

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-99698
(P2008-99698A)

(43) 公開日 平成20年5月1日(2008.5.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 4
C 0 7 K 16/32 (2006.01)	C 0 7 K 16/32	4 C 0 8 5
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 C 0 8 6

審査請求 有 請求項の数 34 O L (全 96 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-290671 (P2007-290671)
 (22) 出願日 平成19年11月8日(2007.11.8)
 (62) 分割の表示 特願2006-262093 (P2006-262093)
 の分割
 原出願日 平成8年2月19日(1996.2.19)
 (31) 優先権主張番号 95200390.3
 (32) 優先日 平成7年2月17日(1995.2.17)
 (33) 優先権主張国 オランダ(NL)
 (31) 優先権主張番号 95201951.1
 (32) 優先日 平成7年7月14日(1995.7.14)
 (33) 優先権主張国 オランダ(NL)

(71) 出願人 506291911
 ブラーディーク、イェルン
 ドイツ連邦共和国 デー-28355 ブ
 レーメン、ヴァイスドルンブファート14
 番
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (72) 発明者 ファン・デ・フェン、ヴィレム・ヤン・マ
 リー
 ベルギー、ペー-3000 ルーベン、レ
 イ8/アー・ブス42番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多重腫瘍異常生長遺伝子

(57) 【要約】

【課題】種々の良性および悪性いずれの腫瘍にも見られる異常細胞成長に関連する遺伝子およびタンパク質の提供。

【解決手段】高速移動群タンパク質遺伝子またはL I Mタンパク質遺伝子(これらの修飾体を含む)の成員の一つの鎖の一つのヌクレオチド配列を有する多重腫瘍異常生長(M A G)遺伝子および多重腫瘍成長因子。遺伝子およびその誘導体は、非生理的増殖を有する細胞の診断、種々の腫瘍、その他診断的および治療的利用に供することができる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

高速移動群タンパク質遺伝子または L I M タンパク質遺伝子（これらの修飾体を含む）の成員の一つの鎖の一つのヌクレオチド配列を有する多重腫瘍異常生長（M A G）遺伝子。

【請求項 2】

図 7 に示された H M G I - C 遺伝子のヌクレオチド配列またはその相補的鎖（両鎖の修飾体または伸長体を含む）を基本的に有する、請求項 1 の多重腫瘍異常生長因子。

【請求項 3】

図 5 に示された L P P 遺伝子のヌクレオチド配列またはその相補的鎖（両鎖の修飾体または伸長体を含む）を基本的に有する、請求項 1 の多重腫瘍異常生長因子。

10

【請求項 4】

ヒトまたは動物における非生理的増殖現象の処置のための適切な発現調節の化合物または技術を設計するための開始点として使用する、請求項 1、2 または 3 の多重腫瘍異常生長因子。

【請求項 5】

非生理的増殖能を有する細胞を野生型細胞と比較して（臨床的に / 医学的に）診断するための適切なヌクレオチド・プローブを設計するための開始点として使用する、請求項 1、2 または 3 の多重腫瘍異常生長因子。

【請求項 6】

非生理的増殖能を有する細胞を野生型細胞と比較して（臨床的に / 医学的に）診断するための適切な抗体を製造するための開始点として使用する、請求項 1、2 または 3 の多重腫瘍異常生長因子。

20

【請求項 7】

M A G 遺伝子の誘導体がセンスおよびアンチセンス c D N A またはそのフラグメント、該遺伝子の転写物またはその実際に用い得るフラグメント、アンチセンス R N A、該遺伝子のフラグメントまたはその相補的鎖、該遺伝子よりコードされたタンパク質またはそのフラグメント、該遺伝子、該 c D N A、該転写物、該タンパク質またはそれらのフラグメントに対する抗体および抗体フラグメントからなる群より選ばれ、診断および治療的組成物の調製に使用される、請求項 1、2 または 3 の M A G 遺伝子の、またはその直接の近隣の誘導体。

30

【請求項 8】

下記の段階

a) 請求項 1 または 2 の M A G 遺伝子のヌクレオチド配列から得られる情報に基づく 1 セットのヌクレオチド・プローブを設計する（該プローブの一つは、野生型遺伝子の対応領域として、同じ座に実質的に位置する異常遺伝子の領域にハイブリダイズ可能であり、他のプローブは、野生型遺伝子の対応領域より異なる座に位置する異常遺伝子の領域にハイブリダイズ可能である）、

b) 非生理的増殖能を有する 1 以上の中間層または間層染色体または細胞をプローブと共にハイブリダイズ条件でインキュベートする、

c) プローブと遺伝子とのハイブリダイゼーションを可視化する、

40

の少なくともいくつかを含む、非生理的増殖能を有する細胞を診断するためのインサイトウ診断法。

【請求項 9】

下記の段階

a) 診断すべき細胞の生検を採取する、

b) それより適当な M A G 遺伝子関連マクロ分子を単離する、

c) 得たマクロ分子を望ましくは同じ個体からの野生型参考分子と比較することにより分析する、

の少なくともいくつかを含む、非生理的増殖能を有する細胞を診断する方法。

【請求項 10】

50

下記の段階

- a) 診断すべき細胞の生検を採取する、
 - b) その全RNAを抽出する、
 - c) 全RNA中のmRNA種の少なくとも一つの第一鎖cDNA (cDNAは適当なテイルを有する)を調製する、
 - d) MAG遺伝子特異cDNAを増幅するために、MAG遺伝子特異プライマーおよびテイル-特異および/または相手特異/整列プライマーを用いてPCRおよび/またはRT-PCRを行う、
 - e) バンドのパターンを得るために、ゲル上でPCR産物を分離する、
 - f) 異常バンドの存在を、望ましくは同じ個体からの野生型バンドとの比較により調べる、
- の少なくともいくつかを含む、請求項9の方法。

10

【請求項11】

下記の段階

- a) 診断すべき細胞の生検を採取する、
 - b) それから全タンパク質を単離する、
 - c) 基本的に個々のバンドを得るためにゲル上で全タンパク質を分離し、そして選択的にバンドをウエスタン・プロットに移行する、
 - d) 得たバンドを、MAG遺伝子の残り部分によりコードされるタンパク質の部分に対する、およびMAG遺伝子の置換部分によりコードされたタンパク質の部分に対する抗体と共にハイブリダイズする、
 - e) 抗原-抗体反応を可視化し、望ましくは同じ個体からの野生型タンパク質よりのバンドとの比較で異常バンドの存在を確認する、
- の少なくともいくつかを含む、請求項9の方法。

20

【請求項12】

下記の段階

- a) 診断すべき細胞の生検を採取する、
 - b) それから全DNAを単離する、
 - c) DNAを1以上のいわゆる“希切断”制限酵素で消化する、
 - d) 分離パターンを得るために、調製した消化物を分離する、
 - e) 選択的に分離パターンをサザンプロットに移行する、
 - f) ゲル中またはプロット上の分離パターンを1以上の情報プローブと共にハイブリダイズ条件でハイブリダイズする、
 - g) ハイブリダイゼーションを可視化し、望ましくは同じ個体からの野生型タンパク質よりのバンドとの比較で異常バンドの存在を確認する、
- の少なくともいくつかを含む、請求項9の方法。

30

【請求項13】

下記の段階

- a) 診断すべき細胞の生検を採取する、
 - b) それからmRNAを抽出する、
 - c) MAG遺伝子から誘導されるmRNAの存在または(比較の)量を確認する、
 - d) 段階c)の結果を望ましくは同じ個体からの野生細胞での同様の実験結果と比較する、
- の少なくともいくつかを含む、請求項9の方法。

40

【請求項14】

非生理的増殖能を有する細胞が間葉腫瘍過誤腫(例えば乳房および肺)、脂肪性組織腫瘍(例えば脂肪腫)、多形態性唾液腺腫、子宮平滑筋腫、血管筋腫、肺の腺維腫、子宮内膜のポリープ、動脈硬化性プラークおよび他の良性腫瘍、さらに肉腫(例えば横紋筋肉腫、骨肉腫)および癌腫(例えば乳房、肺、皮膚、甲状腺の)などの種々の悪性腫瘍、さらに白血病およびリンパ腫のような血液学的悪性腫瘍からなる群より選択される、請求項8 -

50

9のいずれかの方法。

【請求項15】

非生理的増殖能を有する細胞が関与する疾患を該遺伝子の発現を調節することにより処置するのに用いる、請求項1、2または3のMAG遺伝子のアンチセンス分子。

【請求項16】

非生理的増殖能を有する細胞が関与する疾患の処置に用いる、請求項1、2または3のMAG遺伝子の阻害剤または促進剤（リボチームを含む）などの発現調節剤。

【請求項17】

非生理的増殖能を有する細胞が関与する疾患の処置に用いる、請求項1、2または3のMAG遺伝子のmRNA分子に相補的なアンチセンスRNA分子および/またはMAG遺伝子の遺伝子産物に対する抗体。

10

【請求項18】

標識ヌクレオチド・プローブの適当なセットを含む、請求項8の方法を実施するための診断キット。

【請求項19】

標識ヌクレオチド・プローブの適当なセットを含む、請求項10の方法を実施するための診断キット。

【請求項20】

標識MAG遺伝子特異およびテイル特異PCRプライマーの適当なセットを含む、請求項11の方法を実施するための診断キット。

20

【請求項21】

標識プローブの適当なセットおよび適当な希切断制限酵素を含む、請求項11の方法を実施するための診断キット。

【請求項22】

請求項7の誘導体を1以上および/または請求項16の発現調節剤を1以上含む、非生理的増殖能を有する細胞におけるMAG遺伝子発現レベルを低下せしめるための医薬組成物。

【請求項23】

非生理的増殖能を有する細胞が間葉腫瘍過誤腫（例えば乳房および肺）、脂肪性組織腫瘍（例えば脂肪腫）、多形態性唾液腺腫、子宮平滑筋腫、血管筋腫、肺の腺維腫、子宮内膜のポリープ、動脈硬化性プラークおよび他の良性腫瘍、さらに肉腫（例えば横紋筋肉腫、骨肉腫）および癌腫（例えば乳房、肺、皮膚、甲状腺の）などの種々の悪性腫瘍、さらに白血病およびリンパ腫のような血液学的悪性腫瘍からなる群より選択される、請求項22の医薬組成物。

30

【請求項24】

非生理的増殖能を有する細胞に関連する疾患または障害の診断または処置のための診断キットまたは医薬組成物の製造のための請求項7の誘導体の使用。

【請求項25】

非生理的増殖能を有する細胞に関連する疾患または障害の診断または処置のための診断キットまたは医薬組成物の製造のための請求項16の発現調節剤の使用。

40

【請求項26】

非生理的増殖能を有する細胞が間葉腫瘍過誤腫（例えば乳房および肺）、脂肪性組織腫瘍（例えば脂肪腫）、多形態性唾液腺腫、子宮平滑筋腫、血管筋腫、肺の腺維腫、子宮内膜のポリープ、動脈硬化性プラークおよび他の良性腫瘍、さらに肉腫（例えば横紋筋肉腫、骨肉腫）および癌腫（例えば乳房、肺、皮膚、甲状腺の）などの種々の悪性腫瘍、さらに白血病およびリンパ腫のような血液学的悪性腫瘍からなる群より選択される、請求項24および25の使用。

【請求項27】

分子ツール（プローブ、プライマーなど）を設計するためのMAGタンパク質の少なくとも一部分を用いて腫瘍細胞における融合遺伝子、融合転写物または融合タンパク質の存

50

在に基づく他のMAG遺伝子を単離するための方法。

【請求項28】

請求項27の方法により得られるMAG遺伝子。

【請求項29】

診断的または治療的方法に使用するための請求項28のMAG遺伝子。

【請求項30】

動物がそのゲノムにMAG遺伝子を所有する形質転換動物である、非生理的増殖能を有する細胞に関連する疾患または障害の処置における化合物または組成物の有用性検定のための動物モデル。

【請求項31】

MAG遺伝子が、遺伝子の残り部分およびその転座相手の置換部分の融合産物などの異常MAG遺伝子である、請求項30の動物モデル。

【請求項32】

MAG遺伝子が非生理的発現レベルを示す、請求項30の動物モデル。

【請求項33】

動物がその細胞の、少なくとも部分のゲノムにおいて請求項1、2または3のMAG遺伝子に影響を及ぼす特異的遺伝子異常を所有し、その異常が胚胎幹細胞における相同組換えを経由して誘導される、非生理的増殖能を有する細胞に関連する疾患または障害の処置における化合物または組成物の有用性検定のための動物モデル。

【請求項34】

動物が哺乳動物、特にマウス、ラット、イヌ、ブタまたはチンパンジーのような高等霊長動物である、請求項30-33のいずれかの動物モデル。

【請求項35】

詳細な説明および図面に開示したポリ-またはオリゴヌクレオチド・プローブおよびプライマー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、種々の良性および悪性いずれの腫瘍にも見られる異常細胞生長にしばしば関連する遺伝子ファミリーとして、高速移動群(HMG)タンパク質遺伝子ファミリーの同定に関する。本発明は特に、多くの腫瘍に關与する広範な作用の12番染色体切断点領域遺伝子として、多くのHMG遺伝子ファミリーの同定に関する。これらの腫瘍には、限定はしないが、間葉腫瘍過誤腫(例えば乳房および肺)、脂肪腫、多形態性唾液腺腫、子宮平滑筋腫、血管筋腫、肺の腺維腫、子宮内膜のポリープ、動脈硬化性プラークおよび他の良性腫瘍、さらに肉腫(例えば横紋筋肉腫、骨肉腫)および癌腫(例えば乳房、肺、皮膚、甲状腺の)などの種々の悪性腫瘍、さらに白血病およびリンパ腫が含まれる。本発明は、また6番染色体の切断に關連するのが見い出されたHMG遺伝子ファミリーの他の成員にも關する。

【0002】

さらに、本発明は、これらの腫瘍における型特異切断点領域遺伝子の他の型およびHMG遺伝子の頻回融合相手として、LIMタンパク質ファミリーの成員の同定に関する。このファミリーのLPP(脂肪腫-先取相手)遺伝子は、脂肪腫に特異的であることが判明した。本発明は特に、診断および治療においてHMGおよびLIG遺伝子ファミリーおよびそれらの誘導體を使用することに関する。

【背景技術】

【0003】

多くの独立した細胞遺伝子学的研究が、種々の良性および悪性の固形腫瘍型に12番染色体の領域q13-q15が關連していることを示している。良性固形腫瘍については、12q13-q15の關与が良性脂肪性組織腫瘍[1](非特許文献1)、子宮平滑筋腫[2,3](非特許文献2,3)および唾液腺の多形態性腺腫[4,5](非特許文献4

10

20

30

40

50

、5)においてしばしば観察される。同じ領域の関与が子宮内膜ポリープ[6, 7](非特許文献6, 7)、血管外皮細胞腫[8](非特許文献8)および軟骨腫瘍[9, 10, 11, 12](非特許文献9, 10, 11, 12)についても報告されている。最近、染色体12q13-q15の関与が肺軟骨様過誤腫[13, 14](非特許文献13, 14)について報告された。最後に、染色体領域12q13-q15の関与する固形腫瘍のいくつかの症例報告が公表されている。例えば、乳房腫瘍[15, 16](非特許文献15, 16)、拡散星状細胞腫[17](非特許文献17)および骨の巨人細胞腫瘍[18](非特許文献18)である。12q13-q15における再発異常を有する悪性腫瘍型には、粘膜様脂肪肉腫[19](非特許文献19)、軟組織明細胞肉腫[20, 21, 22](非特許文献20, 21, 22)および横紋筋肉腫[23](非特許文献23)がある。

10

【0004】

【非特許文献1】Sreekantaiah, C., Leong, S.L.P., Karakousis, C.P., McGee, D.L., Rappaport, W.D., Villar, H.V., Neal, D., Fleming, S., Wankel, A., Herrington, P. N., Carmona, R. and Sandberg, A.A. (1991). Cytogenetic profile of 109 lipomas. *Cancer Res.* 51: 422-433.

【非特許文献2】Nilbert, M. and Heim, S. (1990). Uterine leiomyoma cytogenetics. *Genes Chrom. Cancer* 2: 3-13.

【非特許文献3】Pandis, N., Heim, S., Willen, H., Bardi, G., Floderus, U.M., Mandahl, N. and Mitelman, F. (1991). Chromosome analysis of 96 uterine leiomyomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* 55: 11-18.

20

【非特許文献4】Sandros, J., Stenman, G. and Mark, J. (1990). Cytogenetic and molecular observations in human and experimental salivary gland tumours. *Cancer Genet. Cytogenet.* 44: 153-167.

【非特許文献5】Bullerdiek, J., Wobst, G., Meyer-Bolte, K., Chilla, R., Haubrich, J., Thode, B. and Bartnitzke, S. (1993). Cytogenetic subtyping of 220 salivary gland pleomorphic adenomas: correlation to occurrence, histological subtype, and in vitro cellular behavior. *Cancer Genet. Cytogenet.* 65: 27-31

【非特許文献6】Walter, T.A., Xuan Fan, S., Medchill, M.T., Berger, C.S., Decker, H.-J.H and Sandberg, A.A. (1989). Inv(12)(p11.2q13) in an endometrial polyp. *Cancer Genet. Cytogenet.* 41: 99-103.

30

【非特許文献7】Vanni, R., Dal Cin, P., Marras, S., Moerman, P., Andrtia, A., Valdes, E., Deprest, J., and Van den Berghe, H., (1993). Endometrial polyp: Another benign tumor characterized by 12q13-q15 changes. *Cancer Genet. Cytogenet.* 68: 32-33.

【非特許文献8】Mandahl, N., Orndal, C., Heim, S., willen, H., Rydholm, A., Bauer, H.C.F. and Mitelman, F. (1993). Aberrations of chromosome segment 12q13-15 characterize a subgroup of hemangiopericytomas. *Cancer* 71: 3009-3013.

【非特許文献9】Mandahl, N., Heim, S., Arheden, K., Rydholm, A., Willen, H. and Mitelman, F. (1989). Chromosomal rearrangements in chondromatous tumors. *Cancer* 65: 242-248.

40

【非特許文献10】Bridge, J.A., Persons, D.L., Neff, J.R. and Bhatia, P. (1992). Clonal karyotypic aberrations in enchondroma. *Cancer Detect. Prev.* 16: 215-219.

【非特許文献11】Hirabayashi, Y., Yoshida, M.A., Ikeuchi, T., Ishida, T., Kojima, T., Higaki, S., Machinami, R. and Tonomura, A. (1992). Chromosome rearrangements at 12q13 in two cases of chondrosarcomas. *Cancer Geaet. Cytogenet.* 60: 35-40.

【非特許文献12】Mandahl, N., Willen, H., Rydholm, A. and Mitelman, F. (1993). Rearrangement of band q13 on both chromosomes 12 in a periosteal chondroma. *Genes Chrom. Cancer* 6: 121-123.

【非特許文献13】Dal Cin, P., Kools, P., De Jonge, I., Moerman, Ph., Van de Ven

50

W., Van den Berghe H. (1993a). Rearrangement of 12q14-15 in Pulmonary Chondroid Hamartoma. *Genes Chrom. Cancer*, 8, 131-133.

【非特許文献 1 4】Schoenberg Fejzo, M., Yoon, S.J., Montgomery, K.T., Rein, M.S., Weremowicz, S., Krauter, K.S., Dorman, T.E., Fletcher, J.A., Mao, J., Moir, D.T., Kucherlapati, R.S., and Morton, C.C. (1995). Identification of a YAC spanning the translocation breakpoints in uterine leiomyomata, pulmonary chondroid hamartoma and lipoma. Physical mapping of the 12q14-15 breakpoint region in uterine leiomyomata. *Genomics* 26: 265-275.

【非特許文献 1 5】Birdsal, S.H., MacLennan, K.A. and Gusterson, B.A. (1992). t(6;12)(q23;q13) and t(10;16)(q22;p11) in a phyllodes tumor of the breast. *Cancer Genet. Cytogenet.* 60: 74-77. 10

【非特許文献 1 6】Rohen, C., Bont, U., Staats, B., Bartnizke, S. and Bullerdiek, J. (1993). Two human breast tumors with translocations involving 12q13-15 as the sole cytogenetic abnormality. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 69: 68-71.

【非特許文献 1 7】Jenkins, R.B., Kilmmell, D.W., Moertel, C.A., Schulz, C.A., Mezezes, R.M., Scheihauer, B., Kelly, P.J. and Dewald, G.W. (1989). Recurrent cytogenetic abnormalities in 80 gliomas. *Cytogenet. Cell Genet.* 51: 1019.

【非特許文献 1 8】Noguera, R., Lombart-Bosch, A., Lopez-Gines, C., Carda, C. and Fernandez, C. (1989). Giant-cell tumor of bone, stage II, displaying translocation t(12;14)(q13;q13). *Virchows Archiv A Pathol. Anat.* 415: 377-382. 20

【非特許文献 1 9】Turc-Carel, C., Limon, J., Dal Cin, P., Rao, U., Karakousis, C., and Sandberg, A.A. (1986). Cytogenetic studies of adipose tissue tumours. II. Recurrent reciprocal translocation t(12;16)(q13;p11) in myxoid liposarcomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* 23: 291-299.

【非特許文献 2 0】Rodriguez, E., Sreekantaiah, C., Reuter, V.E., Motzer, R.J. and Chaganti, R.S.K. (1992). t(12;22)(q13;q13) and trisomy 8 are nonrandom aberrations in clear-cell sarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 64:107-110.

【非特許文献 2 1】Reeves, B.R., Fletcher, C.D.M. and Gusterson, B.A. (1992). Translocation t(12;22)(q13;q13) is a nonrandom rearrangement in clear cell sarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 64: 101-103. 30

【非特許文献 2 2】Fletcher, J.A. (1992). Translocation (12;22)(q13-14;q12) is a nonrandom aberration in soft-tissue clear cell sarcoma. *Genes Chrom. Cancer* 5: 184.

【非特許文献 2 3】Roberts, P., Browne, C.F., Lewis, I.J., Bailey, C.C., Spice, R.D., Williams, J. and Batcup, G. (1992). 12q13 Abnormality in rhabdomyosarcoma. A nonrandom Occurrence? *Cancer Genet. Cytogenet.* 60: 135-140.

