

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-532041

(P2005-532041A)

(43) 公表日 平成17年10月27日(2005.10.27)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 9/127</b>	A 6 1 K 9/127	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 31/7068</b>	A 6 1 K 31/7068	4 C O 7 6
<b>A 6 1 K 35/76</b>	A 6 1 K 35/76	4 C O 8 4
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 6
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-574801 (P2003-574801)	(71) 出願人	503392851
(86) (22) 出願日	平成15年3月7日(2003.3.7)		ザ ジョンズ ホプキンス ユニバーシテ
(85) 翻訳文提出日	平成16年11月8日(2004.11.8)		イー
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/007245		アメリカ合衆国 メリーランド州 ボルテ
(87) 国際公開番号	W02003/076594		イモア 5ス フロアー チャールズ ス
(87) 国際公開日	平成15年9月18日(2003.9.18)		トリート ノース 100
(31) 優先権主張番号	60/362,577	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成14年3月7日(2002.3.7)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100108774
			弁理士 橋本 一憲
		(74) 代理人	100128048
			弁理士 新見 浩一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 後生的に沈黙化された腫瘍抑制遺伝子のゲノムスクリーニング

## (57) 【要約】

後生的に沈黙化された腫瘍抑制遺伝子を含む、後生的に沈黙化された遺伝子を同定するためのゲノムスクリーニング法が提供される。ガン、例えば、食道扁平上皮ガンまたは頭頸部扁平上皮ガンの検出方法、そのようなガンを有する被検体の治療方法も同様に提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

少なくとも一つの後生的に沈黙化されたガン関連遺伝子の同定方法であって、

a) ゲノムを代表するヌクレオチド配列のアレイを、後生的に沈黙化された遺伝子の発現を再活性化させる少なくとも一つの薬剤と接触させたガン細胞で発現されたRNAに対応する核酸と、アレイの相補的なヌクレオチド配列との核酸分子の選択的ハイブリダイゼーションに適した条件下で接触させる段階、および

b) アレイのヌクレオチド配列の部分母集団との、少なくとも一つの薬剤と接触させたガン細胞の核酸分子のハイブリダイゼーションの増加を、

前記の条件下での、ヌクレオチド配列の部分母集団のうちの少なくとも一つのヌクレオチド配列との、ガン細胞で発現されたRNAに対応する核酸分子の、もしあれば、ハイブリダイゼーションのレベルと比較して、検出する段階を含み、

前記の選択的ハイブリダイゼーションの増加によって、後生的に沈黙化された遺伝子の発現の再活性化が同定され、

その結果、少なくとも一つの後生的に沈黙化されたガン関連遺伝子が同定される方法。

## 【請求項2】

後生的に沈黙化された遺伝子の発現を再活性化させる薬剤に、メチル基転移酵素阻害剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、またはその組み合わせが含まれる、請求項1記載の方法。

## 【請求項3】

メチル基転移酵素阻害剤は5-アザ-2'-デオキシシチジンである、請求項2記載の方法。

## 【請求項4】

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤はトリコスタチンAである、請求項2記載の方法。

## 【請求項5】

RNAに対応する核酸分子にcRNAが含まれる、請求項1記載の方法。

## 【請求項6】

アレイを、5-アザ-2'-デオキシシチジン、トリコスタチンA、またはその組み合わせと接触させたガン細胞で発現されたRNAに対応する核酸分子と接触させる段階を含む、請求項1記載の方法。

## 【請求項7】

少なくとも一つの後生的に沈黙化された遺伝子に、表2に記載の核酸分子、またはその組み合わせが含まれる、請求項1記載の方法。

## 【請求項8】

少なくとも一つの後生的に沈黙化された遺伝子に、アポリポタンパク質D、ニューロメジンU、スイプロシン-2、Hep27、KIF5C、ケラチン14、トランスグルタミナーゼ2、MUC1、インターロイキン-1 R2、クリスタリン 2、LIMを有するシステインに富むタンパク質(CRIP-1)、Rad、HEM45、KLF6、ホリスタチン関連タンパク質FLRG、XAP-5、Tbc1d1、サイクリンG1相互作用タンパク質、またはその組み合わせを含む核酸分子が含まれる、請求項1記載の方法。

## 【請求項9】

少なくとも一つの後生的に沈黙化された遺伝子に、アポリポタンパク質D、ニューロメジンU、スイプロシン-2、サイトカイン様因子-1(CLF-1)、CRIP-1、細胞性レチノール結合タンパク質、メタロチオネイン1G、ケラチン14、インターロイキン-1受容体2、クリスタリン 2、またはその組み合わせが含まれる、請求項1記載の方法。

## 【請求項10】

少なくとも一つの後生的に沈黙化された遺伝子に、メチル化沈黙化遺伝子が含まれる、請求項1記載の方法。

## 【請求項11】

少なくとも一つのメチル化沈黙化遺伝子に、アポリポタンパク質D、ニューロメジンU、CLF-1、CRIP-1、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、メタロチオネイン1G、トランスグル

10

20

30

40

50

タミナーゼ2、アポリポタンパク質C1、またはその組み合わせが含まれる、請求項10記載の方法。

【請求項12】

少なくとも一つの後生的に沈黙化された遺伝子に、腫瘍抑制遺伝子が含まれる、請求項1記載の方法。

【請求項13】

腫瘍抑制遺伝子に、アポリポタンパク質D、ニューロメジンU、またはCRIP-1が含まれる、請求項12記載の方法。

【請求項14】

腫瘍抑制遺伝子に、ニューロメジンB、またはGタンパク質シグナル伝達受容体2(RGS2)が含まれる、請求項12記載の方法。 10

【請求項15】

ガンが食道扁平上皮ガンである、請求項1記載の方法。

【請求項16】

ガンが頭頸部扁平上皮ガンである、請求項1記載の方法。

【請求項17】

調節不能な増殖を示すまたは示す素因を呈する細胞を同定するための方法であって、試験細胞において、表2、表5、表6に記載の核酸分子を含む少なくとも一つの遺伝子の後生的な沈黙化、またはその組み合わせを検出する段階、それにより該試験細胞を、調節不能な増殖を示すまたは示す素因を呈する細胞と同定する段階を含む方法。 20

【請求項18】

少なくとも一つの遺伝子に、アポリポタンパク質D、ニューロメジンU、スイプロシン-2、Hep27、KIF5C、ケラチン14、トランスグルタミナーゼ2、MUC1、インターロイキン-1受容体2、クリスタリン2、サイトカイン様因子-1、LIMを有するシステインに富むタンパク質(CRIP-1)、Rad、HEM45、KLF6、ホリスタチン関連タンパク質FLRG、XAP-5、Tbc1d1、サイクリンG1相互作用タンパク質、細胞性レチノール結合タンパク質、メタロチオネイン1G、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、アポリポタンパク質C1、またはその組み合わせが含まれる、請求項17記載の方法。

【請求項19】

調節不能な増殖を示す、または示す素因を呈する細胞が、新生物細胞である、請求項17記載の方法。 30

【請求項20】

新生物細胞が前ガン状態の細胞である、請求項19記載の方法。

【請求項21】

新生物細胞がガン細胞である、請求項19記載の方法。

【請求項22】

ガン細胞が食道扁平上皮ガン細胞である、請求項21記載の方法。

【請求項23】

ガン細胞が頭頸部扁平上皮ガン細胞である、請求項21記載の方法。

【請求項24】

後生的な沈黙化にメチル化による沈黙化が含まれ、メチル化による沈黙化を検出する段階が含まれる、請求項17記載の方法。 40

【請求項25】

メチル化による沈黙化を検出する段階は、CpGジヌクレオチドのメチル化されるシトシン残基を含む5'調節領域中の認識部位を切断する、メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼと、遺伝子を含む核酸分子の5'調節領域を含む領域を接触させる段階を含み、核酸分子の切断により試験細胞の遺伝子のメチル化による沈黙化が示される、請求項24記載の方法。

【請求項26】

メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼがAcc III、Ban I、BstN I、Msp I、またはXma 50

1である、請求項25記載の方法。

【請求項27】

メチル化による沈黙化を検出する段階は、CpGジヌクレオチドのメチル化されるシトシン残基を含む5'調節領域中の認識部位を、CpGジヌクレオチドのシトシン残基がメチル化されていない場合に切断する、メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼと、遺伝子を含む核酸分子の5'調節領域を含む領域を接触させる段階を含み、核酸分子が切断されないことにより試験細胞の遺伝子のメチル化による沈黙化が示される、請求項24記載の方法。

【請求項28】

メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼはAcc II、Ava I、BssH II、BstU I、Hpa II、またはNot Iである、請求項27記載の方法。

10

【請求項29】

メチル化による沈黙化を検出する段階は、試験細胞の遺伝子を含む核酸分子の5'調節領域を、非メチル化シトシン残基またはメチル化シトシン残基のどちらかを選択的に修飾する化学試薬と接触させる段階と、該接触により産生される産物を検出する段階とを含む、請求項24記載の方法であって、産物により遺伝子のCpGジヌクレオチドのシトシン残基のメチル化が示され、それによって試験細胞の遺伝子のメチル化による沈黙化が検出される、方法。

【請求項30】

産物を検出する段階は、電気泳動法、クロマトグラフィー法、質量分析法、またはその組み合わせを含む、請求項29記載の方法。

20

【請求項31】

化学試薬はヒドラジンであり、それにより遺伝子のヒドラジン処理5'調節領域を産生させる、請求項29記載の方法であって、

遺伝子を含む核酸分子の断片を含む産物を産生させるため、ヒドラジン処理5'調節領域を、ヒドラジン修飾シトシン残基を切断する試薬と接触させる段階と、

分子量に応じて断片を分離する段階と、

遺伝子の5'調節領域中でシトシン残基を含むことが知られている位置のギャップを検出する段階とをさらに含み、ギャップにより遺伝子のCpGジヌクレオチドのシトシン残基のメチル化が示され、それによって試験細胞の遺伝子のメチル化による沈黙化が検出される方法。

30

【請求項32】

ヒドラジン修飾シトシン残基を切断する試薬がピペリジンである、請求項31記載の方法。

【請求項33】

化学試薬に重亜硫酸イオンが含まれ、それにより遺伝子の5'調節領域中の非メチル化シトシン残基が重亜硫酸塩修飾シトシン残基に変換される、請求項29記載の方法であって、

重亜硫酸イオン処理遺伝子をアルカリ条件に曝し、それにより重亜硫酸塩修飾シトシン残基がウラシル残基に変換される段階と、

試験細胞の重亜硫酸イオン処理遺伝子の5'調節領域中のウラシル残基の量または分布を検出する段階とをさらに含み、

40

対応する重亜硫酸イオン処理非メチル化遺伝子のアルカリ条件への暴露後のウラシル残基の量または分布と比較した、試験細胞由来の遺伝子の5'調節領域中のウラシル残基の量または分布の減少により、遺伝子の5'調節領域中のCpGジヌクレオチドのシトシン残基のメチル化が示され、それによって試験細胞の遺伝子のメチル化による沈黙化が検出される方法。

【請求項34】

ウラシル残基の量または分布を検出する段階が、アルカリ条件への暴露後の遺伝子の重亜硫酸塩修飾5'調節領域のヌクレオチド配列を決定する段階を含む、請求項33記載の方法。

【請求項35】

50

ウラシル残基の量または分布を検出する段階が、重亜硫酸イオン処理遺伝子配列をアルカリ条件への暴露後に、ウラシル残基を含む遺伝子の5'調節領域に選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドと接触させる段階と、

オリゴヌクレオチドの選択的ハイブリダイゼーションを検出する段階とを含む、請求項33記載の方法。

【請求項36】

オリゴヌクレオチドに検出可能な標識が含まれ、選択的ハイブリダイゼーションを検出する段階に該標識を検出する段階が含まれる、請求項35記載の方法。

【請求項37】

検出可能な標識が、放射性同位体、常磁性同位体、発光化合物、化学発光化合物、蛍光化合物、金属キレート、酵素、酵素に対する基質、受容体、または受容体に対するリガンドである、請求項36記載の方法。 10

【請求項38】

オリゴヌクレオチドはプライマー伸長反応のための基質であり、選択的ハイブリダイゼーションを検出する段階にプライマー伸長反応の産物を検出する段階が含まれる、請求項35記載の方法。

【請求項39】

オリゴヌクレオチドが配列番号:1~127のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する、請求項38記載の方法。

【請求項40】

ウラシル残基の量または分布を検出する段階は、  
増幅に適した条件下で、遺伝子の5'調節領域を、フォワード・プライマーおよびリバース・プライマーを含む増幅プライマー対と接触させる段階を含む、請求項33記載の方法であって、プライマー対の少なくとも一つのプライマーは、ウラシル残基を含む5'調節領域のヌクレオチド配列に選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含み、 20

増幅産物の産出によって、遺伝子の5'調節領域中のCpGジヌクレオチドのシトシン残基のメチル化が示され、その結果、試験細胞の遺伝子のメチル化による沈黙化が検出される方法。

【請求項41】

増幅プライマー対に、配列番号:1、2および65~127に記載のフォワード・プライマーおよびリバース・プライマーを含むプライマー対が含まれる、請求項40記載の方法。 30

【請求項42】

ウラシル残基の量または分布を検出する段階は、  
増幅に適した条件下で、遺伝子の5'調節領域を、フォワード・プライマーおよびリバース・プライマーを含む増幅プライマー対と接触させる段階を含む、請求項33記載の方法であって、プライマー対の両プライマーは、シトシン残基を含む5'調節領域のヌクレオチド配列に選択的にハイブリダイズするが、ウラシル残基を含む5'調節領域の対応ヌクレオチド配列にハイブリダイズせず、

増幅産物の産出によって、遺伝子の5'調節領域中のCpGジヌクレオチドのシトシン残基がメチル化されていないことが示され、その結果、試験細胞の遺伝子のメチル化による沈黙化が検出される方法。 40

【請求項43】

増幅プライマー対に、配列番号:3および4に記載のプライマー対が含まれる、請求項42記載の方法。

【請求項44】

ウラシル残基の量または分布を検出する段階は、  
増幅に適した条件下で、遺伝子の5'調節領域を、第一増幅プライマー対および第二増幅プライマー対と接触させる段階を含む、請求項33記載の方法であって、

第一増幅プライマー対は、フォワード・プライマーおよびリバース・プライマーを含み、該第一プライマー対の少なくとも一つのプライマーは、ウラシル残基を含む遺伝子の5' 50

調節領域のヌクレオチド配列に選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含み、かつ

第二増幅プライマー対は、フォワード・プライマーおよびリバース・プライマーを含み、該第二プライマー対の両プライマーは、シトシン残基を含む遺伝子の5'調節領域のヌクレオチド配列に選択的にハイブリダイズするが、ウラシル残基を含む遺伝子の5'調節領域の対応ヌクレオチド配列にハイブリダイズせず、かつ

第一プライマー対により産出される増幅産物が、もしあれば、第一の長さを有し、第二プライマー対により産出される増幅産物が、もしあれば、第一の長さとは異なる第二の長さを有し、

増幅産物の長さによって、ウラシル残基および従って、遺伝子の5'調節領域中のCpGジヌクレオチドのシトシン残基のメチル化が示され、その結果、試験細胞の遺伝子のメチル化による沈黙化が検出される方法。 10

【請求項45】

メチル化による沈黙化を検出する段階は、

a) 試験細胞を脱メチル化剤と接触させる段階と、  
b) 遺伝子によりコードされるRNAの発現の再活性化を、脱メチル化剤と接触されていない対応する試験細胞のRNAの発現レベルと比較して検出する段階とを含む、請求項24記載の方法。

【請求項46】

脱メチル化剤にメチル基転移酵素阻害剤が含まれる、請求項45記載の方法。 20

【請求項47】

メチル基転移酵素阻害剤には5-アザ-2'-デオキシシチジンが含まれる、請求項46記載の方法。

【請求項48】

高速大量処理の形式で実施される請求項17記載の方法であって、試験細胞、または試験細胞の抽出物に、複数の試験細胞もしくは試験細胞の抽出物、またはその組み合わせのうちの一つが含まれる、方法。

【請求項49】

複数の試験細胞または試験細胞の抽出物のそれぞれが、同一もしくは異なる、またはその組み合わせである、請求項48記載の方法。 30

【請求項50】

調節された増殖を示す対応細胞、または対応細胞の抽出物において、遺伝子の5'調節領域のCpGアイランド中のCpGジヌクレオチドのシトシン残基の、もしあれば、メチル化を検出する段階をさらに含む、請求項48記載の方法。

【請求項51】

試験細胞または試験細胞の抽出物が一つのアレイとして配列される、請求項48記載の方法。

【請求項52】

アレイがアドレス可能なアレイである、請求項51記載の方法。

【請求項53】

試験細胞または試験細胞の抽出物が、マイクロチップ、ガラススライド、またはビーズ上に存在する、請求項48記載の方法。 40

【請求項54】

試験細胞に、被検体から得られた試料が含まれる、請求項17記載の方法。

【請求項55】

被検体がヒト被検体である、請求項54記載の方法。

【請求項56】

試料に、臓器試料、組織試料、または細胞試料が含まれる、請求項54記載の方法。

【請求項57】

試料に、消化管試料、食道試料、肝臓試料、皮膚試料、リンパ節試料、腎臓試料、肺試 50

料、筋肉試料、骨試料、胃腸管試料、または脳試料が含まれる、請求項56記載の方法。

【請求項58】

試料に生体液が含まれる、請求項56記載の方法。

【請求項59】

生体液に骨髄、血液、血清、リンパ液、脳脊髄液、唾液、喀痰、大便、尿、または射精液が含まれる、請求項56記載の方法。

【請求項60】

少なくとも一つのガン関連遺伝子の転写の後生的な沈黙化を示す、細胞の調節不能な増殖を減少させるまたは阻害する方法であって、細胞中の後生的な沈黙化遺伝子によりコードされるポリペプチドの発現を回復させる段階を含み、それによって細胞の調節不能な増殖を減少させるかまたは阻害する方法。

10

【請求項61】

ポリペプチドの発現を回復させる段階に、細胞を脱メチル化剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、またはその組み合わせと接触させる段階が含まれる、請求項60記載の方法。

【請求項62】

脱メチル化剤にメチル基転移酵素阻害剤が含まれる、請求項61記載の方法。

【請求項63】

後生的な沈黙化遺伝子にメチル化沈黙化遺伝子が含まれ、細胞を少なくとも脱メチル化剤と接触させる段階が含まれる、請求項60記載の方法。

【請求項64】

細胞を脱メチル化剤と接触させる段階が培養液中で実施される、請求項63記載の方法。

20

【請求項65】

細胞を脱メチル化剤と接触させる段階に、細胞を含む被検体に薬剤を投与する段階が含まれる、請求項64記載の方法。

【請求項66】

脱メチル化剤が5-アザ-2'-デオキシシチジンである、請求項63記載の方法。

【請求項67】

ポリペプチドの発現を回復させる段階に、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞に導入する段階が含まれ、それによってポリペプチドがポリヌクレオチドから発現される、請求項60記載の方法。

30

【請求項68】

ポリヌクレオチドはベクター中に含まれる、請求項67記載の方法。

【請求項69】

ベクターはウイルス・ベクターである、請求項68記載の方法。

【請求項70】

ポリヌクレオチドを細胞に導入する段階に、細胞をポリヌクレオチドとインビボで接触させる段階が含まれる、請求項67記載の方法。

【請求項71】

後生的な沈黙化遺伝子に、表2に記載の核酸分子が含まれる、請求項67記載の方法。

【請求項72】

後生的な沈黙化遺伝子に、アポリポタンパク質D、ニューロメジンU、スイプロシン-2、Hep27、KIF5C、ケラチン14、トランスグルタミナーゼ2、MUC1、インターロイキン-1受容体2、クリスタリン2、サイトカイン様因子-1(CLF-1)、LIMを有するシステインに富むタンパク質(CRIP-1)、Rad、HEM45、KLF6、ホリスタチン関連タンパク質FLRG、XAP-5、Tbc1d1、サイクリンG1相互作用タンパク質、細胞性レチノール結合タンパク質、メタロチオネイン1G、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、アポリポタンパク質C1、またはその組み合わせが含まれる、請求項60記載の方法。

40

【請求項73】

後生的な沈黙化遺伝子に、メチル化沈黙化遺伝子が含まれる、請求項60記載の方法。

【請求項74】

50

メチル化沈黙化遺伝子に、アポリポタンパク質D、ニューロメジンU、CLF-1、CRIP-1、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、メタロチオネイン1G、トランスグルタミナーゼ2、アポリポタンパク質C1、またはその組み合わせが含まれる、請求項73記載の方法。

【請求項75】

後生的な沈黙化遺伝子に、腫瘍抑制遺伝子が含まれる、請求項60記載の方法。

【請求項76】

腫瘍抑制遺伝子に、アポリポタンパク質D、ニューロメジンU、またはCRIP-1が含まれる、請求項75記載の方法。

【請求項77】

腫瘍抑制遺伝子に、ニューロメジンB、またはGタンパク質シグナル伝達受容体2(RGS2)が含まれる、請求項75記載の方法。 10

【請求項78】

患者のガン細胞が、少なくとも一つの遺伝子の発現の後生的な沈黙化を示す、ガン患者を治療するための方法であって、被検体のガン細胞の少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子の発現を回復させる段階を含み、それによってガン患者を治療する方法。

【請求項79】

少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子に、メチル化沈黙化遺伝子が含まれる、請求項78記載の方法。

【請求項80】

被検体のガン細胞のメチル化沈黙化遺伝子の発現を回復させるのに十分な量の脱メチル化剤を被検体に投与する段階を含む、請求項79記載の方法。 20

【請求項81】

被検体のガン細胞での少なくとも一つのポリペプチドの発現に十分な条件下で、少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子によりコードされる、少なくとも一つのポリペプチドをコードする少なくとも一つのポリヌクレオチドを被検体に投与する段階を含む、請求項78記載の方法。

【請求項82】

ポリヌクレオチドがベクター中に含まれる、請求項81記載の方法。

【請求項83】

ベクターがウイルス・ベクターである、請求項82記載の方法。 30

【請求項84】

ポリヌクレオチドにマトリクスが含まれる、請求項81記載の方法。

【請求項85】

マトリクスがリポソームである、請求項84記載の方法。

【請求項86】

ガンがガン腫または肉腫である、請求項78記載の方法。

【請求項87】

ガンが食道扁平上皮ガンである、請求項78記載の方法。

【請求項88】

少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子に、表2に記載の核酸分子が含まれる、請求項87記載の方法。 40

【請求項89】

後生的な沈黙化遺伝子に、アポリポタンパク質D、ニューロメジンU、スイプロシン-2、Hep27、KIF5C、ケラチン14、トランスグルタミナーゼ2、MUC1、インターロイキン-1受容体2、クリスタリン2、サイトカイン様因子-1(CLF-1)、LIMを有するシステインに富むタンパク質(CRIP-1)、Rad、HEM45、KLF6、ホリスタチン関連タンパク質FLRG、XAP-5、Tbc1d1、サイクリンG1相互作用タンパク質、細胞性レチノール結合タンパク質、メタロチオネイン1G、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、アポリポタンパク質C1、またはその組み合わせが含まれる、請求項87記載の方法。

【請求項90】

後生的な沈黙化遺伝子に、メチル化沈黙化遺伝子が含まれる、請求項87記載の方法。

【請求項91】

メチル化沈黙化遺伝子に、アポリポタンパク質D、ニューロメジンU、CLF-1、CRIP-1、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、メタロチオネイン1G、トランスグルタミナーゼ2、アポリポタンパク質C1、またはその組み合わせが含まれる、請求項90記載の方法。

【請求項92】

後生的な沈黙化遺伝子に、腫瘍抑制遺伝子が含まれる、請求項87記載の方法。

【請求項93】

腫瘍抑制遺伝子に、アポリポタンパク質D、ニューロメジンU、またはCRIP-1が含まれる、請求項92記載の方法。

10

【請求項94】

腫瘍抑制遺伝子に、ニューロメジンB、またはGタンパク質シグナル伝達受容体2(RGS2)が含まれる、請求項92記載の方法。

【請求項95】

ガンは頭頸部扁平上皮ガンである、請求項78記載の方法。

【請求項96】

少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子に、表5もしくは表6に記載の核酸分子またはその組み合わせが含まれる、請求項95記載の方法。

【請求項97】

以下の段階を含む、ガン患者を治療するための治療方針を選択するための方法：

20

a) ゲノムを代表するヌクレオチド配列のアレイを、後生的に沈黙化された遺伝子の発現を再活性化させる少なくとも一つの薬剤と接触させたガン細胞で発現されたRNAに対応する核酸分子と、アレイの相補的なヌクレオチド配列との核酸分子の選択的ハイブリダイゼーションに適した条件下で接触させる段階と

前記の条件の下で、アレイのヌクレオチド配列の部分母集団との少なくとも一つの薬剤と接触させたガン細胞の核酸分子のハイブリダイゼーションの増加を、ヌクレオチド配列のその部分母集団の少なくとも一つのヌクレオチド配列とのガン細胞で発現されたRNAに対応する核酸分子の、もしあれば、ハイブリダイゼーションのレベルと比較して検出する段階とにより、少なくとも一つの後生的に沈黙化されたガン関連遺伝子を同定する段階であって、

30

前記の選択的ハイブリダイゼーションの増加によって、後生的に沈黙化された遺伝子の発現の再活性化が同定され、その結果、少なくとも一つの後生的に沈黙化されたガン関連遺伝子が同定される段階；および

b) 患者のガン細胞の少なくとも一つの後生的に沈黙化された遺伝子の発現を回復させるのに有効な薬剤を選択し、それによってガン患者を治療するための治療方針を選択する段階。

【請求項98】

薬剤に、少なくとも一つの後生的に沈黙化された遺伝子をコードするポリヌクレオチドが含まれる、請求項97記載の方法。

【請求項99】

ポリヌクレオチドに、表2、表5、または表6に記載の核酸分子が含まれる、請求項98記載の方法。

40

【請求項100】

ポリヌクレオチドに、アポリポタンパク質D、ニューロメジンU、スイプロシン-2、Hep27、KIF5C、ケラチン14、トランスグルタミナーゼ2、MUC1、インターロイキン-1受容体2、クリスタリン2、サイトカイン様因子-1(CLF-1)、LIMを有するシステインに富むタンパク質(CRIP-1)、Rad、HEM45、KLF6、ホリスタチン関連タンパク質FLRG、XAP-5、Tbc1d1、サイクリンG1相互作用タンパク質、細胞性レチノール結合タンパク質、メタロチオネイン1G、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、アポリポタンパク質C1、またはその組み合わせが含まれる、請求項98記載の方法。

50

## 【請求項101】

少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子に、少なくとも一つのメチル化沈黙化遺伝子が含まれる、請求項97記載の方法。

