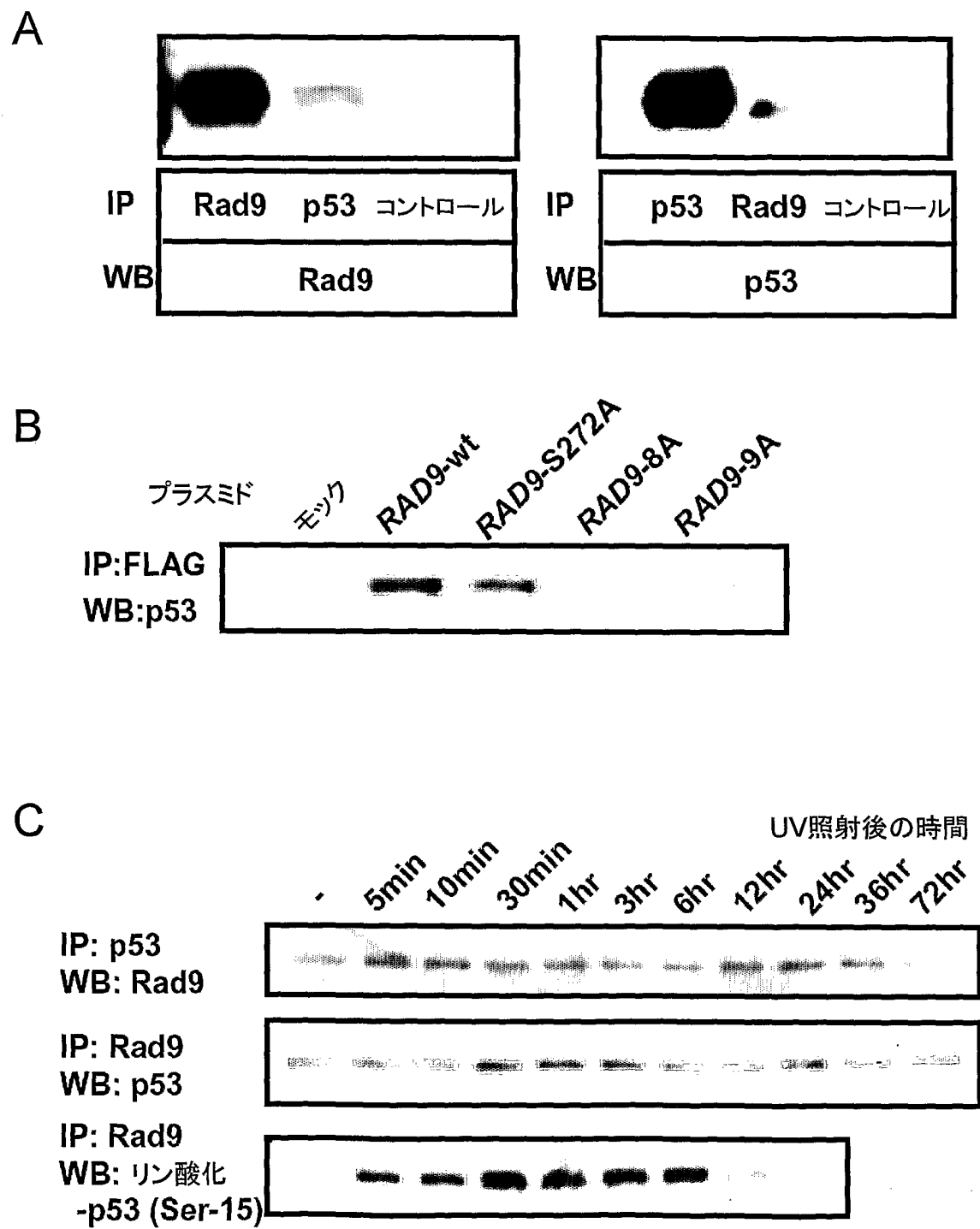


図 6