【発明の開示】

【0005】

これらの研究は、12番染色体の同じ細胞遺伝子学的領域がこれらの固形腫瘍における転座(トランスロケーション)のような染色体異常にしばしば関与することを示唆しているが、種々の腫瘍における12番染色体切断点の正確な本質は、なお分かっていない。転座によって直接どの遺伝子が影響を受けるのかも確認されていない。 40

以前の物理的マッピング研究において、脂肪腫、多形態性唾液腺腫および子宮平滑筋腫における染色体12q切断点は座D12S8とCHOP遺伝子との間に位置づけられ、D12S8はCHOPの末端にあることが示された。最近、FISH解析によって、乳房過誤腫、血管粘液腫および多重肺軟骨様過誤腫における染色体12q切断点は、このDNA間隙内に位置していることも発見された。種々の腫瘍における染色体12q13-q15異常により影響される遺伝子を分子的にクローニングする努力において、本発明者らは、これらの切断点を包含するDNA領域を明確にするための構造的アプローチとして方向性染色体歩行を選択した。 50

染色体歩行の出発点として、座 D 1 2 S 8 を用いた。これらの歩行研究において、多数の子宮平滑筋腫 - 誘導細胞系中に存在する染色体切断点は 4 4 5 k b 染色体断片内にクラスター状に群がっていることが示され、これは、1 2 番染色体上の子宮平滑筋腫クラスター領域 Uterine Leiomyoma Cluster Region on chromosome 12 (ULCR12) と名付けられた [1 2]。続いて、1 2 番染色体上の 1 . 7 M b 領域に、子宮平滑筋腫 - 、脂肪腫 - および唾液腺腫 - 細胞の 1 2 番染色体切断点が種々の腫瘍型重複の切断点クラスター領域を有して、存在することが判明した [2 5 、添付 1]。1 2 番染色体の長腕上のこの 1 . 7 M b 領域は、明らかに U L C R 1 2 を含み、この特性を反映して多重異常領域 Multiple Aberration Region (MAR) と名付けられた。領域マッピング研究において M A R は最近、1 2 q 1 5 に割り当てられた。

10

【 0 0 0 6 】

このように、基本的に 1 . 7 M b 領域における 1 2 番染色体地図のすべての切断点が "多重異常領域" すなわち M A R として関係することが分かった。更なる研究によって、この領域における高速移動群遺伝子ファミリーの成員である H M G I - C 遺伝子が仮定多重腫瘍異常生長遺伝子 (M A G) として同定されることが明らかにされた。同じことが、染色体異常に関与するのが発見された L I M ファミリーの成員についても適用される。それらのうち 3 番染色体 - 誘導脂肪腫 - 先取相手 (L P P) は、特に脂肪腫に関係している。

【 0 0 0 7 】

L I M タンパク質は、システイン富化・亜鉛結合ドメイン、いわゆる L I M ドメインを有するタンパク質である。これはタンパク質 - タンパク質相互作用に関与する [総説について、参考文献 8 0 を参照]。タンパク質ファミリーの成員の一つは、ここに開示された 3 番染色体に位置する L P P タンパク質である。

20

【 0 0 0 8 】

本発明によると、1 2 番染色体上の H M G I - C 遺伝子および 3 番染色体上の L P P 遺伝子における異常は、良性および悪性腫瘍における H M G および L I M 遺伝子ファミリーの成員の関与についての、より一般的な概念を明らかにするモデルとして用いられる。染色体再編成により影響を受けたときに、腫瘍生長の特定群に到達する遺伝子ファミリーの、より一般的な概念が存在することを明らかにするために、本発明者らは、H M G ファミリーの成員である H M G I (Y) 遺伝子が 6 番染色体中の切断に関与することを明らかにした。両 H M G および L I M 遺伝子ファミリーはそれ自体知られているが、本発明に至るまでは、これらのファミリーと、転座、欠失、挿入および内返しのような腫瘍を起こす染色体異常との相関は予想されていなかった。さらに、現在まで、該遺伝子ファミリーの成員の生理的発現レベルにおける異常が腫瘍の発育に関係しているであろうことは、かつて明らかにされなかった。本発明によって、正常成人の細胞において H M G I - C 遺伝子の発現レベルが実際的には検出不可能であり、一方、異常に生長した細胞においては発現レベルが有意に増加していることが明らかになった。

30

【 0 0 0 9 】

これらの知見を基にして、本発明は、該遺伝子ファミリーの成員またはその誘導体を分離した形で、および診断および治療におけるその使用を提供する。さらに、該遺伝子の位置およびヌクレオチド配列の知識は、その再編成または発現を研究するために、およびその発現レベルにおける潜在的増大または低下および細胞の生長に対するその作用を同定するために、用いることができる。この情報に基づき、診断検査法や治療的処置が設計される。

40

【 0 0 1 0 】

本出願において、用語 "多重腫瘍異常生長 (または M A G) 遺伝子" は、種々の型の癌におけるこれら型の遺伝子の関与を示すために用いられる。この用語は、非生理的な増殖生長に関与する H M G および L I M 遺伝子ファミリーのすべての成員を意味し、特に動脈硬化的プラークを含む悪性および良性の腫瘍に関与するものを意味する。しかし、本発明によって更に、実際の遺伝子外側の切断でも、その近隣であれば異常生長が結果として生じることもあるのが判明した。従って、用語 M A G 遺伝子は該遺伝子の直接の近隣も含むこ

50

とを意味している。"直接の近隣"が上記に明確にした非生理的増殖生長をもたらす切断または再編成がなされる遺伝子の周りを含むと理解されるべきことは、当業者は容易に分かるであろう。

【0011】

用語"野生型細胞"は、異常染色体を保有していない細胞または関連遺伝子が生理的な発現レベルにある細胞を意味する。"野生型"すなわち"正常"染色体は、非異常染色体を意味する。

【0012】

本発明は、該遺伝子から誘導される情報に基づく種々の診断的および治療的利用を提供する。この情報は、遺伝子から誘導される遺伝子産物のヌクレオチド配列やアミノ酸配列を包含するのみでなく、遺伝子の複製または翻訳レベルをも含む。

10

【0013】

このように本発明は2重性である。一つは、細胞における異常が遺伝子またはその近隣で起きる物理的切断によって直接的または間接的に生じ得る。他方、細胞における異常が遺伝子の非生理的発現レベルによって生じ得る。この非生理的発現レベルは切断によって生じうるか、または遺伝子を活性化または不活性化する他の刺激によるものであり得る。現在のところ、異常細胞生長の正確なメカニズムまたは起源は分かっていない。しかし、このメカニズムについての正確な知識は、診断方法あるいは処置を確立するのに必要でない。

【0014】

20

本発明の診断方法は、染色体における異常が染色体の外観または生化学的反応について検出可能な変化をもたらすとの事実に基づいている。例えば、転座は、染色体(および、その結果としてMAG遺伝子の)の第一部分が他の(第二)部分に置換されること(以後、"第一および第二置換部分"と言う)が結果として生じる。第一部分は、第二部分を生み出した他の染色体と違った場所にしばしば現れる。結果として、ハイブリドは、両(三重転座の場合は、より以上)染色体の残りの部分と転座相手により提供された置換部分との間で形成される。切断がMAG遺伝子において生じることが判明したので、これはそのMAG遺伝子のハイブリド遺伝子産物をもたらす。RNA、DNAまたはDNA/RNAハイブリドのようなハイブリド分子または抗生物質などのマーカーは、該ハイブリドをDNAレベルおよびRNAまたはタンパク質レベルのいずれでも検出することができる。

30

【0015】

例えば、ハイブリドの転写物は、遺伝子/染色体の残りの部分により提供される領域を含んでいるが、転座された置換部分により提供される領域を欠いている。内返し、欠失および挿入の場合、遺伝子は等しく障害を受ける。

【0016】

転座も細胞遺伝学的に常に検出可能である。他の異常は、細胞遺伝子レベルでみることがしばしばできないので、見出すことはより難しい。本発明は、これらすべての型の染色体異常を診断し得る可能性を提供するものである。

【0017】

転座において染色体の残りおよび置換部分についてのMAG遺伝子に基づくマーカーまたはプローブは元の染色体についての残り部分をインサイトウ検出するが、他の染色体、転座相手についての置換部分を検出しない。

40

【0018】

内返しにおいては例えば、2つのプローブは野生遺伝子において特殊な距離でハイブリダイズする。しかし、この距離は内返しにより変化することがある。インサイトウかかる内返しは、一組の適当なプローブを蛍光ラベルなどの同じまたは相違するマーカーでラベルすることにより可視化される。欠失および挿入は同様の方法により検出される。

【0019】

本発明により、上記インサイトウ利用は、FISH法を用いて非常に都合よく実施され得る。マーカーは例えば2コスミドであり、うち1つはMAG遺伝子のエキソン1-3を

50

含み、他の1つはエキソン4および5を含む。両コスミドは相違する蛍光マーカー、例えば青および黄でラベルされる。正常な染色体は両ラベルの結合を示すのでグリーンの信号となり、一方、転座は1つの染色体の残りの部分(例えば12番)に青信号として見られ、黄信号は置換部分を含む他の染色体に見られる。同じレベルを両プローブに用いた場合、正常染色体に対する信号強度は100%であり、一方異常染色体に対しては50%である。内返しの場合、信号の一つが正常染色体上の一つの場所から異常染色体上の他の場所に変わる。

【0020】

上記の利用において比較のために参考が含まれねばならない。常に2つの染色体の一つが障害を受ける。このように正常染色体を内部参考として利用することは大変便利である。さらに、染色体の残りの未変化部分についてのマーカーを一つ、および置換または逆方向部分について他の一つを選択することが重要である。12番染色体のMAG遺伝子の場合、本発明が示すように、切断は、エキソン3と4の間の大きいイントロンに通常は見い出される。さらに切断はエキソン4と5の間に検出された。エキソン1-3および4および5に基づくプローブ、またはエキソン4か5に基づくプローブは非常に有用である。別法として、両転座または融合相手に基づくプローブの組み合わせを用い得る。例えば、脂肪腫の同定に、一方、HMGIC遺伝子のエキソン1-3に基づき、および他方、LPPC遺伝子のエキソン1-3に基づくプローブを用いることができる。

10

【0021】

さらに、切断が遺伝子の外側、すなわちその5'または3'でも起こり得ることが見い出された。プローブの選択は勿論遺伝子の5'または3'に位置するDNA配列にハイブリダイズする少なくとも一つのプローブを含む。

20

【0022】

ここで用いられる"プローブ"は、広く解釈されるべきで、限定しないが、線状DNAまたはDNA鎖、イースト人工遺伝子(YACS)または環状DNA形、例えばプラスミド、ファージ、コスミドなどを含む。

これらのインサイトウ方法は中間層および間層染色体に用いられる。

【0023】

上記のインサイトウ方法以外に、種々の診断方法がより多くの生化学レベルで実施され得、例えばDNA、RNAまたはタンパク質における変化または遺伝子の生理的発現レベルにおける変化に基づいている。

30

【0024】

染色体の生化学行動における変化に基づく方法の基礎は、適当なプローブを選択することにより、遺伝子中の長さまたは構成、転写物またはタンパク質における多重性がゲルまたはプロット上で検出されることにある。正常遺伝子、転写物またはタンパク質がゲルまたはプロット上の他の位置に現れ、次いで異常遺伝子が現れるので、長さの変化が見られ得る。転座の場合、正常数よりも多くのスポットが現れる。

【0025】

上記の原則を基にして本発明は、例えば、非生理的増殖能を有する細胞を診断する方法に関し、この方法は、診断すべき細胞の生体を採取し、それからMAG遺伝子-関連マクロ分子を分離し、得たマクロ分子を非生理的増殖能がない細胞から、望ましくは同じ個体から生じた参考分子と比較して分析する段階を含んでいる。MAG遺伝子-関連マクロ分子はDNA、RNAまたはタンパク質であり得る。MAG遺伝子は、HMGファミリーまたはLIMファミリーのいずれかの成員である。

40

【0026】

この型の診断方法の特定的実施態様において本発明は、診断すべき細胞の生検を採取し、その全RNAを抽出し、全RNA抽出物またはそのポリ-A-選択フラクション中のmRNA種の第一鎖cDNAを調製し(cDNAは適当なテイルを含む); MAG遺伝子特異的cDNAを増幅させるためにMAG遺伝子特異的プライマーおよびテイル-特異的プライマーを用いてPCRを行い; ゲル上のPCR産物を分離してバンドのパターンを得;

50

異常バンドの存在を、野生型バンド、望ましくは同じ個体から得たもの、と比較して、調べる段階を含む。

【0027】

別の増幅方法が核酸配列に基づく増幅技法(NASBA)[81]またはその変法により実施され得る。

【0028】

他の実施態様において、該方法は、診断すべき細胞の生検を採取し、それから全タンパク質を単離し、ゲル上でタンパク質を分離して基本的に個人のバンドを得、選択的にバンドをウエスタン・プロットに転移し、得たバンドを、MAG遺伝子の残りの部分によりコードされるタンパク質の部分に対する、およびMAG遺伝子の置換部分によりコードされるタンパク質の部分に対する抗体と共にハイブリダイズし；抗原-抗体反応を可視化し、そして異常バンドの存在を、野生型タンパク質からのバンド、望ましくは同じ個体から得たバンドと比較して確認する段階を含む。

10

【0029】

更なる実施態様において、該方法は、診断すべき細胞の生検を採取し、その全DNAを単離し、1以上のいわゆる"希切断"制限酵素(典型的には"6-または以上の切断")でもってDNAを消化し、ゲル上に調製された消化物を分離して、分離パターンを得、選択的に分離パターンをサーザン・プロットに転移し；ゲル中またはプロット上の分離パターンを一組のプローブとハイブリダイズ条件でハイブリダイズし；ハイブリダイゼーションを可視化し、そして異常バンドの存在を野生型バンド、望ましくは同一個体から得たバンドとの比較により確認する段階を含む。

20

【0030】

遺伝子の発現レベルにおける変化は、mRNAレベルまたはタンパク質レベルを適当なプローブの手段で測定することにより検定できる。

【0031】

遺伝子の異常発現レベルに基づく診断方法は、診断すべき細胞のサンプルを採取し、それからmRNAを単離し、望むMAG遺伝子から転写されたmRNAの存在および/または(比較の)量を対照と比較して確認する段階を含む。mRNAの存在および/または(比較の)量の確認は、MAGのmRNAの少なくとも部分をRT-PCRまたは類似の増幅技術により増幅して達成される。別の実施態様において、発現レベルは、例えばモノクローナル抗体の手段で遺伝子産物(例えばタンパク質)の存在および量を測定することにより確認される。

30

【0032】

本発明の診断方法は、非生理的増殖能を有する細胞が間葉腫瘍過誤腫(例えば乳房および肺)、脂肪性組織腫瘍(例えば脂肪腫)、多形態性唾液腺腫、子宮平滑筋腫、血管筋腫、肺の腺維腫、子宮内膜のポリープ、動脈硬化性プラークおよび他の良性腫瘍、さらに肉腫(例えば横紋筋肉腫、骨肉腫)および癌腫(例えば乳房、肺、皮膚、甲状腺の)などの種々の悪性腫瘍からなるグループから選択される疾患に用いられる。本発明は、いわゆる良性または悪性固形腫瘍の診断および治療に限定されず、その原理は、白血病およびリンパ腫のような血液学的悪性腫瘍にも適用できることが分かった。

40

【0033】

最近の報告によると、動脈硬化性プラークが主に平滑筋細胞の異常な増殖[26]も含み、動脈硬化性プラークが良性腫瘍を形成すると推測された[27]。従って、この型の障害も、MAG遺伝子ファミリーの使用、特に診断的および治療的利用できるとであろう適応症であることが分かる。

【0034】

上述したように、ある種の悪性腫瘍においてHMGの発現レベルが増大することは知られている[28]。現在まで、この観察の関連性は理解されなかった。従って、本発明の別の側面は、治療におけるMAG遺伝子の同定を行うことに関する。例えば本発明は、遺伝子の発現を調節して、非生理的増殖能を有する細胞の疾患を処置するのに用いられるM

50

A G 遺伝子のアンチセンス分子または発現阻止剤を提供する。非生理的高発現は、細胞に投与されるかまたは発現され、そして mRNA を結合するアンチセンス RNA による手段、または遺伝子産物に対する抗体による手段で正常化され得るであろう。これらの手段は順に細胞生長の正常化をもたらすであろう。実施例は、白血症細胞中のアンチセンス RNA の発現が正常に反する細胞の再 - 区別を結果として生じること、を表すであろう。

【 0 0 3 5 】

本発明は、M A G 遺伝子の誘導体および / または診断に使用するその直接の環境および治療的組成物の調製を提供する。該誘導体は、センスおよびアンチ - センス c D N A またはそのフラグメント、該遺伝子の転写物またはそのフラグメント、アンチセンス RNA、分子または他の型の " 転写締め具 " を誘発する三重ラセン、該遺伝子のフラグメントまたはその相補的鎖、該遺伝子またはそのフラグメントによりコードされたタンパク質、タンパク質核酸 (P N A)、該遺伝子、該 c D N A、該転写物、該タンパク質または該フラグメントに対する抗体、および抗体フラグメントからなる群から選択される。診断および治療における遺伝子およびその周辺 (はさむ配列) の直接的利用以外に、発現阻害剤または発現促進剤のような他の分子が本発明による治療的処置に用いられる。この型の分子の例は、RNA 分子を破壊するリゾチームである。

10

【 0 0 3 6 】

上記した治療的および予防的方法以外に、本発明の原理は、M A G 遺伝子関連の悪性または良性腫瘍および動脈硬化性プラークの処置のための医薬品を試験するのに役立つ形質転換動物モデルをつくるのに用いられる。実施例の 1 つはかかる動物モデルの産生を記述する。

20

【 0 0 3 7 】

本発明の原理は、説明の目的のために、1 2 番染色体における H M G I - C 遺伝子マッピングおよび 6 番染色体における H M G I (Y) 遺伝子マッピングおよび 3 番染色体上の L P P 遺伝子についてのみ記載されたことが理解されるべきである。本発明により提供された情報に基づき、本発明の一般的概念の範囲を出ないで、当業者は、該遺伝子の対応遺伝子を単離し、配列し、そして本発明の原則を、遺伝子およびその配列を用いて利用し得るであろう。

【 0 0 3 8 】

本発明は下記の実施例によりさらに明らかになるであろう。これらは発明の範囲の制限を意図するものでない。

30

【 実施例 】

【 0 0 3 9 】

実施例 1

1. 序

この実施例は、7 5 の一部重複する Y A C クローンの分離および分析、ならびに、遺伝子座 D 1 2 S 8 の周囲の約 6 M b のゲノム D N A にわたっており且つ M A R を含んでいる Y A C コンティグ (一部重複するクローンの集合体) の確立を記載するものである。1 2 番染色体の長腕上の Y A C コンティグの向きは、二色 F I S H 分析により決定された。S T S 含量マッピングおよび制限酵素分析に基づき、この 6 M b D N A 領域の広範囲物理的地図が確立された。このコンティグは、様々な 1 2 番染色体異常により直接影響を受ける遺伝子を包含する、1 2 q 1 5 に位置する遺伝子の同定を目的とする、c D N A 捕捉の有用な供給源を表す。

40

【 0 0 4 0 】

2. 材料および方法

2. 1. 細胞系

体細胞ハイブリッドを用いる染色体割り当て (C A S H) 実験には、細胞系 P K 8 9 - 1 2 および L I S - 3 / S V 4 0 / A 9 - B 4 を使用した。ハムスターの遺伝的背景中に唯一のヒト染色体として 1 2 番染色体を含む P K 8 9 - 1 2 は、前に記載した [2 9]。P K 8 9 - 1 2 細胞は、1 0 % ウシ胎児血清、2 0 0 I U / m l ペニシリン、および 2 0 0 μ g

50

/mlストレプトマイシンを添加したDME-F12培地中で生育させた。体細胞ハイブリッドLIS-3/SV40/A9-B4は、t(12;16)(q13;p11.2)を有する粘液様脂肪肉腫細胞系LIS-3/SV40、およびマウスA9細胞の融合時に得られた。これは、der(16)を含むが、der(12)および正常な12番染色体のいずれをも含まないことが以前に示されていたものである[30]。LIS-3/SV40/A9-B4細胞は、選択的AOA培地(10%ウシ胎児血清、0.05mMアデニン、0.05mMウワバイン、および0.01mMアザセリンを添加したDME-F12培地で構成されるAOA培地)中で生育させた。両細胞系は標準的細胞遺伝学技術により頻繁に検定した。

【0041】

2.2.ヌクレオチド配列分析およびオリゴヌクレオチド

T7ポリメラーゼ配列決定キット(ファルマシア/LKB)またはdsDNAサイクル配列決定システム(ギブコ/BRL)を用いるジデオキシチエンターミネーション法に従い、ヌクレオチド配列を決定した。DNAフラグメントをpGEM-3Zf(+)中でサブクローニングし、FITC標識した標準SP6もしくはT7プライマー、または新たに得られた配列に基づき合成された特異的プライマーを用いて配列決定した。配列決定の結果は、自動レーザー蛍光(ALF)DNAシーケンサー(ファルマシア・バイオテック)および標準的な30cm、6%ハイドロリンク(商標)、ロング・レンジ(商標)ゲル(ATバイオケム)を使用して得た。ヌクレオチド配列は、配列分析ソフトウェアジーンプロ(リヴァーサイド・サイエンティフィック)、PC/ジーン(インテリジェネティクス)、インテリジェネティクス・スイート・ソフトウェア・パッケージ(インテリジェネティクス、Inc.)、およびオリゴを使用して分析した[31]。オリゴヌクレオチドは全てファルマシア・バイオテックから購入した。

【0042】

2.3.染色体の調製および蛍光インサイトウハイブリダイゼーション(FISH)

YACクローンのFISH分析を実施してそれらの染色体上位置を確認し、そしてキメラクローンを同定した。YAC挿入物末端のSTSに相当するコスミドクローンのFISH分析を実施して、それらの染色体上位置を確認した。コスミドは、ヒトゲノムライブラリーCMLW-25383から分離する[32]か、または、ローレンス・リヴァーモア・ナショナル・ラボラトリーにおいて標準法に従って組み立てられた、整列させた12番染色体特異的ライブラリー(LL12NC01、参考文献33)から分離された[34]。本質的には前記と同様にして常套的FISH分析を実施した[30、35]。DNAは、キーヴィッツ等のプロトコルを用いてピオチン-11-dUTP(ベーリンガー)で標識した[36]。DABCO(2g/100ml、シグマ)、0.1MトリスHCl pH8、0.02%チメロサル、およびグリセロール(90%)より成りヨウ化プロピジウム(0.5µg/ml、シグマ)を対比染色として含有する抗退色媒質を加え、15分後に、FITC/テキサスレッドに対するダブルバンド通過フィルター(オメガ・オプティカル、Inc.)を用いるザイス・アキシオフォト蛍光顕微鏡上で標本を分析した。結果はスコッチ(3M)640ASAフィルム上に記録した。