## 【請求項102】

薬剤に、少なくとも一つのメチル化沈黙化遺伝子を含むポリヌクレオチドが含まれる、請求項101記載の方法。

## 【請求項103】

ポリヌクレオチドに、アポリポタンパク質D、ニューロメジンU、CLF-1、CRIP-1、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、メタロチオネイン1G、トランスグルタミナーゼ2、アポリポタンパク質C1、またはその組み合わせが含まれる、請求項102記載の方法。

10

## 【請求項104】

薬剤に脱メチル化剤が含まれる、請求項101記載の方法。

## 【請求項105】

脱メチル化剤が5-アザ-2'-デオキシシチジンである、請求項104記載の方法。

## 【請求項106】

少なくとも一つの後生的に沈黙化された遺伝子に、少なくとも一つの腫瘍抑制遺伝子が含まれる、請求項97記載の方法。

## 【請求項107】

腫瘍抑制遺伝子に、アポリポタンパク質D、ニューロメジンU、またはCRIP-1が含まれる、請求項106記載の方法。

20

## 【請求項108】

腫瘍抑制遺伝子に、ニューロメジンB、またはGタンパク質シグナル伝達受容体2(RGS2)が含まれる、請求項106記載の方法。

## 【請求項109】

食道扁平上皮ガン(ESCC)に罹患している被検体の治療方法であって、ESCCと関連する細胞に、少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子が含まれ、ESCCと関連する細胞の後生的な沈黙化遺伝子の発現を回復させるのに十分な、少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子の発現を回復させる薬剤の量を、被検体に投与する段階を含み、それによって被検体を治療する方法。

## 【請求項110】

薬剤に、少なくとも一つの後生的に沈黙化された遺伝子をコードするポリヌクレオチドが含まれる、請求項109記載の方法。

30

## 【請求項111】

ポリヌクレオチドに、表2に記載の核酸分子が含まれる、請求項110記載の方法。

## 【請求項112】

ポリヌクレオチドに、アポリポタンパク質D、ニューロメジンU、スイプロシン-2、Hep27、KIF5C、ケラチン14、トランスグルタミナーゼ2、MUC1、インターロイキン-1受容体2、クリスタリン2、サイトカイン様因子-1(CLF-1)、LIMを有するシステインに富むタンパク質(CRIP-1)、Rad、HEM45、KLF6、ホリスタチン関連タンパク質FLRG、XAP-5、Tbc1d1、サイクリンG1相互作用タンパク質、細胞性レチノール結合タンパク質、メタロチオネイン1G、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、アポリポタンパク質C1、またはその組み合わせが含まれる、請求項110記載の方法。

40

## 【請求項113】

少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子に、少なくとも一つのメチル化沈黙化遺伝子が含まれる、請求項109記載の方法。

## 【請求項114】

薬剤に、少なくとも一つのメチル化沈黙化遺伝子を含むポリヌクレオチドが含まれる、請求項113記載の方法。

## 【請求項115】

ポリヌクレオチドに、アポリポタンパク質D、ニューロメジンU、CLF-1、CRIP-1、クロ

50

ーディン-3、脱共役蛋白質-2、メタロチオネイン1G、トランスグルタミナーゼ2、アポリポタンパク質C1、またはその組み合わせが含まれる、請求項114記載の方法。

【請求項116】

少なくとも一つの後生的に沈黙化された遺伝子に、少なくとも一つの腫瘍抑制遺伝子が含まれる、請求項109記載の方法。

【請求項117】

腫瘍抑制遺伝子に、アポリポタンパク質D、ニューロメジンU、またはCRIP-1が含まれる、請求項116記載の方法。

【請求項118】

腫瘍抑制遺伝子に、ニューロメジンB、またはGタンパク質シグナル伝達受容体2(RGS2)が含まれる、請求項116記載の方法。

10

【請求項119】

ポリヌクレオチドがベクター中に含まれる、請求項110記載の方法。

【請求項120】

ベクターがウイルス・ベクターである、請求項119記載の方法。

【請求項121】

ポリヌクレオチドにマトリクスが含まれる、請求項112記載の方法。

【請求項122】

マトリクスがリボソームである、請求項121記載の方法。

【請求項123】

薬剤に脱メチル化剤が含まれる、請求項109記載の方法。

20

【請求項124】

脱メチル化剤が5'-アザ-2'-デオキシシチジンである、請求項123記載の方法。

【請求項125】

薬剤を投与する段階に、患者のESCC細胞の部位に薬剤を投与する段階が含まれる、請求項109記載の方法。

【請求項126】

配列番号:1~127のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドを含む、単離されたオリゴヌクレオチド。

【請求項127】

請求項126記載の単離オリゴヌクレオチドの少なくとも二つを含む、複数の単離オリゴヌクレオチド。

30

【請求項128】

表2の核酸分子の一部を増幅できる、配列番号:1~127に記載のフォワード・プライマーおよびリバース・プライマーを含む、増幅プライマー対。

【請求項129】

核酸分子のメチル化5'調節領域を特異的に増幅できる、請求項128記載の増幅プライマー対。

【請求項130】

核酸の分子メチル化5'調節領域を特異的に増幅できる、配列番号:1、2、および65~127に記載のフォワード・プライマーおよびリバース・プライマーを含む、請求項129記載の増幅プライマー対。

40

【請求項131】

核酸分子の非メチル化5'調節領域を特異的に増幅できる、請求項128記載の増幅プライマー対。

【請求項132】

配列番号:3および4を含む、請求項131記載の増幅プライマー対。

【請求項133】

請求項126記載の少なくとも一つの単離オリゴヌクレオチドを含む、キット。

【請求項134】

50

複数の単離オリゴヌクレオチドを含む、請求項133記載のキット。

【請求項135】

前記の複数の、フォワード・プライマーおよびリバース・プライマーを含む少なくとも一組の増幅プライマー対が含まれる、請求項134記載のキット。

【請求項136】

複数組の増幅プライマー対を含む、請求項135記載のキット。

【請求項137】

増幅プライマー対に、メチル化特異的増幅プライマー対、非メチル化特異的増幅プライマー対、または少なくとも一組のメチル化特異的増幅プライマー対および少なくとも一組の非メチル化特異的増幅プライマー対を含む組み合わせが含まれる、請求項135記載のキット。

10

【請求項138】

メチル化シトシン残基を修飾する試薬をさらに含む、請求項133記載のキット。

【請求項139】

メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼをさらに含む、請求項133記載のキット。

【請求項140】

増幅反応を行うための試薬をさらに含む、請求項133記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本出願は、2002年3月7日付で出願した米国特許出願第60/362,422号の米国特許法第119条(e)項(1)号に基づく優先権の恩典を主張するものであり、その内容の全体が参照として本明細書に組み入れられる。

【0002】

本発明は部分的に、米国立衛生研究所から与えられた助成金番号CA84986-04の下で政府の支援により実施された。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

【0003】

発明の分野

本発明は一般には、ガン細胞で後生的に沈黙化された腫瘍抑制遺伝子の検出方法に関し、より具体的には食道ガンおよび頭頸部ガンのようなガンを診断するための方法に、なら

30

びにそのようなガンの治療方法に関する。

【背景技術】

【0004】

背景情報

ガンは一般に、遺伝子の突然変異のような遺伝的变化が原因であると考えられているが、DNA配列の突然変異を引き起こすことのない、後生的な機構でも同じく、ガンが引き起こされることが明らかとなった。最も多く見られる後生的な変化には、遺伝子配列、特に5'上流の遺伝子調節配列のメチル化による遺伝子発現の沈黙化が含まれる。CpGジヌクレオチドの、特にCpGに富む領域(CpGアイランド)の、グアニンの5'側に位置するシトシン残基のメチル化は、より高等な真核生物では遺伝子発現の正常な調節に関与していることが

40

【0005】

遺伝子発現の消失または欠陥のある遺伝子産物の発現を引き起こす突然変異を含む、ガン関連遺伝子の変化、および遺伝子転写のメチル化による沈黙化のような後生的な機構は、細胞が正常な増殖制御を喪失しやすいかどうか、従って、潜在的ガン細胞であるかどうかを決定するのに有効な指標となる。例えば、BRCA1遺伝子の突然変異は、乳ガンと関連

50

付けられている。従って、例えば、乳ガンの家族歴がある女性からの細胞を用いて、その女性に、乳ガンの指標であるBRCA1の突然変異があるかどうか決定するため、診断学的検査を行うことができる。前立腺特異抗原(PSA)は、指標(この場合は前立腺ガンに対する)の別の例である。PSAの発現を引き起こす欠陥も体内におけるPSAの通常の機能も知られていないが、それでもなおPSAは、前立腺ガンにかかりやすい男性のまたは効果的な治療を施すことができるようなその疾患のごく初期段階での同定が可能とされることから、有用なガンの指標となる。最近になって、サイトカインシグナル伝達サプレッサー/サイトカイン誘導性SH2タンパク質ファミリーメンバーである、SOCS-1遺伝子の転写のメチル化による沈黙化が、肝細胞ガン、多発性骨髄腫、および急性白血病を含む、種々のガンで発見された。従って、SOCS-1遺伝子のメチル化状態を検出することを対象としたスクリーニング試験により、そのようなガンに関する診断情報が提供される可能性がある。

10

#### 【0006】

ガンは多くの場合、疾患がかなり進行するまで、臨床的な徴候または症状を現さない沈黙の疾患であるため、ガンにかかりやすい個体の同定を可能とする、またはさらに初期段階でのガンの検出を可能とする指標の利用可能性または利用は、大きな利益となり得る。残念ながら、ほとんどのガンに対して、そのような指標を利用することができない。従って、多くのガン患者は、ガンが根治療法を必要とする段階となるまで、または治療不可能となるまで、医療援助を求めない。従って、ガン細胞を検出するために利用できる指標が必要とされている。本発明により、この必要性が満たされかつさらなる利点が提供される。

20

#### 【発明の開示】

#### 【0007】

##### 発明の概要

本発明は、少なくとも一つの後生的に沈黙されたガン関連遺伝子の同定方法に関する。そのような方法は、例えば、ゲノムを代表するヌクレオチド配列のアレイを、後生的に沈黙化された遺伝子の発現を再活性化させる少なくとも一つの薬剤と接触させたガン細胞で発現されたRNAに対応する核酸と、アレイの相補的なヌクレオチド配列との核酸の選択的ハイブリダイゼーションに適した条件の下で接触させる段階; および前記の条件の下で、薬剤/薬剤(複数)と接触させたガン細胞の核酸の、アレイのヌクレオチド配列の部分母集団とのハイブリダイゼーションの増加を、もしあれば、ガン細胞で発現されたRNAに対応する核酸の、ヌクレオチド配列のその部分母集団の少なくとも一つのヌクレオチド配列とのハイブリダイゼーションのレベルと比較して検出する段階により行うことができ、選択的ハイブリダイゼーションの増加によって、後生的に沈黙化された遺伝子の発現の再活性化が同定される。

30

#### 【0008】

アレイのヌクレオチド配列と接触させる、RNAに対応する核酸は、例えば、cDNA、cRNA、mRNA、または細胞で発現されたRNAを代表するその他の核酸を含む、DNAまたはRNAとすることができる。後生的に沈黙化された遺伝子の発現を再活性化させる薬剤は、メチル基転移酵素阻害剤(例えば、5-アザ-2'-デオキシシチジン; 5Aza-dC)のような脱メチル化剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(例えば、トリコスタチンA; TSA)、またはその組み合わせとすることができる。ガン細胞は、肉腫またはガン腫細胞、例えば、食道ガン細胞とすることができる。

40

#### 【0009】

一つの態様として、その方法には、アレイを、5Aza-dC、TSA、またはその組み合わせと接触させたガン細胞で発現されたRNAに対応する核酸と接触させる段階が含まれる。例えば、ガン細胞が食道扁平上皮ガン(ESCC)細胞である場合、その方法により同定される後生的に沈黙化された遺伝子は、表2に掲載の遺伝子、またはそのような遺伝子の組み合わせとすることができる。ガン細胞が頭頸部扁平上皮ガン(HNSCC)細胞である場合、その方法により同定される後生的に沈黙化された遺伝子は、表5または表6に掲載の遺伝子とすることができる。本態様の一つの局面として、ガンがESCCであり、後生的に沈黙化された遺伝

50

子は、アポリポタンパク質D(Apo D)遺伝子、ニューロメジンU(NU)遺伝子、スイプロシン-2(swisprosin-2)遺伝子、Hep27遺伝子、KIF5C遺伝子、ケラチン14遺伝子、トランスグルタミナーゼ2遺伝子、MUC1遺伝子、インターロイキン-1受容体2(IL-1 R2)遺伝子、クリスタリン 2遺伝子、LIMを有するシステインに富むタンパク質(CRIP-1)遺伝子、Rad遺伝子、HEM45遺伝子、KLF6遺伝子、ホリスタチン関連タンパク質FLRG遺伝子、XAP-5遺伝子、Tbc1d1遺伝子、サイクリンG1相互作用タンパク質遺伝子、またはその組み合わせである。本態様の別の局面として、後生的に沈黙化された遺伝子は、Apo D遺伝子、NU遺伝子、スイプロシン-2(swisprosin-2)遺伝子、サイトカイン-様因子-1(CLF-1)遺伝子、CRIP-1遺伝子、細胞性レチノール結合タンパク質(CRBP)遺伝子、メタロチオネイン1G遺伝子、ケラチン14遺伝子、IL-1 R2遺伝子、クリスタリン 2遺伝子、またはその組み合わせである。

10

## 【0010】

別の態様として、本発明の方法により同定される少なくとも一つの後生的に沈黙化された遺伝子は、メチル化沈黙化遺伝子である。例えば、ESCCにおけるメチル化沈黙化遺伝子は、Apo D、NU、CLF-1、CRIP-1、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、メタロチオネイン1G、トランスグルタミナーゼ2、もしくはアポリポタンパク質C1遺伝子、またはその組み合わせとすることができる。別の態様として、後生的に沈黙化された遺伝子は、腫瘍抑制遺伝子である。一つの局面として、腫瘍抑制遺伝子は、Apo D遺伝子、NU遺伝子、またはCRIP-1遺伝子であり、これらのそれぞれが、本明細書に開示されるように、腫瘍抑制活性を示す。別の局面として、腫瘍抑制遺伝子は、ニューロメジンB遺伝子、またはGタンパク質シグナル伝達受容体2(RGS2)遺伝子である。

20

## 【0011】

本発明は同様に、調節不能な増殖を示すまたは示す素因を呈する細胞を同定するための方法に関する。そのような方法は、例えば、試験細胞において、表2に記載の少なくとも一つの遺伝子の後生的な沈黙化、またはそのような遺伝子の組み合わせ、例えば、Apo D、NU、スイプロシン-2(swisprosin-2)、Hep27、KIF5C、ケラチン14、トランスグルタミナーゼ2、MUC1、IL-1 R2、クリスタリン 2、CLF-1、CRIP-1、Rad、HEM45、KLF6、ホリスタチン関連タンパク質FLRG、XAP-5、Tbc1d1、サイクリンG1相互作用タンパク質、CRBP、メタロチオネイン1G、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、もしくはアポリポタンパク質C1遺伝子、またはその組み合わせを検出する段階により行うことができる。

30

## 【0012】

試験細胞は、調節不能な増殖を示す、または示す素因を呈する細胞であって、新生物細胞、例えば、前ガン状態の細胞または悪性細胞(即ち、ガン細胞)とすることができる。従って、細胞は、ガン腫細胞、肉腫細胞、または同種のものであることが知られているかまたは疑われる細胞とすることができる。一つの態様として、調節不能な増殖を示すもしくは示す素因を呈する細胞、またはそのような細胞であることが疑われる細胞は、ガン細胞である。本態様の一つの局面として、ガン細胞は、ESCC細胞、またはESCC細胞であることが疑われる細胞である。本態様の別の局面として、ガン細胞は、HNSCC細胞、またはHNSCC細胞であることが疑われる細胞である。

## 【0013】

一つの態様として、後生的な沈黙化にはメチル化による沈黙化が含まれ、その場合、その方法は、試験細胞における一つまたは複数の遺伝子のメチル化および/またはメチル化による沈黙化を検出する段階により実践することができる。本態様の一つの局面として、メチル化による沈黙化は、CpGジヌクレオチドのメチル化されるシトシン残基を含む5'調節領域中の認識部位を切断する、メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼと、遺伝子を含む核酸の5'調節領域を含む領域を接触させる段階により検出され、核酸の切断により試験細胞の遺伝子のメチル化による沈黙化が示される。そのような方法に有効なメチル化感受性制限エンドヌクレアーゼは、例えば、Acc III、Ban I、BstN I、Msp I、またはXma Iとすることができる。本態様の別の局面として、メチル化による沈黙化は、CpGジヌクレオチドのメチル化されるシトシン残基を含む5'調節領域中の認識部位を、CpGジヌクレオチドのシトシン残基がメチル化されていない場合に切断する、メチル化感受性制限エンドヌ

40

50

クレーアーゼと、遺伝子を含む核酸の5'調節領域を含む領域を接触させる段階により検出され、核酸が切断されないことにより試験細胞の遺伝子のメチル化による沈黙化が示される。そのような方法に有効なメチル化感受性制限エンドヌクレアーゼは、例えば、Acc I、Ava I、BssH II、BstU I、Hpa II、またはNot Iとすることができる。

#### 【0014】

遺伝子発現のメチル化による沈黙化は同様に、試験細胞の遺伝子を含む核酸の5'調節領域を、非メチル化シトシン残基またはメチル化シトシン残基のどちらかを選択的に修飾する化学試薬と接触させる段階と、その接触により産生される産物を検出する段階により検出することができ、産物により遺伝子のCpGジヌクレオチドのシトシン残基のメチル化が示され、それによって試験細胞の遺伝子のメチル化による沈黙化が検出される。そのような産物は、例えば、電気泳動法、クロマトグラフィー法、質量分析法、またはその組み合わせにより検出することができる。

10

#### 【0015】

標的遺伝子の5'調節領域のメチル化のそのような検出方法の一つの局面として、化学試薬はヒドラジンであり、それにより遺伝子のヒドラジン処理5'調節領域を産生させ、その際に、遺伝子を含む核酸の断片を含む産物を発生させるため、そのヒドラジン処理5'調節領域を、ヒドラジン修飾シトシン残基を切断する試薬とさらに接触させ、分子量に応じて断片をさらに分離し、遺伝子の5'調節領域中でシトシン残基を含むことが知られている位置のギャップを検出し、その際にギャップは遺伝子のCpGジヌクレオチドのシトシン残基のメチル化を示し、それによって試験細胞の遺伝子のメチル化による沈黙化が検出される。

20

#### 【0016】

標的遺伝子の5'調節領域のメチル化のそのような検出方法の別の局面として、化学試薬には重亜硫酸イオンが含まれ、それにより遺伝子の5'調節領域中の非メチル化シトシン残基が重亜硫酸塩修飾シトシン残基に変換され、その際に、重亜硫酸イオン処理遺伝子をアルカリ条件にさらに曝すことによって、重亜硫酸塩修飾シトシン残基がウラシル残基に変換され、そして試験細胞の重亜硫酸イオン処理遺伝子の5'調節領域中のウラシル残基の量または分布を検出し、その際に、対応する重亜硫酸イオン処理非メチル化遺伝子のアルカリ条件への暴露後のウラシル残基の量または分布と比較した、試験細胞由来の遺伝子の5'調節領域中のウラシル残基の量または分布の減少により、遺伝子の5'調節領域中のCpGジヌクレオチドのシトシン残基のメチル化が示される。

30

#### 【0017】

一つの局面として、ウラシル残基の量または分布は、例えば、アルカリ条件への暴露後の遺伝子の重亜硫酸塩修飾5'調節領域のヌクレオチド配列を決定することにより検出することができる。別の局面として、重亜硫酸イオン処理遺伝子配列をアルカリ条件への暴露後に、ウラシル残基を含む遺伝子の5'調節領域に選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドと接触させて、オリゴヌクレオチドの選択的ハイブリダイゼーションを検出することにより、ウラシル残基の量または分布を同様に検出することができる。そのようなハイブリダイズするオリゴヌクレオチドは、検出可能な標識、例えば、放射性同位体、常磁性同位体、発光化合物、化学発光化合物、蛍光化合物、金属キレート、酵素、酵素に対する基質、受容体、または受容体に対するリガンドをさらに含むことができ、標識を検出することにより、オリゴヌクレオチドの選択的ハイブリダイゼーションが検出される。或いは、またはさらに、オリゴヌクレオチドはプライマー伸長反応のための基質であり、プライマー伸長反応の産物を検出することにより、選択的ハイブリダイゼーションを検出することができる。

40

#### 【0018】

さらに別の局面として、ウラシル残基の量または分布は、増幅に適した条件の下で、遺伝子の5'調節領域を増幅プライマー対(フォワード・プライマーおよびリバース・プライマーを含む)と接触させることにより検出することができ、その際に、プライマー対の少

50

なくとも一つのプライマーは、ウラシル残基を含む5'調節領域のヌクレオチド配列に選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含み、増幅産物の産出により、遺伝子の5'調節領域中のCpGジヌクレオチドのシトシン残基のメチル化が示され、それによって試験細胞の遺伝子のメチル化による沈黙化が検出される。標的遺伝子配列のメチル化特異的増幅を可能とする、そのようなメチル化特異的増幅プライマー対は、配列番号:1および2として記載のプライマー対(同様に、表4; 少なくとも一つのフォワード・プライマー(F1またはF2)および一つのリバース・プライマー(R)を含む、配列番号:65~127を参照されたい)により例示される。

#### 【0019】

さらに別の局面として、ウラシル残基の量または分布は、増幅に適した条件の下で、遺伝子の5'調節領域を、フォワード・プライマーおよびリバース・プライマーを含む増幅プライマー対と接触させることにより検出することができ、その際に、プライマー対の両プライマーは、シトシン残基を含む遺伝子の5'調節領域のヌクレオチド配列に選択的にハイブリダイズするが、ウラシル残基を含む5'調節領域の対応ヌクレオチド配列にハイブリダイズせず、増幅産物の産出により、遺伝子の5'調節領域のCpGジヌクレオチドのシトシン残基がメチル化されていないことが示され、それによって試験細胞の遺伝子のメチル化による沈黙化が検出される。非メチル化5'調節領域を含む標的遺伝子配列の特異的増幅を可能とする、そのような非メチル化特異的増幅プライマー対は、配列番号:3および4として記載のプライマー対により例示される。

10

#### 【0020】

別の局面として、ウラシル残基の量または分布は、増幅に適した条件の下で、遺伝子の5'調節領域を、第一増幅プライマー対および第二増幅プライマー対と接触させることにより検出することができ、第一増幅プライマー対は、フォワード・プライマーおよびリバース・プライマーを含み、第一プライマー対の少なくとも一つのプライマーは、ウラシル残基を含む遺伝子の5'調節領域のヌクレオチド配列に選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含み、そして第二増幅プライマー対は、フォワード・プライマーおよびリバース・プライマーを含み、第二プライマー対の両プライマーは、シトシン残基を含む遺伝子の5'調節領域のヌクレオチド配列に選択的にハイブリダイズするが、ウラシル残基を含む遺伝子の5'調節領域の対応ヌクレオチド配列にハイブリダイズせず、そして第一プライマー対により産出される増幅産物が、もしあれば、第一の長さを有し、そして第二プライマー対により産出される増幅産物が、もしあれば、第一の長さとは異なる第二の長さを有し、増幅産物の長さにより、ウラシル残基および、従って、遺伝子の5'調節領域のCpGジヌクレオチドのシトシン残基のメチル化が示される。

20

30

#### 【0021】

別の態様として、メチル化による沈黙化は、試験細胞を脱メチル化剤と接触させること、および遺伝子によりコードされるRNAの発現の再活性化を、脱メチル化剤と接触されていない対応試験細胞のRNAの発現レベルと比較して検出することにより、検出することができる。脱メチル化剤は、例えば、5Aza-dCのようなメチル基転移酵素阻害剤とすることができ、後生的な沈黙化遺伝子によりコードされるRNAの発現の再活性化は、例えば、発現されたRNA、またはその産物、例えば、RNAの逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)産物を検出することにより、検出することができる。

40

#### 【0022】

後生的に沈黙化された遺伝子の本検出方法は好適に、高速大量処理の形式に適合可能であり、その際に試験細胞、または試験細胞の抽出物は、複数の、試験細胞、もしくは試験細胞の抽出物、またはその組み合わせのうちの一つである。複数の、試験細胞、または試験細胞の抽出物は、同じもしくは異なる、またはその組み合わせ、例えば、二重の、三重の、もしくはそれ以上の特定の試験細胞試料、および多くの異なる試験細胞試料とすることができ、これらは、以下が必要とされるわけではないが、アレイ、例えば、アドレス可能なアレイに(例えば、マイクロチップ、ガラススライド、またはビーズのような固体支持体上に)配列することができる。さらに、試験細胞(またはその抽出物)の単一試料で、

50

後生的な沈黙化を目的として、二つまたはそれ以上の遺伝子を、例えば、区別をつけて標識されたオリゴヌクレオチドにより試験することが可能であり、これによって多重形式が提供される。一つの態様として、高速大量処理および/または多重アッセイにより試験される試験細胞は、調節された増殖を示す対応細胞、または対応細胞の抽出物において、遺伝子の5'調節領域のCpGアイランドの中のCpGジヌクレオチドのシトシン残基の、もしあれば、メチル化を検出する段階をさらに含むことができる。

#### 【0023】

本発明の方法により調べられる試験細胞(またはその抽出物)は、被検体、例えば、ヒトの被検体から得た試料の細胞を含むことができる。従って、試料は、臓器試料、組織試料、または細胞試料、例えば、食道試料、肝臓試料、皮膚試料、リンパ節試料、腎臓試料、肺試料、筋肉試料、骨試料、胃腸管試料、もしくは脳試料とすることができる; または試料は、生体液試料、例えば、骨髄、血液、血清、リンパ液、脳脊髄液、唾液、喀痰、大便、尿、または射精液試料とすることができ、これらには、後生的な沈黙化を目的として試験される一つまたは複数の遺伝子を含む核酸が含まれる。

10

#### 【0024】

本発明は同様に、少なくとも一つのガン関連遺伝子の転写の後生的な沈黙化を示す、細胞の調節不能な増殖を減少させるまたは阻害する方法に関する。そのような方法は、例えば、細胞中の後生的な沈黙化遺伝子によりコードされるポリペプチドの発現を回復させ、それにより細胞の調節不能な増殖を減少させるかまたは阻害することにより実践することができる。一つの態様として、後生的な沈黙化遺伝子によりコードされるポリペプチドの発現は、細胞を脱メチル化剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、またはその組み合わせと接触させることにより回復させることができる。本態様の一つの局面として、少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子にはメチル化沈黙化遺伝子が含まれ、細胞を5Aza-dCのような脱メチル化剤と接触させる。一般に、脱メチル化剤を被検体に、その薬剤が細胞とインピボで接触するように投与することにより、細胞を脱メチル化剤と接触させる。