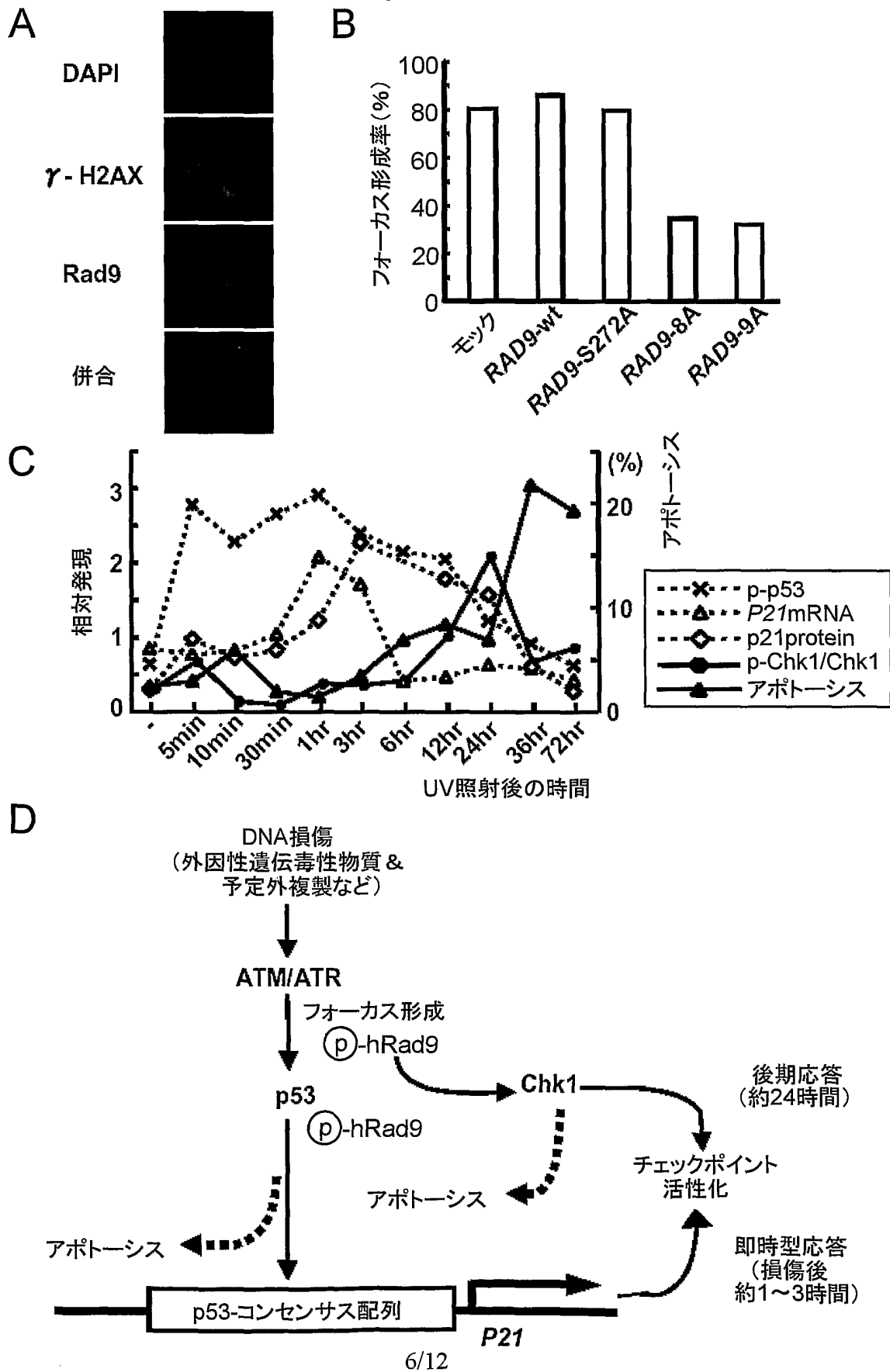
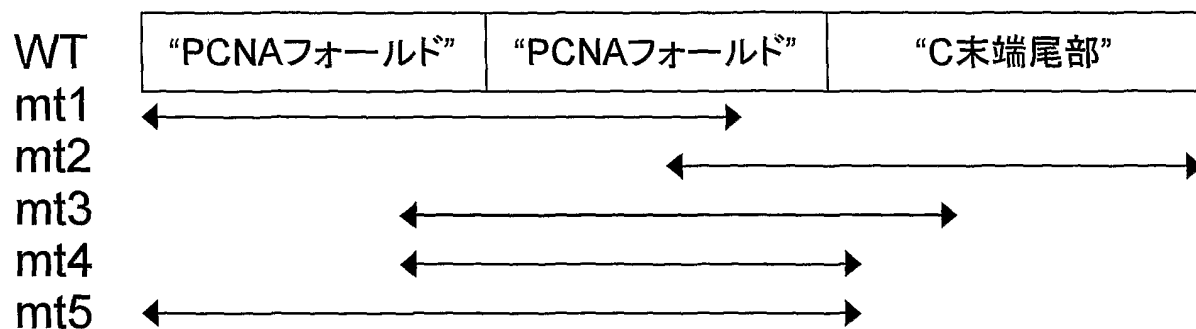