二色FISH実験のために、LLNL12NC01-96C11をジゴキシゲニン-11-dUTP(ベーリンガー)で、そしてコスミドLLNL12NC01-1F6および-193F10をピオチン-11-dUTPで標識した。各プローブの等量を合し、この混合物をハイブリダイゼーションに使用した。ハイブリダイゼーションの後、スライドをアビジン-FITCと共に20分間インキュベートし、次いでキーヴィッツ等により記載されるように洗浄した[36]。その後の一連の、TNB緩衝液(0.1MトリスHCl pH7.5、0.15M NaCl、0.5%ベーリンガー遮断剤(ベーリンガー))中でのインキュベーション、および洗浄工程は、TNT緩衝液(0.1MトリスHCl pH7.5、0.15M NaCl、0.05%トゥイン20)中で実施し、全てのインキュベーションは37°Cで30分間行った。第二のインキュベーションの間にヤギ-アビジン-ピオチン(ベクター)およびマウス-ジゴキシゲニン(シグマ)を同時に適用した。第三のインキュベーションの間にアビジン-FITCおよびウサギ-マウス-TRITC(シグ

10

20

30

40

50

マ)を適用した。最後のインキュベーションの間にヤギ - - ウサギ - T R I T C (シグマ)を適用した。T N T 緩衝液中での最後の洗浄の後、試料を1 x P B S で二回洗浄し、次いでエタノール系列(70%、90%、100%)により脱水した。対比染色として75 ng / μ l D A P I (セルヴァ)を含有する抗退色媒質を使用した。標本を上記のようにザイス・アキシオフォト蛍光顕微鏡で分析した。

【0043】

2.4. Y A C ライブラリーのスクリーニング

サートル・デテドゥ・デュ・ポリフォルミズム・ヒュメ(C E P H)より取得可能となったC E P H ヒトゲノムY A C ライブラリーマーク1および3からY A C クローンを分離した[37、38]。前記のようにスクリーニングを実施した[39]。時に遭遇するカンジダ・パラサイロシスの混入を、成長培地にテルピナフィン(ディーター・レーマー博士、サンド・ファルマ・L T D、パースル、スイス、の好意により提供された)を添加(最終濃度: 25 μ g / ml)することにより根絶した。分離されたY A C クローンを、S T S 含有量マッピング、カントゥア・クランプト均質電場(C H E F)ゲル電気泳動[40]、制限マッピング、ならびにハイブリダイゼーション - およびF I S H 分析により特性決定した。

10

【0044】

2.5. P C R 反応

P C R 増幅は、10 mM トリスH C l p H 8.3、50 mM K C l、1.5 mM M g C l₂、0.01%ゼラチン、2 mM d N T P、各アンプリマー20 pmole、アンプリタク2.5単位(パーキン・エルマー・シータス)、およびD N A 100 ng(スーパープール用)または20 ng(プール用)を含有する最終容量100 μ l 中で、ファルマシア / L K B ・ジーン・A T A Q ・コントローラー(ファルマシア / L K B)を使用して実施した。94 5 分間の最初の変性の後、各々94 1 分間の変性、適当な温度で1分間のアニーリング(表Iを参照されたい)および72 1 分間の伸長で構成される35サイクルの増幅を実施した。P C R 反応は72 5 分間の最後の伸長により完結した。結果を、ポリアクリルアミドミニゲル上で反応生成物10 μ l を分析することにより評価した。

20

【0045】

2.6. パルスフィールドゲル電気泳動およびサザンプロット分析

パルスフィールドゲル電気泳動およびサザンプロット分析は、ショーンメイカーズ等による記載に厳密に従って実施した[39]。高分子量Y A C D N A を含むアガロース充填剤(約1 x 10⁸酵母細胞に相当)をT E 緩衝液(p H 8.0)およそ25 ml 中、50 で30分間2回平衡化し、引き続き室温で同様の平衡化を2回行った。その後充填剤を丸底2 ml エッペンドルフ管に移し、適当な制限温度で適当な1 x 制限緩衝液500 μ l 中、30分間2回平衡化した。その後、消化反応当たり30単位の制限エンドヌクレアーゼを使用し供給者(ペーリンガー)の指示に従って、D N A を充填剤中で4時間消化した。消化後、適当な分子量マーカーと共に充填剤を1%アガロース / 0.25 x T B E ゲル上にロードし、L M P アガロースで密封し、そして120度のパルス角および10秒間(300 kbpまでの分離)から20秒間(500 kbpまでの分離)まで変化する定パルス時間を用いて、C H E F 装置(バイオラド)上で18時間6.0 V / cm でサイズ分画した。大きな制限フラグメントの場合、500 kbpより大きなサイズのフラグメントの分離を目指して、さらなる泳動を行った。電気泳動は0.25 x T B E 中14 で実施した。分子量マーカーとしては、ラダー(プロメガ)および制限エンドヌクレアーゼH i n d IIIで切断した D N A を含有する自家製充填剤を使用した。電気泳動の後、ゲルをエチジウムブロミドで染色し、撮影し、そして120 m J の設定でストラタリンカー(ストラタジーン)を用いてU V 照射した。続いて0.4 N N a O H を転移緩衝液として使用し、D N A をハイボンドN+膜(アマーシャム)上に4 - 16時間プロットングした。プロットング後、この膜を80 で15分間乾燥し、2 x S S P E 中で短時間中和し、そして50%ホルムアミド、5 x S S P E、5 x デンハート、0.1% S D S および200 μ g / mlヘパリンで構成される溶液50 ml 中、42 で少なくとも3時間プレハイブリダイズした。続いて、50%ホルムアミド、5 x S S P E、1 x デンハート、0.1% S D S、100 μ g / mlヘパリン、0.5%

30

40

50

硫酸デキストランおよび標識化したプローブ $2 - 3 \times 10^6$ cpm/ml で構成される溶液 10 ml 中、フィルターを 42 で 16 時間ハイブリダイズした。その後、膜を、まず $2 \times$ S S P E / 0.1% S D S 中室温で 5 分間 2 回、次いで $2 \times$ S S P E / 0.1% S D S 中 42 で 30 分間、そして最後に $0.1 \times$ S S P E / 0.1% S D S 中 65 で 20 分間洗浄した。プローブの挙動に応じてコダック X A R - 5 フィルムを - 80 で 3 - 16 時間露光した。補力スクリーン(キョッコー・スペシャル 500)を使用した。

【0046】

2.7.YAC 挿入物末端からの S T S の作成

YAC 挿入物末端由来の S T S は、本質的にはギャーツ等の記載に従って、直接的 D N A 配列決定分析と組み合わせたベクトレット P C R 法を用いて取得した[41]。基本的には上記の方法に従い、プライマーの組を創出し、ヒトゲノム D N A 上で試験した。本明細書全体を通じ、S T S は簡便のためその略称で呼称する(例えば、S T S 12 - R M 1 の代わりに R M 1)。

10

【0047】

3. 結果

3.1. 遺伝子座 D 1 2 S 8 の周囲の Y A C コンティグの組み立て

先の研究において[39]、D 1 2 S 8 の周囲の 800 kb Y A C コンティグが記載された。このコンティグは、部分的に重複した以下の3個の非キメラ C E P H Y A C クローンで構成されていた: 258F11、320F6、および 234G11。このコンティグを染色体歩行プロジェクトのための出発点として使用して、様々な良性の充実性腫瘍の切断点を包含する、12番染色体の長腕上の D N A 領域を明確にするが、これらは全て D 1 2 S 8 の近位および C H O P の遠位に位置している。最初に、染色体歩行を、コンティグの大きさがその向きに信憑性ある決定を可能にするまで、二方向的に実施した。この二方向性およびその後の一方向性染色体歩行工程においては、以下の一般法を使用した。まず、Y A C クローンの末端の救出および配列決定は、これらの左および右側に特性を与える D N A マーカーを産んだ(表 I)。40 の Y A C 挿入物の末端の配列データに基づき、D N A の特異的増幅のためのプライマーの組を創出し、S T S を確立した(表 II)。12q13 - q t e r へのそれらの局在が、C A S H によって、そして対応するコスミドクローンを分離した後、F I S H によって決定された。さらに、分離された Y A C クローンはしばしば F I S H 分析によって評価され、したがってそれら挿入物の染色体起源が明らかにされるのみならず、幾つかの場合については、それらのキメラ的性格が確立され規定されたことに留意すべきである。さらに、一部重複する Y A C クローンの制限エンドヌクレアーゼ分析により得られるデータは、Y A C クローンの評価およびその後の並列の際に考慮されたことを強調すべきである。連続的に選択され評価されたプライマーの組により、Y A C およびコスミドライブラリーのスクリーニングが実施され、コンティグ組み立てのための構築ブロックが分離された。故に、F I S H - および S T S - 含有量マッピングならびに制限エンドヌクレアーゼ分析から誘導されるデータを使用して、コンティグ組み立てを実施した。このアプローチを使用して本発明者等は、およそ 6 Mb の D N A をカバーする 75 の部分重複する Y A C クローンから成る Y A C コンティグを確立した(図 1)。このコンティグは、研究された全ての腫瘍由来細胞系の 12 番染色体切断点を包含しているように見受けられた。このコンティグの構築に使用された Y A C の特性を表 I に示す。

20

30

40

【0048】

3.2.YAC コンティグの染色体方向の確立

12 番染色体の動原体に向かう一方向性染色体歩行を可能にするため、S T S R M 1 4 および R M 2 6 に隣接する D N A 領域(およその大きさ: 1450 kb)の向きを、二色間期 F I S H 分析によって決定した。これらの S T S に対応するコスミドクローン(即ち L L 1 2 N C 0 1 - 1 F 6 (R M 1 4) および L L 1 2 N C 0 1 - 9 6 C 1 1 (R M 2 6)) を別個に標識すると、それぞれ緑色または赤色のシグナルを示した。対照遺伝子座としてコスミド L L 1 2 N C 0 1 - 1 9 3 F 1 0 を標識したところ、検出時に緑色シグナルを示した。L L 1 2 N C 0 1 - 1 9 3 F 1 0 はかつて、脂肪腫細胞系 L i - 1 4 / S V 4 0 および

50

子宮平滑筋腫細胞系 LM - 30.1 / SV 40 において、LIS - 3 / SV 40 (即ち CHOP) の切断点の遠位および染色体 12 q 切断点の近位にマッピングされた。LL12NC01 - 1F6 および LL12NC01 - 96C11 は、脂肪腫細胞系 Li - 14 / SV 40 および子宮平滑筋腫細胞系 LM - 30.1 / SV 40 において、12 q 切断点の遠位にマッピングされることが判明した。故に、LL12NC01 - 193F10 は、RM14 および RM26 の両方に対して近位にマッピングされると結論付けられた(未発表の結果)。150 の採点された有用な間期のうち、18% は赤 - 緑 - 緑のシグナル順序を示し、一方 72% が緑 - 赤 - 緑のシグナル順序を示した。これらの観察に基づき、本発明者等は、RM26 が RM14 に対し近位にマッピングされると結論付け、よって本発明者等は、YAC コンティグを、本発明者等のコンティグの RM26 (即ち近位) 側からのみ伸長させ続けた。RM14 および RM26 を含むコスミドのみが二色間期マッピングによって順序付けられ、他の全ての順序は YAC コンティグのデータから推理された。最後に、二色間期 FISH 研究の結果に基づいて提起されたコンティグの染色体方向が、YAC コンティグを、種々の腫瘍細胞系中に存在する 12 番染色体切断点を超えて伸長させた後に、個別に確認されたことに留意すべきである。この確認情報は膨大な FISH 研究で得られ、そこでは、YAC およびコスミドクローンの位置が、一次脂肪腫、子宮平滑筋腫、多形態性唾液腺腫、および肺軟骨様過誤腫または誘導細胞系の染色体 12 q 13 - q 15 切断点に対して相対的に決定された[24、42、25、43]。

【0049】

3.3.D 12 S 8 周囲の 6 Mb YAC コンティグからの稀切断物理的地図の組み立て
稀切断酵素(材料および方法を参照されたい)で完全に消化し CHEF ゲル上で分離した、YAC DNA を加えた総酵母のサザンプロットを、i) 問題の YAC の最初のスクリーニングのために使用された STS、ii) pYAC4 右腕配列、iii) pYAC4 左腕配列、および iv) ヒト ALU - 反復プローブ(BLUR - 8)を用いて連続的にハイブリダイズした。このようにして得られた広範囲の制限地図を、PCR 分離された STS / YAC 末端プローブでプロービングすることにより完成した。時に二重消化を行った。個々の YAC クローンの制限地図を並置し、共通制限地図を確立した。ここで、共通稀切断地図全体は、完全な内部一致を示す少なくとも 2 個の独立したクローンによって支持されることに留意することが重要である。

【0050】

3.4.CA 反復および単形態性 STS / EST の物理的地図作成

ヒト 12 番染色体に関する第二回国際ワークショップで明らかとなった統合されたマッピングデータに基づき[44]、幾つかの公表されているマーカーが、本明細書に提示される YAC コンティグ内にマッピングされることが期待された。本発明者等のマッピングデータを他者により得られたデータと完全に統合させるため、幾つかのマーカーを本発明者等のコンティグ上に STS 含量マッピングし、そして陽性であると判明したものをその後 YAC サザンプロット上の(プライマー)ハイブリダイゼーションによってさらに位置決定した。本明細書中に提示されるコンティグ内に存在することが判明したマーカーのうちには、CA 反復 D12S313 (AFM207 x f 2) および D12S335 (AFM273 v g 9)[45]、D12S375 (CHLC GATA3 F02)、および D12S56 があつた[46]。さらに、一般に入手し得る配列データに基づき本発明者等が開発したプライマーの組を使用して、インターフェロン 遺伝子 (IFNG)[47]、ラス関連蛋白遺伝子 Rap1B [48]、および発現された配列タグ EST01096 [49] がマッピングされた(表IIを参照されたい)。試験され陰性であるとわかったマーカーは、D12S80 (AFM102 x d 6)、D12S92 (AFM203 v a 7)、D12S329 (AFM249 x h 9) および D12S344 (AFM296 x d 9) を包含した。

【0051】

4. 考察

本実施例においては、YAC コンティグ、および、幾つかの頻発する良性充実性腫瘍の染色体異常をマッピングすることが知られている MAR を含むヒト 12 番染色体の長腕上

10

20

30

40

50

の領域である、12q15上のおよそ6Mbをカバーする稀切断物理的地図の確立が例示された。

コンティグの全長をおよそ6Mbにおいて、個々のYAC間の重複の程度を注意深く測定した(図1)。YACクローンの幾つかについての本発明者等の寸法別分類データは、CEPHにより決定された大きさと僅かに相違することに留意すべきである[50]。これは恐らく異なる研究所におけるパルスフィールドゲルの稼働のためのパラメータの相違に起因するというのが本発明者等の見解である。

【0052】

制限マッピングおよびSTS含有量分析を使用して、共通する広範囲の物理的地図(図1)を組み立てた。全体の複合地図は少なくとも2倍のカバレッジにより支持される。合計で30Mb以上のYAC DNAが制限およびSTS含有量分析により特性決定され、これは約5倍の平均コンティグカバレッジに相当する。このパルスフィールド電気泳動の技術に伴う「生来の」限定された分析では、非常に正確なサイズの判断はできないものの、本明細書に提示されるYACコンティグ内に含まれる500kbコスミドコンティグから得られる制限マッピングデータとの比較は、極めて良好な相関を示した。コスミドデータからの外挿で、本発明者等は、本明細書に提示された稀切断物理的地図の精度を約10kbと評価する。

【0053】

本発明者等の物理的マッピング研究の結果は、3個の遺伝子特異的および他者により分離された名称の無い5個のマーカーの統合を可能にした(図1の矢印の間に示される)。この名称の無いマーカーは、1個の単形態性および4個の多形性マーカーを含む。かつて公刊された5個のYAC末端由来の単コピーSTS(RM1、RM4、RM5、RM7、およびRM21)ならびに4個の公刊されているCA反復(D12S56、D12S313、D12S335、およびD12S375)および3個の公刊されている遺伝子付随STS/EST(RAP1B、EST01096、およびIFNG)が同じ物理的地図上に置かれたが、これは、その領域中にマッピングされる幾つかの特性/疾病遺伝子の(連鎖)マッピングおよび同定を容易にするであろう。さらに本発明者等は、同じ物理的地図上に、染色体歩行の工程中に開発した、72のYAC末端由来(表I)および8個のコスミド末端-またはインターALU-由来のDNAマーカー(CH9、RM1、RM110、RM111、RM130、RM131、RM132、およびRM133)を置くことができた。PYTHIA@anl.govのPYTHIA自動通信サーバーを使用して、これらDNAマーカーの誘導された配列を反復の存在についてスクリーニングした。これら72のDNAマーカーのうち43について(表IIに列挙されている)、プライマーの組を創出し、PCRおよびヒトゲノムDNAのサザンプロット分析により、対応するSTSが単コピーであることを決定した。残りの29のDNAマーカー(黄色の囲み内に示される)はYAC末端誘導配列を表し、これらについては本発明者等はプライマーの組を作らなかった。これらのYAC末端配列は、制限地図作成に基づき12番染色体にマッピングされると思われる。最後の写真は、70kb内にほぼ1個という、この領域における通算のマーカー密度を明らかにしている。

【0054】

本明細書に提示されるコンティグの分析は、ハウスキーピング遺伝子に頻繁に付随することが知られているHTF島であるかも知れない、多数の富CpG領域を明らかにした。これらCpG島は、まだ未確認の遺伝子の5'末端に位置する可能性が高い：YAC DNA中、3またはそれ以上の稀切断制限部位が一致する、90%の事例において、付随遺伝子のあることが示されている[51]。これは、この領域内で尚同定されるべき遺伝子の数の過小評価であると思われる、何故なら、組織特異的遺伝子の60%はCpG島を伴わない[52]からであり、また、一つの島から2個の遺伝子が別の向きに転写されることが起こり得るからである。

【0055】

CEPH YACライブラリーマーク1から分離されたYACクローンの幾つかはキメ

ラであることが判明したが、FISH、制限マッピングおよびSTS含有量分析に基づき非キメラであるように見受けられる部分重複YACクローンがそれぞれのスクリーニングで得られ、これは、該ライブラリーの報告されている複雑性に合致するものである。CEPH YACライブラリーマーク1についてのキメラ性の程度が、本明細書中で研究されている領域について18%(68のうち12)であると決定された。CEPH YACライブラリーマーク3由来のYACの少数(この研究には7個のMEGA YACのみが含まれた)では、このライブラリー中に存在するキメラクロンのパーセンテージの信頼し得る評価ができなかった。マーク1ライブラリーから誘導されたYACの平均サイズは381 kbであると算出され;非キメラ性YAC(n=58)は平均サイズが366 kbであり、一方キメラ性YAC(n=12)はかなり大きな平均サイズ、即ち454 kbを持つとわかった。

10

【0056】

要約すると、本発明者等は、様々な良性充実性腫瘍において頻繁に再編成されるヒト染色体領域に対応する6 Mb YACコンティグを提示する。このコンティグは、3個の遺伝子付随STSを含む84の遺伝子座を連結している。さらに、制限地図作成により本発明者等は、そこに存在する遺伝子を暗示し得る少なくとも12のCpG島を同定した。最後に、このコンティグ内に4個のCA反復を位置決定した。該領域の遺伝学的、物理学的、および転写地図の統合は、12番染色体のこの領域のさらなる研究のための基本的枠組みを提供する。初期の研究はMARおよびULCR12に収束するようであったが、これは、これらの領域が少なくとも3つの別個の型の充実性腫瘍の切断点クラスター領域を含むためである。本発明者等が本明細書に記載する種々のYACクローンは、このような研究のための貴重な資源である。それらは、この領域に存在する遺伝子の探索および種々の良性充実性腫瘍の12番q染色体異常により直接影響を受けるものの同定を容易にするに相違ない。

20

【0057】

実施例2

1.序

ヒト染色体12q15上の1.7 Mb複合異常領域は、異なる良性充実性腫瘍型にしばしば見いだされる頻発する12番染色体切断点を持っていることが判明した。この実施例においては、病因上の関連があるように見えるMAR内のHMG遺伝子の同定を述べる。ポジショナルクローニングのアプローチを用いて、高速移動群蛋白遺伝子HMG I-CをMARの175 kbセグメント内部に同定し、そのゲノム機構の特性決定を行った。FISHによりこの遺伝子内部に、7つの異なる良性充実性腫瘍型の切断点の大半が正確に指摘された。サザンプロットおよび3'-RACE分析により、HMG I-Cにおける矛盾のない再編成および/または変化したHMG I-C転写物の発現が立証された。これらの結果は、HMG遺伝子ファミリーの一員と良性充実性腫瘍の発達との間の連鎖を示すものである。

30

【0058】

2.材料および方法

2.1.細胞培養および一次腫瘍標本

図3に列挙される腫瘍細胞系は、トランスフェクション法により確立され[54]、前に[39、24]で、そして本出願に付属文書1として添付されているヴァン・ドウ・ヴェン等、Genes Chromosom. Cancer、12、296-303(1995)という文献中に記載されている。20%ウシ胎児血清を添加したTC199培地で細胞を生育させ、標準的細胞遺伝学技術により規則正しい間隔で検定した。ヒト肝細胞性癌腫細胞系Hep 3BおよびHep G2をATCCより取得し(受理番号ATCC HB 8064およびATCC HB 8065)、4%アルトロサーを添加したDMEM/F12(ギブコ/BRL)中で培養した。一次充実性腫瘍は様々な大学診療所から入手した。

40

【0059】

2.2.YACおよびコスミドクローン

YACクローンは、PCRに基づくスクリーニング[59]およびコロニーハイブリダイ

50

ゼーション分析の組み合わせを用いてC E P Hマーク1[57]およびマーク3[58]Y A Cライブラリーから分離した。コスミドクローンは、ローレンス・リヴァーモア・ナショナル・ラボラトリーから入手した(P.ドゥ・ジョングの好意による)整列させたヒト12番染色体特異的コスミドライブラリー(LL12NC01)から分離した[60]。LL12NC01由来のコスミドクローンは、それらの微量定量プレート上の番地により表示される；即ち例えば27E12というように。

【0060】

コスミドDNAは、キアゲンチップ(ディアゲン)での精製を含む標準技術を用いて抽出した。高分子量酵母+YAC DNA(1×10⁹細胞ml⁻¹に相当)を含有するアガロース充填剤を前記[61]のように調製した。充填剤を、T10E1(pH8.0)25ml4回、その後1×制限緩衝液0.5ml2回に対し完全に透析した後、それらをパルスフィールド制限酵素マッピングまたはYAC末端救出のいずれかに付した。YAC末端救出は、前記参考文献61に記載のように、直接固相DNA配列決定と組み合わせたベクトレット-PCR法を用いて実施した。インターAluPCR生成物は、公表されているオリゴヌクレオチドTC65または517を用いて分離し[62]、クローニングを容易にするためここにSalI尾を付加した。配列分析後、OLIGOコンピューターアルゴリズムを用いてプライマー対を開発した[61]。