20

#### 【0025】

別の態様として、細胞中の後生的な沈黙化遺伝子によりコードされるポリペプチドの発現は、そのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞内へ導入することによって、ポリペプチドがポリヌクレオチドから発現されることにより回復される。ポリヌクレオチドを、ベクター、例えば、ウイルス・ベクター中に含有させることができる、および例えば、リボソーム、超微粒気泡などのようなマトリクスの中に製剤化することができるが、それが必要とされるわけではない。一般に、ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド(これはベクター中に存在してもよくおよび/または上述のように製剤化されてもよい)が細胞とインピボで接触するようにポリヌクレオチドを被検体に投与することにより、細胞内へ導入される。

30

#### 【0026】

そのような方法に有効なポリヌクレオチドは、後生的に沈黙化された遺伝子に相当する任意のポリヌクレオチドとすることができる。例えば、細胞がESCC細胞である場合、後生的な沈黙化遺伝子は表2に記載の遺伝子とすることができ、ポリヌクレオチドは、表2に記載のGenBankアクセッション番号で利用可能なポリヌクレオチドのような、その遺伝子によりコードされるポリペプチドをコードする核酸とすることができる。例えば、後生的な沈黙化遺伝子は、Apo D、NU、スイプロシン-2(swisprosin-2)、Hep27、KIF5C、ケラチン14、トランスグルタミナーゼ2、MUC1、IL-1 R2、クリスタリン 2、CLF-1、CRIP-1、Rad、HEM45、KLF6、ホリスタチン関連タンパク質FLRG、XAP-5、Tbc1d1、サイクリンG1相互作用タンパク質、CRBP、メタロチオネイン1G、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、もしくはアポリタンパク質C1遺伝子、またはその組み合わせとすることができる。細胞がHNSCC細胞である場合、後生的な沈黙化遺伝子は表5または6に記載の遺伝子とすることができ、ポリヌクレオチドは、表5および6に記載のGenBankアクセッション番号で利用可能なポリヌクレオチドのような、その遺伝子によりコードされるポリペプチドをコードする核酸とすることができる。

40

50

## 【0027】

一つの態様として、細胞がESCC細胞であり、後生的な沈黙化遺伝子にはメチル化沈黙化遺伝子、例えば、メチル化により沈黙化されたApo D、NU、CLF-1、CRIP-1、クローディング-3、脱共役蛋白質-2、メタロチオネイン1G、トランスグルタミナーゼ2、もしくはアポリポタンパク質C1遺伝子、またはその組み合わせが含まれる。別の態様として、細胞がESCC細胞であり、後生的な沈黙化遺伝子には腫瘍抑制遺伝子、例えば、Apo D、NU、もしくはCRIP-1遺伝子が含まれる；または腫瘍抑制遺伝子にはニューロメジンB、もしくはGタンパク質シグナル伝達受容体2(RGS2)遺伝子が含まれる；またはESCC細胞にはそのような腫瘍抑制遺伝子の組み合わせが含まれる。

## 【0028】

本発明はさらに、患者のガン細胞が少なくとも一つの遺伝子の発現の後生的な沈黙化を示す、ガン患者を治療するための方法に関する。そのような方法は、例えば、被検体のガン細胞の少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子の発現を回復させる段階により行うことができ、それによってガン患者を治療することができる。少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子は、メチル化沈黙化遺伝子とすることができ、以下が必要とされるわけではないが、腫瘍抑制遺伝子または腫瘍抑制遺伝子の活性もしくは発現に影響を及ぼす遺伝子とすることができる。

## 【0029】

一つの態様として、ガン患者のガン細胞には、少なくとも一つのメチル化沈黙化遺伝子が含まれ、その方法には、被検体のガン細胞のメチル化沈黙化遺伝子の発現を回復させるのに十分な量の脱メチル化剤を被検体に投与する段階が含まれる。別の態様として、ガン患者のガン細胞には、少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子が含まれ、その方法には、被検体のガン細胞での少なくとも一つのポリペプチドの発現に十分な条件の下で、後生的な沈黙化遺伝子によりコードされるポリペプチドをコードする少なくとも一つのポリヌクレオチドを被検体に投与する段階が含まれる。ポリヌクレオチドは、ウイルス・ベクターのようなベクター中に含有させてもよく；および/またはリポソームもしくは超微粒気泡のようなマトリクスとともに製剤化してもよい。

## 【0030】

本発明の方法により治療されるガンは、例えば、ガン腫または肉腫を含むガンと関連する少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子を含むガン細胞を含む任意のガンとすることができる。一つの態様として、ガンは食道扁平上皮ガンであり、後生的な沈黙化遺伝子には表2に記載の一つまたは複数の遺伝子が含まれる。例えば、後生的な沈黙化遺伝子は、Apo D、NU、スイプロシン-2(swisprosin-2)、Hep27、KIF5C、ケラチン14、トランスグルタミナーゼ2、MUC1、IL-1 R2、クリスタリン 2、CLF-1、CRIP-1、Rad、HEM45、KLF6、ホリスタチン関連タンパク質FLRG、XAP-5、Tbc1d1、サイクリンG1相互作用タンパク質、CRBP、メタロチオネイン1G、クローディング-3、脱共役蛋白質-2、もしくはアポリポタンパク質C1遺伝子、またはその組み合わせとすることができる。一つの局面として、後生的な沈黙化遺伝子/遺伝子(複数)には、少なくとも一つのメチル化沈黙化遺伝子、例えば、Apo D、NU、CLF-1、CRIP-1、クローディング-3、脱共役蛋白質-2、メタロチオネイン1G、トランスグルタミナーゼ2、もしくはアポリポタンパク質C1遺伝子、またはその組み合わせが含まれる。別の局面として、後生的な沈黙化遺伝子/遺伝子(複数)には、少なくとも一つの腫瘍抑制遺伝子、例えば、Apo D、NU、および/またはCRIP-1遺伝子；またはニューロメジンBおよび/もしくはRGS2遺伝子；またはその組み合わせが含まれる。別の態様として、ガンは頭頸部ガンであり、後生的な沈黙化遺伝子には表5および6に記載の一つまたは複数の遺伝子が含まれる。

## 【0031】

本発明は同様に、ガン患者を治療するための治療方針を選択するための方法に関する。そのような方法は、例えば、本明細書に開示される本発明のゲノムスクリーニング方法に従って、ガンと関連する少なくとも一つの後生的に沈黙化された遺伝子を同定する段階；および患者のガン細胞中の少なくとも一つの後生的に沈黙化された遺伝子の発現を回復す

10

20

30

40

50

るのに有用な薬剤を選択する段階により行うことができる。薬剤は、例えば、後生的に沈黙化された遺伝子/遺伝子(複数)から別の方法で発現されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、例えば、Apo D、NU、スイプロシン-2(swisprosin-2)、Hep27、KIF5C、ケラチン14、トランスグルタミナーゼ2、MUC1、IL-1 R2、クリスタリン 2、CLF-1、CRIP-1、Rad、HEM45、KLF6、ホリスタチン関連タンパク質FLRG、XAP-5、Tbc1d1、サイクリンG1相互作用タンパク質、CRBP、メタロチオネイン1G、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、もしくはアポリポタンパク質C1遺伝子のような表2に掲載の遺伝子によりコードされるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはその組み合わせとすることができる。

【0032】

一つの態様として、同定される後生的な沈黙化遺伝子には少なくとも一つのメチル化沈黙化遺伝子が含まれ、選択される薬剤は、ガン細胞中の少なくとも一つのメチル化沈黙化遺伝子の発現を回復するのに有用な薬剤である。本方法の一つの局面として、選択される薬剤には、メチル化沈黙化遺伝子/遺伝子(複数)、例えば、Apo D、NU、CLF-1、CRIP-1、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、メタロチオネイン1G、トランスグルタミナーゼ2、またはアポリポタンパク質C1遺伝子により別の方法でコードされるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが含まれる。本方法の別の局面として、選択される薬剤には、脱メチル化剤、例えば、5Aza-dCが含まれる。

10

【0033】

別の態様として、同定される後生的な沈黙化遺伝子には少なくとも一つの腫瘍抑制遺伝子が含まれ、選択される薬剤は、ガン細胞中の後生的な沈黙化腫瘍抑制遺伝子によりコードされるポリペプチドを回復するのに有用な薬剤である。例えば、腫瘍抑制遺伝子は、Apo D、NU、もしくはCRIP-1遺伝子、またはニューロメジンBもしくはRGS2遺伝子、またはそのような遺伝子の組み合わせとすることができ、選択される薬剤は、Apo D、NU、CRIP-1、ニューロメジンB、および/またはRGS2遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドとすることができる。

20

【0034】

本発明は同様に、ESCCに苦しむ被検体の治療方法に関し、その場合、ESCC関連細胞は少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子を含む。そのような方法は、例えば、少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子の発現を回復させる薬剤の量を、ESCC関連細胞中の後生的な沈黙化遺伝子の発現を回復させるに足る被検体に投与する段階により行うことができ、それによって被検体を治療することができる。一つの態様として、薬剤には、少なくとも一つの後生的に沈黙化された遺伝子をコードするポリヌクレオチド、特に表2に掲載の遺伝子のコード配列を含むポリヌクレオチド、例えば、Apo D、NU、スイプロシン-2(swisprosin-2)、Hep27、KIF5C、ケラチン14、トランスグルタミナーゼ2、MUC1、IL-1 R2、クリスタリン 2、CLF-1、CRIP-1、Rad、HEM45、KLF6、ホリスタチン関連タンパク質FLRG、XAP-5、Tbc1d1、サイクリンG1相互作用タンパク質、CRBP、メタロチオネイン1G、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、もしくはアポリポタンパク質C1遺伝子のコード配列を含むポリヌクレオチド、またはその組み合わせが含まれる。

30

【0035】

別の態様として、少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子は、メチル化沈黙化遺伝子であり、被検体を治療するための薬剤には、メチル化沈黙化遺伝子によりコードされるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが含まれる。そのポリヌクレオチドには、Apo D、NU、CLF-1、CRIP-1、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、メタロチオネイン1G、トランスグルタミナーゼ2、もしくはアポリポタンパク質C1遺伝子のコード配列、またはその組み合わせが含まれてもよい。

40

【0036】

さらに別の態様として、少なくとも一つの後生的に沈黙化された遺伝子には、少なくとも一つの腫瘍抑制遺伝子が含まれ、被検体の治療方法には、被検体のESCC細胞中の腫瘍抑制遺伝子の発現を回復させる段階が含まれる。例えば、腫瘍抑制遺伝子は、Apo D、NU、もしくはCRIP-1とすることができる；またはニューロメジンB、もしくはRGS2遺伝子とす

50

ることができる；またはそのような遺伝子の少なくとも一つを含む組み合わせとすることができる；およびその薬剤は、後生的に沈黙化された腫瘍抑制遺伝子の一つまたは複数にコードするポリヌクレオチドとすることができる。本発明の方法で有効な薬剤は、被検体に対して、細胞部位に直接的に、または薬剤が被検体のESCC細胞と接触できるように局所的にもしくは全身的に投与することができる。

#### 【0037】

本発明はさらに、配列番号:1~127のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する、単離されたオリゴヌクレオチドに、ならびに配列番号:1~127に記載の単離されたオリゴヌクレオチドの少なくとも二つを含む、複数の単離されたオリゴヌクレオチドに関する。さらに、本発明は、表2に掲載されるような遺伝子のヌクレオチド配列を増幅できる、配列番号:1および2；ならびに配列番号:3および4(同様に、表3、配列番号:7および8、配列番号:9および10など；ならびに表4、配列番号:65および67または配列番号:66および67；配列番号:68および69；配列番号:70および72または配列番号:71および72などを参照されたい)により例示されるようなフォワード・プライマーおよびリバース・プライマーを含む、増幅プライマー対に関する。一つの局面として、本発明の増幅プライマー対は、メチル化5'調節領域を有するApo D遺伝子を増幅できる、配列番号:1および2により、ならびにメチル化5'調節領域を有する記載の遺伝子を増幅できる、表4；配列番号:65~124に記載のフォワード・プライマー(F1またはF2)およびリバース・プライマー(R)を含むプライマー対により例示される増幅プライマー対のように、核酸のメチル化5'調節領域を特異的に増幅するために使用することができる。別の局面として、本発明の増幅プライマー対は、非メチル化5'調節領域を有するApo D遺伝子を増幅できる、配列番号:3および4により例示される増幅プライマー対のように、核酸の非メチル化5'調節領域を特異的に増幅するために使用することができる。

10

20

#### 【0038】

本発明は同様に、本発明の少なくとも一つの単離されたオリゴヌクレオチドを含む、例えば、複数のそのような単離されたオリゴヌクレオチドを含む、キットに関する。一つの態様として、本発明のキットの複数の単離されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも一組の増幅プライマー対(例えば、フォワード・プライマーおよびリバース・プライマー)を含み、複数組の増幅プライマー対を含むことができる。従って、本発明のキットは、例えば、一つまたは複数の種類のガン細胞でメチル化により沈黙化されていることが知られているまたはその疑いがある特定遺伝子のメチル化型または非メチル化型を増幅するのに有効な、メチル化特異的プライマー対および非メチル化特異的プライマー対を含む、一組のまたは複数組の、メチル化特異的増幅プライマー対、非メチル化特異的増幅プライマー対、またはメチル化特異的増幅プライマー対および非メチル化特異的増幅プライマー対の組み合わせを含むことができる。

30

#### 【0039】

本発明のキットは、例えば、キットのオリゴヌクレオチドが有効なある目的に役立ち得る、追加試薬をさらに含むことができる。例えば、キットに一つまたは複数のメチル化特異的および/または非メチル化特異的増幅プライマーが含まれる場合、キットには、例えば、対照用ポリヌクレオチド(これはメチル化または非メチル化とすることができる)；メチル化シトシン残基を修飾する一つまたは複数の試薬、および/または増幅反応を行うための一つもしくは複数の試薬がさらに含まれ得る。キットに、メチル化遺伝子配列にまたは非メチル化遺伝子配列に選択的にハイブリダイズする一つまたは複数のオリゴヌクレオチドが含まれる場合、キットには、例えば、メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼがさらに含まれ得る。

40

#### 【0040】

発明の詳細な説明

本発明は、調節不能な増殖を示す、または示すと疑われる素地を与える細胞のゲノム、例えば、ガン細胞のゲノムにおいて後生的に沈黙化された遺伝子、特に腫瘍抑制遺伝子を同定するための方法の開発に基づく。その方法は、脱メチル化剤、ヒストン脱アセチル化

50

酵素阻害剤、またはその両方で処理後の食道扁平上皮ガン(ESCC)細胞において上方制御された、メチル化沈黙化遺伝子および腫瘍抑制遺伝子を含む、遺伝子565個の同定により例示される(表1を参照されたい)。さらに、共通して上方制御された遺伝子58個が同定され、そのうちの53個には、高密度のCpGアイランドが含まれていた遺伝子44個を含め、CpGアイランドが含まれていた。遺伝子53個のうちの25個が無作為に選択され、脱メチル化で処理後に強力な再発現を示すことが分かった、そしてこれらの遺伝子のうちの3個が腫瘍抑制活性を有することが確認された(実施例1を参照されたい)。さらに、ゲノムスクリーニング方法は、頭頸部扁平上皮ガン(HNSCC)細胞において後生的に沈黙化された遺伝子の同定によりさらに例示される(表5および6、ならびに実施例2を参照されたい)。従って、本発明により、後生的に沈黙化されたガン関連遺伝子を同定するための方法が提供される、

10

ならびに遺伝子発現の後生的な沈黙化と関連性のあるガンの同定方法、そのようなガンを患う患者の治療方法、およびそのような方法を実践するために有効な組成物がさらに提供される。

#### 【0041】

プロモーターの高メチル化は、腫瘍抑制遺伝子の不活化に対する共通経路である。本明細書に開示されるように、メチル化された遺伝子を、食道ガン細胞株における後生的な沈黙化の薬物によるアンマスキングに基づいて同定するための方法が提供される。この研究方法および選択アルゴリズムは、原発性食道腫瘍組織において新規のメチル化遺伝子を多数同定する際に強力である。同定されたメチル化遺伝子により、診断のおよび治療の標的が得られ、腫瘍生物学への洞察がさらに得られる。同定された遺伝子のうちの3個、即ち

20

、ニューロメジンU(NU)、システインを豊富に含む腸管タンパク質1(CRIP1)、およびアポリポタンパク質D(Apo D)は、ガン細胞で過剰発現させると、有力な腫瘍抑制活性を示した。

#### 【0042】

ESCC細胞で共通して不活化された腫瘍抑制遺伝子の包括的調査は、後生的に沈黙化された腫瘍抑制遺伝子が5-アザ-2'-デオキシシチジン(5Aza-dC)およびトリコスタチンA(TSA)により機能的に再活性化されることに基づき、遺伝子12,599個を含むマイクロアレイを用いて行った。この研究方法により同定された遺伝子58個のなかで、44個(76%)がプロモーター領域に高密度のCpGアイランドを有していた。試験した22個のうち13個の遺伝子のプロモーターが細胞株でメチル化され、そのうちの10個の遺伝子は原発性ESCC細胞で、mRNA

30

レベルでの沈黙化を伴っていた。ESCC細胞におけるCRIP1、Apo D、およびNUを含む3個の遺伝子の潜在的な増殖抑制活性がコロニーフォーカス検定法により実証された。本明細書に開示される結果により、後生的な沈黙化を薬理的に反転させることは、ヒトのガンにおける腫瘍抑制遺伝子を包括的に同定するための強力な研究方法であることが実証される。

#### 【0043】

食道ガンは、8番目に多い悪性腫瘍であり、全世界的に見て6番目に頻度の高い死因として位置付けられている(Pissaniら、Int. J Cancer 80:870~873, 1999)。組織型が異なる食道ガンの頻度は変化するが、世界的に扁平上皮ガンが優勢型である。かなりの疫学的証拠から、アルコール、タバコ、ビタミン/保護性酸化防止剤が不足した食事制限、発癌性

40

物質(例えば、漬け物を頻繁に摂取すること)および火傷がESCCの病因として重要であることが示唆される(例えば、Chenら、Int. J. Cancer 820~822, 1995; Garidouら、Int. J. Cancer 68:295~299, 1996を参照されたい)。分子生物学の近年の進歩により、ヒトのESCCにおけるp53およびp16/Rb腫瘍抑制経路の共通性の遺伝的なおよび/または後生的な変化が明らかとなった(Xuら、Cancer Res. 62, 3493~3497, 2002; Montesanoら、Int. J. Cancer 69:225~235, 1996; Mandardら、Mutat. Res. 462:335~342, 2000)。分子標的のさらなる同定により、分子レベルで取り組まれる、ESCCの予防、診断、および治療が可能となるものと思われる。しかし、その他のガンでも同様であるが、ESCCで共通して不活化された腫瘍抑制遺伝子(TSG)の全ゲノムでの包括的調査は、つかみどころのないままである。

## 【 0 0 4 4 】

遺伝的变化に加えて、哺乳類細胞に含まれる後生的な過程である、DNAメチル化の変化は同様に、ヒトのガンの特徴である(Baylinら、Hum. Mol. Genet. 10:687~692, 2001)。多くの遺伝子、特に「ハウスキーピング(細胞の生存に基本的に必要な)」遺伝子のプロモーター領域には、多くのCpGジヌクレオチド(これはゲノムの残りの部分では少ない比率で見られることが多い)が存在する。これらの領域は「CpGアイランド」と呼ばれ、そして、不活化X染色体上の遺伝子および刷込み遺伝子を除いて、CpGアイランドは、正常細胞ではメチル化から保護されている(Baylinら、前掲、2001を参照されたい)。CpGアイランドのメチル化は、その特定遺伝子の発現の消失と関連するため、この保護には重要な意味がある。発ガンでは、広範囲の高メチル化には、特定のプロモーターの高密度の高メチル化が伴われることが多い(Yoshikawara、Nature Genet. 28:29~35, 2001、これは参照として本明細書に組み入れられる；同様に、Merloら、Nature Med. 1:686, 1995；Dammannら、Nat. Genet. 25:315~319, 2000；Liら、Cell 109:113~124, 2002を参照されたい)。多くの研究から、プロモーターの高メチル化と関連する腫瘍抑制遺伝子の沈黙化は、ヒトのガンに共通する特徴であり、腫瘍抑制遺伝子の機能の喪失に対する別の機構としての役割を果たしていることが実証されている。例えば、p16遺伝子の高メチル化は、発現の消失と関連しかつ多くの悪性の充実性腫瘍の共通の特徴であった(Merloら、前掲、1995)。高メチル化は同様に、腫瘍抑制遺伝子VHLの不活性化とも関連し、不活性化点突然変異がない明細胞腎ガンの一部に生じていた(Hermanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9700~9704, 1994；Meyerら、Int. J. Cancer 5:650~653, 2000)、その上、高メチル化と関連するp15発現の消失は、多くの急性白血病の特徴であった(Hermanら、Cancer Res. 56:722~727, 1996)。誤対合修復遺伝子のようなその他の腫瘍抑制遺伝子の転写沈黙化によって、ヒトのガンにおける腫瘍抑制機能の喪失に共通する機構として高メチル化が定着した。従って、ヒトのガンにおいて遺伝的なおよび後生的な不活化の両方を示す腫瘍抑制遺伝子の数が増加している。

## 【 0 0 4 5 】

プロモーターの高メチル化は、遺伝子発現の沈黙化と関連しているので、「メチローム」(Feinberg, Nat. Genet. 27:9~10, 2001)と呼ばれることもある、全ゲノムのメチル化パターンに関する知識により、腫瘍形成の間に不活化されるTSGを同定可能とする手段が提供され得る。ゲノムDNAに取り込まれてメチル基転移酵素の活性部位と共有結合複合体を形成する、5Aza-dCが、後生的な不活化を解明するために使用されている。この自殺阻害によりメチル基転移酵素活性が減少される結果、全般的な脱メチル化がもたらされる。しかし、クロマチンはDNAとヒストンの複合体であり、ヒストンアセチル化も同様に遺伝子転写を低下させる(Pennisi, Science 275:155~157, 1997；Marksら、Nat. Rev. Cancer 3:194~202, 2001)。さらに、DNAメチル化は、ヒストンアセチル化を形成する補助となる(GrayおよびTeh, Curr. Mol. Med. 1:401~429, 2001)。メチル化-CpG-結合タンパク質MeCP2は、ヒストン脱アセチル化酵素活性を有する複合体中に存在すると思われ、さらにDNAメチル基転移酵素はヒストン脱アセチル化酵素2(HDAC2)およびコリプレッサーのDMAP1に結合する(Rountreeら、Nat. Genet. 25:269~277, 2000)。このように、高密度にメチル化されたDNAは、低アセチル化ヒストンの存在を特徴とする転写抑制クロマチンと関係している。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤TSAは、鋳型のメチル化プロモーター上での転写抑制クロマチンの形成を逆行させる(YoshidaおよびHorinouchi, Ann. NY Acad. Sci. 886:23~36, 1999)。後生的な変化はこのように動的に関連し、脱メチル化剤とTSAを用いたヒストン脱アセチル化阻害との間の相乗効果により、5Aza-dC単独よりも強力に、ガンで沈黙化されていた遺伝子が再活性化された(Cameronら、Nature Genet. 21:103~107, 1999；Suzukiら、Nature Genet. 31:141~149, 2002)。本明細書に開示されるように、5Aza-dCおよびTSAを用いたESCC細胞の薬物によるアンマスキングに続いて、cRNAマイクロアレイ解析により、ガンで後生的に不活化された遺伝子が包括的に同定された。この研究方法により、高密度のプロモーターの高メチル化を有する多数の遺伝子が同定され、そしてさらに調査したところ、同定された遺伝子の一部は原発性腫瘍で高頻度に不活化されか

つ腫瘍抑制活性を示すことが明らかとなった。

【0046】

従って、ガンに関連する主要抑制遺伝子を含む、後生的に沈黙化された遺伝子、例えば、メチル化により沈黙化された遺伝子を同定するための方法が提供される。一つの態様として、本発明により、少なくとも一つのガンに関連する、少なくとも一つの後生的に沈黙化された遺伝子の同定方法が提供される。本明細書では、「少なくとも一つの」という用語は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上を意味する。例えば、開示のマイクロアレイ法により、ESCC細胞において脱メチル化剤および/またはヒストンデアセチラーゼ阻害剤での処理後に上方制御される能力により判定されるものとして、後生的に沈黙化されていた565個の遺伝子が同定された。さらに、ESCCで後生的に沈黙化されたと同定された遺伝子のいくつかは、TSGの予測された特性を有していることが確認された(表2、5、および6も参照のこと)。

10

【0047】

「後生的に沈黙化された」という用語は、遺伝子に関して使用される場合、遺伝的变化以外の機構により、遺伝子が転写されていないこと、または対応する対照細胞(例えば、正常細胞)における遺伝子の転写レベルに対して低下したレベルで転写されていることを意味する。遺伝子沈黙化の後生的な機構は、よく知られており、例えば、遺伝子の5'調節領域のCpGアイランドのCpGジヌクレオチドの高メチル化、および遺伝子転写が低下されるかまたは阻害されるような、例えば、ヒストンのアセチル化によるクロマチンの構造変化を含む。後生的な遺伝子沈黙化を検出するための方法が、本明細書に開示され、そしてその方法には、例えば、沈黙化が高メチル化による場合、後生的な沈黙化を取り除く薬剤との、例えば、脱メチル化剤との細胞の接触後の遺伝子の再発現(再活性化)を検出する段階が含まれる。

20

【0048】

本明細書では、「メチル化」または「高メチル化」という用語は、遺伝子に関して使用される場合、遺伝子と関連するCpGアイランドのCpGジヌクレオチドのシトシン残基が5'位でメチル化される、即ち、5'-メチルシトシンであることを意味する。「メチル化状態」という用語は、本明細書では、CpGアイランドのCpGジヌクレオチドのメチル化シトシン残基の、その有無を含めて、相対存在量について言及するために使用される。一般に、CpGアイランドのシトシン残基は、転写活性遺伝子ではメチル化されず、従って、CpGアイランドのメチル化シトシン残基の検出により、遺伝子発現が低下するかまたは阻害されることが示唆される。従って、本明細書において「メチル化沈黙化」遺伝子とは、遺伝子の5'調節領域のCpGアイランドのCpGジヌクレオチドの高メチル化により、遺伝子が転写されていないこと、または対応する対照細胞(一般に、正常細胞)における遺伝子の転写レベルに対して低下したレベルで遺伝子が転写されていることを意味する。遺伝子発現のメチル化による沈黙化の結果は、細胞中で通常その遺伝子産物によるものとされるあらゆる機能が低下するかまたはなくなるほど、遺伝子を含む細胞が、その遺伝子によりコードされるポリペプチド(即ち、遺伝子産物)の量を減らされるか、または完全に失うことである。