図 7

A

Rad9



B

Rad9

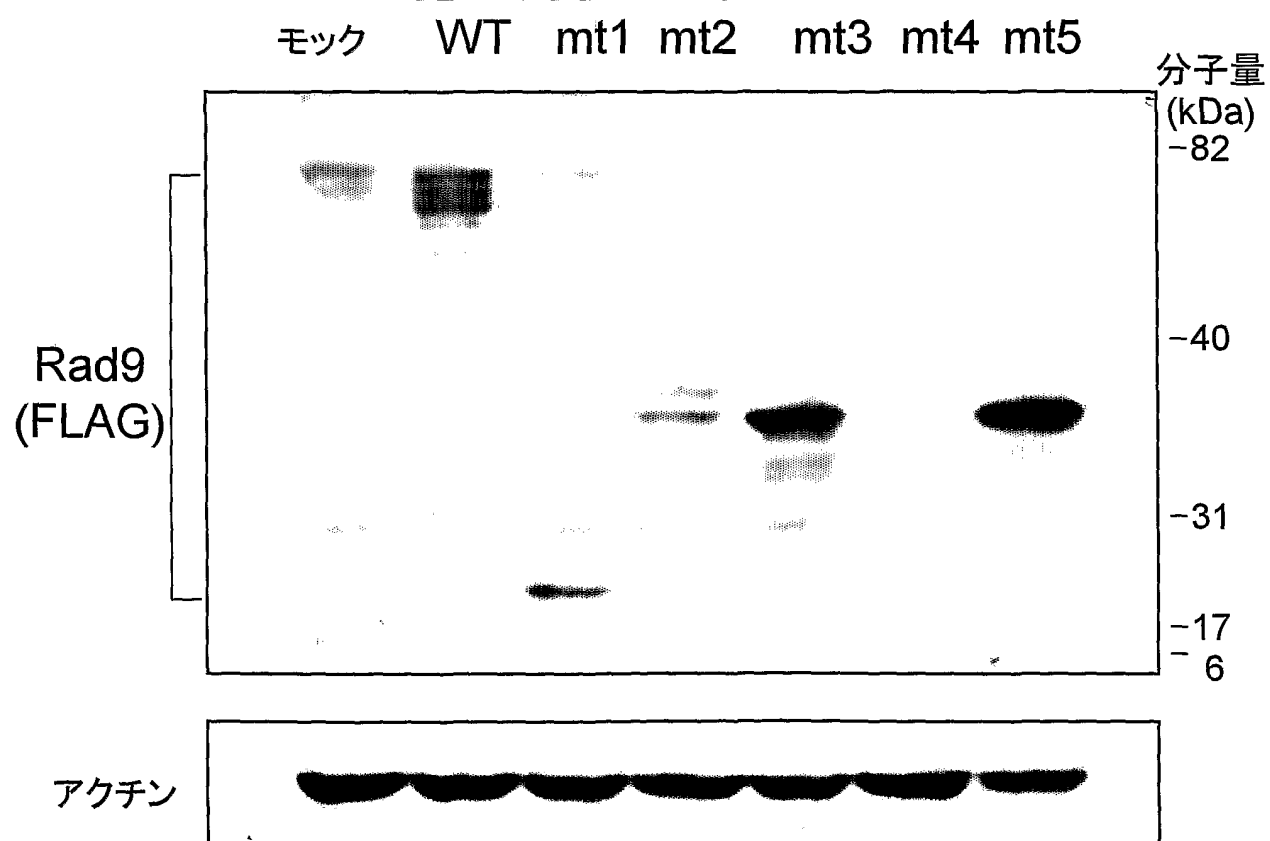


図 8