10

【0061】

2.3.DNA標識化

YAC、コスミド、PCR生成物およびオリゴヌクレオチドからのDNAを様々な技術を用いて標識した。FISHのために、コスミドクローンまたはYACのインターAluPCR生成物をニック翻訳によりビオチン-11-dUTP(ベーリンガー)でビオチニル化した。フィルターハイブリダイゼーションのために、ランダム六量体を用いてプローブを-32P-dCTPで放射標識した[62]。サイズが200bpより小さいPCR生成物の場合、同様のプロトコルを適用したが、標識化反応を開始させるために特異的オリゴヌクレオチドを使用した。オリゴヌクレオチドは-32P-ATPを用いて標識した。

20

【0062】

2.4.ヌクレオチド配列分析およびPCR増幅

ヌクレオチド配列は実施例1に記載のように決定した。配列決定結果は、A.L.F.DNAシーケンサー(商標)(ファルマシア・バイオテック)を使用し標準的30cm、6%ハイドロリンク(商標)、ロングレンジ(商標)ゲル(ATバイオテック)上で分析した。PCR増幅は本質上前記と同様に実施した[39]。

30

【0063】

2.5.cDNA末端の迅速増幅(RACE)

3'cDNA末端の迅速増幅(3'-RACE)は、ギブコ/BRL3'-ETプロトコルの一部を僅かに改変した方法を用いて行った。第一鎖cDNA合成のためには、アダプタープライマー(AP2)AAGGATCCGTCGACATC(T)17を使用した。第一および第二回目のPCRの両者のために、不変増幅プライマー(UAP2)CUACUACUACUAAAGGATCCGTCGACATCを「逆プライマー」として使用した。PCRの第一回目では以下の特異的「前進プライマー」を使用した：i)5'-CTTCAGCCCAGGACAAAC-3'(エキソン1)、ii)5'-CAAGAGGCA GACCTA GGA-3'(エキソン3)、またはiii)5'-AAC AAT GCA ACT TTT AAT TAC TG-3'(3'-UTR)。PCRの第二回目では以下の特異的前進プライマー(第一回目で使用されたものと比較して入れ子状のプライマー)を使用した：i)5'-CAUCAUCAUCAUCAUCGCCTCAGAAGAGAGGAC-3'(エキソン1)、ii)5'-CAUCAUCAUCAUGTT CAG AAG AAG CCT GCT-3'(エキソン4)、またはiii)5'-CAUCAUCAUCAUTTGATCTGATTAAGCAAGA GTGGG-3'(3'-UTR)。入れ子状特異的プライマーのCUA/CAU尾は、指向性のクローンアンプクローニング系(ギブコ/BRL)の使用を可能にした。

40

50

【 0 0 6 4 】

3. 結果

3.1. コスミドコンティグおよびM A RセグメントのS T S地図の開発

ヒト12番染色体の長腕に焦点を絞ったポジショナルクローニング作業工程の間に本発明者等は、約6 Mbにわたる、そして75の部分重複Y A Cから成る酵母人工染色体(Y A C)コンティグを組み立てた。その説明については実施例1を参照されたい。このコンティグはM A Rを包含しており(図2をも参照されたい)、そこでは、様々な一次良性充実性腫瘍(これまで試験された8つの異なる型の34の腫瘍;表5)および腫瘍細胞系(これまで試験された26。脂肪腫、子宮平滑筋腫、および多形態性唾液腺腫より誘導;図3)に存在する殆どの染色体12q13 - q15の切断点の殆どが密集しているように見える。本発明者等は広範囲S T SおよびM A Rの稀切断物理的地図の両者を開発し、F I S H分析により、M A Rの445 kb垂領域内にマッピングされる切断点の殆どがS T S R M 33およびR M 98の間に位置することを見いだした(図2および図3を参照されたい)。大規模な品質管理を含むF I S H実験を、常法に従い前記のように実施した[25、39、24、42、36]。この445 kb M A Rセグメント内部の切断点の分布をさらに精密にするため、54の一部重複コスミドクローンで構成されるコスミドコンティグを開発し、稠密なS T S地図(図2)を確立した。このコスミドコンティグは、稀切断物理的地図との比較およびS T S含有量マッピングによって二重確認した。

10

【 0 0 6 5 】

3.2. M A Rの175 kb D N Aセグメント内部への染色体12q切断点の密集

研究された様々な腫瘍細胞系中の染色体12q切断点が、F I S Hによりコスミドコンティグ内部に正確に指摘された(図3)。本発明者等の品質管理F I S H実験の一部として[25、39、24、42]、選択されたコスミドをまず、正常リンパ球から誘導された中期拡散について試験した。F I S Hの結果は、これら腫瘍細胞系中の12番染色体切断点の大多数(少なくとも26例のうちの18)がR M 99およびR M 133の間の175 kb D N A間隔の中に密集して見いだされることを示し、これは、この間隔が中心的な切断的クラスター領域を構成することを示すものである。L i - 501 / S V 40で得られたF I S H結果は、M A Rの一部は見掛け上正常な第3染色体に転座する事(応用細胞遺伝学により目撃された染色体異常)を示した。最後に、子宮平滑筋腫細胞系L M - 5.1 / S V 40、L M - 65 / S V 40、およびL M - 608 / S V 40の切断点と同じコスミドクローン、即ちコスミド27E12内部にマッピングされる事が見いだされたという事実は、興味を持って注目される。

20

30

本発明者はさらに、染色体12q13 - q15の異常を有する8つの異なる型の一次良性充実性腫瘍についてF I S H実験を行った(表4)。コスミドクローン27E12および142H1の混合物を分子プローブとして使用した。要約すると、一次腫瘍のF I S H研究の結果は、腫瘍細胞系について得られた結果と矛盾しなかった。試験された7つの異なる腫瘍型の各々の切断点がM A Rの同じ175 kb D N A間隔内部に見いだされたという観察は、この間隔がこれらの腫瘍の発達と決定的に関連し、故に可能性あるM A G遺伝子座またはその重要な部分を有しているかも知れないということを示唆した。

【 0 0 6 6 】

3.3. M A R内部にマッピングされる候補遺伝子の同定

S T S R M 99およびR M 133の間のM A Rの175 kb垂領域内部にマッピングされる候補遺伝子を同定する試みにおいて、本発明者等は3' - 末端エキソン捕捉およびゲノム配列サンプリング(G S S)を使用した[63]。G S Sアプローチを使用して本発明者等はコスミド27E12の4.9 kb B a m H Iサブフラグメントの末端のD N A配列データを得、これはF I S H分析により、試験された子宮平滑筋腫細胞系のうち3個において12番染色体の異常によって分断されることが示された。B L A S T[64]探索は、これらの配列の一部が、H M G遺伝子ファミリーの一員である[66]高速移動群(H M G)蛋白遺伝子H M G I - C[65]の一般に入手し得る部分的c D N A配列(E M B L受理番号Z 31595)と配列一致を示すことを明らかにした。これらの観察に照らし、H M G I -

40

50

Cは候補MAG遺伝子であると考えられ、さらに詳細に研究した。

【0067】

3.4. HMG I - Cのゲノム機構および良性充実性腫瘍における再編成

HMG I - C転写物は1200ヌクレオチド(報告されたサイズはおよそ4 kb[65、67])が一般に入手し得るのみであるため、本発明者等はまず、HMG I - C転写物(ジェンバンク、#U28749)の残りのヌクレオチド配列の殆どを決定した。この事は、本発明者等にとって該遺伝子のゲノム機構の実質的な確立を可能にした。この配列データについて興味深く注目される事は、CT反復がHMG I - Cの5' - UTRに、そしてGGGGTペンタヌクレオチド反復が3' - UTRに存在することであり、これらは調節上の関連があるかも知れない。当該遺伝子の転写されたものをゲノムDNA配列(ジェンバンク、#U28750、U28751、U28752、U28753、およびU28754)と比較することにより、HMG I - Cが少なくとも5個のエキソンを含むことが明らかとなった(図2)。遺伝子の転写方向は染色体の長腕のテロメアに向かっている。最初の3個のエキシソンの各々は、可能性あるDNA結合ドメイン(DBD)をコードしており、そしてエキソン5は、エキソン4によりコードされているスパーサドメインにより3個のDBDから分離されている酸性ドメインをコードしている。3個のDBDコード化エキソンは、互いに比較的近接して位置しており、約140 kbの大きなイントロンによって他の2個のエキソンと分離され、そしてこの2個は互いに約11 kb離れている。ここで特段の興味を持って強調されることは、5個のエキソンは少なくとも160 kbのゲノム領域にわたって散在しており、したがって上記の175 kbの主要MAR切断点クラスター領域全体を殆どカバーしているという事である。分子プローブとしてコスミド142H1(エキソン1 - 3を含む)および27E12(エキソン4および5を含む)の混合物を使用した分子細胞遺伝学的研究の結果は、HMG I - C遺伝子が、評価された腫瘍および腫瘍細胞系の大多数において観察された12番染色体の異常に直接影響を受けていることを明確に証明する(図3;表4)。これらの細胞遺伝学的観察は、LM - 608 / SV40(結果は示されていない)、LM - 30.1 / SV40[24]、およびAd - 312 / SV40(使用されたプローブはCH76、RM118 - A、およびEM26を包含した)の事例におけるサザンプロット分析によって独立して確認された。これら3つのプローブのいずれを用いてもLM - 65 / SV40、LM - 609 / SV40、Ad - 211 / SV40、Ad - 263 / SV40、Ad - 302 / SV40、Li - 14 / SV40、およびLi - 538 / SV40の切断点を検出できなかったという事は、MAR中の切断点の相対位置を確立したFISHデータとも合致した(図3参照)。これらの結果により、HMG I - Cが、仮定的MAG遺伝子の第一候補とされた。

【0068】

3.5. 良性充実性腫瘍細胞における異常HMG I - C転写物の発現

追跡的研究の内容において、可能性ある異常HMG I - C発現について試験することは興味深いものであった。最初のノーザンプロット研究により、HMG I - Cの転写物は、試験された多様な正常組織(脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、膵臓、胎盤、骨格筋)ならびに図3に列挙される幾つかの腫瘍細胞系で検出することができないことが明らかとなった(データは示されていない)。正常な分化した組織中のHMG I - CmRNAレベルは悪性組織中よりもずっと低いことが知られている[65、67]。本発明者等のノーザン研究の対照として、本発明者等は、比較的高いレベルのHMG I - Cを発現することが知られる肝癌細胞系Hep3Bを含めた。本発明者等は、大きさがおよそ3.6および3.2 kbである二つの主要なHMG I - C転写物を容易に検出した(分子量の相違はそれらの5' - 非コード化領域の相違に起因するというのが最もありそうなことである)。HMG I - Cまたは3' - 異常HMG I - C転写物を検出する代替の且つより感受性の高いアプローチにおいて、本発明者等は3' - RACE実験を行った。多様なHMG I - C転写レベル(Hep3B肝癌細胞では高レベル、HepG2肝癌細胞では中等度、そして子宮筋層、正常脂肪組織、および偽粘液腫では低レベル)を有する幾つかの組織を用いた対照実験において、本発明者等は、3つの選択されたプライマーの組のいずれが使用されようとも、分子ク

ローニングおよびヌクレオチド配列分析時に3'-HMGI-C mRNA配列の完璧な部分cDNAコピーを表すように見える3'-RACEクローンを取得した(方法論を参照されたい)。潜在性のまたは異常にスプライスされたHMGI-C転写物に対応する可能性が最も高いRACE生成物が時に観察され、それらの異所性配列は、HMGI-Cイントロン3または4に戻ってマッピングされた。

【0069】

10の異なる一次腫瘍または脂肪腫、子宮平滑筋腫、および多形態性唾液腺腫から誘導された腫瘍細胞系の同様な3'-RACE分析において、本発明者等は定常的および特異なPCR生成物の両者を検出した。定常的PCR生成物は殆どの場合3'-HMGI-C mRNA配列の完璧な部分cDNAコピーを表すように見えた。それらは恐らくは変化を受けていないHMGI-C対立遺伝子に起源する可能性が最も高く、内部対照として考えられるかも知れない。ここに提示された10の腫瘍細胞試料の特異なPCR生成物は、HMGI-C配列と融合した異所性配列を含むように見受けられた。殆どの場合、異所性配列は、確立された転座相手から誘導されることが見いだされ、したがって、HMGI-C遺伝子の、転座で誘発される再編成のための独立した証拠を提供するものである。これらのRACE生成物の異所性配列のヌクレオチド配列、転換点、および染色体起源に関する情報を表5に要約する。異所性配列の染色体起源は、コリエル・セル・レポジトリーズから入手したNIGMS ヒト/齧歯類体細胞ハイブリッドマッピングパネル2を用いてCASH(体細胞ハイブリッドを用いる染色体割り当て)によって確立されたことに留意すべきである。染色体割り当ては、表5にさらに概説されるように、pCH1111、pCH1172、pCH174、pCH193、およびpCH117の事例についてさらなるデータにより個別に確認された。常套的細胞遺伝学的分析の限界を考慮すると、複雑な核型の場合には特に、異所性配列の染色体割り当ては、かつての転座の細胞遺伝学的記載と良好に一致する。

【0070】

得られる分子細胞遺伝学的分析が、その12番染色体切断点がHMGI-C遺伝子の遙か外側(1Mb以上)にマッピングされることを示したという、Ad-312/SV40で得られたデータは、幾分予想外であった[42]。異所性配列は、確立された転座相手である第1染色体(より正確には、部分的に1p22にマッピングされるM.I.T.YACコンテグWC-511内部のセグメント)に起源を発するように見えた(図2)。この特別の事例における異常HMGI-C遺伝子の機能的発現への影響を正確に解明するためにはさらなる分子解析が必要とされる。ここでさらに興味を持って注目されることは、GGGGT反復がRACE生成物中に存在しないことから、第1染色体に由来する配列が、HMGI-Cの3'-UTR領域に観察されるGGGGT反復を除去するらしいことである。対照的に、やはり3'-UTRに切断点を有することが示された一次子宮平滑筋腫LM-#58(t(8;12)(q24;q14-q15))においては、この反復はRACE生成物中に存在するらしく思われた。故に、この反復の除去は、十中八九腫瘍の発達にとって決定的ではない。X染色体が細胞遺伝学的に指定された転座相手である、一次腫瘍LM-#168.1に関する結果は、異所性配列が、平滑筋腫における優先的転座相手である第14染色体から誘導されることを明らかにした。第14染色体の関与は、Li-501/SV40の場合にそうであると判明したように、この特別の事例での標準的核型決定によっては検出できない可能性がある。一次脂肪腫Li-#294(t(8;12)(q22;q14))では、これに代わる2個の異所性配列が検出された。ヒト第8染色体に対するプローブの領域位置決定のためのハイブリッド細胞マッピングパネルを使用したさらなるCASH分析[68]は、これらが共に染色体8q22-qterから誘導されていることを明らかにした(表5)。これらのRACE生成物が、選択的にスプライシングされた転写物に相当するということは極めて可能性が高い。最後に、事例のうち4つにおいて(表5、pCH114、pCH110、pCH109、pCH116)、対応する異所性配列がHMGI-Cイントロン3または4のいずれかから誘導されると判明したことから、RACE生成物は潜在性のまたは異常にスプライスされたHMGI-C転写物に相当するよう見えた

。このような R A C E 生成物は上記の対照実験でも観察されている。結論として、腫瘍細胞における異常 H M G I - C 転写物の検出は、H M G I - C が様々な 1 2 番染色体異常により一貫して再編成されていることをさらに強く支持するものである。様々な事例における異常 H M G I - C 転写物は、生物学的な関わりについて何らかの最終的結論を引き出す前に、全長を特性決定すべきであるということに留意すべきである。

【 0 0 7 1 】

分離された異所性配列の最初のそして予備的評価は、変動する長さの、位相が同じオープンリーディングフレームを明らかにした。例えば一次腫瘍 L M - # 2 5 の場合、その異所性配列の第二コドンが既に終止コドンであるらしい(表 5)。配列データは 2 回の大規模な(恐らく突然変異を誘発する) P C R を経て生成されたクローンについてのみ得られているため、ここでは注意することがふさわしい。興味を持って注目されることは、L i - 5 0 1 / S V 4 0 については、ノーザンブロット分析において、分離された異所性配列が、心臓、腎臓、肝臓、肺、膵臓、胎盤、および骨格筋を包含する種々の組織に 1 0 kb 以上の転写物を検出したが、脳には検出されなかった(データは示されていない)ということである。第 3 染色体は脂肪腫中の染色体 1 2 q 1 3 - q 1 5 転座の好ましい相手であり、また種々の脂肪腫の第 3 染色体切断点は Y A C クローン C E P H 1 9 2 B 1 0 を横切っていることが見いだされたことから、検出された転写物は、可能性ある脂肪腫を好む相手遺伝子(L P P)に相当するのかも知れない。

【 0 0 7 2 】

4. 考察

付属文書 1 において、脂肪腫、多形態性唾液腺腫、および子宮平滑筋腫の染色体 1 2 q 1 3 - q 1 5 切断点は、過去にそれらが 1 2 番染色体のセグメント q 1 3、q 1 4、または q 1 5 に細胞遺伝学的に割り当てられたことに関わりなく、全て M A R と呼称される 1 . 7 M b D N A 間隔内部に全て密集している。3 つの腫瘍型のうち 2 つで 1 2 番染色体転座切断点にかかっている C E P H メガ - Y A C を同定しているシェーンベルク・フェッツォ等の最近の研究[1 4]は、この主張されている切断点の密集を支持している。本研究において本発明者等は、F I S H 分析により、7 つの異なる充実性腫瘍型の 1 2 番染色体切断点が、M A R の比較的小さな(1 7 5 kb)セグメント内部に密集していることを決定的に立証した。幾つかの腫瘍細胞系についてはサザンブロットデータが得られ、これらは常に F I S H 結果を支持した。これら全ての観察から、本発明者等は、M A R のこのセグメントはこれらの腫瘍における 1 2 番染色体異常のための主たる標的領域を構成していること、そしてそれは可能性ある M A G 遺伝子座：これらの腫瘍における共通した通性と考えられ得る多腫瘍異常増殖遺伝子座を表していそうなことを結論付ける。

【 0 0 7 3 】

この 1 7 5 kb M A R セグメント内部に、本発明者等は H M G I - C 遺伝子を同定し、そのゲノム機構の特性を決定した。構造的にはこの H M G I - C コード化燐蛋白は、3 個の可能性ある D N A 結合ドメイン、1 個のスペーサー領域、および酸性カルボキシ末端ドメインで構成され、カゼインキナーゼ II および p 3 4 / c d c 2 の両者のための燐酸化の可能性ある部位を含んでいる[6 5、6 7]。本発明者等は、H M G I - C が本明細書中で研究された様々な腫瘍型に関わる第一候補の標的遺伝子である強力な証拠を提供した。F I S H 研究において、3 3 の一次腫瘍のうち 2 9 の切断点は、2 つの極めて有用なコスミド 1 4 2 H 1 および 2 7 E 1 2 の間にマッピングされることが判明した。第一のコスミドは 3 個の D B D コード化エキソンを含み、第二のコスミドは別の 2 個のドメインをコードしている残りのエキソンを含んでいる。故に、切断点の大多数は該遺伝子の内部にマッピングされ、それらの殆どは恐らく 1 4 0 kb イントロン(イントロン 3)内部にあり、これは、評価された 2 6 の腫瘍細胞系で得られた F I S H 結果とも合致する。H M G I - C 遺伝子の 5' 末端はまだ完全には特性決定されていないことにも留意すべきである。この遺伝子ファミリーの別の成員である H M G I (Y) は様々な代替第一エキソンを持っていることが知られていることから[6 9]、H M G I - C 遺伝子の大きさは、想像されているよりも大きいかも知れない。H M G I - C が 1 2 番染色体異常の影響を受けていることのさらな

る支持は、3'-RACE実験の結果から導くことができる。新たに獲得された配列に融合した転写されたHMG I - C配列で構成される異常HMG I - C転写物が、腫瘍細胞に検出されたが、明らかに殆どの場合、細胞遺伝学的に転座相手として同定された染色体に起源を発している。多くの染色体が、研究された腫瘍中の転座相手として発見されているという事は注目すべきである。これらの転座に關与する相互切断点領域に觀察されるこの不均一性は、MLL遺伝子を含む染色体11q23再編成を伴う様々な血液学的悪性腫瘍のそれと似ており[70]、その翻訳産物はHMG I蛋白のDNA結合モチーフに關連するアミノ末端モチーフを持っている。

【0074】

興味をそそる論点は、HMG I - C遺伝子の発現に及ぼす12番染色体異常の影響および直接の生理学的関わりに關係している。HMG I - Cの幾つかの機能的特徴は知られているか、または他のファミリー成員の研究から推測により導くことができる。それはDNAの小溝で結合することから、HMG I - Cはサテライトクロマチンの組織化において役割を果たしているか、または転写因子として働いていると示唆されている[71、72]。HMG I - Cに最も密接に關連する成員であるHMG I (Y)に關する研究は、HMG I (Y)はNF- κ B転写活性のためのプロモーター特異的副因子として機能し得る事を示唆した。HMG I (Y)はさらに、明瞭な転写因子ATF-2イソ型のDNA結合を刺激または阻害することが示されている[74]。どちらの研究も、該蛋白はプロモーター/エンハンサー事情において機能する転写装置の構造要素を構成しているに過ぎないことを示している。HMG I - Cと類似のドメイン構造を持ち、遺伝子転写において準転写因子として働くHMG遺伝子ファミリーのさらに別の成員である、高速移動群蛋白1(HMG1)に關する最近の報告では、酸性カルボキシ末端領域を欠く末端切除HMG1蛋白が遺伝子転写を阻害することが示された[75]。DNA結合により惹起される抑制の排除に加えて遺伝子発現の増強のためには、HMG1分子の酸性末端が必須であることが提唱された。12番染色体切断点の殆どが140kbイントロンに存在するらしいことから、酸性カルボキシ末端ドメインからのDBDの分離は頻繁に起こっていると思われる。HMG I - Cの酸性ドメインがHGM I (Y)のそれと同様の機能を有する場合、12番染色体異常の結果は遺伝子発現に影響する可能性がある。最後に、酸性カルボキシ末端領域をコードしている配列の結末はまだ知られていないことに留意すべきである。