30

【0049】

本発明は、少なくとも一つの後生的に沈黙されたガン関連遺伝子の同定方法に関する。そのような方法は、例えば、ゲノムを代表するヌクレオチド配列のアレイを、後生的に沈黙化された遺伝子の発現を再活性化させる少なくとも一つの薬剤と接触させたガン細胞で発現されたRNAに対応する核酸と、アレイの相補的なヌクレオチド配列との核酸の選択的ハイブリダイゼーションに適した条件の下で接触させる段階; および前記の条件の下で、薬剤/薬剤(複数)と接触させたガン細胞の核酸の、アレイのヌクレオチド配列の部分母集団とのハイブリダイゼーションの増加を、もしあれば、ガン細胞で発現されたRNAに対応する核酸の、ヌクレオチド配列のその部分母集団の少なくとも一つのヌクレオチド配列とのハイブリダイゼーションのレベルと比較して検出する段階により行うことができ、選択的ハイブリダイゼーションの増加によって、後生的に沈黙化された遺伝子の発現の再活性化が同定される。

40

50

## 【0050】

本明細書では、「ゲノムを代表するヌクレオチド配列のアレイ」という用語は、固体支持体、例えば、マイクロチップまたはガラススライドに連結される、組織化されたヌクレオチド配列群を意味し、その配列は、細胞で発現される核酸に特異的かつ選択的にハイブリダイズすることができる。アレイは、被検細胞の由来生物に基づいて選択され、そして、故に、一般に、真核生物の細胞、特に哺乳類の細胞、および好ましくはヒトの細胞のゲノムを代表する。一般に、ゲノムを「代表」するプローブのアレイにより、細胞で発現される核酸の少なくとも約10%、一般には少なくとも約20%または40%、通常は約50%~70%、とりわけ少なくとも約80%または90%が同定されるものと思われ、そして好ましくは発現される核酸の全てが同定されるものと思われる。当然のことながら、その代表(数)が大きくなれば、ガンで後生的に沈黙化された遺伝子の全てが同定される可能性も高くなると思われる。特定のゲノムを代表するヌクレオチド配列を含むアレイは、周知の方法により調製することができる、または本研究(実施例1を参照されたい)で使用されたGeneChip(商標) Human Genome U95AV2アレイ(Affymetrix)により例示されるように、商業的供給源(例えば、Affymetrix; Invitrogen社)から入手することができる。

10

## 【0051】

本明細書において、細胞の「RNAに対応する核酸」とは、mRNAもしくはポリA<sup>+</sup> RNAのようなRNA、細胞から鋳型としてRNAを用いて生成されるcDNA、または鋳型としてRNAもしくはcDNAを用いて生成されるcRNAを意味する。本発明の方法を実践するため、細胞のRNAに対応する核酸は一般に、例えば、放射性同位体、常磁性同位体、発光化合物、化学発光化合物、蛍光化合物、金属キレート、酵素、酵素に対する基質、受容体、または受容体に対するリガンドで検出可能に標識される；またはアレイのヌクレオチド配列との核酸のハイブリダイゼーションが検出され得るように、例えば、検出可能に標識されたプローブを用いて検出され得る。従って、アレイのヌクレオチド配列と接触させる、RNAに対応する核酸は、例えば、cDNA、cRNA、mRNA、または細胞で発現されたRNAを代表するその他の核酸を含む、DNAまたはRNAとすることができる。後生的に沈黙化された遺伝子の発現を再活性化させる薬剤は、メチル基転移酵素阻害剤(例えば、5Aza-dC)のような脱メチル化剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(例えば、TSA)、またはその組み合わせとすることができる。

20

## 【0052】

本発明の方法によれば、少なくとも1つ(例えば、1、2、3、4、5、またはそれ以上)の後生的に沈黙化された遺伝子を、少なくとも1つ(例えば、1、2、3、またはそれ以上)のガンと関連付けることができる。ガンは、例えば、一つまたは複数の特定の種類のガン、例えば、消化管/胃腸管ガン、肝臓ガン、皮膚ガン、乳ガン、卵巣ガン、前立腺ガン、リンパ腫、白血病、腎臓ガン、肺ガン、筋肉腫、骨肉腫、または脳腫瘍を含む、ガン腫または肉腫とすることができる。後生的に沈黙化されたガン関連遺伝子は、ESCCと関連する、表2に掲載の遺伝子(そしてそれらにはGenBankアクセッション番号が付与されている)により本明細書に例示される。表2に関して、脱メチル化剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、またはその組み合わせとの細胞の接触により再活性化され得る、ESCC細胞で後生的に沈黙化された遺伝子には、アポリポタンパク質D(Apo D)遺伝子、ニューロメジンU(NU)遺伝子、スイプロシン-2(swisprosin-2)遺伝子、Hep27遺伝子、KIF5C遺伝子、ケラチン14遺伝子、トランスグルタミナーゼ2遺伝子、MUC1遺伝子、インターロイキン-1受容体2(IL-1 R2)遺伝子、クリスタリン 2遺伝子、LIMを有するシステインに富むタンパク質(CRIP-1)遺伝子、Rad遺伝子、HEM45遺伝子、KLF6遺伝子、ホリスタチン関連タンパク質FLRG遺伝子、XAP-5遺伝子、Tbc1d1遺伝子、サイクリンG1相互作用タンパク質遺伝子、またはその組み合わせが含まれる。

30

40

## 【0053】

一つの態様として、後生的に沈黙化された遺伝子には、Apo D遺伝子、NU遺伝子、スイプロシン-2(swisprosin-2)遺伝子、サイトカイン-様因子-1(CLF-1)遺伝子、CRIP-1遺伝子、細胞性レチノール結合タンパク質(CRBP)遺伝子、メタロチオネイン1G遺伝子、ケラチン

50

14遺伝子、IL-1 R2遺伝子、またはクリスタリン 2遺伝子の一つまたは複数が含まれる。別の態様として、少なくとも一つの後生的に沈黙化された遺伝子は、メチル化沈黙化遺伝子、例えば、Apo D、NU、CLF-1、CRIP-1、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、メタロチオネイン1G、トランスグルタミナーゼ2、もしくはアポリポタンパク質C1遺伝子、またはその組み合わせである。さらに別の態様として、後生的に沈黙化された遺伝子は、腫瘍抑制遺伝子、例えば、Apo D遺伝子、NU遺伝子、またはCRIP-1遺伝子(これらのそれぞれが、本明細書に開示されるように、腫瘍抑制活性を示す); ならびに/またはニューロメジンB遺伝子および/もしくはGタンパク質シグナル伝達受容体2(RGS2)遺伝子である。

#### 【0054】

通常はメチル化されていない遺伝子プロモーター領域中のCpGジヌクレオチドの異常なDNAメチル化と関連した遺伝子転写の沈黙化は、腫瘍形成において最も広く研究されている後生的な異常である。メチル-CpG-結合ドメイン、転写のコリプレッサー、クロマチン再構成タンパク質およびヒストン脱アセチル化酵素からなるタンパク質複合体の高メチル化DNA領域への結合により、転写が抑制化(沈黙化)されたクロマチン状態が引き起こされる。真核細胞では、グアノシン残基のすぐ5'側のシトシン残基のメチル化は、CGに乏しい領域で優先的に起こる。これに対して、CpGアイランドは一般に、X染色体の不活性化および親特異的刷込みの間(この場合、5'調節領域のメチル化が転写抑制と結びつく)を除いて、正常細胞ではメチル化されないままである。網膜芽細胞腫(Rb)遺伝子の新規メチル化が、ごく一部の網膜芽細胞腫で実証されており(Sakaiら、Am. J. Hum. Genet. 48:880, 1991)、VHL遺伝子の異常なメチル化が、散発性腎細胞ガン腫の一部で発見された(Hermanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9700~9704, 1994)。腫瘍抑制遺伝子の発現は同様に、通常はメチル化されていない5' CpGアイランドのDNAの新規メチル化によっても消失し得る(例えば、Issaら、Nature Genet. 7: 536, 1994; Merloら、Nature Med. 1: 686, 1995; Hermanら、Cancer Res. 56: 722, 1996を参照されたい)。

#### 【0055】

CpGアイランドのプロモーター領域の異常なメチル化は同様に、ガンの発生とも関連していた。造血器悪性腫瘍では、例えば、E-カドヘリンの高メチル化(Graffら、Cancer Res. 55: 5195~5199, 1995)、DAP-キナーゼの高メチル化(Katzenellenbogenら、Blood 93: 4347~4353, 1999)、ならびに細胞周期調節因子p15<sub>INK4B</sub>およびp16<sub>INK4A</sub>の高メチル化が、遺伝子不活化と関連している(Hermanら、Cancer Res. 57:837~841 1997; Melkiら、Blood 95:3208~3213, 2000; Ngら、Clin. Canc. Res. 7:1724~1729, 2001)。高メチル化による転写沈黙化は同様に、CDKN2A遺伝子(Hermanら、Cancer Res. 55:4525~4530, 1995)、MGMT(Estellerら、Cancer Res. 59: 793~797, 1999)、およびMLH1遺伝子(Hermanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6870~6875, 1998)でも検出された。

#### 【0056】

染色体位置17p13.3のCpGアイランドの高メチル化は、ヒトのガンの多くの共通型において観測されており(Makosら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1929, 1992; Makosら、Cancer Res. 53:2715, 1993; Makosら、Cancer Res. 53:2719, 1993)、そして脳腫瘍、結腸ガン、および腎臓ガンにおける17p喪失およびp53突然変異のタイミングや頻度と符号している。通常はメチル化されていないプロモーター領域のCpGアイランドの高メチル化に関する遺伝子転写の沈黙化は、腫瘍抑制遺伝子を不活化するためのコード領域の突然変異のもう一つの機構と見なされている(Baylinら、Cancer Cells 3:383, 1991; JonesおよびBuckley, Adv. Cancer Res. 54:1~23, 1990)。この変化は同様に、第3染色体短腕(3p)上の腎臓ガンの腫瘍抑制遺伝子であるVHL(Hermanら、上記, 1994)、第6染色体長腕(6q)上のエストロゲン受容体遺伝子(Ottavianoら、Cancer Res. 54:2552, 1994)、および第11染色体短腕(11p)上のH19遺伝子(Steenmanら、Nature Genetics, 7: 433, 1994)の発現の喪失とも関連付けられている。

#### 【0057】

本発明は同様に、調節不能な増殖を示すまたは示す素因を呈する細胞を同定するための方法に関する。そのような方法は、例えば、試験細胞において、表2に記載の少なくとも

10

20

30

40

50

一つの遺伝子の後生的な沈黙化、またはそのような遺伝子の組み合わせを検出する段階により行うことができる。一つの態様として、本発明の方法には部分的に、試験細胞または試料中の遺伝子のメチル化状態を、調節された増殖を示す対応細胞中の対応遺伝子のメチル化状態と比較することが必要とされる。本明細書では、「対応(する)」という用語は、試験物質が比較されている基準物質を意味する。一般に、基準物質とは、試験物質が比較される対照または標準を示す。例えば、メチル化状態が調べられているApo D遺伝子に対して、対応する非メチル化Apo D遺伝子とは、非メチル化Apo D遺伝子が、メチル化状態が調べられているApo D遺伝子と同じ種類の遺伝子であること、例えば、試験遺伝子および対応する非メチル化遺伝子がともにヒトのApo D遺伝子であることを意味する。試験細胞に対して、調節された増殖を示す対応細胞とは一般に、正常細胞、即ち、健常者におけるその細胞集団に特徴的な細胞周期および増殖様式を有する細胞、例えば、検査されている試験細胞がESCC細胞である疑いがある場合、正常な食道上皮細胞を指す。

10

**【0058】**

本発明の方法は、試験細胞、または全部もしくはメチル化状態について調べられる遺伝子の5'調節領域のCpGアイランドを含む一部分を含有する、細胞の核酸、特にゲノムDNAを含む試験細胞の抽出物、を含む試料を用いて実践することができる。一般に、試験細胞は、調節不能な増殖を示す細胞の疑いがある細胞、例えば、疑わしい病巣の生検試料である、または前ガン状態のもしくは悪性の細胞に近接する(または近接していた)細胞、例えば、疑わしい病巣部位の外側の1箇所または数箇所採取される細胞試料であって、その試験細胞により、例えば、外科手術を行うべき度合いの指標が得られる、または切除縁から採取される細胞試料であって、その試験細胞は、ガンが完全に切除されたかどうかを決定するために、もしくはガンが再発したかどうかを決定するために有効である。

20

**【0059】**

本発明の方法により調べられる試験細胞は同様に、例えば、培養系が樹立された細胞と実質的に同じ増殖特性を示す初代培養細胞を樹立する目的で、または被検体に再投与するために細胞を処理するおよび/もしくは増殖させる目的で、被検体から得られかつ培養液中に入れられた初代細胞とすることができる。例えば、一つまたは複数のガン関連遺伝子の発現のメチル化による沈黙化を示す、食道の上皮細胞は、ESCCを患うガン患者から得ることができる。沈黙化された遺伝子/遺伝子(複数)の発現を回復させる能力を目的として試験される一つまたは複数の薬剤を用いて、その細胞を培養液中で処理することが可能であり、それによってそのガン患者、または一つまたは複数の同一遺伝子のメチル化による沈黙化を特徴とするESCCを患う他の患者を治療するのに有効となり得る薬剤を同定する手段が提供される。

30

**【0060】**

試験細胞は、細胞を含む試料を得る臨床場面で通常使用される任意の方法で被検体から得ることができる。例えば、試験細胞(または試験細胞を含む試料)は、試験される細胞を含む器官または組織の針生検のような生検法により得ることができる。従って、試験細胞は、消化管試料、胃腸管試料、肝臓試料、骨髄試料、皮膚試料、リンパ節試料、腎臓試料、肺試料、筋肉試料、骨試料、脳試料などから得ることができる。試験細胞は同様に、生体液成分、例えば、血液、リンパ液、脳脊髄液、唾液、喀痰、大便、尿、または射精液とすることもできる。適切な場合、試験細胞は同様に、結腸、子宮、腹腔などから試験細胞を得るための、例えば、洗浄により、または骨髄試料を得るための、例えば、吸引法により得ることもできる。

40

**【0061】**

本発明の方法は同様に、全部または調べられる遺伝子もしくは遺伝子(複数)の部分を含むCpGアイランド、を含む試験細胞の核酸、特にゲノムDNAを含む、試験細胞の抽出物を用いて実践することもできる。抽出物は、例えば、試験細胞を含む組織の凍結融解試料を含む、未精製抽出物とすることができる;例えば、核マトリクスの成分を含み得る、部分的に精製されたゲノムDNAを含むことができる;または例えば、タンパク質分解酵素およびアルコール沈殿による処理後に得られる、実質的に精製されたゲノムDNAを含むことがで

50

きる。ある種の態様として、試験細胞は同様に、パラフィン中に包埋される組織学的試料の成分とすることもできる。

#### 【0062】

後生的な沈黙化にメチル化による沈黙化が含まれる場合、調節不能な増殖を示すまたは示す素因を呈する細胞を同定するための方法は、細胞の一つまたは複数の標的遺伝子のメチル化を検出する段階により行われる。核酸のCpGメチル化を検出するためのさまざまな周知の方法のいずれかを用いて、遺伝子のCpGアイランドのCpGジヌクレオチドのメチル化を検出することができる。そのような方法には、修飾の有無が検出可能とされるように、非メチル化シトシン残基またはメチル化シトシン残基のどちらかを選択的に修飾するが、その両方ではない一つまたは一連の化学試薬と遺伝子を接触させる段階；配列の切断の有無が検出可能とされるように、CpGジヌクレオチドを含む認識部位を有し、CpGのメチル化シトシン残基が有るかCpGのメチル化シトシン残基が無いかのどちらかであるが、その両方ではない認識部位を切断するメチル化感受性制限エンドヌクレアーゼと遺伝子配列を接触させる段階；または遺伝子配列に選択的にハイブリダイズしかつCpGメチル化が存在するかどうかについて決定することを可能とする、オリゴヌクレオチド・プローブ、プライマー、または増幅プライマー対と遺伝子を含む核酸を接触させる段階が含まれる。そのような方法の例が本明細書に提供されており、そのような方法に対する変更および変形は、当技術分野においてよく知られている。

10

#### 【0063】

標的遺伝子のメチル化は、例えば、CpGジヌクレオチドのメチル化されるシトシン残基を含む5'調節領域中の認識部位を切断する、メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼと、遺伝子を含む核酸の5'調節領域を含む領域を接触させることにより検出することができ、核酸の切断によりメチル化および、故に、試験細胞の遺伝子のメチル化による沈黙化が示される。メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼはよく知られており、例えば、Acc III、Ban I、BstN I、MspI、およびXma Iを含む。或いは、またはさらに、メチル化による沈黙化は、CpGジヌクレオチドのメチル化されるシトシン残基を含む5'調節領域中の認識部位を、CpGジヌクレオチドのシトシン残基がメチル化されていない場合に切断する、メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼと、遺伝子を含む核酸の5'調節領域を含む領域を接触させることにより検出することができ、核酸が切断されないことにより試験細胞の遺伝子のメチル化による沈黙化が示される。そのようなメチル化感受性制限エンドヌクレアーゼは、Acc II、Ava I、BssH II、BstU I、Hpa II、およびNot Iにより例示される。

20

30

#### 【0064】

メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼによる標的遺伝子配列を含む核酸の切断の有無は、ポリヌクレオチド配列の長さまたは連続性を検出するのに有用な任意の方法を用いて同定することができる。例えば、標的遺伝子配列の切断は、切断部位の地図作製を可能とする、サザンブロット解析により、または相対サイズ、電荷、もしくはその組み合わせに基づいて核酸を分離する、その他の電気泳動法もしくはクロマトグラフィー法を用いて検出することができる。標的遺伝子の切断は同様に、オリゴヌクレオチド連結アッセイにより検出することもでき、このアッセイ法では、制限エンドヌクレアーゼとの接触後に、その標的遺伝子配列と、制限エンドヌクレアーゼ切断部位の上流かつ近傍に選択的にハイブリダイズする第一オリゴヌクレオチドならびにその切断部位の下流かつ近傍に選択的にハイブリダイズする第二オリゴヌクレオチドを接触させ、そしてさらに、切断されていない場合には、その二つのオリゴヌクレオチドは相互に近接してともに連結されるが、切断されている場合には、連結が起こらないように、リガーゼと接触させる。連結反応後、オリゴヌクレオチドのサイズまたはその他の関連パラメータを決定することにより、連結されたオリゴヌクレオチドを、連結されていないオリゴヌクレオチドと区別することができ、それによって制限エンドヌクレアーゼ活性の指標が得られる。

40

#### 【0065】

遺伝子のメチル化による沈黙化は同様に、試験細胞の遺伝子を含む核酸の5'調節領域を、非メチル化シトシン残基またはメチル化シトシン残基のどちらかを選択的に修飾する化

50

学試薬と接触させること、およびその接触により産生される産物を検出することにより検出することができ、その際に産物により遺伝子のCpGジヌクレオチドのシトシン残基のメチル化が示され、それによって試験細胞の遺伝子のメチル化による沈黙化が検出される。例えば、産物は、電気泳動法、クロマトグラフィー法、質量分析法、またはそのような方法の組み合わせにより検出することができる。

#### 【0066】

本態様の一つの局面として、遺伝子を、シトシン残基を修飾するがメチル化シトシン残基を修飾しない、ヒドラジンと接触させ、次にヒドラジンで処理された遺伝子配列を、ヒドラジン修飾シトシン残基で核酸を切断する、ピペリジンのような試薬と接触させ、それによって断片を含む産物を生じさせる。例えば、電気泳動法、クロマトグラフィー法、または質量分析法を用いて、分子量に応じて断片を分離することと、その分離パターンを、同じように処理された対応する非メチル化遺伝子配列のパターンと比較することで、ギャップによりメチル化シトシン残基を含んだ試験遺伝子の位置が明らかとなる。従って、ギャップの存在により、試験細胞の標的遺伝子のCpGジヌクレオチドのシトシン残基のメチル化が示される。

10

#### 【0067】

別の局面として、標的遺伝子を含む核酸を、重亜硫酸イオン、例えば、重亜硫酸ナトリウムを含む化学試薬と接触させて、非メチル化シトシン残基を重亜硫酸塩修飾シトシン残基に変換し、次いで重亜硫酸イオン処理遺伝子配列を、アルカリ条件に曝して、重亜硫酸塩修飾シトシン残基をウラシル残基に変換する。重亜硫酸ナトリウムは、シトシンの5,6-二重結合と容易に反応して(しかし、メチル化シトシンとはそれほど反応しない)脱アミノ化を起こし易いスルホン化シトシン反応中間体を形成し、その結果、スルホン化ウラシルを生じる。従って、スルホネート基は、アルカリ条件に曝すことにより除去可能であり、結果としてウラシルが形成される。その後、DNAを、例えば、PCRにより増幅し、全てのCpG部位のメチル化状態を決定するために塩基配列決定することができる。ウラシルは、Taqポリメラーゼによりチミンとして認識されるため、PCRを行うと、得られる産物には、最初の鋳型DNA中で5-メチルシトシンが存在していた場所にだけシトシンが含まれる。試験細胞の重亜硫酸イオン処理遺伝子配列中のウラシル残基の量または分布を、同様に処理された非メチル化対応配列と比較して、試験細胞由来の遺伝子でウラシル残基の量または分布の減少が検出されることにより、試験細胞の標的遺伝子中のCpGジヌクレオチドのシトシン残基のメチル化が示される。ウラシル残基の量または分布は同様に、重亜硫酸イオン処理標的遺伝子配列を、アルカリ条件への暴露後に、ウラシル残基を含むかまたはウラシル残基を欠くかのどちらかであるが、その両方ではない、標的遺伝子のヌクレオチド配列に選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドと接触させて、オリゴヌクレオチドの選択的ハイブリダイゼーション(またはそれがいないこと)を検出することにより、検出することもできる。

20

30

#### 【0068】

本明細書では、「選択的ハイブリダイゼーション」または「選択的にハイブリダイズする」または「特異的ハイブリダイゼーション」という用語は、中ストリンジェントのまたは高ストリンジェントの条件の下で、生じかつ安定である二つの核酸の相互作用を指す。従って、選択的ハイブリダイゼーションは、例えば、オリゴヌクレオチドと標的核酸との間で選択的に起こり、オリゴヌクレオチドと標的核酸以外の核酸(標的核酸に関連するが遺伝子ファミリーの別のメンバーをコードする核酸ではないものを含む)との間では実質的に起こらない。一般に、標的核酸に選択的にハイブリダイズするプローブまたはプライマーとして有用なオリゴヌクレオチドは、長さが少なくとも約12~15ヌクレオチド、一般に、長さが少なくとも約18~20ヌクレオチド、通常、長さが少なくとも約21~25ヌクレオチド、および特に、長さが約26~35ヌクレオチドまたはそれ以上である。本発明の方法を実践する際に有用なオリゴヌクレオチドの例は、配列番号:1~127の記載に含まれ、それらは表2に記載した遺伝子を試験するのに有用である。本発明の方法を実践するのに有用なさらなるオリゴヌクレオチドは、本開示ならびに表2に記載のGenBankアクセッションナ

40

50

ンバーで入手可能なヌクレオチド配列に基づいて設計することが可能である。

【0069】

選択的ハイブリダイゼーションを可能とする条件は、実験的に決定することができる、または例えば、ハイブリダイズするオリゴヌクレオチドおよび標的核酸の相対GC:AT(またはGC:AU)含量、ハイブリダイズするオリゴヌクレオチドの長さ、ならびにもしあれば、オリゴヌクレオチドとオリゴヌクレオチドがハイブリダイズする標的配列との間の誤対合の数に基づいて推測することができる(例えば、Sambrookら、「Molecular Cloning」: A laboratory manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989)を参照されたい)。従って、特定のレベルのストリンジェンシーを得るために使用される条件は、ハイブリダイズする核酸の性質により変化するものと思われる。他に考慮すべき点としては、核酸の一方を、例えば、フィルター膜に固定化させるかどうかという点が挙げられる。段階的に高くなるストリンジェンシー条件の例は、次の通りである: 約室温で2×SSC/0.1% SDS(ハイブリダイゼーション条件); 約室温で0.2×SSC/0.1% SDS(低ストリンジェンシー条件); 約42°Cで0.2×SSC/0.1% SDS(中ストリンジェンシー条件); および約62°Cで0.1×SSC(高ストリンジェンシー条件)。ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄は、これらの条件のうちの一つだけ、例えば、高ストリンジェンシー条件を用いて行うことが可能であり、またはこれらの条件のいずれかを用いることが可能であり、例えば、列挙したステップのいずれかまたは全てを上記の順にそれぞれ10~15分間繰り返して使用することもできる。

10

【0070】

標的遺伝子(例えば、表2に掲載の遺伝子)とのオリゴヌクレオチドの選択的ハイブリダイゼーションは、例えば、検出可能な標識を含むオリゴヌクレオチドを用いる方法を行うことにより検出することができる。検出可能な標識は、都合よくオリゴヌクレオチドに連結できかつ簡単に利用可能な装置を用いて検出できる、任意の分子とすることができる。例えば、検出可能な標識は、Cy3、Cy5、Fam、フルオレセイン、ローダミン、または緑色蛍光タンパク質もしくはその増強型か改良型のような蛍光化合物; イオウ-35、テクネシウム-99、リン-32、トリチウムまたはヨウ素-125のような放射性核種; 炭素-13、Gd-157、Mn-55、Dy-162、Cr-52またはFe-56のような常磁性磁気標識; エクオリンのような発光化合物; 化学発光化合物; 金属キレート; ルシフェラーゼもしくは $\beta$ -ガラクトシダーゼのような酵素、または酵素に対する基質; または受容体もしくは受容体に対するリガンド、例えば、ビオチンとすることができる。検出可能な標識を検出するための手段は、標識の特性に基づいて選択されるものと思われ、標識をオリゴヌクレオチドに連結するための手段についても同様である(例えば、Hermanson、「Bioconjugate Techniques」(Academic Press 1996)を参照されたい、これは参照として本明細書に組み入れられる)。

20

30

【0071】

選択的ハイブリダイゼーションは同様に、例えば、オリゴヌクレオチドをプライマー伸長反応のための基質として利用し、プライマー伸長反応が進行するのに十分な条件の下で、試料を、必要に応じて、検出可能なdNTP(例えば、蛍光標識dNTP、ジゴキシゲニン標識dNTP、またはビオチン標識dNTP)を含む、デオキシリボヌクレオチド(dNTP)、およびDNA依存のDNAポリメラーゼとさらに接触させ、そしてプライマー伸長反応の産物を検出することにより検出することができる。プライマー伸長反応を行うための条件は、当技術分野においてよく知られている(例えば、Sambrookら、上記、1989を参照されたい)。