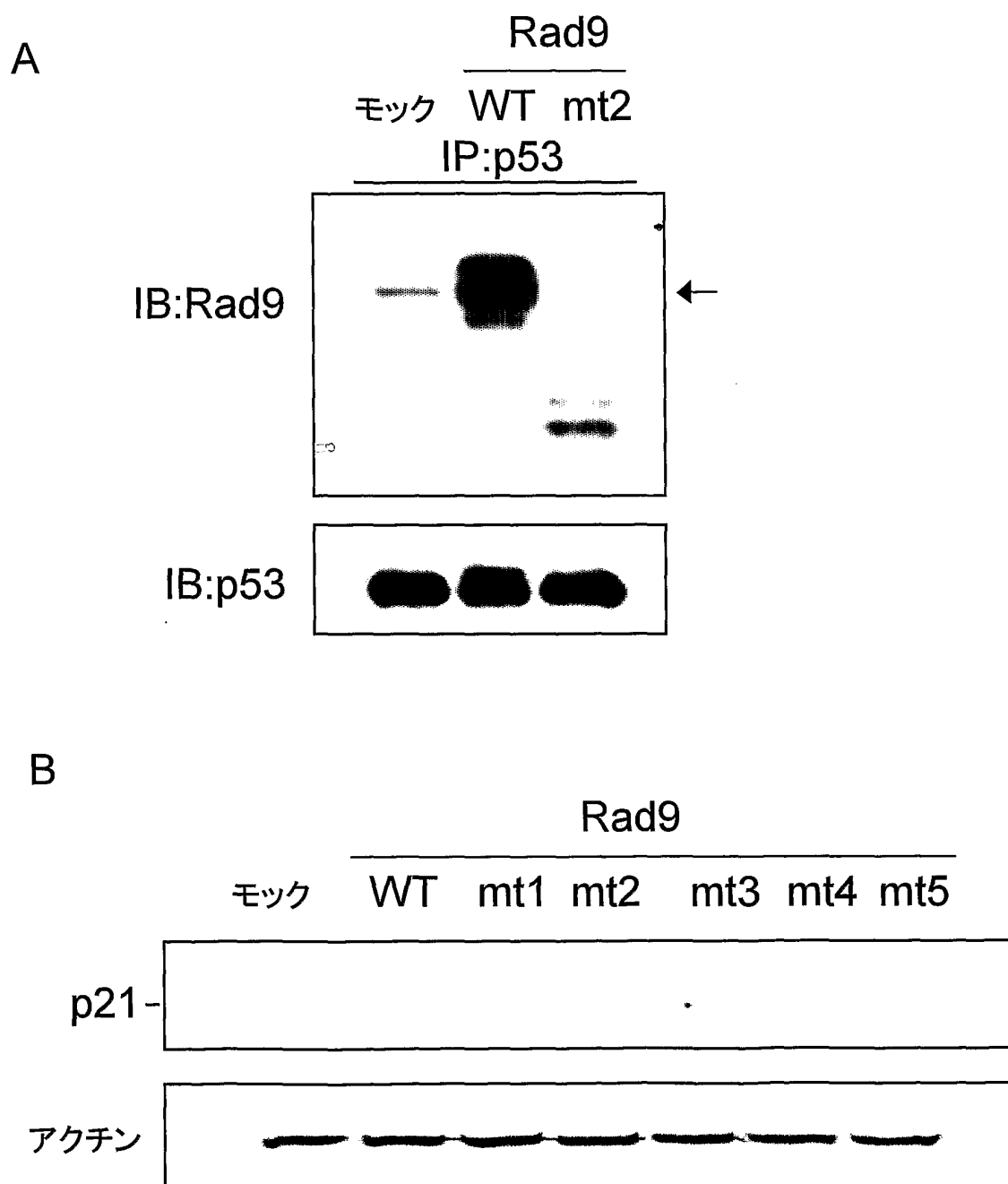
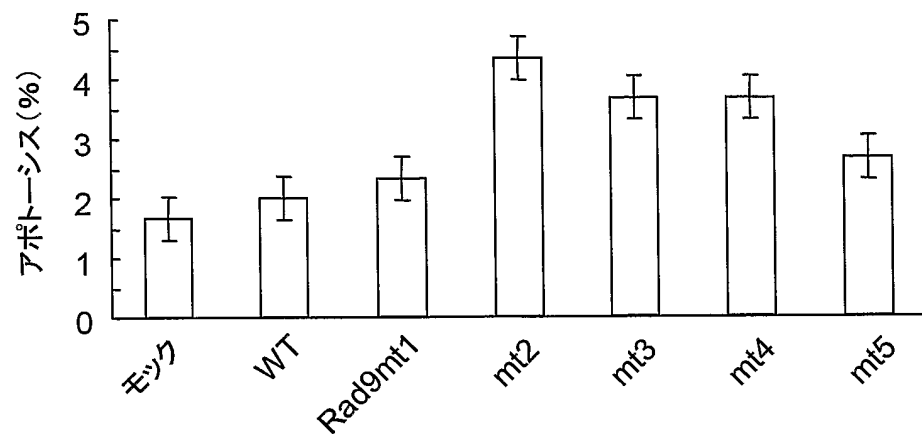