【0075】

HMG I - Cは、良性腫瘍の発達に關わり得るHMG遺伝子ファミリーの最初の成員であるため、このファミリーの他の成員もまた關与しているのかという疑問が生まれる。HMG蛋白ファミリーは3つのサブファミリーで構成される：i)HMG Iおよび2型蛋白。これらはインビトロで転写を促進することが判明しており、またHMGボックスを有するずっと大きなクラスの調節物質の成員であり得る。ii)まだ知られていない機能を有するランダムコイル蛋白HMG14および17。iii)HMG I - 型蛋白。これらは小溝に結合し、HMG I - C、HMG I、およびHMG I - Yを包含する。後者の二つは同じ遺伝子によりコードされている。HMGファミリー成員の公表されているマッピング位置が、本明細書で研究されているような良性充実性腫瘍の公表されている染色体切断点と一致するという事は、興味を持って注目される。例えばHMG I (Y)遺伝子はヒト染色体6q21にマッピングされている[69]が、これは、子宮平滑筋腫、脂肪腫、および多形態性唾液腺腫で觀察される頻出する転座に關与していることが知られている[76]。ヒトゲノムデータベースに列挙されるように、HMGファミリーの既知の成員全てが染色体上に割り当てられている訳ではないが、それらの幾つかについては比較的正確なマッピング位置が確立されている。例えば、HMG17は染色体1p36.1-p35に、HMG1Lは13q12に、そしてHMG14は21q22.3に割り当てられ、腫瘍型の染色体切断点の本明細書中で研究されている染色体セグメントは全て報告されている[76]。HMG I (Y)またはこれらHMG成員のうちの他のいずれかが実際にこれらの腫瘍の他の亜群に影響を及ぼしているかどうかは依然として確立されねばならない。さらに、バンナヤン-ゾナナ(マッククシク#153480)、プロテウス(マッククシク#176920)、

10

20

30

40

50

およびコウデン(マッククシク# 158350)のような症候群(後者の症候群は多発性過誤腫症候群とも呼ばれる)を記載することは興味深い。先天性バンナヤン - ゾナナ症候群を有する個体の60%には、中胚葉過誤腫を伴う家族性巨大頭蓋、離散した脂肪腫および血管腫が見いだされた[70]。

【0076】

最後に、本発明者等の結果の一つの局面を見逃すべきではない。この研究で評価された全ての腫瘍は間葉起源または間葉成分を含んでいた。観察されたHMGICの関与が間葉特異的であるのかまたは非間葉起源の腫瘍にも見いだされるのかを解明することは非常に興味深いことであろう。本発明者等がここに記載する様々なDNAクローンは、この重要な問題に取り組むための貴重な原資であり、HMGIC遺伝子を腫瘍発生に最終的に関連付ける研究を容易にするに違いない。

10

【0077】

実施例3

HMG遺伝子ファミリーの他の成員の再編成

1. 序

この実施例は、もしHMGIC遺伝子またはHMGIC(Y)遺伝子のいずれかが染色体再編成により影響を受けるならば、与えられた腫瘍実体(例えば肺軟骨様過誤腫、子宮平滑筋腫、子宮内膜ポリープ)内部に、組織学的に實際上互いに区別不可能な腫瘍が発生することを明確に証明する。したがって、HMGICおよびHMGIC(Y)を包含する(但しこれらに限定されない)異常な間葉増殖につながる遺伝子の一群を、実際に解明することができる。

20

【0078】

2. 材料および方法

2.1. 染色体の調製

染色体の調製は常法に従う。細胞をコルセミド(10 µg/ml)30 µlで2 - 3時間処理し、次いで、トリプシン法(0.05%トリプシン、0.02%EDTA)、その後室温下で20分間の6倍希釈の培地TC199中の低張性ショックおよびメタノール：酢酸(3:1)固定を用いて収穫した。次いで染色体をGTGバンド化した。

【0079】

2.2. インサイトゥハイブリダイゼーション

インサイトゥハイブリダイゼーションは前記実施例の一つに概説されるようにして実施した。

30

【0080】

2.3. PACライブラリースクリーニング

PACライブラリー(ゲノム・システムズ・ライブラリー・スクリーニング・サーヴィス、セントルイス、ミズーリ、USA)を、HMGIC(Y)遺伝子に特異的なプライマーの組を用いてPCRによりスクリーニングした。スクリーニングのために本発明者等は、配列:

5' - CTC CAA GAC AGG CCT CTG ATG T - 3' (イントロン3)

を有する前進プライマー、および逆プライマー:

40

5' - ACC ACA GGT CCC CTT CAA ACT A - 3' (イントロン3)

を設計し、338bpのフラグメントが生成した。増幅のため、以下の熱循環を使用した: 94 °C、5分間(94 °C、1分間、59 °C、1分間、72 °C、2分間) × 30、72 °C、10分間。

【0081】

2.4. PACクローンからのDNAの調製

単一のPACクローンを含む細菌コロニーをLB培地に接種し、37 °Cで一晩増殖させた。この一夜培養660 µlをLB培地25ml中に希釈し、0.05 - 0.1のOD550となるまで増殖させた。最終濃度0.5 mMとなるまでIPTGを添加することによりP1溶菌性レプリコンを誘導した。IPTG添加後、OD550が0.5 - 1.5となるまで増殖を

50

継続し、そしてゲノムシステムズの推奨するアルカリ溶菌法を用いてプラスミドDNAを抽出した。

【0082】

3. 結果

ヒトPACライブラリーをスクリーニングするためのプライマーの組は、HMGI(Y)のイントロン3に属する配列から設計した。HMGI-CおよびHMGI(Y)の間の配列相同性の故に、増幅された338bpの配列を、HMGI(Y)にのみ特異的である相同性探索によって試験した。ライブラリースクリーニングの結果、挿入物の平均の長さがおよそ100kbである3個の陽性PACクローンが得られた。これらのクローンのうち2個(Pac604、Pac605)を以下のFISH研究に使用した。HMGI(Y)が単純または複雑な形で6p21.3を含む転座を伴う腫瘍において再編成されているか否かを証明するために、本発明者等は、全て6p21.3の異常を伴う4つの一次肺軟骨様過誤腫および2つの子宮内膜ポリープ由来の中期拡散についてFISH分析を実施した。各々の場合について20の中期を採点した。上に記載した2つのPACクローンPac604およびPac605のうち少なくとも一方は、分析した6例全てにおいて切断点と交差していた。これらの結果は、本明細書で調査された6p21異常を伴う腫瘍の切断点がHMGI(Y)遺伝子内部またはその近傍のいずれかに密集していることを明白に示している。

【0083】

実施例4

脂肪腫細胞におけるハイブリッドHMGI-C

第3染色体由来の脂肪腫を好む相手遺伝子LPP(>50kb)のcDNAクローンを分離し、そのヌクレオチド配列を確立した。複合cDNAのデータを図4に示す。ニワトリのジキシンに対しアミノ酸配列類似性(50%以上)を有する蛋白(612アミノ酸(aa))のためのオープンリーディングフレームを同定した。ジキシンは、その成員が全ていわゆるLIMドメインを有するLIM蛋白ファミリーの一員である[78]。LIMドメインは、転写レギュレーター、プロトオンコジーン生成物、および付着斑構成成分を包含する、種々の機能を有する漸増する数の蛋白に見いだされる、システインに富む亜鉛結合蛋白である。LIMファミリー成員の多くは、細胞シグナル生成および発達過程の細胞の運命の制御において役割を果たしていると考えられてきた。近年、LIMドメインはモジュラー蛋白結合界面であることが証明された[79]。細胞外マトリックスへのおよび他の細胞への細胞接着部位に存在するジキシンと同様、推定されるLPPコード化蛋白(図6)は3個のLIMドメインを持ち、古典的なDNA結合ホメオドメインを欠く。

【0084】

Li-501/SV40の3'-RACE分析において、融合転写物を含むHMGI-Cが同定され、ここからハイブリッド蛋白(324aa)を予想することができ、そして引き続きHMGI-Cの3個のDBD(83aa)と、これらのカルボキシ末端の、LPPによりコードされている3個のLIMドメイン(241aa)で構成されると予想された。適当な入れ子状のアンプリマーの組を使用するPCR分析では、類似のHMGI-C/LPPハイブリッド転写物が、t(3;12)を有する様々な一次脂肪腫および脂肪腫細胞系に、そして細胞遺伝学的に正常な脂肪腫にも検出された。これらのデータは、脂肪腫中の細胞遺伝学的に検出し得るおよび隠れたt(3;12)転座は常に、LPPコード化蛋白の仮定的モジュラー蛋白結合界面とHMGI-CのDNA結合分子との同調した融合をもたらす、それによりHMGI-Cの酸性ドメインがLIMドメインに置き換えられるように見える。その結果、これらの蛋白結合界面は、これら脂肪腫細胞の核環境で提供される可能性が高く、そこでそれらは遺伝子発現に影響を及ぼし、恐らくは異常な増殖調節を導き得る。染色体12q13-q15異常を伴う多岐にわたる良性間葉性腫瘍の中で、これは、明確に定義された腫瘍関連HMGI-C融合蛋白の形成に頻繁に且つ不断に寄与する染色体転座相手の最初の例である。図5は、分離された完全なLPP遺伝子のcDNA配列を示している。

【0085】

10

20

30

40

50

実施例 5

脂肪腫のための診断試験

脂肪腫を有する患者の生検試料を取得した。このようにして得られた材料から、製造者のマニュアルに記載されるようにして、ギブコ/BRLの標準トリゾール(商標)LSプロトコルを用いて総RNAを抽出した。この総RNAを使用して、逆転写酵素(ギブコ/BRL)および結合させた短い余分のヌクレオチドを含むオリゴdT(17)プライマーを用いてcDNAの第一鎖を調製した。使用したプライマーの配列は、実施例2の2.5.の項に記載される通りである。引き続きRNアーゼHを使用して、合成されたDNA/RNAハイブリッド分子からRNAを除去した。遺伝子特異的プライマー(実施例2、2.5.項)および結合させた余分の短いヌクレオチドに対し相補的なプライマーを用いてPCRを実施した。このようにして得られたPCR生成物をゲル電気泳動により分析した。それらを同じ個体の正常細胞のバックグラウンドバンドと比較することにより、融合組み立て物が検出された。

さらなる実験において、1個の内部プライマーおよび短いヌクレオチドに対し相補的なプライマーを用いて半入れ子状PCRの第二回目を実施した。したがってこの試験の感受性は有意に改善された。

図8は典型的なゲルを示す。

【0086】

実施例 6

肺軟骨様過誤腫における12q14 - 15および6p21の異常

1. 序

肺軟骨様過誤腫(PCH)は、いわゆる貨幣病変として肺のX線検査中にしばしば検出される。しかし、悪性腫瘍の肺転移および稀に肺癌もまた貨幣病変として存在し得る。この実施例は、最少量の腫瘍細胞しか必要としないFISHを使用して、PCHの大多数と悪性腫瘍とを正しく識別できることを示すものである。したがって、この試験は、例えば微細な針での吸引により取得した腫瘍細胞にうまく適用することができる。

【0087】

2. 材料および方法

この研究には、組織学的に特性決定された合計80のPCHから得た試料が含まれる。細胞培養、染色体調製およびFISHは、前記実施例に記載のように取得または実施した。

【0088】

3. 結果

細胞遺伝学的研究は、細胞遺伝学的に研究された80のPCHのうち51が、12q14 - 15または6p21のいずれかを含む検出可能な異常を表すことを明らかにした。HMG I - C遺伝子に属するコスミドのプールまたは前記実施例に記載されたHMG I (Y)のPACクローンのいずれかを使用するFISHにより、本発明者等は、さらなる4例においてそれらの領域の隠された構造的再編成を検出することができた(3例に12q、そして1例に6pの関与)。故に、FISH試験単独をキットに使用して、PCHの50%以上にHMG I - Cの再配置またはHMG I (Y)遺伝子再配置のいずれかを正確に検出することができ、したがってこれは、これらの腫瘍の診断のための価値あるさらなる手段である(他の2つの実施例に示されるように、この型の腫瘍に制限される訳ではない)。

【0089】

実施例 7

軟組織腫瘍、特に含脂肪細胞起源の腫瘍の診断

1. 序

含脂肪細胞組織腫瘍は、特に微細な針での吸引生検または低温切片を評価せねばならない場合には、しばしば診断上の困難をもたらす。この実施例は、含脂肪細胞組織腫瘍および稀な軟組織腫瘍の鑑別診断のためのFISH試験の妥当性を証明するものである。

【0090】

10

20

30

40

50

2. 材料および方法

2.1. 腫瘍試料

3つの軟組織腫瘍からの腫瘍試料をFISHにより調査した。試料1(1)は含脂肪細胞腫瘍からのものであり、組織学的にはそれは異型性脂肪腫または良く分化した脂肪肉腫のいずれかであった。第二の事例(腫瘍2)は、恐らく粘液様脂肪肉腫であろうと診断されたが、攻撃的な血管粘液腫を包含する他の型の悪性軟組織腫瘍もまた考慮された。第三の腫瘍(腫瘍3)もまた含脂肪細胞起源のものであって、脂肪腫および良く分化した脂肪肉腫の両者が考えられた。

【0091】

2.2. 細胞の分離およびFISH

腫瘍試料は常法に従い酵素で分散させた。得られた単一細胞懸濁液を遠心し、この懸濁液をメタノール：氷酢酸(3：1)を使用して室温で1時間固定した。次にこの細胞懸濁液を清浄な乾燥したスライド上に滴下し、60℃で6時間経過させた。前記実施例に記載のようにHMGIC遺伝子からの分子プローブを用いてFISHを実施した。

【0092】

3. 結果

間期のレベルにおいて、腫瘍1および2はいずれも対立遺伝子の一方についての分断シグナルを示した。これらの発見は、良性腫瘍、即ち第一の事例では異型性脂肪腫、そして第二の事例では攻撃的な血管粘液腫であるとの診断と矛盾しない。それらは悪性の含脂肪細胞組織腫瘍の存在を除外することができる。

第三の事例では、FISHはMAR領域またはその一部の高度の増幅を明らかにした。良く分化した脂肪肉腫において、巨大マーカ―または環状染色体で観察される増幅単位はMAR領域を含むことができることから、これらの発見は、良く分化した脂肪肉腫という診断へとつながる。この実施例に提示された3つの事例は、記載されたDNAプローブの有用性を示す。それらは、軟組織腫瘍の診断用のさらなる手段を提供する、比較的単純且つ迅速な間期FISH実験用のキットに使用することができる。

【0093】

実施例8

正常組織におけるHMGICの発現

1. 序

HMGIC遺伝子の発現は主として胚および胎児の発達中の人間の組織に限定されるという事を示すのが、この実施例の目的である。対照的に、特にHMGIC再編成を伴う腫瘍が発生し得る組織および器官を包含する成人の殆どの正常組織においては、発現は現れない。この事は、該遺伝子の転写の再活性化でも腫瘍形成を開始させ得ることを示すものである。他方では、これは、腫瘍の成長を阻害または止めるためのアンチセンス法(正常HMGIC mRNAに対するアンチセンス分子を包含する)の有用性を強調するものである。

【0094】

2. 材料および方法

2.1. 組織試料

この研究のために使用される全ての成人組織試料は、採取後15分以内液体窒素中で凍結させた外科的に採取された組織から得た。試料の殆どは、腫瘍手術の間に採取された隣接する正常組織由来のものであった。詳細には、本発明者等は、様々な解剖学的部位の脂肪組織から採った8個の試料、子宮筋層組織から採った20個の試料、肺組織から採った8個の試料、唾液腺(耳下腺および顎下腺)から採った4個の試料、心筋から採った1個の組織試料、異なった年齢の患者の胸部組織から採った25個の試料、脳由来の2個の試料、3個の肝臓試料、腎臓組織から採った7個の試料、および社会経済的理由での人工妊娠中絶後の胚/胎児(10-14妊娠週)由来の胚/胎児組織(四肢、6個の試料)を使用した。

さらに、3つの細胞系を使用した：HMGIC発現用の対照として本発明者等は、肝

10

20

30

40

50

癌細胞系 H e p 3 B および典型的な転座 t (3 ; 1 2) を伴う脂肪腫から確立された細胞系 L 1 4 を使用した。10回再現した R T 実験では本発明者等自身の研究において H M G I - C 発現を表さなかったため、負の対照として H e L a 細胞を使用した。

【 0 0 9 5 】

2.2. H M G I - C の発現のための R T - P C R

組織試料 100mg をホモジナイズし、フェノールおよびイソチオシアナートを含むトリゾール試薬(ギブコ B R L、エッゲンシュタイン、ドイツ)を用いて R N A を分離した。ポリ(A) - オリゴ(d t) 17 プライマーおよび M - M L V 逆転写酵素(ギブコ B R L、エッゲンシュタイン、ドイツ)を用いて c D N A を合成した。次いで半入れ子状 P C R を実施した。

第一および第二の P C R のために同じ下部プライマー(レヴェックス 4)(5' - T C C T C C T G A G C A G G C T T C - 3'(エキソン 4 / 5))を使用した。P C R の第一回目では特異的上部プライマー(S E 1)(5' - C T T C A G C C C A G G G A C A A C - 3'(エキソン 1))を、そして P C R の第二回目に入れ子状上部プライマー(P 1)(5' - C G C C T C A G A A G A G A G G A C - 3'(エキソン 1))を使用した。いずれの回の P C R も 10mM トリス / H C l p H 8.0、50mM K C l、1.5mM M g C l₂、0.001%ゼラチン、100μM d A T P、100μM d T T P、100μM d G T P、100μM d C T P、200nM 上部プライマー、200nM 下部プライマー、および 1 単位 / 100μl アンプリタクポリメラーゼ(パーキン・エルマー、ヴァイターシュタット、ドイツ)を含む 100μl 容量で実施した。増幅は 30 周期の間実施した(94 1 分間、53 1 分間、72 2 分間)。第 1 回目の P C R での鋳型としては 250ng 総 R N A から誘導した c D N A を、そして第 2 回目の P C R では第一の P C R 反応混合物 1μl を使用した。

【 0 0 9 6 】

2.3. 無傷の m R N A / c D N A のための対照検定

無傷の R N A および c D N A の P C R のための対照反応として、試験はハウスキーピング遺伝子グリセルアルデヒド 3 - 燐酸デヒドロゲナーゼ(G A P D H) の c D N A の増幅を基礎とした。P C R 反応は、H M G I - C 発現の P C R の第一回目について上に記載したものと同一条件の下で 35 周期実施した。

【 0 0 9 7 】

3. 結果

発現実験については、全ての試験は少なくとも 2 回反復した。R T - P C R に使用された R N A および c D N A 調製物が全て無傷であることを確実にするため(さもなければ偽陰性結果が導かれる)、定型的にハウスキーピング遺伝子 G A P D H の発現のための R T - P C R を行った。陽性の G A P D H R T - P C R 結果は 299bp フラグメントを生成した。陽性の G A P D H R T - P C R を示す試料のみをこの研究に使用した。H e p 3 B および L 1 4 のような H M G I - C 陽性細胞における R T - P C R の結果、特異的 220bp フラグメントが検出できる。H e L a 細胞は H M G I - C の発現を示さなかった。2 つの子宮筋層試料を除いて(ごく微少レベルの筋腫のためである可能性が高い)、成人個体から採取した全ての正常組織試料は、検出し得るレベルの H M G I - C 発現を示さなかった。対照的に、試験された全ての胎児 / 胚組織は H M G I - C 発現を表した。

【 0 0 9 8 】

実施例 9

白血病の早期検出のための診断手段としての H M G I - C 遺伝子の発現

1. 序

H M G I - C 遺伝子を冒す細胞遺伝学的に検出し得る異常が、間葉起源の様々な良性充実性腫瘍中に発見されている。明らかにこの異常は該遺伝子の転写活性化をも導く。血液細胞もまた間葉起源であることから、白血病細胞を H M G I - C 発現について調べることに興味を持たれた。本実施例は、末梢血の細胞中の遺伝子の活性化が、白血病に見いだされる未熟な細胞 / 異常な幹細胞を示す好適なマーカーであることを示すものである。H M

10

20

30

40

50

G I - C の発現は高度の感受性を持って測定されるため、該遺伝子の発現のための R T - P C R は、様々な血液疾患のごく早期の検出に使用することができる。

【 0 0 9 9 】

2. 材料および方法

フィラデルフィア染色体陽性 C M L の患者 1 9 人、A M L の患者 5 人、および A L L の患者 3 人を包含する異なった型の白血病の患者 2 7 人の末梢血由来の試料を H M G I - C 発現の測定に使用した。1 5 人の健康な家系発端者からの血液試料を対照として使用した。

H M G I - C の発現のための R T - P C R は実施例 8 に概説されるように実施した。

【 0 1 0 0 】

3. 結果

白血病患者からの血液試料には H M G I - C の発現が明白に検出できたのに対し、対照の人間から採取された血液試料のいずれにも発現は認められなかった。該遺伝子の転写活性化が遺伝子またはその周囲を冒している突然変異によるという事の証拠はなかった。活性化はむしろ、細胞の未熟性またはそれらの異常な増殖に関連する二次的効果であると想像することの方が、より理にかなっている。とは言え、高い、且つ改善され得る感受性は、例えば H M G I - C 遺伝子の発現のための R T - P C R に基づくキットを極めて好適な診断手段とする。

【 0 1 0 1 】

実施例 1 0

H M G I - C 遺伝子の転写再発現は腫瘍の始動を導き得る。

1. 序

この実施例は、幾つかの腫瘍実体については、H M G I - C 遺伝子の 5 ' に位置する染色体切断点もまた事実存在することを明確に示し、この事は、該遺伝子の転写の上方調節が、対応する腫瘍型の増殖を開始させるのに充分であることを示唆している。

【 0 1 0 2 】

2. 材料および方法

2. 1. 細胞培養

外科手術の後、腫瘍試料(肺軟骨様過誤腫 3 個、子宮平滑筋腫 1 個)を、ペニシリン(2 0 0 I U / ml)およびストレプトマイシン(2 0 0 μ g / ml)を添加したハंक溶液で洗浄した。腫瘍をコラゲナーゼにより 3 7 ° C で 5 - 6 時間分離させた。小フラグメントおよび単一細胞を含むこの懸濁液を、2 0 % ウシ胎児血清、2 0 0 I U / ml ペニシリン、および 2 0 0 μ g / ml ストレプトマイシンを添加したアール塩を伴う培養基 T C 1 9 9 中に再懸濁した。

【 0 1 0 3 】

2. 2. 染色体の調製

染色体の調製は常法に従った。細胞をコルセミド(1 0 μ g / ml) 3 0 μ l で 2 - 3 時間処理し、次いで、トリプシン法(0. 0 5 % トリプシン、0. 0 2 % E D T A)、その後室温下で 2 0 分間の 6 倍希釈の培地 T C 1 9 9 中の低張性ショックおよびメタノール：酢酸(3 : 1)固定を用いて収穫した。次いで染色体を G T G バンド化した。