40

【0072】

アルカリ条件への暴露後の、標的遺伝子配列を含む重亜硫酸イオン処理核酸中のウラシル残基の量または分布は同様に、PCRのような増幅反応により検出することもできる。増幅反応は、標的核酸への増幅プライマー対のフォワードおよびリバース・プライマーの選択的ハイブリダイゼーションを可能とする条件の下で行われる。一般に、反応は、緩衝水溶液中、約pH 7~9、通常約pH 8で行われる。さらに、反応は一般に、標的核酸に対しプライマーのモル過剰にて、例えば、プライマー対ゲノムDNAが約100対1の比率で行われる。例えば、生物試料を用いる診断手順において、試料中の標的核酸の量が分からない場合、一般に少量のプライマーを添加するだけで、増幅反応が進行できるような十分なモル過

50

剥になると思われるが、一連のプライマー量を、並行して行われる試料のなかで用いることができる。

#### 【0073】

デオキシリボヌクレオシド三リン酸の、dATP、dCTP、dGTP、およびdTTPを、適当な量で、合成混合物(これは、プライマーをさらに含み得る)に、別々にまたは混合物として添加することができ、そして得られた溶液を、約1~10分間、好ましくは1~4分間、約90~100まで加熱する。この加熱時間の後、溶液を室温にまで冷却させるが、これはプライマーのハイブリダイゼーションにとっては好ましい。この冷却させた混合物に、プライマー伸長反応を行うために適切な試薬、一般にはポリメラーゼを添加し、本明細書に開示される(実施例1を参照されたい)または当技術分野において他に知られる条件の下で反応を起こさせる。ポリメラーゼが熱安定性である場合、その他の試薬とともに添加することができる。ポリメラーゼは、プライマー伸長産物の合成を方向づけるのに有効な任意の酵素とすることができ、例えば、大腸菌(*E. coli*)DNAポリメラーゼI、大腸菌(*E. coli*)DNAポリメラーゼIのクレノー断片、T4 DNAポリメラーゼ、その他の利用可能なDNAポリメラーゼ、ポリメラーゼ突然変異タンパク質、逆転写酵素、および熱安定酵素を含む、当技術分野において周知でありかつ市販されているような、その他の酵素を含む。増幅産物は、配列決定法、オリゴマー制限法(Saikiら、*BioTechnology* 3:1008~1012, 1985)、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド・プローブ解析法(Connerら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:278, 1983)、オリゴヌクレオチド連結アッセイ(Landegrenら、*Science* 241:1077, 1988)、および同種のアッセイ(同様に、Landegrenら、*Science* 242:229~237, 1988を参照されたい)により、メチル化されたものまたはメチル化されていないものとして同定することができる。

10

20

#### 【0074】

一つの態様として、増幅は、増幅に適した条件の下で、標的遺伝子配列(例えば、表2、5、または6に掲載の遺伝子)を、フォワード・プライマーおよびリバース・プライマーを含む増幅プライマー対と接触させることにより行われ、その際にプライマー対の少なくとも一つのプライマーは、ウラシル残基を含む標的遺伝子配列に選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含み、増幅産物の産出により、試験細胞の標的遺伝子のCpGジヌクレオチドのシトシン残基のメチル化が示される。別の態様として、増幅反応は、増幅に適した条件の下で、標的遺伝子配列を、フォワード・プライマーおよびリバース・プライマーを含む増幅プライマー対と接触させることにより行われ、その際にプライマー対の両プライマーは、シトシン残基を含む標的遺伝子配列に選択的にハイブリダイズするが、ウラシル残基を含む標的遺伝子配列にハイブリダイズせず、増幅産物の産出により、試験細胞の標的遺伝子のCpGジヌクレオチドのシトシン残基がメチル化されていないことが示される。

30

#### 【0075】

さらに別の態様として、核酸のメチル化状態を検出するため、メチル化特異的PCR(MSP)のようなメチル化特異的反応を、単独で、または重亜硫酸塩処理と組み合わせる(米国特許第6,265,171号; 米国特許第6,200,756号; および米国特許第6,017,704号を参照されたい、これらのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる; 同様に、実施例1も参照されたい)。MSPは、少数のメチル化対立遺伝子の検出およびパラフィン包埋材料を含む、少量の核酸試料の使用を可能とする特に感度の高い方法であり、そして同様に、例えば、単一試料中の非メチル化産物およびメチル化産物の同時検出を含む、多重解析に好都合に適合することができ、それによって内部対照が与えられる。

40

#### 【0076】

MSP反応で使用される増幅プライマー対は、重亜硫酸塩未処理または非修飾DNAと、メチル化および非メチル化DNAとを特異的に識別するように設計する。非メチル化DNAに対するMSPプライマー対(非メチル化特異的プライマー対)は一般に、3'-CpG対中にチミジン残基を有し、メチル化DNA中に保持されているシトシン残基とこのチミジン残基とが区別される、そしてこの相補体がアンチセンス・プライマー用として設計される。センス(フォワ

50

ード)プライマー中にはシトシンが存在せず、アンチセンス(リバーズ)プライマー中にはグアニンが存在しないので、通常、MSPプライマー対には、その配列中に比較的少量のシトシンまたはグアニン残基が含まれる；シトシンは修飾されてウラシルとなり、このウラシルは増幅産物中ではチミジンとして増幅される。MSP非メチル化特異的プライマー対およびMSPメチル化特異的プライマー対は、表2に記載のメチル化遺伝子または非メチル化遺伝子の増幅に有用なメチル化特異的プライマー対および非メチル化特異的プライマー対、例えば、配列番号:1および2に記載のApoDメチル化特異的プライマー対ならびに配列番号:3および4に記載のApoD非メチル化特異的プライマー対(表4、亜硫酸塩の配列決定に用いられるプライマーを含む、示された遺伝子のメチル化特異的プライマー対を開示している配列番号:65~127も参照のこと)を含む、表2に記載の多様な遺伝子についてGenBankアクセ

10

#### 【0077】

従って、一つの局面として、MSPを、アルカリ処理後の重亜硫酸イオン処理標的遺伝子中のウラシル残基の量または分布を検出するために使用する。そのような方法は、増幅に適した条件の下で、遺伝子配列を、第一増幅プライマー対および第二増幅プライマー対と接触させる段階により行うことができ、第一増幅プライマー対は、フォワード・プライマーおよびリバーズ・プライマーを含み、第一プライマー対の少なくとも一つのプライマーは、ウラシル残基を含む標的遺伝子のヌクレオチド配列に選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含み、そして第二増幅プライマー対は、フォワード・プライマーおよびリバーズ・プライマーを含み、第二プライマー対の両プライマーは、シトシン残基を含む標的遺伝子に選択的にハイブリダイズするが、ウラシル残基を含む標的遺伝子配列にハイブリダイズせず、そして第一プライマー対により産出される増幅産物が、もしあれば、第一の長さを有し、そして第二プライマー対により産出される増幅産物が、もしあれば、第一の長さとは異なる第二の長さを有し、増幅産物の長さによって、ウラシル残基の量または分布および、それ故、試験細胞の標的遺伝子におけるCpGジヌクレオチドのシトシン残基のメチル化が示される。

20

#### 【0078】

ウラシル残基の量または分布は同様に、増幅に適した条件の下で、遺伝子の5'調節領域を、第一増幅プライマー対および第二増幅プライマー対と接触させる段階により行うことができ、第一増幅プライマー対は、フォワード・プライマーおよびリバーズ・プライマーを含み、第一プライマー対の少なくとも一つのプライマーは、ウラシル残基を含む遺伝子の5'調節領域のヌクレオチド配列に選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含み、そして第二増幅プライマー対は、フォワード・プライマーおよびリバーズ・プライマーを含み、第二プライマー対の両プライマーは、シトシン残基を含む遺伝子の5'調節領域のヌクレオチド配列に選択的にハイブリダイズするが、ウラシル残基を含む遺伝子の5'調節領域の対応ヌクレオチド配列にハイブリダイズせず、そして第一プライマー対により産出される増幅産物が、もしあれば、第一の長さを有し、そして第二プライマー対により産出される増幅産物が、もしあれば、第一の長さとは異なる第二の長さを有し、増幅産物の長さによって、ウラシル残基および、それ故、遺伝子の5'調節領域のCpGジヌクレオチドの

30

40

#### 【0079】

調節不能な増殖を示すまたは示す疑いのある細胞の遺伝子(例えば、ガン関連遺伝子)のメチル化による沈黙化は同様に、試験細胞を脱メチル化剤と接触させる段階、およびその遺伝子によりコードされるRNAの発現増加を、脱メチル化剤と接触されていない試験細胞のRNAの発現レベルと比較して検出する段階により同定することができる。そのような方法は、調節された増殖を示す対応細胞、または対応細胞の抽出物において、遺伝子の5'調節領域のCpGアイランドのCpGジヌクレオチドのシトシン残基の、もしあれば、メチル化を検出する段階をさらに含む。脱メチル化剤は、5Aza-dCのようなメチル基転移酵素阻害剤

50

とすることができる。RNAの発現増加は、例えば、ノザンプロット解析、逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応法、または本明細書に開示のヌクレオチド配列からなるアレイへの選択的ハイブリダイゼーションを含む、RNAを検出するための任意の方法により検出することができる。従って、本発明の方法は、高速大量処理の形式で実施することができ、その際に試験細胞、または試験細胞の抽出物には、複数の、試験細胞、もしくは試験細胞の抽出物、またはその組み合わせのうちの一つが含まれる；そして複数の、試験細胞、または試験細胞の抽出物のそれぞれが、同じもしくは異なる、またはその組み合わせである。

**【0080】**

本発明の方法を高速大量処理の形式に適用する際に、試験細胞、または試験細胞の抽出物は、アレイ(これはアドレス可能なアレイとすることができる)の、マイクロチップ、ガラススライド、またはビーズのような固体支持体上に配列することができ、その細胞(または抽出物)を、本明細書に開示のオリゴヌクレオチド・プローブまたはプライマー(もしくはプライマー対)と連続的にまたは並行して接触させることができる。アレイにまたはその他に再現可能な形態で配列される試料には、アドレス(即ち、アレイ上での位置)を割り当て可能であり、それによって試料の起源の同定が容易となる。試料をアレイに、特にアドレス可能なアレイに配列することのさらなる利点は、さまざまな時点で、試薬を添加するか試料の一つもしくは複数から試薬を除去するのに、または特定の試料に異なる試薬を添加するのに、自動システムを使用できることである。多数の試料を同時に調べることの利便性に加え、そのような高速大量処理試験により、単一試料の一定分量を二重、三重、またはそれ以上で調べるための手段が提供され、それによって得られる結果の有効性が高まる、および試験試料と同じ条件の下で対照試料を調べるための手段が提供され、それによって異なる試験から得られる結果を比較するための内部標準が得られる。好都合なことに、アレイのある位置の細胞または抽出物を、区別して標識されているかまたは区別できる産物を産生する反応物を含む、オリゴヌクレオチドのプローブまたはプライマー(もしくはプライマー対)の二つまたはそれ以上と接触させることができ、それによって多重アッセイを行うための手段が提供される。そのようなアッセイにより、試験細胞において後生的に沈黙化された遺伝子を同定するため、1つまたは複数の、特に2、3、4、5、10、15、20、またはそれ以上の遺伝子の試験が可能とされ得る。

**【0081】**

本発明により同様に、後生的に沈黙化された遺伝子(またはそれがいないこと)を同定するためのプローブまたはプライマーとして有用となり得る、オリゴヌクレオチドが提供される。本明細書では、「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド」、または「核酸」という用語は広く、ホスホジエステル結合によりともに結合されている、二つまたはそれ以上のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドの配列を意味するように使用される。「遺伝子」という用語は同様に、ゲノム中に含まれるポリヌクレオチド配列を指すようにも本明細書で使用される。しかし、当然のことながら遺伝子の一部を含む核酸は、細胞から単離できることまたはゲノムDNAとして、例えば、ハイブリダイゼーション反応またはPCR反応により調べることができる。従って、ゲノム中で、遺伝子が始まるまたは終わる特定のヌクレオチドの位置が必ずしも明確であるとは限らないが、本発明では、遺伝子は、本明細書で同定されたおよび/または調べられた種々の遺伝子に関して表2、5、および6に示されるGenBankアクセッション番号に記載のヌクレオチド配列を少なくとも含む不連続の核酸であると考えられる。

**【0082】**

議論の便宜上、「オリゴヌクレオチド」という用語は本明細書では、プローブまたはプライマーとして使用されるポリヌクレオチドを指すように用いられる一方で、「ポリヌクレオチド」、または「核酸」という用語は、オリゴヌクレオチドを含む、二つまたはそれ以上のヌクレオチドからなる任意の配列を包含するようにより広く用いられる。さらに、「ヌクレオチド配列」という用語は、アレイ上に存在する分子を指すように用いられる。従って、当然ながら異なる核酸を都合よく区別するため、種々の用語が本明細書で使用される。従って、その用語には、遺伝子またはその一部、cDNA、合成ポリデオキシリボ核酸

の配列などとできる、RNAおよびDNAが含まれる。一般に、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖、ならびにDNA/RNAハイブリッドとすることができるが、当然ながらプローブまたはプライマーとして使用される二本鎖オリゴヌクレオチドの鎖は、例えば、そのオリゴヌクレオチドを含む溶液を、その特定のオリゴヌクレオチドの融解温度を超えるように加熱することで分離される。

#### 【0083】

本明細書で使用される「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド」などの用語には、細胞から単離できる天然に存在する核酸分子のほか、例えば、制限エンドヌクレアーゼ消化により産生されるその断片、および例えば、化学合成法によりまたはPCRによるような酵素法により調製できる合成分子が含まれる。種々の態様として、本発明のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、ヌクレオシドもしくはヌクレオチド類似体、またはホスホジエステル結合以外の骨格結合、例えば、チオジエステル結合、ホスホロチオエート結合、ペプチド様結合もしくは合成ポリヌクレオチドを産生するためヌクレオチドを連結するのに有用な、当業者に周知の他の任意の結合を含むことができる(例えば、Tamら、*Nucl. Acids Res.* 22:977~986, 1994; Eckerおよび Crooke, *BioTechnology* 13:351360, 1995を参照されたい、これらのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる)。天然に存在しない、ヌクレオチド類似体またはヌクレオチドもしくは類似体を連結する結合を組み込むことは、ポリヌクレオチドが例えば、組織培地、細胞、または生存被検体中を含む、核酸分解活性を含み得る環境に曝されるような場合、分解に対して感受性がより低くなるように(または、必要に応じて、より高くなるように)修飾ポリヌクレオチドを設計できるため、特に有用となり得る。

10

20

#### 【0084】

一般に、ポリヌクレオチドを含むヌクレオチドは、天然に存在する、2'-デオキシリボースに連結されたアデニン、シトシン、グアニンもしくはチミンのようなデオキシリボヌクレオチド、またはリボースに連結されたアデニン、シトシン、グアニンもしくはウラシルのようなりボヌクレオチドである。しかし、ポリヌクレオチド(またはオリゴヌクレオチド)には同様に、天然には存在しない合成ヌクレオチドまたは天然に存在するヌクレオチドの修飾型を含む、ヌクレオチド類似体が含まれてもよい。そのようなヌクレオチド類似体は、当技術分野においてよく知られかつ市販されており、そのような類似体を含むポリヌクレオチドについても同様である(Linら、*Nucl. Acids Res.* 22:5220~5234, 1994; Jellinekら、*Biochemistry* 34:11363~11372, 1995; Pagratisら、*Nature Biotechnol.* 15:68~73, 1997、これらのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる)。

30

#### 【0085】

天然に存在するヌクレオチドおよびホスホジエステル結合を含むポリヌクレオチドは、化学的に合成することができるまたは適当なポリヌクレオチドを鋳型として用い、組換えDNA法により産生することができる。T7ポリメラーゼのような酵素は、ある種のヌクレオチド類似体をポリヌクレオチドに組み込むことができ、故に、適当な鋳型から組換え的にそのようなポリヌクレオチドを産生するために使用することができるが、相対的には、ヌクレオチド類似体またはホスホジエステル結合以外の共有結合を含むポリヌクレオチドは一般に、化学的に合成されるものと思われる(Jellinekら、上記、1995)。従って、ポリヌクレオチドは、例えば、ジエチルホスホルアミダイトを用いるような自動化方法を含む、従来型のホスホトリエステルおよびホスホジエステル法のような方法(Beaucageら、*Tetrahedron Lett.*, 22:1859~1862, 1981を参照されたい)、またはオリゴヌクレオチドが改変型固体支持体上で合成される方法(米国特許第4,458,066号を参照されたい)により調製することができる。

40

#### 【0086】

標的核酸に選択的にハイブリダイズできかつ遺伝子の発現および/またはメチル化(またはメチル化されていないこと;「非メチル化」)を検出するための試薬として使用できる、本発明のオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子の約2000ヌクレオチド上流(5'側)または下流(3'側)以内の、および一般にシトシンのメチル化について調べられるCpGアイランドを含

50

む領域の約1000ヌクレオチド以内の、通常は調べられる部位の約500ヌクレオチド以内のヌクレオチド配列に選択的にハイブリダイズするように設計される。さらに、本発明のオリゴヌクレオチド、または本発明の方法に有用なオリゴヌクレオチドは、長さが少なくとも約12ヌクレオチド、一般に長さが少なくとも約14または15ヌクレオチド、通常は少なくとも約18~20ヌクレオチドであり、オリゴヌクレオチドが標的核酸に選択的にハイブリダイズできるように、長さが約25、30、35またはそれ以上のヌクレオチドとすることができる。当然ながらオリゴヌクレオチドの長さは、部分的には、標的遺伝子に依存するものと思われる。例えば、標的遺伝子が、実質的な配列類似性の領域を有する密接に関連する遺伝子ファミリーのうちの一つである場合、標的遺伝子との選択的ハイブリダイゼーションと、もしあれば、関連遺伝子配列/配列(複数)との最小限の交差ハイブリダイゼーションが確実にされるように、より長いオリゴヌクレオチドを使用することができる。

10

**【0087】**

本発明のオリゴヌクレオチドは、ゲノム座に対応する二本鎖核酸の少なくとも片方の鎖に(または介在配列が増幅されるような場合には両鎖のそれぞれに)実質的に相補的となるように設計され、それらのオリゴヌクレオチドがメチル化シトシン残基と非メチル化シトシン残基を区別するために使用されるような場合には、上述のように、適当なグアニンまたはシトシン残基を含むものと思われる。本発明のオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子のヌクレオチド配列のRT-PCRに有用な増幅プライマー対(表3、配列番号:7~64を参照されたい);および標的遺伝子のヌクレオチド配列のメチル化特異的もしくは非メチル化特異的増幅に有用な増幅プライマー対;または重亜硫酸塩PCRに有用な増幅プライマー対(表4、配列番号:65~127を参照されたい)、メチル化特異的プライマー(配列番号)により例示される。

20

**【0088】**

従って、本発明により、配列番号:1~127のいずれか一つから選択されるオリゴヌクレオチドが提供され、および例えば、表2に掲載されるApo D遺伝子の一部を、場合によっては、例えば、標的配列がメチル化されているかメチル化されていないかに応じて増幅できる、増幅プライマー対として有効な少なくとも二つのオリゴヌクレオチドを含む組み合わせを含む、配列番号:1~127として記載のオリゴヌクレオチドの少なくとも二つ(例えば、2、3、4、またはそれ以上)を含む、そのようなオリゴヌクレオチドの複数がさらに提供される。本発明により同様に、フォワード・プライマーおよびリバース・プライマーを含む増幅プライマー対、特に、フォワード・プライマー、リバース・プライマーまたはプライマー対の両方とできる、一つの、および特に二つの、オリゴヌクレオチドを含むプライマー対、特に、表2に掲載される遺伝子の一部を増幅するのに有効なプライマー対が提供される。一つの局面として、本発明の増幅プライマー対は、核酸のメチル化5'調節領域を特異的に増幅するために使用することができる。別の局面として、本発明の増幅プライマー対は、核酸の非メチル化5'調節領域を特異的に増幅するために使用することができる。

30

**【0089】**

本発明は同様に、本発明の少なくとも一つの単離されたオリゴヌクレオチドを含む、例えば、複数のそのような単離されたオリゴヌクレオチドを含む、キットに関する。一つの態様として、本発明のキットの複数の単離されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも一組の増幅プライマー対(例えば、フォワード・プライマーおよびリバース・プライマー)を含み、そして例えば、本明細書に開示の増幅プライマー対を含む、複数組の増幅プライマー対を含むことができる。従って、本発明のキットは、例えば、一つまたは複数の種類のガン細胞でメチル化により沈黙化されていることが知られているまたはその疑いがある特定遺伝子のメチル化型または非メチル化型を増幅するのに有効な、メチル化特異的プライマー対および非メチル化特異的プライマー対を含む、一組のまたは複数組の、メチル化特異的増幅プライマー対、非メチル化特異的増幅プライマー対、またはメチル化特異的増幅プライマー対および非メチル化特異的増幅プライマー対の組み合わせを含むことができる。

40

**【0090】**

本発明のキットは、例えば、キットのオリゴヌクレオチドが有効なある目的に役立ち得

50

る、追加試薬をさらに含むことができる。例えば、キットに一つまたは複数のメチル化特異的および/または非メチル化特異的増幅プライマーが含まれる場合、キットには、例えば、対照用ポリヌクレオチド(これはメチル化または非メチル化とすることができる);メチル化シトシン残基を修飾する一つまたは複数の試薬、および/または増幅反応を行うための一つもしくは複数の試薬がさらに含まれ得る。キットに、メチル化遺伝子配列にまたは非メチル化遺伝子配列に選択的にハイブリダイズする一つまたは複数のオリゴヌクレオチドが含まれる場合、キットには、例えば、メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼがさらに含まれ得る。本発明のキットは同様に、少なくとも第二のプライマー対を含むこともでき、そのプライマーは、上記に掲載されるプライマー対の一つとできるが、それが必要とされるわけではなく、例えば、ネスト化増幅反応に有効とすることができる。そのようなさらなるプライマー対は、標的遺伝子に関連するGenBankアクセス番号(表2を参照されたい)の利用可能な配列情報を用い、標的遺伝子の増幅部分の予測配列に基づいて設計することができる。

#### 【0091】

一つの態様として、本発明のキットは、同じ標的遺伝子に特異的な、メチル化特異的プライマー対および非メチル化特異的プライマー対を含み、それによってキットの使用者は特定の標的遺伝子がメチル化されているかメチル化されていないかを決定することができる。別の態様として、キットは、複数のそのようなメチル化特異的および非メチル化特異的プライマー対を含み、それによって使用者は一つまたは複数の標的遺伝子のメチル化を決定することができる。例えば、そのようなキットは、一つまたは複数の選択された標的遺伝子、例えばApoD遺伝子、NU遺伝子、CRIP1遺伝子、または他の表2に記載の遺伝子のメチル化特異的プライマー対および非メチル化特異的プライマー対を含み、それによって一つまたは複数の選択された遺伝子の5'調節領域がメチル化されているかメチル化されていないかを決定するのに有用な増幅プライマー対が提供される。そのようなキットは、メチル化特異的または非メチル化特異的プライマー対を用いて産生される、予測増幅産物に選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含むプライマー対をさらに含むことができ、それによってネスト化増幅手順を行うのに有用な試薬が提供される。

#### 【0092】

本発明のキットは同様に、キットのオリゴヌクレオチドに連結され得るかまたは組み込まれ得る検出可能な標識、または使用者の要求に応じ、特定の用途に対して選択され得るような複数の異なる検出可能な標識、および、必要に応じて、検出可能な標識をオリゴヌクレオチドに連結するかまたは組み込むための試薬を含むことができる。或いは、またはさらに、キットは、選択的ハイブリダイゼーション条件が容易に得られるようにハイブリダイゼーション反応を行うのに有用な一つもしくは複数の試薬を含むことができる; および/または一つもしくは複数の標準核酸、例えば、オリゴヌクレオチドが選択的にハイブリダイズするように設計される領域に対応するメチル化シトシン残基を含む標的ApoDヌクレオチドの標準配列、もしくは標的配列に対応する非メチル化シトシン残基を含む標的ApoDヌクレオチドの標準配列、またはその組み合わせを含むことができる。そのような標準により、例えば、試験細胞、またはその抽出物が適切に機能したことの確認が可能となること、または異なる時点で調べられたもしくは異なる起源から集められた試料間での比較が可能となることを含む、いくつかの利点を得られる。

#### 【0093】

キットがプライマー伸長(または増幅)反応を行うのに有用な一つまたは複数のオリゴヌクレオチドを含む場合、キットは、そのオリゴヌクレオチドによって伸長反応の基質が供与されるような選択的ハイブリダイゼーション反応を行うための試薬; および/もしくはプライマー伸長(または増幅)反応を行うための一つまたは複数の試薬、例えば、dNTP(この一つまたは複数を検出可能に標識する或いは検出可能な標識を都合よく連結させるために修飾することができる); 一つまたは選択のポリメラーゼ; ならびに/または一つもしくは複数の標準となる標的核酸をさらに含むことができる。本発明のキットが、本明細書に例示されるもののような或いは本発明の方法を実践するのに有用な、二つまたはそれ以上

のオリゴヌクレオチド(またはプライマー対)を含む場合、必要に応じて、当業者が一つまたは複数のオリゴヌクレオチド(またはプライマー対)を選択できる、便利な試薬情報がキットにより提供される。

【0094】

本発明は同様に、少なくとも一つのガン関連遺伝子の転写の後生的な沈黙化を示す、細胞の調節不能な増殖を減少させるまたは阻害する方法に関する。そのような方法は、例えば、細胞中の後生的に沈黙化された遺伝子によりコードされるポリペプチドの発現を回復させる段階、それにより細胞の調節不能な増殖を減少させるかまたは阻害する段階により実践することができる。一つの態様として、後生的な沈黙化遺伝子によりコードされるポリペプチドの発現は、細胞を脱メチル化剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、またはその組み合わせと接触させることにより回復させることができる。本態様の一つの局面として、少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子にはメチル化沈黙化遺伝子が含まれ、細胞を5Aza-dCのような脱メチル化剤と、例えば、その薬剤が細胞とインビボで接触するように、脱メチル化剤を被検体に局所的にまたは全身的に投与することにより接触させる。