図 9

A

MMSI-1



B

Hela

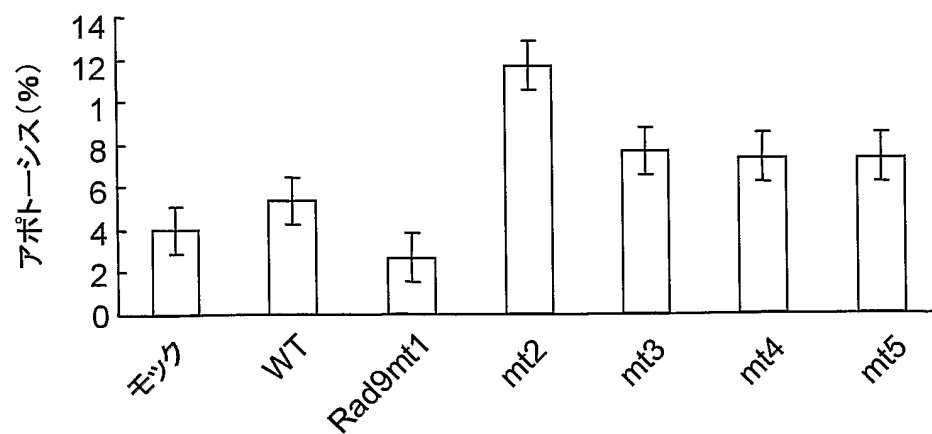


図 10

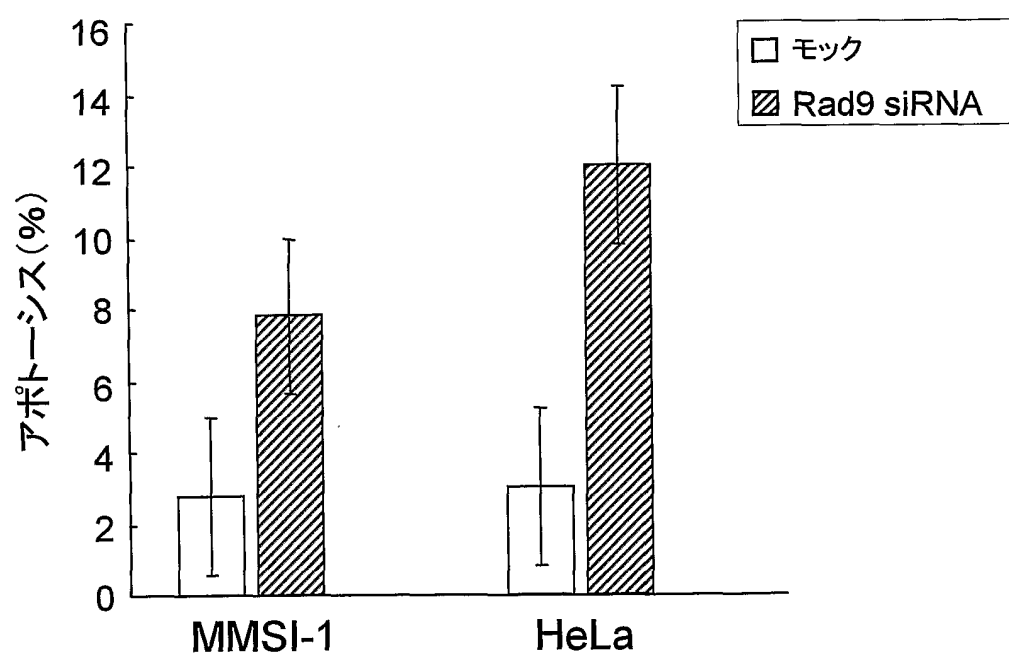