【 0 1 0 4 】

2. 3. F I S H 研究

染色体を確実に同定するため、同じ中期拡散の G T G バンド化の後、F I S H を実施した。D N A プローブとして、本発明者等は、図 2 のレジェンダに記載されるような、H M G I - C 遺伝子にまでかかっている Y A C - コンティグに属する 5 個のコスミドを使用した。これらのコスミドのうち 3 個(2 7 E 1 2、1 8 5 H 2、1 4 2 H 1)は H M G I - C の第三イントロンにマッピングされ、一方コスミド 2 6 0 C 7 および 2 4 5 E 8 はそれぞれ 3 ' または 5 ' 末端に位置する。スライドをザイス(ザイス、オーバーコッペン、ドイツ)アキシオプラン蛍光顕微鏡を用いて分析した。結果をパワー・ジーン・カリオタイプング・システム(P S I、ハラデイル、英国)で処理し記録した。c D N A 末端の迅速増幅(R A

10

20

30

40

50

C E) は前記実施例の一つに記載されるようにして実施した。

【0105】

3. 結果

4つの腫瘍は全て同じ型の細胞遺伝学的異常、即ち2個の見掛け上正常な12番染色体および余分の誘導体14 der(14)t(12;14)(q14-15;q24)を含むが、対応するder(12)の無い47の染色体の存在を示した。HMGI-Cの3'-5'の向きは動原体に向かっているため、HMGI-C遺伝子内部の一つの破損はその5'部分の喪失ならびにder(12)の喪失を導くであろう。故に本発明者等は、切断点をより正確に決定するため一連のFISH実験を行った。5個のコスミド260C7、27E12、185H2、142H1、および245E8を使用して、同じ強度のハイブリダイゼーションシグナルが、正常な12番染色体および余分のder(14)のいずれにも観察された。このFISH結果は、4つの事例全てにおいて、染色体切断点はHMGI-C遺伝子の5'に位置することを明らかにした。

10

【0106】

4つの事例全てにおいて切断点がHMGI-C遺伝子の5'に割り当てられたことは、RACE-PCRの結果と良好に合致する。正常なHMGI-C転写物に加えて本発明者等は、3つの腫瘍全てに異常転写物を検出することができた。配列は、それらが第14染色体からではなく、恐らくは潜在性スプライス部位のためにHMGI-Cのイントロン3から誘導されていることを示した。しかし、RACE結果は、実際に4つの事例全てでHMGI-C発現があることを明らかにした。

20

【0107】

実施例11

白血病細胞の再分化

1. 序

HMGI-C遺伝子の発現は、多岐にわたる腫瘍、充実性腫瘍、および白血病においてしばしば非常に上昇する。HMGI-C蛋白が細胞の形質転換で重要な役割を果たしているのではないかと考えられた。この実施例は、HMGI-C遺伝子の発現がアンチセンスHMGI-C配列を発現することにより大きく低下し得ること、そして腫瘍細胞におけるHMGI-Cレベルの低下は形質転換された表現型の復帰をもたらすことを示すものである。したがって、アンチセンス分子の発現または投与は、治療上成功裏に適用することができる。

30

【0108】

2. 材料および方法

2.1. 腫瘍細胞系

腫瘍細胞系は悪性一次唾液腺腫瘍および一次乳癌から作成した。細胞系は、B.カズミールチャク、B.ソード、S.パートニッケ、J.ブラーディエク、およびW.シュルート、「多形態性腺腫細胞は最初の核型に応じてそれらのSV40形質転換に対する感受性を変える」、Genes Chrom.Cancer、5巻35-39頁(1992)に記載のように確立した。

【0109】

2.2. 形質転換された状態の検定

軟寒天コロニー検定を、マクファーソンおよびモンタニアー、「ポリオーマウイルスにより形質転換された細胞の選択検定のための寒天懸濁培養」、Virology、23巻291-294頁(1964)に記載のように実施した。

40

唾液腺および胸部腫瘍細胞を、20%ウシ胎児血清(ギブコ)、200IU/mlペニシリン、および200μg/mlストレプトマイシンを添加したアール塩を伴うTC199培養基中で増殖させた。

トランスフェクトさせた唾液腺(AD64)および胸の細胞系の腫瘍形成性を、無胸腺マウスに細胞を皮下注射することにより試験した。

【0110】

2.3. トランスフェクション検定

50

トランスフェクションは種々のプロトコルを用いて実施した。即ち：

1. グラムおよびヴァン・デル・エブの燐酸カルシウム法(「ヒトアデノウイルスの感染性の検定のための新しい技術」、Virology、52巻456-467頁(1973))。
2. リポフェクション：製造者の指針に従い、リポソーム仲介DNA輸送(リポフェクタミン、ギブコBRL)を用いてトランスフェクションを実施した。

【0111】

2.4. アンチセンス組み立て物

種々のプロモーター状況、例えばモロニーマウス白血病ウイルスの長末端反復、CMVプロモーター、またはSV40の初期プロモーターの転写調節の下で、ヒトHMGI-C cDNA配列を、発現ベクター中に、センスおよびアンチセンスの両方向に挿入することにより、HMGI-C遺伝子のセンスおよびアンチセンス組み立て物を得た。例えば、ヒトHMGI-Cの全コード化配列を含むヒトHMGI-C cDNAフラグメントを、ヒトサイトメガロウイルス初期プロモーターおよびエンハンサーの調節下での発現、およびG418耐性についての選択を可能にするpRC/CMV(インビトロゲン)中にクローニングすることによって、CMV/HMGI-Cプラスミドを組み立てた。

10

【0112】

3. 結果

3.1. 形質転換された表現型の復帰

胸および唾液腺の腫瘍細胞にアンチセンスHMGI-C発現を誘導した後、これらの腫瘍細胞に、形質転換された表現型の復帰が観察された。軟寒天コロニー検定により測定されたように、そしてインビボ無胸腺マウスで、腫瘍形成性の著しい低下が観察された。免疫沈降およびウェスタンブロット分析は、アンチセンスHMGI-C配列を発現している細胞にHMGI-C蛋白レベルの著しい低下を示した。故に、このアプローチは、HMGI-Cの関与する腫瘍に治療的に使用することができる。

20

【0113】

実施例12

インビボ治療薬試験の手段としての、HMGI-Cを含む動物腫瘍モデル

得られたHMGI-Cの知識に基づき、インビボ薬物試験の手段としての動物腫瘍モデルを開発することができる。この目的(例えば子宮平滑筋腫のための)を達成するため、2つのアプローチを使用することができる。即ち、一方は遺伝子転移(形質転換動物の作成)であり、他方は遺伝子標的化技術(胚の幹細胞(ES細胞)でのホモローガスな組換えを介して特異的遺伝子異常をインビボで模倣する)である。

30

【0114】

これらの技術は、複雑な生態系の遺伝子機構の操作を特異的且つ予め設計されたように行うことを可能にする。広範な技術的詳細については、B.ホーガン、R.ベディングトン、F.コンスタンティーニ、およびE.レイシー、マウス胚の操作、研究室マニュアル、コールド・スプリング・ハーバー・プレス、1994；ISBN 0-87969-384-3を参照されたい。

【0115】

HMGI-C遺伝子の不活性化または突然変異を、特に選択された細胞型において選択された時点で起こすために、近年記載されたCre/LoxP系を使用することができる(H.グー等、細胞型特異的遺伝子標的化を用いたT細胞のDNAポリメラーゼ遺伝子セグメントの除去、Science、265、103-106、1994)。Cre酵素は、その生理的役割が、感染の間に互いに結合するようになったファージゲノムを分離する事である、バクテリオファージP1由来の組換え酵素である。これを達成するため、Creは、LoxP部位と呼ばれるファージDNAの短い配列に並び、1個のLoxP部位を残してそれらの間のDNAを除去する。この系は現在、哺乳動物細胞中で、染色体DNAを高い効率で切り取るのに有効であることが示されている。この系を用いた遺伝子の組織特異的不活性化または突然変異は、Cre酵素の組織特異的発現を介して獲得することができる。

40

【0116】

50

一例として、該モデルが治療薬のインビボ試験の助けになるような、MAG遺伝子ファミリーの一員を使用した子宮平滑筋腫のための動物モデル系の開発を下に概説する。

2つのアプローチに従うことができる：

- a) 人間の患者に観察されるような特異的遺伝子異常のインビボ誘導((条件的)遺伝子(同質遺伝子)標的化アプローチ)；および、
- b) 患者に観察される遺伝子異常を代表するDNA組み立て物の導入(遺伝子転移アプローチ)。

【0117】

遺伝子転移に使用されるDNA組み立て物は、構造および発現調節に関する限り、子宮平滑筋腫に罹患している患者でなされた観察に基づいて作成することができる；例えば、
 種々の転座相手遺伝子を伴うHMGI-C融合遺伝子、特に、CEPHYAC6C3、89C5、308H7、336H12、460A6、489F4、902F10、952F5、958C2、961E1、および971F5により表されるYACコンティグに位置する第14染色体の優先的転座相手遺伝子、基本的にHMGI-Cの3個のDNA結合ドメインをコードしている末端切除遺伝子、ならびに完全なHMGI-Cまたは強力なプロモーターの調節下でのHMGI-Cの誘導体。

10

【0118】

実施例13

HMGI-Cに対する抗体の調製

診断および治療に使用するための好適な分子の一つの型は、MAG遺伝子に対する抗体である。HMGI-Cに対するウサギポリクローナル抗体の製造のためには、リサーチ・ジェネティクス・Inc.、ハンツヴィル、AL、USAから入手し得る以下の3個の市販のペプチドを使用した：

20

(H-ARGEGAGQPSTSAQGQPAAPAPQKR)8-多抗原ペプチド(MAP)、

(H-SPSKAAQKKAEATGEKR)8-MAP、

(H-PRKWPQQVVQKKPAQEE)8-MAP。

ポリクローナル抗体は標準技術に従って作製した。

【0119】

表

30

表1
YACクロンの解析

CEPH-コード	大きさ(kb)	標識 左側	#	標識 右側	#	キメラ特性
183F3	715			[RM10]		YES (L + R)
70E1	450	RM29	U27125			ND
95F1	390			RM30	U29054	ND
201H7	320	RM13	U29051	RM14	U29053	ND
186G12	320					ND
354B6	280					YES (R)
126G8	410					ND
258F11	415	RM4	U29052			ND
320F6	290	RM5	U29050	RM21	U29047	ND
234G11	475	RM7	U29046			ND
375H5	290					ND
252E10	510	[RM15]		RM16	U29048	YES (L)
181C8	470			RM26	U29045	ND
107D1	345	RM31	U29043			ND
499C5	320	RM44	U29044	RM46	U29037	ND
340B6	255					ND
532C12	400	RM45	U29041			ND
138C5	510	[RM59]		RM65	U29042	YES (L)
145F2	490	RM60	U29030	RM66	U29040	ND
105E8	340	RM57	U29033	RM63	U29038	ND
55G1	365	RM56	U29031	RM62	U29039	ND
103G7	370	RM85	U29025	RM80	U29035	ND
295B10	295	RM77	U29035	RM81	U29025	ND
338C2	200	RM78	U29034	RM82	U29029	ND
391C12	160	[RM79]		RM83	U29027	YES (L)
476A11	225	[RM67]		RM84	U29032	YES (L)
138F3	460	RM90	U29028	RM91	U29019	ND
226E7	500	RM48	U29024	RM54	U29015	ND
499E9	375	RM51	U29016			YES (R)
312F10	560	[RM50]		RM69	U29021	YES (L)
825G7	950					ND
34B5	315	RM88	U29020	RM89	U29013	ND
94A7	610					YES (R)
305B2	650					YES (L)
379H1	280	RM104	U29014	RM105	U29009	ND
444E6	350	RM92	U29017	RM93	U29010	ND
446H3	370	RM94	U29011	RM95	U29018	ND
403B12	380					ND
261E5	500	RM102	U29012	RM103	U26689	ND
78B11	425					ND
921B9	1670					ND
939H2	1750					ND
108H7	350					ND
142F4	390					ND
404E12	350					ND
164A3	375					ND
244B12	415	RM105	U29007	RM107	U29008	ND
275H4	345	RM108	U29004	RM109	U29005	ND
320F9	370					ND
51F8	450					ND
242A2	160	CH1	U29006			ND

10

20

30

40

【 0 1 2 0 】

表1 (続き)

YACクローンの解析

253H1	400					ND
303F11	320					ND
322C8	410			CH2	U29003	ND
208G12	370	RM96	U29002	RM97	U27135	ND
341C1	270	RM98	U26847	RM99	U27130	ND
354F1	270					ND
452E1	270	CH5	U27135			ND
41A2	310					ND
934D2	1370					ND
944E8	1290			CH8	U23792	ND
2G11	350					ND
755D7	1390					YES (L)
365A12	370					ND
803C2	1080					ND
210C1	365	RM70	U28998	RM86	U27133	ND
433C8	360	RM73	U29000	RM76	U27132	ND
402A7	500	RM41	U28994	[RM42]		YES (R)
227E8	465	RM53	U27134	RM55	U29995	ND
329F9	275	RM72	U28793	RM75	U23357	ND
261E6	355	[RM71]		RM74	U23995	YES (L)
348F2	370			[RM136]		YES (R)
6F3	320	RM35	U27140	RM36	U27141	
59F12	430	RM34	U28794	RM33	U27131	
265H3	300			RM40	U23999	

10

20

YACクローンは、材料および方法について記載したようにCEPH YACライブラリーから単離した。ND：用いた方法では検出されない。6 Mb コンティグ内にマッピングしない標識は [] で示す。ジーン・バンク受理番号を示す (#)。

【 0 1 2 1 】

30

表2
PCRプライマー

STS 名称 (STS 12-)	ヌクレオチド配列 5' - 3'	産物の大きさ (bp)	T _{ann} (°C)
CH1	EGGGACTAACGGATTTTCAA TGTGGTDCATTCATGCCATTA	213	58
CH2	TCCATCCTCATCTCAAAACA CTCTACCAAAATGGAATAAACAG	145	58
CH5	GCAGCTCCAGGCTCCCTCCCA TGGCTTCCTGAAACGGGAGA	143	58
CH8	TCTCCACTGCTTCCATTAC ACACAAAACCACCTGGGGTCT	147	58
CH9	CAGCTTTGGAATCAGTGAGG CCTGGGGAGAGGAGTAAAG	262	58
RM1	GAGCTTCCTATCTCATCC ATGCTTGTGTGTGAGTGG	308	60
RM4	TTGGCTAAGCTAGGTGCC AGCTTCAAGACCCATGAG	236	60
RM5	CAGTCTGAGACTGCTTG TAAAGCAGGGACTCAGC	324	60
RM7	CTTGTCTCACTCTTTTAAAGGG CACCCCTTTTATAGATCCTAC	533	58
RM13	GATGTTCATCACAGTGTG AATGTGAGGTTCTGTGAG	±500	58
RM14	TTCTCATGGGGTAAGGACAG AAAGCTGCTTATATAGGGAATC	158	58
RM16	CCTTGGCTTAGATATGATACAC GCTCTTCAGAAATATCCTATGG	252	58
RM21	CCTTAGCAGTTGCTTGTCTG TCGTCACAGGACATAGTCAC	290	58
RM26	TCTATGGTATGTTATACAAGATG CAGTGAGATCCTGTCTCTA	102	58
RM31	TCTGTGATGTTTTAAGCCACTTAG AATTCCTGTGTCCCTGCCACC	239	56
RM33	ATTCCTCCTCACCTCCCACC AATCTGCAGAGAGGTCCAGC	±600	60
RM34	AATCTCCTCATCTGGCCCTGG GAACGCTAAGCATGTGGGGAG	±600	60
RM36	CTCCAACCATGGTCCAAAAC GACCTCCAGTGGCTCTTTAG	296	60
RM46	ACCATCAGATCTGGCACTGA TTACATTGGAGCTGTCTATGC	241	57
RM48	TCCAGGACATCCTGAAAATG AGTATCCTGCACTTCTGCGAG	391	58
RM51	GATGAACTCTGAGGTGCCTTC TCAAACCCAGCTTTGACTCC	311	60
RM53	GTCTTCAAAAACGCTTTCCTG TGGTTTGCATAAATGCTGATG	333	60

10

20

30

【 0 1 2 2 】

表 2 (続き)

PCRプライマー

STS 名称 (STS 12-)	ヌクレオチド配列 5' - 3'	産物の大きさ (bp)	T _m (°C)
RM50	TACACTACTCTGCAGCACAC TCTGAGTCAATCACATGTCC	94	58
RM59	CTCCCCAGATGATCTCTTTC CGGTAGGAAATAAAGGAGAG	236	58
RM72.	TATTTACTAGCTGGCCTTGG CATCTCAGGCACACACAATG	101	62
RM76	ATTGAGAGAGTGGCCAAATG GGGATAGGTCTTCTGCAATC	496	58
RM85	TCCAACAATACTGAGTGACC TCCATTTCACTGTAGCACTG	435	58
RM86	GTAATCAACCATTCCCCTGA AAAATAGCTGGTATGGTGGC	203	56
RM90	ACTGCTCTAGTTTCAAGGA AATTTACCTGACAGTTTCCT	257	58
RM93	GCAATGACCTCCAATATTTG ATTCCATGGGCTAACACAAG	347	60
RM98	GCAAACTTTGACTGAAACG CACAGACTATCGCACTGCAT	356	58
RM99	AAGAGATTTCCCATGTTGTG CTAGTGCCCTCACAAGAACC	240	58
RM103	AATCTTGAGGGGTTCACTG TCCACTGAGAGCTTTTCA	199	60
RM108	GTGGTTCTGTACAGCAGTGG TGAGAAAATGTCTGCCAAT	439	60
RM110	GCTCTACCAGGCATACAGTG ATTCCTAGCATCTTTTCACG	328	58
RM111	ATATGCATTAGGCTCAACCC ATCCCACAGGTCAACATGAC	312	58
RM130	ATCCTTACATTTCCAGTGGCATTCA CCCAGAGACCCACATTCCTCAT	336	58
RM131	TTTTAAGTTTCTCCAGGGAGGAC AATAGGCTCTTTGGAAAGCTGGAGT	226	58
RM132	TCTCAGCTTAATCCAAGAAGGACTTC GCCATATTCCTCAACAATTTATGCTT	376	58
RM133	TGGAGAAGCTATGGTGCTTCCTATG TGACAAATAGGTGAGGGAAAGTTGTTAT	225	58
EST01096	TCACACGCTGAATCAATCTT CAGCAGCTGATACAAGCTTT	188	58
IFNG	TGTTTTCTTTCCCGATAGGT CTGGGATGCTCTTCGACCTC	150	52
Rap1B	CCATCCAACATCTTAAATGGAC CAGCTGCAAACTCTAGGACTATT	149	58

STS s は、材料または方法について記載したように単離するか、あるいは E S

TO1096, IFNG, および Rap1B に関する文献を検索した。

【 0 1 2 3 】

表 3

図 1 に表示した種々の配列のゲノムデータベース受託番号 (D-番号)

pcr	locus_symbol	pcr	pcr_gdb_id	locus	locus_gdb_id
CH1-lower/CH1-upper	D12S1484	CH1-lower/CH1-upper	G00-595-292	D12S1484	G00-595-415
CH2-lower/CH2-upper	D12S1485	CH2-lower/CH2-upper	G00-595-295	D12S1485	G00-595-416
CH3-lower/CH3-upper	D12S1486	CH3-lower/CH3-upper	G00-595-298	D12S1486	G00-595-417
CH8-lower/CH8-upper	D12S1487	CH8-lower/CH8-upper	G00-595-301	D12S1487	G00-595-418
CH9-lower/CH9-upper	D12S1488	CH9-lower/CH9-upper	G00-595-304	D12S1488	G00-595-419
EH2-lower/EM2-upper	D12S1489	EH2-lower/EM2-upper	G00-595-307	D12S1489	G00-595-420
EH3-lower/EM3-upper	D12S1490	EH3-lower/EM3-upper	G00-595-310	D12S1490	G00-595-421
EH4-lower/EM4-upper	D12S1491	EH4-lower/EM4-upper	G00-595-313	D12S1491	G00-595-422
RH13-lower/RH13-upper	D12S1492	RH13-lower/RH13-upper	G00-595-316	D12S1492	G00-595-423
RH14-lower/RH14-upper	D12S1493	RH14-lower/RH14-upper	G00-595-319	D12S1493	G00-595-424
RH16-lower/RH16-upper	D12S1494	RH16-lower/RH16-upper	G00-595-322	D12S1494	G00-595-425
RH25-lower/RH25-upper	D12S1507	RH25-lower/RH25-upper	G00-595-325	D12S1495	G00-595-426
RH26-lower/RH26-upper	D12S1495	RH26-lower/RH26-upper	G00-595-328	D12S1496	G00-595-427
RH31-lower/RH31-upper	D12S1497	RH31-lower/RH31-upper	G00-595-331	D12S1497	G00-595-428
RH33-lower/RH33-upper	D12S1498	RH33-lower/RH33-upper	G00-595-334	D12S1498	G00-595-429
RH34-lower/RH34-upper	D12S1499	RH34-lower/RH34-upper	G00-595-337	D12S1499	G00-595-430
RH36-lower/RH36-upper	D12S1500	RH36-lower/RH36-upper	G00-595-340	D12S1500	G00-595-431
RH46-lower/RH46-upper	D12S1501	RH46-lower/RH46-upper	G00-595-343	D12S1501	G00-595-432
RH48-lower/RH48-upper	D12S1502	RH48-lower/RH48-upper	G00-595-346	D12S1502	G00-595-433
RH51-lower/RH51-upper	D12S1503	RH51-lower/RH51-upper	G00-595-349	D12S1503	G00-595-434
RH53-lower/RH53-upper	D12S1504	RH53-lower/RH53-upper	G00-595-352	D12S1504	G00-595-435
RH60-lower/RH60-upper	D12S1505	RH60-lower/RH60-upper	G00-595-355	D12S1505	G00-595-436
RH69-lower/RH69-upper	D12S1506	RH69-lower/RH69-upper	G00-595-358	D12S1506	G00-595-437
RH72-lower/RH72-upper	D12S1508	RH72-lower/RH72-upper	G00-595-361	D12S1507	G00-595-438
RH76-lower/RH76-upper	D12S1509	RH76-lower/RH76-upper	G00-595-364	D12S1508	G00-595-439
RH85-lower/RH85-upper	D12S1510	RH76-lower/RH76-upper	G00-595-367	D12S1509	G00-595-440
RH86-lower/RH86-upper	D12S1511	RH85-lower/RH85-upper	G00-595-370	D12S1510	G00-595-441
RH90-lower/RH90-upper	D12S1512	RH86-lower/RH86-upper	G00-595-373	D12S1511	G00-595-442
RH93-lower/RH93-upper	D12S1513	RH90-lower/RH90-upper	G00-595-376	D12S1512	G00-595-443
RH98-lower/RH98-upper	D12S1514	RH93-lower/RH93-upper	G00-595-379	D12S1513	G00-595-444
RH99-lower/RH99-upper	D12S1515	RH98-lower/RH98-upper	G00-595-382	D12S1514	G00-595-445
RH103-lower/RH103-upper	D12S1496	RH99-lower/RH99-upper	G00-595-385	D12S1515	G00-595-446
RH108-lower/RH108-upper	D12S1516	RH103-lower/RH103-upper	G00-595-388	D12S1516	G00-595-447
RH110-lower/RH110-upper	D12S1517	RH108-lower/RH108-upper	G00-595-391	D12S1517	G00-595-448
RH111-lower/RH111-upper	D12S1518	RH110-lower/RH110-upper	G00-595-394	D12S1518	G00-595-449
RH121-lower/RH121-upper	D12S1519	RH111-lower/RH111-upper	G00-595-397	D12S1519	G00-595-450
RH130-lower/RH130-upper	D12S1520	RH121-lower/RH121-upper	G00-595-400	D12S1520	G00-595-451
RH131-lower/RH131-upper	D12S1521	RH130-lower/RH130-upper	G00-595-403	D12S1521	G00-595-452
RH132-lower/RH132-upper	D12S1522	RH131-lower/RH131-upper	G00-595-406	D12S1522	G00-595-453
RH133-lower/RH133-upper	D12S1523	RH132-lower/RH132-upper	G00-595-409	D12S1523	G00-595-454
	D12S1524	RH133-lower/RH133-upper	G00-595-412	D12S1524	G00-595-455