10

【0095】

細胞中の後生的な沈黙化遺伝子によりコードされるポリペプチドの発現の回復方法は同様に、そのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞内へ導入する段階によっても行うことができ、それによってポリペプチドがポリヌクレオチドから発現される。ポリヌクレオチドを、ベクター、例えば、ウイルス・ベクター中に含有させることができる、および例えば、リポソーム、超微粒気泡などのようなマトリクスの中に製剤化することができるが、それが必要とされるわけではない。ポリヌクレオチドが細胞と接触するようにポリヌクレオチドを被検体に投与することにより、ポリヌクレオチドを細胞内へ導入することができる、その際に、ポリヌクレオチドが細胞により取り込まれてコードされるポリペプチドが発現可能とされる。

20

【0096】

そのような方法に有効なポリヌクレオチドは、後生的に沈黙化された遺伝子に相当する任意のポリヌクレオチドとすることができる。例えば、細胞がESCC細胞である場合、後生的な沈黙化遺伝子は表2に記載の遺伝子とすることができる、ポリヌクレオチドは、表2に記載のGenBankアクセッション番号で利用可能なポリヌクレオチドのような、その遺伝子によりコードされるポリペプチドをコードする核酸とすることができる。例えば、後生的な沈黙化遺伝子は、Apo D、NU、スイプロシン-2(swisprosin-2)、Hep27、KIF5C、ケラチン14、トランスグルタミナーゼ2、MUC1、IL-1 R2、クリスタリン 2、CLF-1、CRIP-1、Rad、HEM45、KLF6、ホリスタチン関連タンパク質FLRG、XAP-5、Tbc1d1、サイクリンG1相互作用タンパク質、CRBP、メタロチオネイン1G、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、もしくはアポリタンパク質C1遺伝子、またはその組み合わせとすることができる。

30

【0097】

一つの態様として、細胞がESCC細胞であり、後生的な沈黙化遺伝子にはメチル化沈黙化遺伝子、例えば、メチル化により沈黙化されたApo D、NU、CLF-1、CRIP-1、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、メタロチオネイン1G、トランスグルタミナーゼ2、もしくはアポリタンパク質C1遺伝子、またはその組み合わせが含まれる。別の態様として、細胞がESCC細胞であり、後生的な沈黙化遺伝子には腫瘍抑制遺伝子、例えば、Apo D、NU、もしくはCRIP-1遺伝子が含まれる；または腫瘍抑制遺伝子にはニューロメジンB、もしくはGタンパク質シグナル伝達受容体2(RGS2)遺伝子が含まれる；またはESCC細胞にはそのような腫瘍抑制遺伝子の組み合わせが含まれる。

40

【0098】

本発明はさらに、患者のガン細胞が少なくとも一つの遺伝子の発現の後生的な沈黙化を示す、ガン患者を治療するための方法に関する。そのような方法は、例えば、被検体のガン細胞の少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子の発現を回復させる段階により行うことができ、それによってガン患者を治療することができる。少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子は、メチル化沈黙化遺伝子とすることができる、以下が必要とされるわけではない

50

が、腫瘍抑制遺伝子または腫瘍抑制遺伝子の活性もしくは発現に影響を及ぼす遺伝子とすることができる。

【0099】

一つの態様として、ガン患者のガン細胞には、少なくとも一つのメチル化沈黙化遺伝子が含まれ、その方法には、被検体のガン細胞のメチル化沈黙化遺伝子の発現を回復させるのに十分な量の脱メチル化剤を被検体に投与する段階が含まれる。別の態様として、ガン患者のガン細胞には、少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子が含まれ、その方法には、被検体のガン細胞での少なくとも一つのポリペプチドの発現に十分な条件の下で、後生的な沈黙化遺伝子によりコードされるポリペプチドをコードする少なくとも一つのポリヌクレオチドを被検体に投与する段階が含まれる。ポリヌクレオチドは、ウイルス・ベクターのようなベクター中に含有させてもよく；および/またはリポソームもしくは超微粒気泡のようなマトリクスとともに製剤化してもよい。

【0100】

本発明の方法により治療されるガンは、例えば、ガン腫または肉腫を含むガンと関連する少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子を含むガン細胞を含む任意のガンとすることができる。一つの態様として、ガンは食道扁平上皮ガンでありかつ後生的な沈黙化遺伝子には表2に記載の一つまたは複数の遺伝子が含まれる。例えば、後生的な沈黙化遺伝子は、Apo D、NU、スイプロシン-2(swisprosin-2)、Hep27、KIF5C、ケラチン14、トランスグルタミナーゼ2、MUC1、IL-1 R2、クリスタリン 2、CLF-1、CRIP-1、Rad、HEM45、KLF6、ホリスタチン関連タンパク質FLRG、XAP-5、Tbc1d1、サイクリンG1相互作用タンパク質、CRBP、メタロチオネイン1G、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、もしくはアポリポタンパク質C1遺伝子、またはその組み合わせとすることができる。一つの局面として、後生的な沈黙化遺伝子/遺伝子(複数)には、少なくとも一つのメチル化沈黙化遺伝子、例えば、Apo D、NU、CLF-1、CRIP-1、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、メタロチオネイン1G、トランスグルタミナーゼ2、もしくはアポリポタンパク質C1遺伝子、またはその組み合わせが含まれる。別の局面として、後生的な沈黙化遺伝子/遺伝子(複数)には、少なくとも一つの腫瘍抑制遺伝子、例えば、Apo D、NU、および/またはCRIP-1遺伝子；またはニューロメジンBおよび/もしくはRGS2遺伝子；またはその組み合わせが含まれる。

【0101】

本発明は同様に、ガン患者を治療するための治療方針を選択するための方法に関する。そのような方法は、例えば、本明細書に開示される本発明のゲノムスクリーニング方法に従って、ガンと関連する少なくとも一つの後生的に沈黙化された遺伝子を同定する段階；および患者のガン細胞中の少なくとも一つの後生的に沈黙化された遺伝子の発現を回復するのに有用な薬剤を選択する段階により行うことができる。薬剤は、例えば、後生的に沈黙化された遺伝子/遺伝子(複数)から別の方法で発現されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、例えば、Apo D、NU、スイプロシン-2(swisprosin-2)、Hep27、KIF5C、ケラチン14、トランスグルタミナーゼ2、MUC1、IL-1 R2、クリスタリン 2、CLF-1、CRIP-1、Rad、HEM45、KLF6、ホリスタチン関連タンパク質FLRG、XAP-5、Tbc1d1、サイクリンG1相互作用タンパク質、CRBP、メタロチオネイン1G、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、もしくはアポリポタンパク質C1遺伝子、またはその組み合わせのような表2に掲載の遺伝子によりコードされるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとすることができる。

【0102】

一つの態様として、同定される後生的な沈黙化遺伝子には少なくとも一つのメチル化沈黙化遺伝子が含まれ、選択される薬剤は、ガン細胞中の少なくとも一つのメチル化沈黙化遺伝子の発現を回復するのに有用な薬剤である。本方法の一つの局面として、選択される薬剤には、メチル化沈黙化遺伝子/遺伝子(複数)、例えば、Apo D、NU、CLF-1、CRIP-1、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、メタロチオネイン1G、トランスグルタミナーゼ2、またはアポリポタンパク質C1遺伝子により別の方法でコードされるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが含まれる。本方法の別の局面として、選択される薬剤には、脱メチル化剤、例えば、5Aza-dCが含まれる。

10

20

30

40

50

## 【0103】

別の態様として、同定される後生的な沈黙化遺伝子には少なくとも一つの腫瘍抑制遺伝子が含まれ、選択される薬剤は、ガン細胞中の後生的な沈黙化腫瘍抑制遺伝子によりコードされるポリペプチドを回復するのに有用な薬剤である。例えば、腫瘍抑制遺伝子は、Apo D、NU、もしくはCRIP-1遺伝子、またはニューロメジンBもしくはRGS2遺伝子、またはそのような遺伝子の組み合わせとすることができ、選択される薬剤は、Apo D、NU、CRIP-1、ニューロメジンB、および/またはRGS2遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドとすることができる。

## 【0104】

本発明は同様に、ESCCに苦しむ被検体の治療方法に関し、その場合、ESCC関連細胞は少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子を含む。そのような方法は、例えば、少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子の発現を回復させる薬剤の量を、ESCC関連細胞中の後生的な沈黙化遺伝子の発現を回復させるに足る被検体に投与する段階により行うことができ、それによって被検体を治療することができる。一つの態様として、薬剤には、少なくとも一つの後生的に沈黙化された遺伝子をコードするポリヌクレオチド、特に表2に掲載の遺伝子のコード配列を含むポリヌクレオチド、例えば、Apo D、NU、スイプロシン-2(swisprosin-2)、Hep27、KIF5C、ケラチン14、トランスグルタミナーゼ2、MUC1、IL-1 R2、クリスタリン 2、CLF-1、CRIP-1、Rad、HEM45、KLF6、ホリスタチン関連タンパク質FLRG、XAP-5、Tbc1d1、サイクリンG1相互作用タンパク質、CRBP、メタロチオネイン1G、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、もしくはアポリポタンパク質C1遺伝子のコード配列を含むポリヌクレオチド、またはその組み合わせが含まれる。

## 【0105】

別の態様として、少なくとも一つの後生的な沈黙化遺伝子は、メチル化沈黙化遺伝子であり、被検体を治療するための薬剤には、メチル化沈黙化遺伝子によりコードされるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが含まれる。そのポリヌクレオチドには、Apo D、NU、CLF-1、CRIP-1、クローディン-3、脱共役蛋白質-2、メタロチオネイン1G、トランスグルタミナーゼ2、もしくはアポリポタンパク質C1遺伝子のコード配列、またはその組み合わせが含まれてもよい。さらに別の態様として、少なくとも一つの後生的に沈黙化された遺伝子には、少なくとも一つの腫瘍抑制遺伝子が含まれ、被検体の治療方法には、被検体のESCC細胞中の腫瘍抑制遺伝子の発現を回復させる段階が含まれる。例えば、腫瘍抑制遺伝子は、Apo D、NU、またはCRIP-1とすることができる；もしくはニューロメジンB、またはRGS2遺伝子とすることができる；またはそのような遺伝子の少なくとも一つを含む組み合わせとすることができる；およびその薬剤は、後生的に沈黙化された腫瘍抑制遺伝子の一つまたは複数にコードするポリヌクレオチドとすることができる。本発明の方法で有効な薬剤は、被検体に、薬剤が被検体のESCC細胞と接触できるように局所的にまたは全身的に投与することができる。

## 【0106】

細胞中の一つまたは複数の遺伝子の転写のメチル化による沈黙化の結果として、その遺伝子産物/産物(複数)が細胞中に存在せず、それ故、コードされる遺伝子産物/産物(複数)がないことに関連した機能喪失が存在する。例えば、ApoD遺伝子の後生的な沈黙化は、そのcisが細胞増殖停止に関連しており、結果としてこの機能の損失をもたらし、それにより細胞増殖が調節不能となる。従って、一つまたは複数のSFRP遺伝子の機能喪失により、全体の腫瘍抑制経路が抑止される可能性がある。同様に、PCDH8遺伝子は、細胞接着分子ファミリーのメンバーをコードし、その機能の喪失が腫瘍の浸潤および転移に重要であることが知られている(Strehlら、Genomics 53:81~89, 1998)。従って、本発明の方法は、後生的に沈黙化された、特にメチル化により沈黙化された遺伝子発現が原因で調節不能な増殖を示す細胞に、そのメチル化により沈黙化された遺伝子によりコードされるポリペプチドを投与すること、それによって調節された増殖を細胞に回復させることに基づく。本明細書に開示されるように、ポリペプチドは、細胞に直接投与することができる、細胞中に導入されかつそのポリペプチドをコードする外来性ポリヌクレオチドから、または細胞

中の内在性メチル化沈黙化遺伝子の発現を回復させることにより発現させることができる。調節不能な増殖を示す細胞にポリペプチドを回復させることによって、また、例えば、軟寒天中で増殖する能力、増殖の接触阻止の欠如、またはプログラム化された細胞死に対する不応状態を含む、調節不能な増殖と一般に関連付けられる特性が軽減される。

#### 【0107】

表2に示される一つまたは複数の遺伝子のような、一つまたは複数のメチル化沈黙化遺伝子の発現は、例えば、細胞を5Aza-dC(これが、細胞の複製の間に遺伝子に組み込まれると、転写可能とされる、非メチル化遺伝子を含む子孫細胞が生じる)のような脱メチル化剤と接触させて回復させることができる。必要に応じて、被検体への投与前に、脱メチル化剤が、細胞に対する毒性なしに、標的遺伝子の脱メチル化を引き起こすのに十分な量で与えられていることを決定するかまたは確認するために、被検体から得た標的細胞試料(または標的細胞に相当する細胞)を脱メチル化剤と培養液中で接触させることができる。培養液中で接触される細胞は一般に、脱メチル化剤の被検体への投与前に検査中の、被検体の細胞であるが、同様にして、例えば、被検体中で接触される細胞と同じ種類の樹立細胞株の細胞、例えば、ESCC細胞とすることもできる。本発明による被検体の治療方法には、特定のガンを患う被検体を治療するのに有効な当技術分野においてその他周知の薬剤、または本方法と組み合わせて使用する場合に、新たに有効となり得る薬剤で被検体を治療する段階をさらに含むことができる。

10

#### 【0108】

遺伝子発現のメチル化による沈黙化を示す細胞は一般に、脱メチル化剤を被検体に投与することにより、その薬剤とインピボで接触させることができる。都合がよければ、脱メチル化剤を、例えば、カテーテル法を用いて、被検体の調節不能な増殖を示す細胞の部位にもしくはその近傍に、またはその細胞の部位に向かって血液が流れている血管壁中に、投与することができる。同様に、治療される器官、またはその一部をシャント法により単離することができる場合、シャントを介して薬剤を投与することができ、それによって細胞を含む部位に薬剤を実質的に投与することができる。薬剤は同様に、全身にまたは本明細書に開示のもしくは当技術分野においてその他周知の他の経路を介して投与することができる。

20

#### 【0109】

後生的な沈黙化遺伝子によって減少しているかまたは存在していないポリペプチドは同様に、そのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞に導入することで細胞に供給することができ、それによって細胞中でポリペプチドがポリヌクレオチドから発現される。従って、本発明により、遺伝子治療法が提供される。例えば、細胞がApoD遺伝子の転写のメチル化による沈黙化を特徴とする場合、GenBankアクセス番号J0261(表2を参照されたい)に記載のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを標的細胞に導入することができる。

30

#### 【0110】

ポリヌクレオチドは、ポリペプチドをコードする配列に加えて、操作可能に連結された転写調節要素、翻訳調節要素などを含むことができ、そして裸のDNA分子の形態とすることができるが、これをベクター中に含有させてもよく、またはポリヌクレオチドの特定細胞への移入を容易とするリポソームもしくは超微粒気泡のようなマトリクス中に製剤化してもよい。本明細書では、「操作可能に連結された」という用語は、二つまたはそれ以上の分子が、単一ユニットとして作用しかつ一方のもしくは両方の分子またはその組み合わせによる機能をもたらすように相互に配置される、二つまたはそれ以上の分子を指す。例えば、操作可能に連結されたコード配列からキメラポリペプチドが発現されるように、ApoD遺伝子のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、第二の(またはそれ以上の)コード配列に操作可能に連結することができる。キメラポリペプチドは、二つの(またはそれ以上の)コードされるポリペプチドが単一ポリペプチドに翻訳される、即ち、ペプチド結合を介して共有結合される、融合タンパク質とすることができる; または二つの別個のペプチドとして翻訳させることができ、翻訳されると、それらは相互に動作可能に会合し

40

50

て安定な複合体を形成することができる。同様に、所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を、調節要素に操作可能に連結することができ、その場合には、調節要素は細胞中で通常関連するポリヌクレオチド配列に効果を及ぼすのと同様な形で、調節要素はポリヌクレオチドにその調節効果を及ぼす。

#### 【0111】

融合タンパク質は一般に、そのポリペプチド構成要素のそれぞれの特性のいくつかまたは全てを示し、そして、故に、細胞での遺伝子発現を回復させるのに役立つし、さらなる利点をさらに与え得る。例えば、融合タンパク質は、細胞で融合タンパク質を発現させることまたは細胞に融合タンパク質を充填することにより、融合タンパク質がその活性をもたらす、核のような細胞内区画へのそのコードされるポリペプチドの移動が可能となるように、細胞区画局在化ドメインに操作可能に連結された、そのコード遺伝子の後生的な沈黙化によって普通なら減少しているかまたは存在していないポリペプチドを含むことができる。細胞区画化ドメインは、例えば、よく知られており、原形質膜局在化ドメイン、核局在化シグナル、ミトコンドリア膜局在化シグナル、小胞体局在化シグナルなどのほか、細胞からのポリペプチドの分泌を可能とするシグナルペプチドを含む(例えば、 Hancockら、EMBO J. 10:4033~4039, 1991; Bussら、Mol. Cell. Biol. 8:3960~3963, 1988; 米国特許第5,776,689号を参照されたい、これらのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる)。融合タンパク質は同様に、融合タンパク質が所望のポリペプチドのタンパク質活性、受容体に対するリガンドとして作用するペプチド、ポリペプチドが発現される細胞を同定するための、もしくは融合タンパク質を単離するためのタグとして有用なペプチド、または関心のあるその他のペプチドもしくはポリペプチドに操作可能に連結された所望のポリペプチドを含むことができる。ニッケルイオン、コバルトイオンなどのような二価陽イオンを用いて検出できる、ポリヒスチジン・タグ・ペプチド、例えば、His-6のようなペプチド・タグ; 抗FLAG抗体を用いて検出できる、FLAGエピトープ(例えば、Hoppら、BioTechnology 6:1204(1988); 米国特許第5,011,912号を参照されたい、これらのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる); エピトープに対する特異抗体を用いて検出できる、c-mycエピトープ; ストレプトアビジンまたはアビジンを用いて検出できる、ビオチン; およびグルタチオンを用いて検出できる、グルタチオンS-トランスフェラーゼは、当技術分野においてよく知られており、それらに操作可能に連結されたポリペプチドの存在を検出する手段を与える。例えば、実質的に精製された形でポリペプチドを得ることが望まれる場合、そのようなタグにより、操作可能に連結されたポリペプチドの単離を容易にすることができるというさらなる利点が得られ、そのようなポリペプチドは同様に、本発明の方法を実践するのに有効となる。

#### 【0112】

後生的に沈黙化された遺伝子によりコードされるポリペプチドを別の方法でコードするポリヌクレオチドは、単独で使用することができる、またはポリヌクレオチドの標的細胞への導入を含め、ポリヌクレオチドの操作を容易にすることができる、ベクター中に含有させることができる。ベクターは、ポリヌクレオチドを操作するのに有効な、クローニング・ベクターとすることができる、またはポリヌクレオチドのほかに、特定細胞でポリヌクレオチドおよびコードされるポリペプチドを発現させるのに有効な調節要素を含む、発現ベクターとすることができる。発現ベクターは、例えば、コード化ポリヌクレオチドの持続転写を達成するのに必要な発現要素を含むことができる、またはポリヌクレオチドがベクターにクローニングされる前に、調節要素をポリヌクレオチドに操作可能に連結することができる。

#### 【0113】

発現ベクター(または所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド)は一般に、コード化ポリヌクレオチドの構成的なまたは、必要に応じて、誘導的なもしくは組織特異的なもしくは成長段階特異的な発現を与え得るプロモーター配列、ポリ-A認識配列、およびリボソーム認識部位もしくは内部リボソーム侵入部位、または組織特異的とすることができる、エンハンサーのようなその他の調節要素を含むかまたはコードする。ベクターは同

10

20

30

40

50

様に、必要に応じて、原核生物のもしくは真核生物の宿主系またはその両方での複製に必要とされる要素を含むことができる。プラスミド・ベクターならびにバクテリオファージ、バキュロウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、ワクシニア・ウイルス、セムリキ森林ウイルスおよびアデノ随伴ウイルス・ベクターのようなウイルス・ベクターを含む、そのようなベクターは、よく知られており、そして商業的供給源(Pro mega, Madison WI; Stratagene, La Jolla CA; GIBCO/BRL, Gaithersburg MD)から購入可能であり、または当業者により構築可能である(例えば、Meth. Enzymol., Vol. 185, Goe ddel(編)(Academic Press社, 1990); Jolly, Canc. Gene Ther. 1:51~64, 1994; Flott e, J. Bioenerg. Biomemb. 25:37~42, 1993; Kirshenbaumら、J. Clin. Invest. 92:381 ~387, 1993を参照されたい; これらのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる) 10

#### 【0114】

テトラサイクリン(tet)誘導プロモーターは、所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現させるのに特に有効となり得る。tet誘導プロモーターに操作可能に連結されたポリヌクレオチドを含む被検体に、テトラサイクリン、またはテトラサイクリン類似体を投与すると、コードされるポリペプチドの発現が誘導される。ポリヌクレオチドは同様に、ポリペプチドの発現が個体の特定細胞に、または培養細胞の混合集団、例えば、器官培養中の特定細胞に限定されるように、組織特異的調節要素、例えば、 $\alpha$ -フェトプロテイン・プロモーター(Kanaiら、Cancer Res. 57:461~465, 1997; Heら、J. Exp. C lin. Cancer Res. 19:183~187, 2000)もしくはアルブミン・プロモーター(Powerら、Bio chem. Biophys. Res. Comm. 203:1447~1456, 1994; Kuriyamaら、Int. J. Cancer 71:47 0~475, 1997)のような肝細胞特異的調節要素; ミオグロビン・プロモーター(Devlinら、J. Biol. Chem. 264:13896~13901, 1989; Yanら、J. Biol. Chem. 276:17361~17366, 2 001)のような筋肉細胞特異的調節要素; PSAプロモーター(Schuurら、J. Biol. Chem. 271 :7043~7051, 1996; Lathamら、Cancer Res. 60:334~341, 2000)のような前立腺細胞特 異的調節要素; エラスターゼ・プロモーター(Ornitzら、Nature 313:600~602, 1985; Sw iftら、Genes Devel. 3:687~696, 1989)のような膵臓細胞特異的調節要素; ロイコシア リン(CD43)プロモーター(Shelleyら、Biochem. J. 270:569~576, 1990; KudoおよびFuku da、J. Biol. Chem. 270:13298~13302, 1995)のような白血球特異的調節要素; または同 種のものに操作可能に連結することもできる。組織特異的調節要素を含む、その多くが市 販されている調節要素は、当技術分野においてよく知られている(例えば、InvivoGen; Sa n Diego CAを参照されたい)。 20 30

#### 【0115】

ウイルス発現ベクターは、ポリヌクレオチドを細胞、特に被検体の細胞中に導入するのに特に有用となり得る。ウイルス・ベクターにより、比較的高い効率で宿主細胞に感染できかつ特定の細胞型に感染できるという利点が得られる。例えば、所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、バキュロウイルス・ベクターにクローニングすることができ、次いでこれを昆虫宿主細胞に感染させるのに使用することができ、それによってコードされるポリペプチドを大量に産生させるための手段が提供される。ウイルス・ベクターは同様に、関心のある生物の細胞、例えば、哺乳類、鳥類または魚類宿主細胞のような 脊椎動物の宿主細胞に感染するウイルス由来とすることもできる。ウイルス・ベクターは 40、本発明の方法を行う際に有用なポリヌクレオチドを標的細胞に導入するのに特に有用となり得る。特定の宿主系、特に哺乳類系で使用するためのウイルス・ベクターが開発されており、例えば、レトロウイルス・ベクター、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に基づくもののようなその他のレンチウイルス・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、ヘルペスウイルス・ベクター、肝炎ウイルス・ベクター、ワクシニア・ウイルス・ベクターなどを含む(MillerおよびRosman, BioTechniques 7:980~990, 199 2; Andersonら、Nature 392:25~30 Suppl., 1998; VermaおよびSomia, Nature 389:239 ~242, 1997; Wilson, New Engl. J. Med. 334:1185~1187 (1996)を参照されたい、これら のそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる)。 50

## 【0116】

ポリヌクレオチド(これをベクター中に含有させることができる)は、当技術分野において周知の種々の方法のいずれかにより細胞に導入することができる(Sambrookら、上記、1989; Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John WileyおよびSons, Baltimore, MD (1987、および1995年分までの補遺)、これらのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる)。そのような方法には、例えば、トランスフェクション法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法および、ウイルス・ベクターでは、感染法が含まれ; ならびにポリヌクレオチドの細胞への導入を容易とできかつ細胞へのその導入前にポリヌクレオチドを分解から保護できる、リポソーム、超微粒気泡などの使用が含まれ得る。特に有効な方法には、循環系に注入できる、超微粒気泡へのポリヌクレオチドの取り込みが含まれる。超音波が腫瘍に伝達されるように超音波源を配置することができ、その際にポリヌクレオチドを含む循環している超微粒気泡が超音波によって腫瘍部位で破壊され、それによってポリヌクレオチドをガンの部位に供給することができる。特定の方法の選択は、例えば、ポリヌクレオチドが導入される細胞のほか、細胞が、培養で単離されるかどうか、または培養のもしくはは原位置の組織もしくはは器官の中に存在しているかどうかに依存するものと思われる。

10

## 【0117】

ウイルス・ベクターを用いた感染による細胞へのポリヌクレオチドの導入は、細胞へ核酸を効果的に導入できるという点で特に有利である(例えば、米国特許第5,399,346号を参照されたい、これは参照として本明細書に組み入れられる)。さらに、ウイルスは非常に特殊化されており、一種類または数種類の特定の細胞型に感染してその中で増殖する能力に基づき、ベクターとして選択することができる。従って、ベクター中に含まれる核酸を特定の細胞型に標的化するのにそれら固有の特殊性を利用することができる。従って、T細胞に感染させるのにHIVに基づくベクターを使用することができる、例えば、呼吸上皮細胞に感染させるのにアデノウイルスに基づくベクターを使用することができる、神経細胞に感染させるのにヘルペスウイルスに基づくベクターを使用することができる、など。ウイルスまたは非ウイルス・ベクターは同様に、受容体媒介事象を介した標的特異性が変化するように特定の受容体またはリガンドに対して修飾することができるが、アデノ随伴ウイルスのようなその他のベクターは、宿主細胞の範囲をさらに広く持ち得ることから、それ故、種々の細胞型に感染させるのに使用することができる。本発明のポリヌクレオチド、またはポリヌクレオチドを含むベクターは、細胞、例えば、ポリヌクレオチドを含むベクターの増殖を可能とする宿主細胞、またはポリヌクレオチドを含むウイルス・ベクターのパッケージングを可能とするヘルパー細胞に含まれてもよい。ポリヌクレオチドは、細胞に一過的に含まれてもよく、または、例えば、細胞のゲノムへの組込みによって安定的に維持されてもよい。