図 1 1

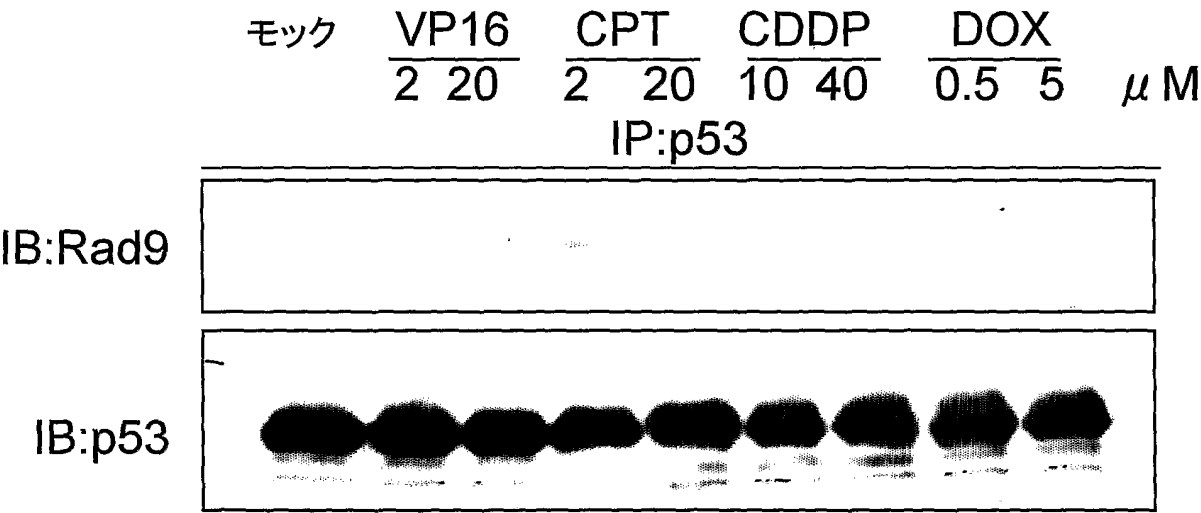
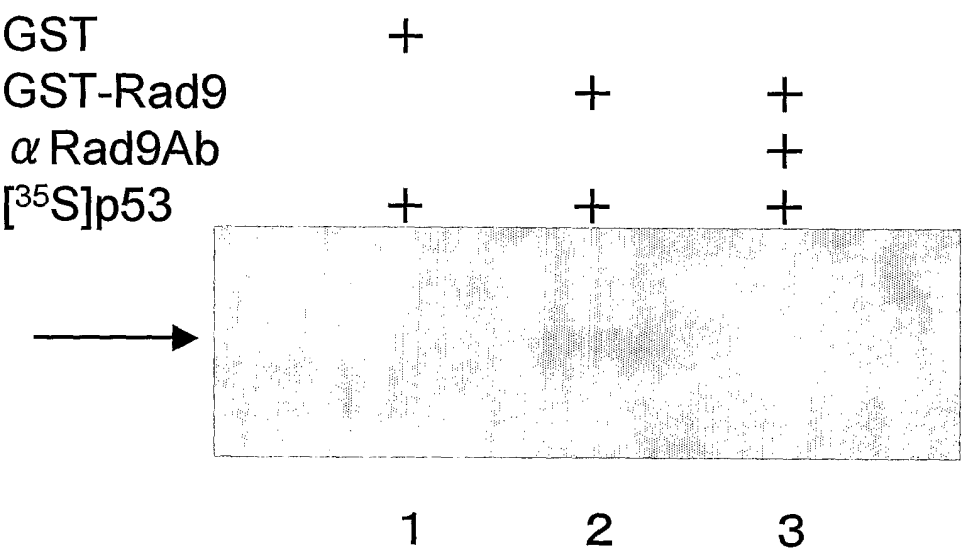