Genome Data Base

10

20

30

40

表 4

原発性良性充実性腫瘍における 1 2 番染色体切断点の F I S H マッピング
MAR の垂領域について

腫瘍の型	MAR 内の切断点	主な切断クラスター領域内の切断点を有する腫瘍フラクション*
脂肪腫	6/6	6/6
多形態性唾液腺腫	7/7	5/7
子宮平滑筋腫	7/8	7/8
乳房過誤腫	1/1	1/1
腺維腺腫	1/1	1/1
肺過誤腫	8/9	8/9
血管筋腫	1/1	1/1

10

20

*腫瘍サンプルは、ブレメン大学の組織病理・細胞遺伝学施設において採取し、解析した。コスミドクローン 27E12 および 142H1 の混合物は、FISH 解析において分子プローブとして用いた。

【 0 1 2 5 】

表5-2

クローン	腫瘍/細胞系	分岐点	核酸配列 (10b)	染色体 RACE	細胞遺伝子源	ポリ(A) シグナル	IA's	プライマー・セット
			exon/Intron 4 (SPACER)	GCCTGCTCAG	GTAAGACATA			
PCI109	LM30.1/SV40	after spacer	GCCTGCTCAG	GTCNATGTTG	14	AATAAA	17	109-AB
PCI238	#2778-93	after spacer	GCCTGCTCAG	GTCNATGTTG	14	AATAAA	17	109-AB
PCI244	#2162-91	after spacer	GCCTGCTCAG	GTCNATGTTG	14	AATAAA	17	109-AB
PCI254	#2776-93	after spacer	GCCTGCTCAG	GTCNATGTTG	14	AATAAA	17	109-AB
PCI203	#2528-90	after spacer	GCCTGCTCAG	TCCTGGTACC	12 (NF1 ¹)	N.D.	19	
PCI199	#CG575	after spacer	GCCTGCTCAG	TCCTGGTACC	12 (NF1 ¹)	(AATAAA)	15	
PCI222	#CG575	after spacer	GCCTGCTCAG	TCCTGGTACC	12 (NF1 ¹)	N.D.	16	
PCI206	#CG575	after spacer	GCCTGCTCAG	TCCVGGTACC	12 (NF1 ¹)	(AATAAA)	16	
PCI175	#275	after spacer	GCCTGCTCAG	TCTTTGAGAT	12 ?	AATAAA	15	175-AB
PCI237	#2617-93	after spacer	GCCTGCTCAG	TCTTTGAGAT	12 ?	AATAAA	16	
PCI207	#2540-87	after spacer	GCCTGCTCAG	AATTAACCTCT	12	AATAAA	18	
PCI239	#2344-94	after spacer	GCCTGCTCAG	AATTAACCTCT	12	AATAAA	18	
PCI116	L1-14/SV40	after spacer	GCCTGCTCAG	GACTGACTCA	12	AATAAA	17	116-AB
PCI184	Myo163.1	after spacer	GCCTGCTCAG	TATTCCTGAA	14	(AATAGA)	19	184-AB
PCI208	#2540-87	after spacer	GCCTGCTCAG	GTCNATGTTG	12	AATAAA	47	
PCI224	#2540-87	after spacer	GCCTGCTCAG	AATTAACCTCT	12	AATAAA	15	
PCI201	#837-88	after spacer	GCCTGCTCAG	AATTAACCTCT	12	AATAAA	15	
PCI236	#2162-91	after spacer	GCCTGCTCAG	GCTTTTTCAA	12	AATAAA	28	
PCI243	#2162-91	after spacer	GCCTGCTCAG	GTTVAGGAAAC	12	?	?	
PCI227	#183-89	after spacer	GCCTGCTCAG	GNCVGCATAC	12	(AATAGA)	14	
PCI193	#58	within 3'-UTR	TATCCCTTCA	AAGTCAAGAG	12	AATAAA	23	(195-AB)
PCI194	#58	within 3'-UTR	TATCCCTTCA	AAGTCAAGAG	12	AATAAA	34	(195-AB)
PCI195	#192	within 3'-UTR	TATCCCTTCA	AAGTCAAGAG	12	AATAAA	23	195-AB
PCI196	#192	within 3'-UTR	TATCCCTTCA	AAGTCAAGAG	12	AATAAA	>17	195-AB
PCI189	Myo192.1	within 3'-UTR	TCTTTGACT	de1 CCCTGT	12			
PCI117	Ad-312/SV40	within 3'-UTR	ATACCACTTA	TTTTAAACA	12 N.T. ¹	AATAAA	23	---
PCI253	#2617-93	within 3'-UTR	TTGCCATGGT	AATCTGAAT	12	?	?	117-AB
PCI264	#568-92	within 3'-UTR	CACCTTTCATC	ATATGGCAAG	12	N.D.	19	
PCI270	#2528-90	within 3'-UTR	ATAAGGACTA	TCAGGCCATCA	12	(AGTAAA)	4	
			NCTTGTNAGC	TAGAGATTAG	12	N.D.		

3'-非翻訳領域(種々の位置)

N. T. : 試験できない;
N. T. ¹ : 異所性配列がプライマー・セットを發展せしめない
N. T. ² : 異所性配列は主に反復配列からなる
N. D. : 検出されない

参考文献

1. Sreekantaiah, C., Leong, S.L.P., Karakousis, C.P., McGee, D.L., Rappaport, W.D., Villar, H.V., Neal, D., Fleming, S., Wankel, A., Herrington, P.N., Carmona, R. and Sandberg, A.A. (1991). Cytogenetic profile of 109 lipomas. *Cancer Res.* 51: 422-433. 10
 2. Nilbert, M. and Heim, S. (1990). Uterine leiomyoma cytogenetics. *Genes Chrom. Cancer* 2: 3-13.
 3. Pandis, N., Heim, S., Willen, H., Bardi, G., Floderus, U.M., Mandahl, N. and Mitelman, F. (1991). Chromosome analysis of 96 uterine leiomyomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* 55: 11-18.
 4. Sandros, J., Stenman, G. and Mark, J. (1990). Cytogenetic and molecular observations in human and experimental salivary gland tumours. *Cancer Genet. Cytogenet.* 44: 153-167. 20
 5. Bullerdiek, J., Wobst, G., Meyer-Bolte, K., Chilla, R., Haubrich, J., Thode, B. and Bartnitzke, S. (1993). Cytogenetic subtyping of 220 salivary gland pleomorphic adenomas: correlation to occurrence, histological subtype, and in vitro cellular behavior. *Cancer Genet. Cytogenet.* 65: 27-31. 30
 6. Walter, T.A., Xuan Fan, S., Medchill, M.T., Berger, C.S., Decker, H.-J.H. and Sandberg, A.A. (1989). Inv(12)(p11.2q13) in an endometrial polyp. *Cancer Genet. Cytogenet.* 41: 99-103.
 7. Vanni, R., Dal Cin, P., Marras, S., Moerman, P., Andrtia, A., Valdes, E., Deprest, J., and Van den Berghe, H., (1993). Endometrial polyp: Another benign tumor characterized by 12q13-q15 changes. *Cancer Genet. Cytogenet.* 68: 32-33. 40
 8. Mandahl, N., Orndal, C., Heim, S., Willen, H., Rydholm, A., Bauer, H.C.F. and Mitelman, F. (1993). Aberrations of chromosome segment 12q13-
- 【 0 1 2 8 】

15characterize a subgroup of hemangiopericytomas. *Cancer* 71: 3009-3013.

9. Mandahl, N., Heim, S., Arheden, K., Rydholm, A., Willen, H. and Mitelman, F. (1989). Chromosomal rearrangements in chondromatous tumors. *Cancer* 65:242-248.

10. Bridge, J.A., Persons, D.L., Neff, J.R. and Bhatia, P. (1992). Clonal karyotypic aberrations in enchondroma. *Cancer Detect. Prev.* 16: 215-219.

11. Hirabayashi, Y., Yoshida, M.A., Ikeuchi, T., Ishida, T., Kojima, T. Higaki, S., Machinami, R. and Tonomura, A. (1992). Chromosome rearrangements at 12q13 in two cases of chondrosarcomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* 60: 35-40.

12. Mandahl, N., Willen, H., Rydholm, A. and Mitelman, F. (1993). Rearrangement of band q13 on both chromosomes 12 in a periosteal chondroma. *Genes Chrom. Cancer* 6: 121-123.

13. Dal Cin, P., Kools, P., De Jonge, I., Moerman, Ph., Van de Ven W., Van den Berghe H. (1993a). Rearrangement of 12q14-15 in Pulmonary Chondroid Hamartoma. *Genes Chrom. Cancer.* 8, 131-133.

14. Schoenberg Fejzo, M., Yoon, S.J., Montgomery, K.T., Rein, M.S., Weremowicz, S., Krauter, K.S., Dorman, T.E., Fletcher, J.A., Mao, J., Moir, D.T., KucherlApati, R.S., and Morton, C.C. (1995). Identification of a YAC spanning the translocation breakpoints in uterine leiomyomata, pulmonary chondroid hamartoma and lipoma. Physical mapping of the 12q14-15 breakpoint region in uterine leiomyomata. *Genomics* 26: 265-275.

15. Birdsall, S.H., MacLennan, K.A. and Gusterson, B.A. (1992). t(6;12)(q23;q13) and t(10;16)(q22;p11) in a phyllodes tumor of the breast. *Cancer Genet. Cytogenet.* 60: 74-77.

16. Rohen, C., Bont, U., Staats, B., Bartnizke, S. and Bullerdiek, J. (1993). Two human breast tumors with translocations involving 12q13-15 as the sole cytogenetic abnormality. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 69: 68-

【 0 1 2 9 】

10

20

30

40

71.

17. Jenkins, R.B., Kimmell, D.W., Moertel, C.A., Schulz, C.A., Menezes, R.M., Scheihauer, B., Kelly, P.J. and Dewald, G.W. (1989). Recurrent cytogenetic abnormalities in 80 gliomas. *Cytogenet. Cell Genet.* 51: 1019.

18. Noguera, R., Llombart-Bosch, A., Lopez-Gines, C., Carda, C. and Fernandez, C.I. (1989). Giant-cell tumor of bone, stage II, displaying translocation $t(12;19)(q13;q13)$. *Virchows Archiv A Pathol. Anat.* 415: 377-382.

10

19. Turc-Carel, C., Limon, J., Dal Cin, P., Rao, U., Karakousis, C., and Sandberg, A.A. (1986). Cytogenetic studies of adipose tissue tumours. II. Recurrent reciprocal translocation $t(12;16)(q13;p11)$ in myxoid liposarcomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* 23: 291-299.

20

20. Rodriguez, E., Sreekantaiah, C., Reuter, V.E., Motzer, R.J. and Chaganti, R.S.K. (1992). $t(12;22)(q13;q13)$ and trisomy 8 are nonrandom aberrations in clear-cell sarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 64:107-110.

21. Reeves, B.R., Fletcher, C.D.M. and Gusterson, B.A. (1992). Translocation $t(12;22)(q13;q13)$ is a nonrandom rearrangement in clear cell sarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 64: 101-103.

30

22. Fletcher, J.A. (1992). Translocation $(12;22)(q13-14;q12)$ is a nonrandom aberration in soft-tissue clear cell sarcoma. *Genes Chrom. Cancer* 5: 184.

23. Roberts, P., Browne, C.F., Lewis, I.J., Bailey, C.C., Spice, R.D., Williams, J. and Batcup, G. (1992). 12q13 Abnormality in rhabdomyosarcoma. A nonrandom Occurrence? *Cancer Genet. Cytogenet.* 60: 135-140.

40

24. Schoenmakers, H.F.P.M., Mols, R., Wanschura, S., Kools, P.F.J., Geurts, J.M.W., Bartnitzke, S., Bullerdiek, J., Van den Berghe, H., and

【 0 1 3 0 】

Van de Ven, W.J.M. (1994b). Identification, molecular cloning and characterization of the chromosome 12 breakpoint cluster region of uterine leiomyomas. *Genes Chrom. & Cancer*. 11: 106-118.

25. Van de Ven, W.J.M., Schoenmakers, H.F.P.M., Wanschura, S., Kazzierczak, B., Kools, P.F.J., Geurts, J.M.W., Bartnitzke, S., Van den Berghe, H., and Bullerdiek, J. (1995). Molecular characterization of MAR, a multiple aberration region on human chromosome segment 12q13-q15 implicated in various solid tumors. *Genes Chrom. & Cancer*. 12: 296-303.

10

(Enclosed as "ANNEX 1")

26. Casalone, r. et al. (1991) Cytogenetic analysis reveals clonal proliferation of smooth muscle cells in atherosclerotic plaques. *Hum. Gen.* 87, 139-143.

20

27. Vanni, R. et al. (1990) Atherosclerotic plaque as a benign tumor. *Cancer Genet. Cytogenet.* 47, 273-274.

28. Giancotti, V. et al. Elevated levels of a specific class of nuclear phosphoproteins in cells transformed with ras and v-mos oncogenes and byco-transfection with c-myc and polyoma middle T genes. *EMBO J.* 6, 1981-1987 (1987).

30

29. Warburton, D., Gersen, S., Yu, M-T., Jackson, C., Handelin, B. and Housman, D. (1990). Monochromosomal rodent-human hybrids from microcell fusion of human lymphoblastoid cells containing an inserted dominant selectable marker. *Genomics* 6: 358-366.

30. Schoenmakers, H.F.P.M., Kools, P.F.J., Kazzierczak, B., Bullerdiek, J., Claussen, U., Horsthemke, B., Van den Berghe, H. and Van de Ven, W.J.M. (1993). Isolation of a somatic cell hybrid retaining the der(16) t(12;16)(q13;p11.2) from a myxoid liposarcoma cell line. *Cytogenet. Cell Genet.* 62: 159-161.

40

31. Rychlik, W. and Rhoads, R.E. (1989). A computer program for

【 0 1 3 1 】

choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 17: 8543-8551.

32. Verbeek, J.S., Roebroek, A.J.M., Van den Ouweland, A.M.W., Bloemers, H.P.J. and Van de Ven, W.J.M. (1985). Human *c-fms* proto-oncogene: comparative analysis with an abnormal allele. *Mol. Cell. Biol.* 5: 422-426

33. Montgomery, K.T., LeBlanc, J.M., Tsai, P., McNinch, J.S., Ward, D.C., De Jong, P.J., Kucherlapati, R., and Krauter, K.S. (1993). Characterization of two chromosome 12 cosmid libraries and development STSs from cosmids mapped by FISH. *Genomics* 17: 682-693

34. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

35. Dal Cin, P., Kools, P., Scot, R., De Wever, I., Van Damme, B., Van de Ven, W. and Van den Berghe, H. (1993b). Molecular cytogenetic characterization of ring chromosomes in adipose tissue tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 68, 85-90.

36. Kievits, T., Dauwerse, J.G., Wiegant, J., Devilee, P., Breuning, M.H. Cornelisse, C.J. and van Ommen, G., Pearson, P.L. (1990). Rapid subchromosomal localization of cosmids by nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 53: 134-136.

37. Albertsen, H.M., Abderrahim, H., Cann, H.M., Dausset, J., L Paslier, D., and Cohen, D. (1990). Construction and characterization of a yeast artificial chromosome library containing seven haploid human genome equivalents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4256-4260.

38. Chumakov, I., Rigault, P., Guillou, S., Ougen, P., Billaut, A., Guasconi, G., Gervy, P., LeGall, I., Soularue, P., Grinas, L., Bougueleret, L., BellanneChantelot, C., Lacroix, B., Barillot, E.,

[0 1 3 2]

10

20

30

40

Gesnouin, P., Pook, S., Vaysseix, G., Frelat, G., Schmitz, A., Sambucy, J.L., Bosch, A., Estivill, X., Weissenbach, J., Vignal, A., Riethman, H., Cox, D., Patterson, D., Gardiner, K., Hattori, M., Sakaki, Y., Ichikawa, H., Ohki, M., L Paslier, D., Heilig, R., Antonarakis, S., and Cohen, D. (1992). Continuum of overlapping clones spanning the entire human chromosome 21q. *Nature* 359: 380-387.

10

39. Schoenmakers, H.F.P.M., Kools, P.F.J., Mols, R., Kazmierczak, B., Bartnitzke, S., Bullerdiek, J., Dal Cin, P., De Jong, P.J., Van den Berghe, H. and Van de Ven, W.J.M. (1994a). Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myxoid liposarcoma. *Genomics* 20:210-222.

40. Chu, G., Vollrath, D. and Davis, R.W. (1986) Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234: 1582-1585.

20

41. Geurts, J., Schoenmakers H.F.P.M., Mols, R., and Van de Ven, W.J.M. (1994). Improved procedure for rapid isolation and sequencing of DNA insert termini in yeast artificial chromosomes. *Meth. Mol. Cell. Biol.*, 4: 257-265.

42. Kools, P.F.J., Wanschura, S., Schoenmakers, H.F.P.M., Geurts, J.W.M., Mols, R., Kazmierczak, B., Bullerdiek, J., Van den Berghe, H. and Van de Ven, W.J.M. (1995). Identification of the chromosome 12 translocation breakpoint region of a pleomorphic salivary gland adenoma with t(1;12)(p22;q15) as the sole cytogenetic abnormality. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 79: 1-7. (Enclosed as "ANNEX 2")

30

43. Kazmierczak, B., Wanschura, S., Rosigkalt, J., MeyerBolte, K., Uschinsky, K., Haupt, R., Schoenmakers, H.F.P.M., Bartnitzke, S., Van de Ven, W.J.M. and Bullerdiek, J. (1995). Molecular characterization of 12q14-15 rearrangements in three pulmonary chondroid hamartomas. *Cancer* [0 1 3 3]

40

Res.in press.

44. Kucherlapati, R., Craig, I., and Marynen, P. (1994). Report of the second international workshop on human chromosome 12 mapping 1994. *Cytogenet. Cell Genet.* 67: 246-276
45. Gyapay, G., Morissette, J., Vignal, A., Dib, C., Fizames, C., Millasseau, P., Marc, S., Bernardi, G., Lathrop, M. and Weissenbach, J. (1994). The 1993-94 Genethon human genetic linkage map. *Nature Genetics* 7: 246-339. 10
46. Ulinowski, Z., Taylor, K., Griffin, D., Delhanty, J. and Wolfe, J. (1991). D12S56: a highly polymorphic locus on human chromosome 12q14. *Ann. Hum. Genet.* 55: 279-282.
47. Trent, J.M., Olson, S. and Lawn, R.M. (1982) Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 7809-7813. 20
48. Pizon, V., Lerosey, I., Chardin, P. and Tavitian, A. (1988). Nucleotide sequence of a human cDNA encoding a ras-related protein (rap1B). *Nucleic Acids Res.* 16: 7719.
49. Adams, M.D., Dubnick, M., Kerlavage, A.R., Moreno, R., Kelley, J.M., Utterback, T.R., Nagle, J.W., Fields, C., and Venter, J.C. (1992). Sequence identification of 2,375 human brain genes. *Nature* 355:632-634. 30
50. Cohen, D., Chumakov, I., and Weissenbach, J. (1993). A first-generation physical map of the human genome. *Nature* 366: 698-701.
51. Larsen, F., Gundersen, G., and Prydz, H. (1992a). Choice of enzymes for mapping based on CpG islands in the human genome. *GATA* 9: 80-85. 40
52. Larsen, F., Gundersen, G., Lopez, R., and Prydz, H. (1992b). CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* 13: 1095-1107.
53. Lavia, P., MacLeod, D., and Bird, A. (1987). Coincident start sites
- 【 0 1 3 4 】

for divergent transcripts at randomly selected CPG-rich island of mouse.

EMBO J. 6: 2773-2779.

54. Kazzierczak, B., Bartnitzke, S., Hartl, M. & Bullerdiek, J. In vitro transformation by the SV40 "early region" of cells from a human benign salivary gland tumor with a 12q13-q15 rearrangement. Cytogenet. Cell Genet. 53, 37-39 (1990).

55. Albertsen, H.M., Adderrahim, H., Cann, H.M., Dausset, J., Le Paslier, D. & Cohen, D. Construction and characterization of a yeast artificial chromosome library containing seven haploid human genome equivalents. Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 4256-4260 (1990).

56. Chumakov, I. et al. Continuum of overlapping clones spanning the entire human chromosome 21q. Nature 359, 380-387 (1992).

57. Green, E.D. & Olson, M.V. Systematic screening of yeast artificial-chromosome libraries using the polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 1213-1217 (1990).

58. Montgomery, K.T. et al. Characterization of two chromosome 12 cosmidlibraries and development of STSs from cosmids mapped by FISH. Genomics 17, 682-693 (1993).

59. Geurts, J.M.W., Schoenmakers E.F.P.M., Mols, R. & Van de Ven, W.J.M. Improved procedure for rapid isolation and sequencing of DNA insert termini in yeast artificial chromosomes. Meth. Mol. Cell. Biol. 4, 257-265 (1994).

60. Nelson, D.L. et al. Alu polymerase chain reaction: A method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources. Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 6686-6690 (1989).

61. Rychlik, W. & Rhoads, R.E. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. Nucl. Acids Res. 17, 8543-8551 (1989).

[0 1 3 5]

10

20

30

40

62. Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13 (1984).

63. Smith, M.W., Holmsen, A.L., Wei, Y.H., Peterson, M. & Evans, G.A. Genomic sequence sampling: a strategy for high resolution sequence-based physical mapping of complex genomes. *Nature Genetics* 7, 40-47 (1994). 10

64. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410 (1990).

65. Patel, U.A. et al. Expression and cDNA cloning of human HMGI-C phosphoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, 63-70 (1994).