20

30

## 【0118】

本発明の方法は同様に、被験者において調節不能な増殖を示す細胞の部位に所望のポリペプチドを直接供給することにより実践することもできる。ポリペプチドは、本明細書に開示の方法を用いて、産出かつ単離することができ、さらに必要に応じて、製剤化することができ、細胞に接触させて該ポリペプチドを標的細胞の細胞膜を通過させることができる。所望のポリペプチドを生物の細胞と接触させる場合、ポリペプチドは、細胞膜を越えた輸送を容易とするペプチドまたはポリペプチド成分、例えば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV) TATタンパク質の形質導入ドメインを含む、融合タンパク質を含むことができる、およびポリペプチドに操作可能に連結された核局在化ドメインをさらに含むことができる。或いは、またはさらに、ポリペプチドを、細胞へのポリペプチドの移入を容易とするマトリクス中に製剤化することができる。

40

## 【0119】

生存被検体への投与の場合、本発明の治療方法を実践するのに有用な、脱メチル化剤、ポリヌクレオチド、またはポリペプチドのような薬剤は一般に、被検体への投与に適した組成物中に製剤化される。従って、本発明により、一つまたは複数の遺伝子の転写がメチ

50

ル化により沈黙化されたことが原因で調節不能な増殖を示す細胞に対し、調節された増殖を回復させるのに有用な薬剤を含む組成物が提供される。従って、薬剤は、そのような調節不能な増殖と関連した病的状態に苦しむ被検体を治療するための薬物として有用である。

#### 【0120】

そのような組成物には一般に、薬剤を製剤化するおよび薬剤を被検体に投与するのに許容され得る担体が含まれる。そのような許容される担体は、当技術分野においてよく知られており、例えば、水もしくは緩衝生理食塩溶液のような水溶液またはグリコール、グリセロール、オリーブオイルのようなオイルもしくは注射可能な有機エステルのようなその他の溶媒もしくは媒体を含む。許容される担体には、例えば、複合体の吸収を安定化させるまたは増加させるように作用する、生理的に許容される化合物が含まれてもよい。そのような生理的に許容される化合物には、例えば、グルコース、スクロースもしくはデキストランのような糖質、アルコールピニン酸もしくはグルタチオンのような抗酸化剤、キレート剤、低分子量タンパク質またはその他の安定剤もしくは賦形剤が含まれる。当業者であれば、生理的に許容される化合物を含む、許容される担体の選択は、例えば、治療薬の物理化学的特性におよび組成物の投与経路(これは例えば、経口的もしくは経静脈的のような非経口的な方法、および注射、挿管による方法、または当技術分野において知られる他のそのような方法とすることができる)に依存することを理解するものと思われる。薬学的組成物には同様に、診断薬のような第二試薬、栄養物質、毒物、または治療薬、例えば、ガン化学療法薬が含まれてもよい。

10

20

#### 【0121】

薬剤は、水中油型乳剤、マイクロエマルジョン、ミセル、混合ミセル、リポソーム、ミクロスフェア、超微粒気泡、またはその他のポリマーマトリクス内のような封入材料内に組み込むことができる(例えば、Gregoriadis, *Liposome Technology*, Vol. 1 (CRC Press, Boca Raton, FL 1984); Fraleyら、*Trends Biochem. Sci.*, 6:77 (1981)、これらのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる)。例えば、リン脂質またはその他の脂質からなるリポソームは、作製かつ投与するのが比較的容易な、無毒性の、生理的に許容されるおよび代謝性の担体である。「ステルス」リポソーム(例えば、米国特許第5,882,679号; 米国特許第5,395,619号; および米国特許第5,225,212号を参照されたい、これらのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる)は、本発明の方法で有用な組成物を調製

30

#### 【0122】

治療薬を含む組成物の投与経路は、部分的には、分子の化学構造に依存するものと思われる。ポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、例えば、経口投与されると、消化管で分解される可能性があるので、特に有用でない。しかし、ポリペプチドを、例えば、内在性プロテアーゼによる分解を受けにくくさせるかまたは消化管を介して吸収されやすくさせるために、これを化学的に修飾するための方法が本明細書に開示されている或いは当技術分野において周知である(例えば、Blondelleら、上記、1995; EckerおよびCrook、上記、1995を参照されたい)。さらに、ポリペプチド薬剤は、D-アミノ酸を用いて調製することができる、またはドメイン構造を模倣する有機分子である、ペプチド模倣体に基づく; もしくはビニロガス・ペプトイド(vinylogous peptoid)のようなペプトイドに基づく一つもしくは複数のドメインを含むことができる。

40

#### 【0123】

50

本明細書に開示の組成物は、例えば、経口もしくは非経口、例えば、静脈内、筋肉内、皮下、眼窩内、関節内、腹腔内、直腸内、大槽内を含む種々の経路により、または例えば、皮膚パッチもしくは経皮的イオン導入法を用いてそれぞれ、皮膚を介した受動的吸収もしくは促進吸収により個体に投与することができる。さらに、組成物は、注射、挿管により、経口的にまたは局所的に投与することが可能であり、その後者は、例えば、軟膏の直接塗布により受動的とすることが可能であり、または、例えば、点鼻薬もしくは吸入薬(この場合には、組成物の一成分は適当な噴霧剤である)を用いて、能動的とすることが可能である。薬学的組成物を同様に、病的状態の部位に、例えば、腫瘍に供給を行っている血管中に経静脈的にまたは経動脈的に投与することができる。

#### 【0124】

本発明の方法を実践する際に投与される薬剤の総量を、単一用量として、比較的短時間にわたって大量瞬時投与または注入により被検体に投与することができる、または複数回用量を長時間にわたって投与する、分割治療手順により投与することができる。当業者であれば、被検体の病的状態を治療するための組成物の量は、被検体の年齢および全般的な健康状態のほかに投与経路および投与される治療薬の数を含む多くの要因に依存することを理解するものと思われる。これらの要因を考慮して、当業者は、必要とされる特定用量を調整するものと思われる。一般に、組成物の剤形ならびに投与の経路および頻度は、第I相および第II相臨床試験により、最初に、決定される。

#### 【0125】

組成物は、錠剤、または溶液もしくは懸濁形態のような、経口製剤として製剤化することができる；または経腸的なもしくは非経口的な使用に適した有機のもしくは無機の担体もしくは賦形剤との混合剤を含むことができ、そして例えば、錠剤、小丸薬、カプセル剤、坐剤、溶剤、乳剤、懸濁剤、または使用に適したその他の形態のための通常は無毒性の、薬学的に許容される担体と調合することができる。担体は、上記に開示されるものに加えて、グルコース、ラクトース、マンノース、アラビアゴム、ゼラチン、マンニトール、デンプン糊、三ケイ酸マグネシウム、タルク、コーンスターチ、ケラチン、コロイダル・シリカ、ジャガイモ・デンプン、尿素、中鎖トリグリセリド、デキストラン、および固形状の、半流動性の、または液状の形態として、製剤を製造する際の使用に適したその他の担体を含むことができる。さらに助剤、分解防止剤、増粘剤または着色剤および芳香剤、例えば、トリウロース(triulose)のような安定乾燥剤を使用することができる(例えば、  
米国特許第5,314,695号を参照されたい)。

#### 【0126】

以下の実施例は、本発明を限定するものではなく例示することを意図するものである。

#### 【0127】

##### 実施例1 食道ガン細胞の後生的な沈黙化腫瘍抑制遺伝子の同定

本実施例により、食道扁平上皮ガン細胞と関連する、後生的に沈黙化された腫瘍抑制遺伝子を含む、後生的に沈黙化された遺伝子を同定するためのゲノムスクリーニング法が提供される(同様に、Yamashitaら、Cancer Cell 2 :485~495, 2002を参照されたい、これは参照として本明細書に組み入れられる)。

#### 【0128】

##### 方法

##### 細胞株および組織試料

食道扁平上皮ガン(ESCC)細胞株TE1、TE2、TE3、TE4、TE5、TE7、TE13、KYSE30、KYSE70、KYSE110、KYSE140、KYSE150、KYSE200、KYSE410およびKYSE520は、東北大学 加齢医学研究所 医用細胞資源センター(Cell Response Center for Biomedical Research Institute of Department)より入手した(TE細胞系)また京都大学外科部門のShimada博士から親切にも提供していただいた(KYSE細胞系)。DNAおよびRNAの単離のため、細胞は、10%ウシ胎児血清を添加したRPMI 1640中で増殖させた。原発性ESCC腫瘍組織およびその周囲の正常組織は、メリーランド医科大学 医学分野 消化器病科より入手した。

10

20

30

40

50

## 【0129】

細胞の5-アザ-2'デオキシシチジン(5Aza-dC)およびトリコスタチンA(TSA)処理

処理の12~24時間前に、細胞を低密度(T-25フラスコ当たり $5 \times 10^5$ 個)に分割し、その後、3、4、または5日間、50%酢酸に溶解した100mM保存液から、1  $\mu$ Mまたは5  $\mu$ Mとした5Aza-dC(Sigma)で処理した、または同じ酢酸溶液を含んだ同一用量のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で偽処理した。5Aza-dCで最初にインキュベーション(48時間)後、エタノールに溶解した5 mM保存液から、TSA(Sigma)を最終濃度300 nMとして培地に添加した、または細胞を同一用量のエタノールで偽処理した。

## 【0130】

マイクロアレイおよびRT-PCR解析

オリゴヌクレオチド・マイクロアレイ解析は、12,599個の遺伝子を含む、GeneChip(商標) Human Genome U95Av2アレイ(Affymetrix)を用い、製造元の使用説明書に従って行った。薬物処理により上方制御された遺伝子は、製造元のアルゴリズムに従って同定された。RNAはTRIZOL試薬(Invitrogen社)を用いて単離し、総RNA(8  $\mu$ g)をM-MLV(Invitrogen社)で逆転写した; cDNA産物の100分の1をPCR法の鋳型として使用した。RT-PCR法は、次の24~30サイクルで行った: 95 で1分間、54または56 で1分間、および72 で1分間。RT-PCR法のための増幅プライマー対の例は、表3(配列番号:7~64)に示されている。対照反応として、逆転写酵素なし(-RT)ではPCR産物の増幅は見られなかった。

## 【0131】

カットオフを2倍増とした予備解析では、多くの追加遺伝子が得られた。しかし、これらの遺伝子のほとんどは、二つ以上の細胞株で上方制御されておらず、BIN1、BRCA関連タンパク質1(BAP-1)、およびMAPキナーゼ8相互作用タンパク質3(JNKタンパク質の足場タンパク質)のようなくつかの遺伝子は、プロモーター領域がメチル化されていなかった。このような遺伝子は、調べた細胞株で後生的に調節されていた、さらに上流の遺伝子により調節される経路に位置している可能性があると思われた。相対的に、発現の3倍増加をカットオフとすると、プロモーターの高メチル化をともなう後生的に沈黙化された遺伝子が日常的に同定された。従って、本明細書に開示の研究では3倍増加を使用した。

## 【0132】

塩基配列決定解析

ゲノムDNAはTRIZOL試薬により抽出し、ゲノムDNAの重亜硫酸塩修飾は報告されている(Merlinoら、Nature Med. 1:686~692, 1995、これは参照として本明細書に組み入れられる)ように行った。重亜硫酸塩処理DNAは、25個の遺伝子について作製されたプライマーセット(掲載の22遺伝子、ならびにMAPK8IP3、BIN1、およびBAP-1)を用い、開始部位ATGまたは提唱の転写開始部位を含んだ5'領域(約200~500 bp)を増幅した。PCR産物は、全てゲル抽出(Qiagen)し、BDターミネーター色素(Applied Biosystems)およびネスト化プライマーまたはフォワード・プライマー(表4; F2プライマーを参照されたい)を用い、Applied Biosystems 3700 DNA解析装置にかけた。

## 【0133】

メチル化特異的PCR法

重亜硫酸塩処理DNAを、アポリポタンパク質Dに対するメチル化特異的または非メチル化特異的プライマーセットのどちらかを用い、次の33サイクルで増幅させた: 96 で30秒間、59 (メチル化)および55 (非メチル化)で30秒間、ならびに72 で30秒間。アポリポタンパク質Dに対するメチル化特異的プライマー配列は、フォワード・プライマーとして

5'-CACACGCGCGAAAACAATAT-3' (配列番号:1)

およびリバース・プライマーとして

5'-TATGTATGTTACGTTTCGTCG-3' (配列番号:2)

を用いて設計した。

非メチル化特異的プライマー配列は、

10

20

30

40

50

5'-CACACAAAAACAATATCTCATTCT-3' (配列番号:3)

および

5'-TTTTTATGTATGTTATGTTTGTG-3' (配列番号:4)

とした。

別の実験では、配列番号:82および84として記載のメチル化特異的プライマーを使用した(表4を参照されたい)。さらなるメチル化特異的プライマーは、表4(配列番号:65~127)に示されており、表中、フォワード・プライマーはF1またはF2として表示され、リバース・プライマーはRとして表示されており;そして「PCR増幅」という欄は、本明細書に開示の結果を得るために使用したメチル化特異的プライマー対を示し、「配列」という欄は、重亜硫酸塩配列決定法に使用したプライマーを示している。

10

【0134】

ヒト発現ベクターの構築

完全長のCRIP1 cDNAは、Hind IIIおよびXba I認識部位を含む、プライマーセット

5'-CAGAAGCTTCCACCATGCCCAAGTGCCCAAGTGC-3' (配列番号:5)

および

5'-CTCTCGGTGTGAAAGTTCATTAGATCTGAC-3' (配列番号:6)

20

を用いたPCRによりTE2細胞から単離された。

PCR産物をゲルから切り出し、Hind IIIおよびXba Iで切断し、そしてCMVプロモーターを有する、Hind III-Xba I消化pcDNA3(商標)ベクター(Invitrogen)に連結した。pcDNA3-CRIP1の1クローンが、センス方向かつ正しい配列で挿入配列を有していた。pRCC-p53(Osadaら、Nature Med. 4:839~843, 1998、これは参照として本明細書に組み入れられる)を鋳型としてp53を増幅し、pcDNA3(商標)ベクターのHind IIIおよびXba I部位にサブクローニングし、そして配列決定した。pcDNA3(商標)ベクターに挿入されたApo D cDNAおよびpcDNA3(商標)ベクターに挿入されたSTAT3C cDNAを同様に使用した(例えば、Brombergら、Cell 98:295~303, 1999を参照されたい)。

【0135】

30

トランスフェクションおよびコロニー形成検定法

コロニー形成検定法は、単層培養で行った(Yoshikawaら、前掲、2001)。6-ウェルプレートを用い、ウェルあたり細胞 $2 \times 10^4$ 個として細胞を撒き、これにpcDNA3-p53、pcDNA3-STAT3C、pcDNA3-CRIP1、pcDNA3-Apo D、またはpcDNA3-mock(挿入配列なし)1  $\mu$ gを、製造元の手順書に従ってLipofectamine Plus(商標)トランスフェクション試薬(Invitrogen)を用いてトランスフェクトした。次いで、トランスフェクションの24~48時間後に、細胞を剥して100 mm組織培養皿に撒き、そしてApo DのmRNAレベル(RT-PCR法)でその発現を確認するために、トランスフェクションから48時間後に同時に回収した。CRIP1でトランスフェクトされた細胞は、トランスフェクション後、48時間までに急激に死んだ;従って、mRNAレベルはトランスフェクションから24時間後に評価した。細胞のApo DおよびCRIP-1 RNAレベルは、非メチル化細胞株の基底発現よりも1.5~2.0倍高かった。細胞をG418(1 mg/ml)で選択し、トランスフェクションから2週間後にコロニーを計測した。ニューロメジンU(NU; -Phoenix Pharmaceutical)を用いた処理の場合、コロニーフォーカス検定法では、対照用PBSまたは培地中に100  $\mu$ M UNを含有させた。

40

【0136】

結果

転写抑制遺伝子の薬物によるアンマスキング

脱メチル化剤5aza-dC(1  $\mu$ Mまたは5  $\mu$ M)を3~5日間用い、かつヒストン脱アセチル化酵素阻害剤TSA(300 nM;最後の24時間)を有りまたは無しとした細胞処理を利用して、ESC細胞3株で後生的に沈黙化された遺伝子を再活性化させた。処理後、遺伝子発現の変化

50



はどちらもNUを発現しかつプロモーターのメチル化がなかった。Apo Dの場合、TE5を除くESCC細胞株の全てで、プロモーターのメチル化が示されたが、一方でTE5細胞(この細胞は、Apo Dを十分に発現していた)には、いずれのメチル化もなかった。TE2、TE4、およびTE13細胞は、Apo D mRNAの弱い発現を示し、重亜硫酸塩処理DNAの直接配列決定で、細胞の約50%が非メチル化対立遺伝子を有していた。

#### 【0140】

原発性ESCC腫瘍における発現およびプロモーターの高メチル化

13個のメチル化遺伝子(表2; 「cpg<sup>d</sup>」レーン、「M」と示した遺伝子)を、メチル化特異的PCR(MSP)法または直接配列解析によりESCC組織におけるプロモーターのメチル化について調べた。13個の遺伝子のうちの10個は、腫瘍特異的なプロモーターのメチル化があった(図2)。腫瘍メチル化の頻度は、10%(UCCP-2)~80%(アポリポタンパク質C1)に及んだ。Apo Dは、ほとんど全ての原発性ESCC組織(80%)でメチル化されていた、そしてMSP法ではいくつかの正常組織で低レベルのメチル化を示した。スイプロシン-2(Swiprosin-2)およびチュープリンでは、正常な食道粘膜標本でメチル化が示されたことから、腫瘍特異的ではなく、組織特異的な高メチル化であると示唆される。試験した10個の原発性腫瘍のどれもIGFBP-2のメチル化がなかった。

10

#### 【0141】

次に、13個の遺伝子の発現を原発性ESCC 5組織で調べた; 原発性ガンでは対応する正常組織と比較して、発現の減少が検出された(表2)。NUおよびApo Dは、いくつかの原発性腫瘍では対応する正常組織と比較して、mRNAのレベルで顕著に抑制されていた。スイプロシン-2(swisprosin-2)を除いては、原発性腫瘍でメチル化されていた全ての遺伝子で、RNAレベルでの発現の顕著な減少が実証された。スイプロシン-2(swisprosin-2)の場合、原発性腫瘍または細胞株において、メチル化は発現の減少と相関していなかった(表2)。少数の腫瘍ではメチル化がないにもかかわらず、その他の機構によると思われる、特定遺伝子の下方制御(表2)が時折実証された。

20

#### 【0142】

腫瘍抑制活性

メチル化された遺伝子のうちの3個(CRIP、ApoD、およびNU)を、これら3個の遺伝子が全て沈黙化されたKYSE30で腫瘍増殖の抑制因子として機能する能力について調べた。この3個の遺伝子は、各遺伝子または対照ベクター(pcDNA3(商標)ベクター)をトランスフェクション後、G418選択を用いたコロニーフォーカス検定法により試験した。STAT3は発がんタンパク質であり、STAT3Cは構成的活性型である(Brombergら、前掲、1999)。STAT3の発現は5Aza-dC処理後に変化しなかったため、これを腫瘍抑制活性の陰性対照として使用した。NUの場合、タンパク質そのものを100 μMの濃度で使用した。3回の独立した実験でトランスフェクション(ApoD, 61.3±15.0%; CRIP1, 18.3±15.7%)またはタンパク質の添加(NU 33.6±12.3%)後に観察されたコロニー形成能は著しく減少し、3個の遺伝子の全てで、潜在的な腫瘍抑制活性が実証された(例えば、図3を参照されたい)。CRIP1の役割を発現にてさらに確認するため、KYSE30細胞にIRES-CRIP1を一過性にトランスフェクトした。GFPタンパク質(従って同時にCRIP1)を強く発現している細胞では、円形化、アポトーシス小体の出現、および核の縮小を含む、アポトーシスの典型的な形態学的変化が示された。TUNEL法により、CRIP1発現細胞でDNAの断片化が確認された。

30

40

#### 【0143】

後生的な沈黙化を薬物により反転させることで、ESCCにおける無数の転写抑制遺伝子が明らかになった。いくつかの未知のTSG候補が、マイクロアレイ解析および直観的アルゴリズムにより3倍増のカットオフを利用して同定された。大部分の遺伝子は高用量の5aza-dC処理により同定され、一部の遺伝子は、結腸ガン細胞株で実証されている(Cameronら、前掲、1999; Suzukiら、前掲、2002)ように、低用量の5aza-dCおよびTSAを用いた相対的処理により再活性化された。後生的な沈黙化の反転は、可変的に再発現される一部の細胞で起こる可能性が高いので、この調査では最小数の上方制御遺伝子が示されているものと思われる(Cameronら、前掲、1999)。選択的クローニング法を含むさらに複雑な研究法に

50

より、結腸直腸ガンで多くのメチル化された標的が同定されており、これを利用して、いっそう捕らえにくい標的を同定することができる(Suzukiら、前掲、2002)。5aza-dCを高用量で使用することで、さらに多くの数の細胞で再発現が誘導された可能性があり、それによって本研究で使用した直接的ハイブリダイゼーションによる研究法が容易となる。後生的な沈黙化を反転させる多くの研究法は、最も包括的な遺伝子調査となる可能性が高い。さらに、その他のアルゴリズムおよびより優れた脱メチル化剤またはHDAC阻害剤により、メチル化された標的がさらに暴かれることで、収率が改善される可能性がある。

#### 【0144】

ニューロメジンUは、正常な食道粘膜の保全に関与していると提唱されており、NUならば最近同定された同族受容体(Hedrickら、Mol. Pharmacol. 58:870~875, 2000)は、正常な食道粘膜で豊富に発現されている(Hedrickら、前掲、2000; Lynchら、Nature 406:70~74, 2000)。NU受容体(FM3)は、ヒトの結腸ガン細胞の増殖を遮断することが最近になって確認されたPI3キナーゼ(Sasakiら、Nature 406:897~902, 2000)を介してシグナルを伝達できる、Gタンパク質結合受容体である。さらに、本研究において、TSG候補の一覧には、同じ経路に関与している、ニューロメジンBおよびRSG2が含まれる。

10

#### 【0145】

CRIPは、発ガンに関与している、LIMドメイン(例えば、Lmo2およびLmo4)を有する。Lmo2は、おそらく血管形成を促進させることで(Yamadaら、Oncogene 21:1309~1315, 2002)、T細胞の白血病誘発において発ガンの役割を果たすことが提唱されている(Grutzら、EMBO J. 17:4594~4605, 1998)転写因子である。Lmo4は乳ガン細胞で過剰発現されており、BRCA1と結合することで、結果的にBRCA1転写活性の抑制を引き起こす(Visvanderら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:14452~14457, 2001; Sumら、J. Biol. Chem. 277:7849~7856, 2002)。パキシリンは、多くのLIMドメインを有し、細胞の拡張および運動に関与する焦点接着関連アダプタンパク質である(Schaller, Oncogene 20:6459~6472, 2001)。パキシリンのLIMは、APCおよびFhitを含むその他の重要な腫瘍抑制因子に対するパートナーである、-チューブリンと結合する(Herrerosら、2000)。本明細書で同定されたLIM遺伝子(CRIP)は、ドミナントネガティブな形で他のLIMタンパク質を調節できるおよび発ガンの多くの経路を調節するかまたはそれに影響を与える可能性がある、非常に小さい分子(273 bpの読み取り枠)である。さらに、酵母ツーハイブリッド・スクリーニング法により、結合パートナーとしてUbc13が同定されたことは、アポトーシスに欠かせない、NF- $\kappa$ BおよびJNK経路にCRIPを関連付けるものである(Wangら、Nature 412:346~351, 2001)。

20

30

#### 【0146】

アポリポタンパク質Dは、細胞増殖の停止に関与している(Do Carmoら、J. Biol. Chem. 277:5514~5523, 2002)、しかしその根底にある機構は知られていない。アポリポタンパク質CIおよびアポリポタンパク質Jのような他のアポリポタンパク質が、本明細書で同定された58個の遺伝子のなかに含まれている。アポリポタンパク質Jは、細胞死を誘導する潜在的な能力を有している(Hanら、Nature Med. 7:338~343, 2001)。アポリポタンパク質Dは、MAPキナーゼのシグナル伝達を調節するサイトカイン型受容体に結合する(Liuら、FASEB J. 15:1329~1331, 2001)。サイトカインシグナル伝達経路は同様に、SOCS-1のような認知されている腫瘍抑制因子(Yoshikawaら、前掲、2001)により利用される可能性があり、本結果により示されるように、IL-1受容体アンタゴニスト(IL-1 R2)(Colottaら、Science 261:472~475, 1993)やCLF-1(Elsonら、J. Immunol. 161:1371~1379, 1998)も同様にしてこの経路に関与している可能性がある。

40

#### 【0147】

58個の候補遺伝子の染色体位置が表2に掲載されている。多くのTSG候補が特定の染色体領域に密集していたこと(表2)から、薬物による脱メチル化処理後にその存在が暴かれる可能性がある、腫瘍で非常に高密度にメチル化されかつ遺伝子発現の減少したメチル化染色体領域の存在が示唆された。アポリポタンパク質D、NU、およびCRIP1はそれぞれ、3q26、4q12、および14q24に位置している。これらの遺伝子座の全てに、種々のガンで染色体欠失またはLOHがあり、3q26はまた、脆弱な部位でもある。本研究により、10個の遺伝子

50

が腫瘍に特異的な様式でメチル化されていたことが明らかとされたが、メチル化されているか否かにかかわらず、これらの遺伝子の全てがTSG経路における候補遺伝子である。例えば、MUC2は本研究で同定された遺伝子のうちの一つであったが；MUC2ノックアウトマウスは腫瘍形成されやすい(Velcichら、Science 295:1726~1729 2002)。このように、本研究で同定された遺伝子の多くが、ガンで遺伝的または後生的な不活化がまだ調べられていないTSG候補にあたる可能性がある。

#### 【0148】

ESCCで後生的に調節された経路および候補遺伝子が、メチル化および脱アセチル化を機能的に反転させた後に、マイクロアレイでハイブリダイゼーションさせることで同定された。本明細書に開示された結果から、本研究法は迅速かつ強力であることが実証され、その方法は、他のガン細胞株においても、後生的に沈黙化された抑制遺伝子を包括的に探索するために容易に繰り返し行うことができる。メチル化されたCpGアイランドを探索する相補的ゲノムアレイによる研究法を、機能的な再活性化による調査と比較することができる(Gitanら、Genome Res. 12:158~164, 2002 ;Adorjanら、Nucleic Acid Res. 30:e21, 2002; Shiら、Cancer Res. 62:3214~3220, 2002)。プロモーター領域にCpGアイランドおよび腫瘍組織でメチル化がある遺伝子は、本物のTSGである可能性が高い(表2)。このように、本研究法により3個の新規TSGが得られ、さらに多くがまだ調査されていないままである。