図 1 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/062362

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N15/09(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i</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) <i>C12N15/09, A61K31/7088, A61K38/00, A61K39/395, A61K45/00, A61K48/00, A61P35/00, G01N33/15</i> Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <i>JMEDPlus/JST7580/JSTPlus (JDream2), CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)</i>		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Kazuhiro ISHIKAWA et al., "p53 o Kaisuru P21 Hatsugen Seigyo ni Okeru Rad9 no Yakuwari to Shuyo Zoshoku eno Kan'yo", Japanese Journal of Head and Neck Cancer, 32(2), 15 May, 2006 (15.05.06), page 159	1-13
Y	MOCHAN Tamara A. et al., 53BP1, an activator of ATM in response to DNA damage, DNA Repair, 3(8/9), 2004, pp.945-952	1-13
X	ISHIKAWA Kazuhiro et al., A role of Rad9 in regulation of p53-dependent p21waf1 activation after exposure to UV light, Seikagaku, 2006, Shoroku CD pageA10724(3P-A-269)	11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 September, 2007 (14.09.07)		Date of mailing of the international search report 25 September, 2007 (25.09.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/062362

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YIN Yuxin et al., Human RAD9 checkpoint control/proapoptotic protein can activate transcription of p21, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 101(24), 2004, pp.8864-8869	1-13

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, G01N33/15(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（I P C）） Int.Cl. C12N15/09, A61K31/7088, A61K38/00, A61K39/395, A61K45/00, A61K48/00, A61P35/00, G01N33/15			
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			
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） JMEDPlus/JST7580/JSTPlus(JDream2)、CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
Y	石川和宏ら, p53 を介する P21 発現制御における Rad9 の役割と腫瘍増殖への関与 頭頸部癌, 32(2), 2006.05.15, p.159	1-13	
Y	MOCHAN Tamara A. et al., 53BP1, an activator of ATM in response to DNA damage DNA Repair, 3(8/9), 2004, pp.945-952	1-13	
X	ISHIKAWA Kazuhiro et al., A role of Rad9 in regulation of	11	
<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 1 4 . 0 9 . 2 0 0 7		国際調査報告の発送日 2 5 . 0 9 . 2 0 0 7	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 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） 植原 克典 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8	4 B 9 8 4 0

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	<p>p53-dependent p21waf1 activation after exposure to UV light 生化学, 2006, 抄録 CD pageA10724 (3P-A-269)</p> <p>YIN Yuxin et al., Human RAD9 checkpoint control/proapoptotic protein can activate transcription of p21 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101 (24), 2004, pp. 8864-8869</p>	1-13