10

#### 【0149】

MSP法を利用することで、原発性腫瘍でのメチル化による不活化の頻度の迅速な検出が可能となる一方で、機能的な解析により抑制活性の迅速な評価が可能となる。同定された遺伝子により、ESCCの生物学的な進行を同定かつ操作するための手段が提供され、それ故、重要な治療標的になる可能性がある。さらに、遺伝子同定後にMSP検定法を迅速に開発することで、有望な分子検出の研究法を実施するうえで原発性腫瘍および他の臨床試料を大雑把に解析することが可能となる(例えば、Estellerら、前掲、1999; Kawakamiら、J. Natl. Cancer Inst. 92:1805~1811, 2000; Jeronimoら、J. Natl. Cancer Inst. 93:1747~1752, 2001を参照されたい)。

20

#### 【0150】

実施例2 頭頸部ガン細胞の後生的な沈黙化腫瘍抑制遺伝子の同定

本実施例は、食道ガン細胞に対する上記の開示結果を頭頸部扁平上皮ガン(HNSCC)細胞にまで拡張するものである。

30

#### 【0151】

HNSCC細胞を10 $\mu$ M 5Aza-dCとまたは0.1 $\mu$ M 5Aza-dCおよび300 nM TSAとインキュベートし、実施例1に記載されているようにスクリーニングした。後生的に沈黙化された遺伝子の再活性化が処理細胞の両群で観測された。発現の少なくとも2倍増加を示す遺伝子の実例が表5および6に示されている(増加倍数が第2列に示されている)。

#### 【0152】

これらの結果から、実施例1に開示のゲノムスクリーニング法は、その他のガン型にまで拡大適用できることが実証される。実施例1に開示されるように、HNSCC細胞で再発現された遺伝子のさらなる解析によって、腫瘍抑制活性を有する遺伝子を同定することができる。

40

#### 【0153】

本発明を上記の実施例に関連して記述してきたが、当然ながら本発明の精神および範囲内で変更および変形が含まれる。従って、本発明は、表1~6に従う、特許請求の範囲によってのみ限定される。

#### 【0154】

(表1) 処置後にマイクロアレイ解析により上方制御されていた遺伝子

	KYSE30	KYSE410	KYSE520
1 μM 5Aza-dC	46	15	5
1 μM 5Aza-dC + 300 nM TSA	57	21	51
5 μM 5Aza-dC	242	334	149
固有遺伝子数	289	363	185

全固有数 = 565 遺伝子

10

20

30

【 0 1 5 5 】

(表 2) 食道ガンにおける腫瘍抑制遺伝子の候補の同定

40

Gene bank	遺伝子名	ESCC 細胞株			ESCC 組織			既知のまたは提唱の機能
		染色体	CpG <sup>a</sup>	アンメチル化	CpG <sup>d</sup>	発現 <sup>e</sup>	CpG <sup>f</sup>	
M21302	プロリンに富む小タンパク質 (sprll)	1	(-)	•	•	•	UV誘発遺伝子	
A1813532	TNF 受容体 1B	1p36	(++)	•	•	•	サイトカイン受容体	
A1883652	ヒストン 2A.2	1q21	(++)	•	•	•	スクレオソームタンパク質	
J05581	MUC1	1q21	(++)	Yes	•	U	腫瘍抗原	
L13463	Gタンパク質シグナル伝達系調節因子 2 (RGS2)	1q31	(++)	•	•	U	Gタンパク質シグナル	
AF010309	Pig3	2p23	(+)	•	•	•	p53により誘導される遺伝子	
X06956	α-チロシン(b α 1)	2p36	(++)	•	•	M	微小管	
X59770	IL-1 R2	2q12	(-)	Yes	•	•	サイトカイン受容体	
A8011103	KIF5C	2q23	(?)	Yes	•	•	細胞質輸送	
X63368	HSP40 相同体 (HSJ1)	2q32	(+)	•	•	•	ストレス誘発遺伝子	
W27472	スイプロリン-2 (Swiprosin-2)	2q36	(++)	Yes	•	M	増殖停止 <sup>g</sup>	
S37730	IGFBP2	2q36	(++)	•	•	M	IGFシグナル	
M11433	細胞性レチノール結合タンパク質 (CRBP)	3q21	(++)	•	•	M	レチノール結合タンパク質	
J02611	アポリポタンパク質 D	3q26	(+)	Yes	•	M	増殖停止	
A8029031	Tbc1d1	4p14	(++)	Yes	•	•	腫瘍能	
AF084481	腫瘍通タンパク質 (WFS1)	4p16	(++)	•	•	•	Wolfam 症候群	
X76029	ニトロイメジン U	4q12	(++)	Yes	•	M	Gタンパク質受容体のリガンド	
X57522	TAP1	6p21	(++)	•	•	U	腫瘍抗原プロセッシング	
AF040958	リソソーム性ノイラミニダセ前駆体	6p21	(++)	Yes	•	•	酵素	
X70683	Sry	6p22	(++)	•	•	•	性別決定遺伝子	
AB000714	クロロチン-3	7q11	(++)	•	•	•	骨質結合	
M25915	アポリポタンパク質 J	8p21	(++)	Yes	•	•	アポリポタンパク質	
M22488	骨形成タンパク質 1 (BMP-1)	8p21	(++)	•	•	•	TGF-βスーパーファミリー	
AF001461	KLF6 (Zf9)	10p15	(++)	Yes	•	•	腫瘍抑制遺伝子	
M13755	インターフェロン誘発性 17-kDa/15-kDa	11p36	(++)	•	•	•	インターフェロン誘発性遺伝子	
U94592	肺共役蛋白質 2	11q13	(++)	Yes	•	•	アポリポタンパク質	
W68521	シヌクタン E/M (6)	11q13	(++)	•	•	•	タンパク質分解阻害因子	
AF001436	Cdc42 エフェクタータンパク質 2 (CEP2)	11q13	(++)	•	•	•	運動性阻害	
X15675	p187	11q13	(++)	•	•	•	反複製列遺伝子	

AL038340	クリスタリンα B	11q22 (++)	Yes	ストレス誘発遺伝子
AJ001484	NKG2C	12p13 (-)	•	NK 細胞認識
AJ001485	NKG2E	12p13 (-)	•	NK 細胞認識
M20481	GLUT3	12p13 (+)	•	グルコース輸送
U31875	Hep27	14q11 (++)	•	抑癌停止 <sup>a</sup>
X81637	クラスリン軽鎖 b	14q21 (++)	•	膜再構成
X67325	インターフェロン刺激性遺伝子 12 (p27)	14q32 (+)	•	IFN 誘発性遺伝子
A017574	LIM を有するシステインに富むタンパク質 (CRIP1)	14q32 (++)	Yes	LIM タンパク質
A1984572	ヒューマン B	15q22 (++)	•	G タンパク質受容体のリガンド
NM_002201	HEM45 (インターフェロン刺激性遺伝子 20)	15q26 (++)	•	IFN 誘発性遺伝子
J03910	メタロチオネイン-1G	16q (++)	•	アポトシス関連遺伝子
NM_004165	Rad	16q22 (++)	Yes	運動性阻害
AA974838	アポリポタンパク質 C1	16q22 (++)	Yes	増殖促進 <sup>a</sup>
J00124	ケラチン 14	17q12 (+)	•	中間体フィラメント
U20982	IGFBP4	17q12 (++)	•	IGF シグナル
Z19574	サイトケラチン 17	17q12 (++)	•	中間体フィラメント
AF059293	サイトカイン様因子-1 (CLF-1)	19p13 (++)	Yes	サイトカイン受容体相同体
D12620	チトクロム P-450L1BV	19p13 (++)	•	電子伝達
AF041812	ケラチン 16	19q12 (++)	•	中間体フィラメント
U76702	ホリスタチン関連タンパク質 FLRG	19q13 (++)	•	TGF-β 関連遺伝子
AF044948	ネクチン 2	19q13 (++)	•	接着結合
AA152406	チトクロムオキシダーゼ c、Vilc 型 <sup>d</sup>	19q13 (++)	•	電子伝達
M37457	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase 触媒サブユニット、α-III	19q13 (++)	•	イオン輸送
U61837	推定上のサイトクリン G1 相互作用タンパク質	20p13 (++)	No	細胞周期 (G2/M)
M55153	トランスグルタルタミチナゼ 2 (組織グルタミナゼ)	20q11 (++)	Yes	アポトシス
W72816	切断刺激因子	20q13 (++)	•	RNA 結合タンパク質
X75315	Seb4B (RPM 型 RNA 結合タンパク質)	20q13 (++)	•	BRCA1 関連遺伝子
X91817	トランスケトラーゼ 2	Xq28 (+)	•	代謝産物の補因子
AD001530	XAP-5	Xq28 (++)	No	反復配列遺伝子

10

20

30

<sup>a</sup> CpG 部位。プロモーター領域中に (++) 高密度の CpG アイランド、(+) CpG 部位、(-) CpG 部位なし。 40

<sup>b</sup> 処置後の実験の RT-PCR 結果。\* : 行っていない。Yes: 三つの主要細胞で沈黙化および処置後の再活性化が確認された。

<sup>c</sup> ESCC 細胞の広範なパネルにおける RT-PCR による遺伝子発現。\* : 行っていない。Yes: いくつかの細胞株で沈黙化が確認された。No: 調べた全細胞株で普遍的に発現していた。

<sup>d</sup> ESCC 細胞の CpG の状態。M; メチル化、U: 非メチル化、\* : 行っていない。

<sup>e</sup> ESCC 組織における RT-PCR による遺伝子発現。沈黙化されていた腫瘍 / 調べた腫瘍 (% 沈黙化)。

<sup>f</sup> ESCC 組織における直接塩基配列決定法によるプロモーターのメチル化。メチル化されていた腫瘍 / 調べた腫瘍 (% メチル化)。

50

【 0 1 5 6 】  
( 表 3 )

	F	R
RT-PCR プライマー		
MUC1	GCTGGTCTGGTCTGTGTTCT (7)*	AACCTGAGTGGAGTGAATGG (8)
IL-1 R2	TGAAGCCAGCAATACAACAT	TGCGTAGTGTCTGAAAACTCA
KIF5C	AGAAACTGCAACTGGAACAGG	CAGCTGCTTGTGAACCTTTGGT
スイプロシン-2 (Swiprosin-2)	TGTCATCGGCCAGTAAGTTTG	AGAGGAGCAGAGGCAGGAGAC
CRBP	AGGCCCTCCTGGATGTCACC	GGAAGATGCTGAGCAACGAG
アポリポタンパク質D	GCATTTTCATCTTGGGAAGTGC	TGCAGGTACAGGAATACACGA
Tbc1d1	CGAGAAATGAGCAGCGAGAGA (19)	CTCCGAGTCACTGGACAGGTC (20)
ニューロメジンU	GCTCCAATATTACCTCAAGGA	TCGTCCACTCTGAATCTCTTC
TAP1	CAGAACTCTGTACCAGCCC	CTGGCTGTTTGCATCCAGG
リンソーム性ノイラミニダーゼ前駆体	TGGCTCAGTCGTCATCAATGC	TCCGGCCCTTTCTCATAACAGGA
アポリポタンパク質J	ACAACCCCTCCCAGGCTAAGC	TCCGCCACGGTCTCCATAAAT
KLF6	ATGTGCAGCATCTTCCAGGAG (29)	CCAATGGGTCGGAGGTAAC (30)
脱炭水素白質 2	CTAGCAGGCAGCACCCACAGGT	GTCTACAGGGGAGGCCGATGAC
クリスタリン $\alpha$ B	GACCAGTTCTTCGGAGAGCAC	ACAGTGAGGACCCCATCAGAT
NKG2E	TCAGGAACCGAACAGGAAATA	CATGAGGAAGGTAATAATGCTG
Hep27	AATACTACCCGCAAGGTCTG	CTAGCACAGGGATGAAACCAG
ISG12 (p27)	CAGTGTGGCCAAAGTGGTCAG (35)	CAATGGAGCCCAGGATGAACT (40)
CRIP-1	CCAAGTGCAACAAGGAGGTG	GGGTGGTTGCAGTAGGGTTTG
HEM45	GCTCGTTGCAGCCTCGTGAAC	TCAGCACCCCGCAGGGAGACAC
メタロチオネイン1G	TAGGAGGGTGCTTGGTTTTCC	TTAGCCACAGCCCCAGATTCC
Rad	GTGCGCTCTCGTGAGGTCTCG	CGTTCGCTCCCCACCATAGTG
ケラチン14	TAGTGGCTTTGGGGAGGATA (49)	GTCCACTGTGGCTGTGAGAAT (50)
IGFBP4	ACAAAAGACTGCCAAGGACAT	TATTCTCGATAAAGCCCTGTGC

10

20

30

40

CLF-1	CCGATGTACTCACGCTGGATA	CATAGATGCCCAAAGGGTTGC
FLRG	TTTCTCAGCCCCCAAGCCTCTA	GTCCCCACACGCACTCAGACT
推定上のサイクリンG1相互作用タンパク質	CGGATGTCACCTGTGCTTGAGG	ATCGTGCCCGGAAGAACTCCTG
トランスグルタミナーゼ	TACGATGCCCCCTTTGTCTTT (59)	AGCGGTGTTGTTGGTGATGTG (60)
XAP-5	GGAAGCCCAAGCAGGAGAAGAT	TGAGCAACCCGCACATCGTCAT
GAPDH	GTCAACGGATTTGGTCGTATT (63)	AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT (64)

10

20

30

40

\* 配列番号： - 左から右へ、上から下へ、7~64まで番号を付けた；代表的な配列番号が示されている。

【 0 1 5 7 】

( 表 4 )

メチル化プロプライマー	F1	F2	R	PCR 増幅	配列
MUC1	AACCTACCCCTCCCCCTCC (65)*	AAACCCCTTATACCCTACCCCA (66)	GAGGGGTAGATAGATAGTTAG (67)	F2-R	F2
RG52	ATCTCCTATCATAACTTCTCTAAAC	TACTCCACACCTACCCCAAC (68)	TGTTTGGTTTTGTTTATGGGTTT (69)	F2-R	F2
α-チロシン	TCCTCCACCAACTACAAAT	AAATTAATAATCTAAACCAA	ATTTTATTTAACGGTTATAAGAGT	F1-R	F2
スワイロシン-2 (Swiprosin-2)	TATTCCTTCATAAAATCATAATCA	CCAATCCATCCGTAACCCGTC	GTACGTTAGTTTTTATTTGGTTATGG	F2-R	F2
IGFBP2	ATCTCCTCTTCCCTTTATAAAAAA	ATAATCAACCCAAAAAATA	GGTAGGTGGTACGGTTTTGTGAG	F1-R	F2
アポリポタンパク質D	AACGAAGTTAACTGATACCCCTC (82)	CCTAAACAAACCTAACCCCTT	TGATTGGAGTTAGTTGGTTATAAGT	F1-R	F2
ヒューマンメジンU	CCCAATCCAATCCCTCCAAAAATA	TCCATCTCTTTATCCCAA	TATTTTGGTGTGTTGGTTGTGTTT	F1-R	F2
TAP1	CAACATCCCTACAAAACCCACTCT	TAAACAATAATTTCCAAAG	TGTTTAAATTTTTTATTTATGTATA	F1-R	F2
リン酸-α-マンノシドラーゼ	AAACCAATAAAATAATACCAATC	CCCTTTCACCCCAACCAAT	ATTTTGGTAGTAGATTTTATAGAG	F2-R	F2
クロロチン-3	CACAAACCAAAATCCTTCCGCCAA	TCACTATCCTTTAAACCCCTAC	GGACGGGTTGGTATTTTATAGGAGG	F1-R	F2
BMP-1	TTTTGTTAGTTATAGGTGAGT (98)	CGACTAAACCCAAAAACAA (99)	TTTCGTTAGGTTATAGGTGAGT (100)	F1-R	F2
脱炭酸糖質 2	AAAAAATCATAAAAAAACCCCTAA	CCCAATAAAAACTAACAAA	CGAGCGTGGATAGTTAAATTTAAGG	F2-R	F2
CRIP-1	CTTAAACCCCTAAACCTAAATTCAAA	ATCCCAAAATCCAAATCCT	TATTTTTTGGTGTATTTGGGATAT	F2-R	F2
メタロチオネイン 1G	CCAACTAGCTCAAAAAACCTTAC	TACACTAACCCATCTCCCTA	TTAAGCGAAGGGAGAGAGGTAGTG	F1-R	F2
Rad	AATAACCCCTAAACCTAAATCTAA	CITCTCTCACACCTCAAAAC	GAGGGGTTGGTATTTTATAGGAGG	F2-R	F2
アポリポタンパク質 C1	AAAAATAAATAATCTAAAAACCC (113)	ACCCCAAAATCAAAAAA (114)	TATTTAGTATTAATTTGAATTTTG (115)	F1-R	F2
CLF-1	TAAATTAATAAACTTTAAAC	TTATCAATTCACACTACTCAAACTTA	AGAGTAGTAGTAGTAGGGGTAGTAA	F2-R	F2
FLRG	CCCTAAATCCCAACCCAGATCTGCCA	CCAAATACATTTCTTAACCTC	AGGGTAGAGGTTAGAGTGGTTTTGG	F1-R	F2
推定上のサイクリン G1相互作用タンパク質	ACAAAATTTACACCTCCACACTAA	ATTTAACCCCTATAAAACAT	AGGATTGATTTGGGAAGGGGAAGGG	F1-R	F2
トランススグルタルタミチン-セ2	ATCCCTAAATAAACCCAC (125)	TAAATAACCTCCCAAAATCAC (126)	GCGGTGATTTTGATATATTTT (127)	F2-R	F2

10  
20  
30  
40

\* 配列番号： - 左から右へ、上から下へ、65～127まで番号を付けた；代表的な配列番号が示されている。

【 0 1 5 8 】

(表5) 5aza-dCで処理したHNSCC#011細胞株

1776_at	10.9	L24564/FEATURE=/DEFINITION=HUMRAD ヒト Rad mRNA、完全コード
1902_at	5.562	起源：ヒト除去修復タンパク質 (ERCC1) mRNA、完全コード、クロニン pcd
36953_at	3.5132	キイロシヨウジョウバエ Mothers against dpp (Mad) 遺伝子(DPC4 遺伝子)、GenBan
34892_at	2.4292	DR4 相同体；TNF 受容体に類似のデスドメインを含む；TRAIL 受容体
1879_at	3.7	M14949 ヒト R-ras 遺伝子、エクソン2～6
1860_at	2.3	U58334 ヒト Bcl2、p53 結合タンパク質
2031_s_a	2.9	U03106 ヒト野生型 p53 により活性化される断片 -1 (WAF1) mRNA
595_at	3.648	腫瘍壊死因子 $\alpha$ 誘導性タンパク質
35151_at	2.4474	DOC-1 関連タンパク質
1668_s_a	2.4375	起源：ホモサピエンス(Homo sapiens)(クロニンg7)フォン・ヒッペル・リンドウ病腫瘍抑制
1814_at	3.3	ホモサピエンス (Homo sapiens) TGF- $\beta$ IIR $\alpha$ mRNA
425_at	5.8	X67325 ホモサピエンス (H.sapiens) p27 Mrna
38374_at	2.3	AF050110 ホモサピエンス(Homo sapiens)TGFb誘導性初期タンパク質および初期増殖応答
1736_at	2.2	M62402 ヒトインスリン様増殖因子結合タンパク質 6 (IGFBP6) 遺伝子
39781_at	3.7	U20982 ヒトインスリン様増殖因子結合タンパク質 4 (IGFBP4) 遺伝子
32034_at	3.1	AF041259 ホモサピエンス (H.sapiens) 乳ガンの推定上の転写因子(ZABC1) 遺伝子

10

20

30

40

【 0 1 5 9 】

(表6) 5aza-dC + TSAで処理したHNSCC#013細胞株

1879_at	4.8	M14949	ヒト R-ras 遺伝子、エクソン 2～6
41848_f_at	6.4361		起源：ヒト MDA-7 (mda-7) mRNA、完全コード
1454_at	2.3633		起源：ホモサピエンス mad タンパク質相合体 (hMAD-3) mRNA、完全コード
31851_at	2.3171		起源：関与する腫瘍抑制候補に対するホモサピエンス mRNA
38886_i_at	2.2503		起源：ホモサピエンスの推定上の腫瘍抑制 NOEY2 mRNA、完全コード
1211_s_at	2.1	U84388	ヒト デスドメイン 含有 タンパク質 CRADD mRNA
33642_s_at	11.7	U17986	ヒト GABA/ノルアドレナリン・トランスポーター mRNA
1348_s_at	2.7	S79219	転移関連遺伝子 (ヒト、高転移性肺細胞亜株 Anip[937]、部分的 mRNA、978 nt)
1788_s_at	2.1	U48807	ヒト MAP キナーゼ脱リン酸化酵素 (MKP2) mRNA
38477_at	2.1	S81752	DPH2L = <small>腫瘍抑制候補遺伝子 (卵巣がんでの欠失の必須領域)</small> 「ヒト、9週 の胎児組織および胎盤組織、mRNA、2233 nt」
34308_at	2.9	U90551	ヒト ヒストン 2A 様 タンパク質 mRNA
33352_at	3.3	X57985	ホモサピエンスのヒト ヒストン H2B.1 および H2A 遺伝子
37196_at	2.4		ホモサピエンス VE-カドヘリン mRNA
38994_at	2.6	AF037989	ホモサピエンスの STAT 誘導性 STAT 阻害因子-2 mRNA

10

20

30

40

## 【図面の簡単な説明】

【0160】

【図1】腫瘍抑制遺伝子 (TSG) 候補を選択するためのフローチャートを示す。食道扁平上皮がん (ESCC) 細胞3株を、1~5 μM 5-アザ-2'-デオキシシチジン (5Aza-dC) ± 300 nM トリコスタチン A (TSA) で処理後、オリゴヌクレオチド 12,599個のマイクロアレイへの cRNA のハイブリダイゼーションによって、TSG 候補についてスクリーニングした。処理後に3倍以上の増加を示した、500個を超える固有遺伝子が同定された (表1を参照されたい)。候補遺伝子の数は、調べた ESCC 細胞株で共通して上方制御されていた遺伝子 (120個の遺伝子) を選択することで減らされ、さらに発現プロファイリングおよび未知遺伝子の除外により、いく

50



【手続補正書】

【提出日】平成17年1月17日(2005.1.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2005532041000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 47/24	4 C 0 8 7
A 6 1 K 47/24	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	A 6 1 K 37/02	

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

(72) 発明者 シドランスキー デイビッド

アメリカ合衆国 メリーランド州 ボルティモア ノースブロッック ロード 3 0 0 7

(72) 発明者 ハーマン ジェームス

アメリカ合衆国 メリーランド州 ルーサービル ダンベス コート 2 0 6

(72) 発明者 スズキ ヒロム

アメリカ合衆国 メリーランド州 ボルティモア アpartment 1 0 2 ハローデイル ロード 6 8 0 4

(72) 発明者 ベイリン ステファン ビー.

アメリカ合衆国 メリーランド州 ボルティモア リバーサイド アベニュー 1 2 4 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 CA09 CA11 HA09 HA11 HA12  
 4B063 QA01 QA12 QA13 QA18 QA19 QQ42 QQ52 QR08 QR14 QR55  
 QR62 QR82 QS16 QS25 QS26 QS34 QS36 QX02 QX07  
 4C076 AA19 BB01 BB13 CC27 CC47 DD15 DD63 FF63 GG45  
 4C084 AA02 AA03 AA13 AA17 BA01 BA35 BA44 BA47 CA01 CA53  
 DA01 DA27 DA47 DC25 MA24 MA52 MA66 NA14 ZB352  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA07 MA24 MA52 MA66 NA14  
 ZB26  
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA09 CA12 MA24 MA52 MA66 NA14 ZB26

专利名称(译)	表观遗传学沉默的肿瘤抑制基因的基因组筛选		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005532041A</a>	公开(公告)日	2005-10-27
申请号	JP2003574801	申请日	2003-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	约翰霍普金斯大学		
申请(专利权)人(译)	约翰·霍普金斯大学		
[标]发明人	シドランスキーデイビッド ハーマンジェームス スズキヒロム ベイリンステファンビー		
发明人	シドランスキー デイビッド ハーマン ジェームス スズキ ヒロム ベイリン ステファン ビー.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K9/127 A61K31/165 A61K31/7068 A61K35/76 A61K38/00 A61K45/00 A61K47/24 A61K48/00 A61P35/00 C07H21/00 C12N C12N1/00 C12N15/09 C12Q1/04 C12Q1/68 G01N37/00		
CPC分类号	A61P35/00 C12Q1/6827 C12Q1/6886 C12Q2600/154 C12Q2537/164		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K9/127 A61K31/7068 A61K35/76 A61K45/00 A61K47/24 A61K48/00 A61P35 /00 C12Q1/68.A C12Q1/68.Z G01N33/53.M G01N37/00.102 A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/HA09 4B024/HA11 4B024 /HA12 4B063/QA01 4B063/QA12 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR14 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063 /QS26 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B063/QX07 4C076/AA19 4C076/BB01 4C076/BB13 4C076/CC27 4C076/CC47 4C076/DD15 4C076/DD63 4C076/FF63 4C076/GG45 4C084/AA02 4C084 /AA03 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA35 4C084/BA44 4C084/BA47 4C084/CA01 4C084/CA53 4C084/DA01 4C084/DA27 4C084/DA47 4C084/DC25 4C084/MA24 4C084/MA52 4C084 /MA66 4C084/NA14 4C084/ZB352 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA07 4C086/MA24 4C086/MA52 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C087/AA01 4C087 /AA02 4C087/BC83 4C087/CA09 4C087/CA12 4C087/MA24 4C087/MA52 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZB26		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/362577 2002-03-07 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

提供了用于鉴定表观遗传沉默基因，包括表观遗传沉默肿瘤抑制基因的基因组筛选方法。还提供了检测癌症的方法，例如食道鳞状细胞癌或头颈鳞状细胞癌，以及治疗患有这种癌症的受试者的方法。

3) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	ターマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/00</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 9/127</b>	A 6 1 K 9/127	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 31/7068</b>	A 6 1 K 31/7068	4 C O 7 6
<b>A 6 1 K 35/76</b>	A 6 1 K 35/76	4 C O 8 4
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 6
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 61 頁) 最終頁に続

2) 出願番号	特願2003-574801 (P2003-574801)	(71) 出願人	503392851
3) (22) 出願日	平成15年3月7日 (2003.3.7)		
4) 翻訳文提出日	平成16年11月8日 (2004.11.8)		
5) 国際出願番号	PCT/US2003/007245		
6) 国際公開番号	W02003/076594		
7) 国際公開日	平成15年9月18日 (2003.9.18)		
8) 優先権主張番号	60/362,577	(74) 代理人	100102978
9) 優先日	平成14年3月7日 (2002.3.7)		弁理士 清水 初志
10) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100108774
			弁理士 橋本 一憲
		(74) 代理人	100128048
			弁理士 新見 浩一