66. Bustin, M., Lehn, D.A. & Landsman, D. Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1049, 231-243 (1990). 20

67. Manfioletti, G. et al. cDNA cloning of the HMGI-C phosphoprotein, a nuclear protein associated with neoplastic and undifferentiated phenotypes. *Nucl. Acids Res.* 19, 6793-6797 (1991).

68. Wagner, M.J., Ge, Y., Siciliano, M. & Wells, D.E. A hybrid cell mapping panel for regional localization of probes to human chromosome 8. *Genomics* 10, 114-125 (1991). 30

69. Friedman, M., Holth, L.T., Zoghbi, H.Y. & Reeves, R. Organization, inducible-expression and chromosome localization of the human HMG-I(Y) nonhistone protein gene. *Nucl. Acids Res.* 21, 4259-4267 (1993).

70. Rabbitts, T.H. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 372, 143-149 (1994). 40

71. Yang-Yen, H.F. & Rothblum, L.I. Purification and characterization of a high-mobility-group-like DNA-binding protein that stimulates rRNA synthesis in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3406-3414 (1988).

【 0 1 3 6 】

72. Reeves, R., Langan, T.A. & Nissen, M.S. Phosphorylation of the DNA-binding domain of nonhistone high-mobility group I protein by cdc2 kinase: reduction of binding affinity. Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 88,1671-1675 (1991) .

73. Thanos, D. & Maniatis, T. The high mobility group protein HMGI(Y) is required for NF- κ B-dependent virus induction of the human IFN- β gene. Cell 71, 777-789 (1992). 10

74. Du, W. & Maniatis, T. The high mobility group protein HMGI(Y) can stimulate or inhibit DNA binding of distinct transcriptional factor ATF-2 isoforms. Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 11318-11322 (1994).

75. Aizawa, S., Nishino, H., Saito, K., Kimura, K., Shirakawa, H. & Yoshida, M. Stimulation of transcription in cultured cells by high mobility group protein 1: Essential role of the acidic carboxyterminal region. Biochemistry 33, 14690-14695 (1994). 20

76. Mitelman F (1994): Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer. 4th ed., New York, Wiley- Liss.

77. Miles, J.H., Zonanna, J., Mcfarlane, J.I, Aleck, K.A. & Bawle, E. Macrocephaly with hamartomas:Bannayan-Zonana syndrome. Am. J. Med. Genet.19, 225-234 (1984). 30

78. Crawford, A.W., Pino, J.D. & Beckerie, M.C.J. Cell. Biol., 124, 117-127 (1994)

79. Schmeichel, K.L. & Beckerie, M.C. Cell. 79, 211-219 (1994)

80. Sanchez-Garcia, I. & Rabbitts, T. (1994) The LIM domain: a new structural motif found in zinc-fingerlike proteins. Trends in Genetics 10(9), 315-320. 40

81. Compton, J. (1991). Nucleic acid sequence-based amplification. Nature 350, 91-92.
【 0 1 3 7 】

付属文書 1

Genes, Chromosome & Cancer 12:296-303 (1995)

Molecular Characteriation of MAR, a Mutiple Aberration Region on Human
Chromosome Segment 12q15 Implicated in Various Solid TumorsWim J.M. Van de Ven, Eric F.P.M. Schoenmakers, Sylke Wanschura, Bernd
Kazmierczak, Patric F.J. Kools, Jan M.W. Geurts, Sabine Bartnitzke,
Herman Van den Berghe, and Jörn Bullerdiekベルギー国、ルーベン大学、ヒト遺伝学センター(W. J. M. V. D. V., E. F. P. M. S., P. F.
J. K., J. W. M. G., H. V. D. B.)

ドイツ連邦共和国、ブレーメン大学、ヒト遺伝学センター(S. W., B. K., S. B., J. B.)

1994年9月27日受付、1994年11月7日受理。別刷請求宛先：ベルギ
ー国、B-3000ルーベン、ヘレストラート49、ルーベン大学、ヒト遺伝学
センター、Wim J.M. van de Ven博士

【0138】

原発性多形態性唾液腺腫から由来した7種の細胞系における染色体腕12qの切断点を、9種のDNAプローブに関してFISH分析によりマッピングした。これらのプローブは、すべて染色体断片12q13-q15の2.8MbゲノムDNA領域に存在し、以前に発表された配列標識部位(STS)に対応する。それらの相対的位置は、YACクロニング並びに長距離物理的及びSTS含量マッピングにより確認した。5種の細胞系の12q切断点は、最近STS RM33及びRM98間の12番染色体子宮平滑筋腫クラスター領域の切断点と定義された445kb DNA区間の3個の異なる亜領域内にマッピングされていることがわかった。7種の切断点は、すべてSTS RM36およびRM103間の1.7Mb DNA区間に位置しているようであった。さらに、3種の原発性多形態性唾液腺腫の12番染色体切断点もRM36及びRM103間にマッピングされることがわかった。最後に、12q13-q15異常をもつ2種の脂肪腫細胞系のFISH分析が、これらの切断点について、2種の原発性脂肪腫のものと同様にRM36とRM103間に位置すると見られる比較的小さな隣接DNA断片を鋭く指向していた。我々は、3種の明確な充実性腫瘍の12q切断点のクラスター観察から、RM36とRM103間の12番染色体長腕1.7Mb DNA領域が、我々がMARと名付ける多重異常領域であると結論する。

【0139】

Genes Chromosom. Cancer 12:296-303 (1995). ©1995 Wiley-Liss, Inc.

【0140】

緒論

12番染色体のq13-q15領域が関係する染色体転座は、広範囲の充実性腫瘍で観察されている(ミテルマン、1991年)。細胞遺伝学的に異常な子宮平滑筋腫(ニルバートおよびハイム、1990年;パンディスら、1991年)、多形態性唾液腺腫(サンドロスら、1990年;ブラーディーから1993年)及び良性脂肪組織腫(スリーカンティアら、1993年)のサブグループにおいて、12q13-q15の異常はしばしば観察されている。最近の研究(シェーンメーカーズら、1994年b)において、我々は

、12番染色体切断点の子宮平滑筋腫クラスター領域であるULCR12を同定し、分子として確認した。本研究では、我々はまたは小唾液腺由来の良性上皮腫である多形態性唾液腺腫における染色体12q切断点に焦点を合わせる。これは最も一般的な型の唾液腺腫であり、この器官の全新生物中のほぼ50%を説明する。腫瘍の約85%は耳下腺に見られ、10%は小唾液腺に、5%は顎下腺に見られる(ザイフェルトら、1986年)。これら腺腫の多数は正常な核型をもつようであるが、細胞遺伝学的研究は、頻発性の特異的染色体異常を明らかにした(サンドロスら、1990年;ブーディーラら、1993年)。8番染色体の異常に加えて、しばしば、12番染色体の異常である $t(3;8)(p21;q12)$ を最も一般的な異常として伴う、8q12における切断点での転座も頻繁であり、転座は通常12q13-q15が関係する。非頻発性のクローン性異常も報告されている。明確な充実性腫瘍タイプにおける頻繁な12q13-q15領域の関与は、この染色体領域が、これらの腫瘍の発生と関係を持つ可能性がある遺伝子(類)を宿していることを示唆する。したがって、これらの腫瘍における12番染色体の切断点の分子クローニング及び接合フラグメントの確認は、このような遺伝子(類)の同定に通ずる。

【0141】

我々は、先に、蛍光系内ハイブリダイゼーション(FISH)データに基づいて、原発性多形態性唾液腺腫由来の幾つかの細胞系における12番染色体切断点(カズミールチャックら、1990年;シェンメーカーズら、1994年a)が、12番染色体長腕上でD12S19及びD12S8座間の区間に位置することを報告した(シェンメーカーズら、1994年a)。このDNA区間は、約7cMであると推定されている(キーツら、1989年;クレイグら、1993年)。これらの腫瘍細胞の12番染色体切断点を含む区間は、さらに、すべての切断点が粘液脂肪肉腫に特徴的な $t(12;16)$ 転座により直接影響され(アマンら、1992年;クロザットら、1993年;ラビッツら、1993年)、D12S19及びD12S8間に位置する、CHOP遺伝子から遠位に位置することが示されることにより狭められた。さらに最近の研究(クールスら、1995年)によると、多形態性唾液腺腫細胞系Ad-312/SV40の12番染色体切断点は、165kbより小さい大きさの配列標識部位(STS)RM110及びRM111間のDNA領域を鋭く指向する。その他の多形態性唾液腺腫細胞系の12番染色体切断点のFISHによる評価は、それらがAd-312/SV40に近位に800kbより大きな距離で位置すべきことを示した(クールスら、1995年)。これらの結果は、12番染色体切断点が12番染色体長腕上の比較的大きなゲノム領域に亘り分散する可能性を指向するものであった。

ここでは、我々は、原発性腫瘍から得た多形態性唾液腺腫細胞及び樹立腫瘍細胞系における12番染色体切断点の物理的マッピングを報告する。細胞に見られた核型の異常はすべて異なるが、常に12番染色体のq13-q15領域に関係する。我々は、6Mb DNA領域の長距離物理的マップにおける配列標識部位(STS)に対応し、染色体歩行実験で得られたD12S8とCHOP間のDNAプローブを使用して、FISH実験を実施し、多形態性唾液腺腫の大きな12番染色体切断点クラスター領域をさらに精細に定義した。この切断点クラスター領域は、ULCR12と重なるようであった。さらに、我々は、脂肪腫の12q13-q15切断点もまた多形態性唾液腺腫及び子宮平滑筋腫のものと同じ領域内に位置するか否かについて試験した。

【0142】

材料及び方法

原発性充実性腫瘍及び誘導細胞系

多形態性唾液腺腫、脂肪腫及び子宮平滑筋腫を含む原発性充実性腫瘍は、ベルギー国ルーベン(I.ド・ウイパー博士);ドイツ連邦共和国ブレーメン(R.チリ博士);ドイツ連邦共和国クレフェルト(J.ハウプリッヒ博士)の大学診療所;及びスウェーデン国ゲーテボルクの病理学研究所(G.ステンマン博士)から入手した。細胞培養およびその後のFISH分析のために、腫瘍細胞を微細にみじん切りし、0.8%コラーゲナーゼ(ベーリンガーマンハイムFRG)で4-6時間処理し、常法によりFISH分析用操作を

10

20

30

40

50

行った。

この研究に用いたヒト腫瘍細胞系は、既報の多形態性唾液腺腫細胞系 Ad - 211 / SV40、Ad - 248 / SV40、Ad - 263 / SV40、Ad - 295 / SV40、Ad - 302 / SV40、Ad - 366 / SV40、及び Ad - 386 / SV40 (カズミールチャックら、1990年；シェーンメーカーズら、1994年 a) 並びに最近開発された Li - 14 / SV40 を含んでいた。これらの細胞に見られた12番染色体異常は表1に記載する。細胞は20%ウシ胎児血清を補充したアール塩含有TC199培地中で増殖させた。

【0143】

表1. 原発性ヒト充実性腫瘍及び細胞系における12番染色体の異常*

10

異常		
細胞系		
Ad-211/SV40	t(8;12)(q21;q13-q15)	
Ad-248/SV40	ins(12;6)(q15;q16q21)	
Ad-263/SV40	inv(12)(q15q24.1)	
Ad-295/SV40	t(8;12;18)(p12;q14;p11.2)	
Ad-302/SV40	t(7;12)(q31;q14)	
Ad-366/SV40	inv(12)(p13q15)	
Ad-386/SV40	t(12;14)(q13-q15;q13-q15)	20
Li-14/SV40	t(3;12)(q28;q13)	
Li-538/SV40	t(3;12)(q27;q14)	
LM-5.1/SV40	t(12;15)(q15;q24)	
LM-30.1/SV40	t(12;14)(q15;q24)	
LM-65/SV40	t(12;14)(q15;q24)	
LM-67/SV40	t(12;14)(q13-q15;q24)	
LM-100/SV40	t(12;14)(q15;q24)	
LM-605/SV40	ins(12;11)(q14;q21qter)	
LM-608/SV40	t(12;14)(q15;q24)	
LM-609/SV40	t(12;14)(q15;q24)	30
原発性腫瘍		
Ad-386	t(12;14)(q15;q11.2)	
Ad-396	t(3;12)	
Ad-400	t(12;16)	
Li-166	t(12;12)	
Li-167	t(3;12)(q28;q14-q15)	
LM-163.1	t(12;14)(q14;q24)	
LM-163.2	t(12;14)(q14-q24)	40
LM-168.3	t(X;12)(q22;q15)	
LM-192	t(2;3;12)(q35;p21;q14)	
LM-196.4	t(12;14)(q14;q24)	

*Ad : 多形態性唾液腺腫 ; Li : 脂肪腫 ; 子宮平滑筋腫

【0144】

DNAプローブ

我々は、12番染色体の長腕に焦点を合わせたヒトゲノムプロジェクトに関連して、12番染色体特異配列コスミドライブラリーLINL12NC01 (モンゴメリーら、19

50

93年)からコスミドクローン cRM33、cRM36、cRM51、cRM69、cRM72、cRM76、cRM98、cRM103、及びcRM133を分離した。これらのコスミドの詳細は、第2回国際12番染色体ワークショップ(1994年)で発表し、他の文献に記載する(クチャラパチら、1994年)。概略を述べると、先に報告したように(シェンメーカーズら、1994年b)、最初のスクリーニングはPCRベースのスクリーニング法(グリーン及びオルソン、1990年)を用いて実施し、その後最終スクリーニング段階としてフィルターハイブリダイゼーション分析を行った。コスミドクローンはYACクローン由来のSTS類を用いて分離した。STS類は、ベクトレットPCRを含む方法を用いてYAC挿入物末端の回収後PCR産物の直接固相蛍光配列決定法(ゲーツら、1994年)またはAlu間PCR(ネルソンら、1989年)を行って得た。コスミドクローンは標準的方法(サムブルックら、1989年)により増殖させ処理した。

12番染色体の長腕テロメア領域に向かって位置するコスミドクローン cPK12qter(クールズら、1995年)を参照マーカーに使用した。

【0145】

染色体調製及び蛍光系内ハイブリダイゼーション

多形態性唾液腺腫細胞系または正常ヒトリンパ球中期塗抹を、先に報告したように調製した(シェンメーカーズら、1993年)。FISH実験における染色体の同一性を間違いなく確認するため、同じ中期塗抹のGTGバンド形成後にFISH分析を行った。GTGバンド形成は、基本的にシュミットら(1990年)が報告したように実施した。系内ハイブリダイゼーションは、キービッツら(1990年)が報告したプロトコルに従い若干の修正を施して(クールズら、1994年;シェンメーカーら、1994年b)行った。コスミド及びYACのDNAは、先に報告したように(シェンメーカーズら、1994年b)ピオチン-11-dUTP(ベーリンガーマンハイム)またはピオチン-14-ATP(BRL)で標識した。検体は、FITCフィルター(ツァイス)を用いてツァイスアクシオフォト蛍光顕微鏡で分析した。結果は、スコッチ(3M)のASA640フィルムに記録した。

【0146】

結果

多形態性唾液腺腫細胞系における12q切断点のFISHマッピング

我々は、先の研究(シェンメーカーら、1994年a)において、若干の唾液腺の多形態性アデノームにおける幾つかの12番染色体切断点を種々のDNAマーカーに関してマッピングし、これらがすべてD12S8座の近位でCHOP遺伝子から遠位に位置することを確認した。この領域は、連結座D12S8及びD12S19に包まれる7cMより若干小さい領域である(キーツら、1989年)。YACクローニングを使用し、最近報告されたようにして(クチャラパチら、1994年)、この7cM領域の大部分を覆う長距離物理的/STS地図を作図した。さらに、多数のゲノムクローン(コスミドクローン)を分離し、この地図内におけるその相対的位置を確認した(クチャラパチら、1994年)。これらのコスミド中、cRM33、cRM36、cRM51、cRM69、cRM72、cRM76、cRM98、cRM103、及びcRM133を含めた9種をFISH研究に使用して、唾液腺の多形態性腺腫に由来する7種の細胞系(表1)における12番染色体切断点の位置を確認した。約2.8Mbの12番染色体長腕上ゲノム領域を覆うこれら9種のコスミドクローンの相対的マッピング順位を図1に示し、種々のコスミドプローブによるFISH実験結果を同図に概略的に示す。実例として、cRM76及びcRM103をプローブとして使用しAd-195/SV40細胞系の中期細胞で得られたFISH結果を図2に示す。染色体の同定については、FISH前GTGバンド形成を常に使用したことに注意すべきである。このようなバンド形成に基づき、ハイブリダイゼーションシグナルが既知の存在としての染色体のものとして決定的に帰属決定された。交差及び背景ハイブリダイゼーションシグナルがしばしば観察されるので、これらがある場合このことは大きな重要性をもつ。ハイブリダイゼーションシグナルが弱いかまたは不明

確なバンド形成のために、G T G バンド形成と F I S H 分析の組み合わせが決定的でない結果をもたらした場合、参照プローブとしてコスミドクローン c P K 1 2 q t e r (クールズら、1995年)を用いて F I S H 分析を実施した。

【0147】

c R M 1 0 3 を用いて行った 7 種の多形態性唾液腺腫細胞系のそれぞれに関する中期染色体の F I S H 分析は、このコスミドが、ここで実験した 7 種の細胞系すべての 1 2 番染色体切断点の遠位に位置することを示した。また、7 種の細胞系中 6 種の中期染色体は、プローブ c R M 6 9 で試験し、2 つの場合については c R M 5 1 で試験した。後者の実験の結果はすべて c R M 1 0 3 で得た結果と矛盾しなかった。プローブとして c R M 3 6 を用いて行った同様な F I S H 分析は、このプローブがすべての切断点の近位に位置することを示した。これらの結果はすべて、c R M 7 2 を用いた実験における 7 種の細胞系中 5 種について得た結果と矛盾しなかった。全体として、我々の F I S H 実験の結果は、7 種の細胞系すべてにおける 1 2 番染色体切断点が、約 1 . 7 M b のゲノム領域に広がる c R M 3 6 及び c R M 1 0 3 間に位置することを示した。

【0148】

唾液腺の多形態性アデノーム由来細胞系における 1 2 q 切断点の精細マッピング

7 種の多形態性唾液腺腫細胞系における 1 2 番染色体切断点の精細マッピングのため、図 1 に概略を示すように別の F I S H 実験を行った。細胞系 A d - 2 1 1 / S V 4 0、A d - 2 9 5 / S V 4 0、及び A d - 3 6 6 / S V 4 0 の切断点は、約 7 5 k b と推定される c R M 7 6 及び c R M 1 3 3 間の D N A 領域に位置すると思われた。他の 4 種の細胞系の切断点は、c R M 3 6 及び c R M 1 0 3 間の別の 1 . 7 M b 域に見つかった。A d - 2 4 8 / S V 4 0 細胞系のものは c R M 3 3 及び c R M 7 6 間の約 2 7 0 k b 断片に、A d - 2 6 3 / S V 4 0 細胞系のものは c R M 9 8 及び c R M 1 0 3 間の約 1 M b 断片に、A d - 3 0 2 / S V 4 0 細胞系のものは c R M 3 3 及び c R M 3 6 間の約 2 4 0 k b 断片に、A d - 3 8 6 / S V 4 0 細胞系のものは c R M 9 8 及び c R M 1 3 3 間の約 1 0 0 k b 断片にあった。結論として、これらの結果は、殆ど (7 種中 5 種) の細胞系の 1 2 番染色体切断点が、c R M 3 3 及び c R M 9 8 間の 1 2 番染色体長腕上の 4 4 5 k b ゲノム領域に亘って分散していることを示した。ここで、正確にこの領域が最近原発性子宮平滑筋腫由来細胞系における染色体 1 2 q 切断点を含むことが示され (図 3 参照)、したがって U L C R 1 2 と命名されたこと (シェーンメーカーズら、1994年 b) に注意することが重要である。この 1 2 番染色体長腕断片は少なくとも 2 種の型の充実性腫瘍に関係し (シェーンメーカーズら、1994年 b ; 本研究)、また、下に示すように、第 3 の充実性腫瘍型に関係しているため、我々は、以下 c R M 3 6 及び c R M 1 0 3 間の D N A 区間を M A R (多重異常領域) と称する。

【0149】

原発性多形態性唾液腺腫における 1 2 q 切断点の F I S H マッピング

以上に提示した唾液腺の多形態性腺腫中期染色体に関する我々の F I S H 研究は、原発性腫瘍由来の細胞系に限定されていた。細胞系における 1 2 番染色体切断点が、対応する原発性腫瘍のものと、たとえ同一でないとしても類似はしていると仮定することが合理的ではあるが、細胞系の樹立またはその後の培養の結果相違が出ることは完全には除外できない。したがって、我々は、3 種の原発性唾液腺腫における 1 2 番染色体切断点も M A R にマッピングされるか否かについて研究した。この可能性を試験するため、分子プローブとしてコスミドクローン c R M 3 3 及び c R M 1 0 3 の組み合わせを使用した。3 つの場合すべてにおいて、このコスミドプールは 1 2 番染色体切断点に広がったが (データは記載せず)、これはこれらの切断点を実際に M A R に局在することを示す。最近の研究 (バンシュラら、投稿中) において、1 2 q 1 4 - 1 5 異常をもつ 5 種の原発性子宮平滑筋腫の 1 2 番染色体切断点が、すべて原発性子宮平滑筋腫由来の種々の細胞系の切断点を含むことが知られている 1 . 5 M b D N A 断片内のクラスターに見出されることが報告された (図 3 に概略を示す)。細胞系を使用した切断点マッピング研究の結果と一致して、2 種の原発性充実性腫瘍型で得た結果から、原発性腫瘍細胞の切断点が M A R に位置すること

10

20

30

40

50

が確認された。

【0150】

脂肪腫染色体断片 12q13 - q15 切断点の M A R 内マッピング

12q13 - q15 異常をもつ他の充実性腫瘍の 12 番染色体切断点もまた M A R 内に位置する可能性を試験するため、我々は、2 種の脂肪腫細胞系 - - - L i - 14 / S V 40 および L i 538 / S V 40 について F I S H 分析により実験した。これら 2 種の 12 番染色体異常を表 1 に示す。分子プローブとして、コスミドクローン c R M 33、c R M 53、c R M 72、c R M 76、c R M 99、c R M 103、及び c R M 133 を使用した。図 3 に略図を示すように、L i - 14 / S V 40 の切断点は、R M 76 及び R M 133 間の 75 k b D N A 区間にマッピングされ、L i 538 / S V 40 のそれは、R M 76 及び R M 99 間の 90 k b p 区間にマッピングされた（データは記載せず）。分子プローブとして c R M 36 及び c R M 103 を用いて行った 2 種の原発性脂肪腫の F I S H 分析は、ハイブリダイゼーションパターンをもたらしたが、これはプローブ混合物が切断点の両側の配列を検出したことを示す。これらの結果は、脂肪腫においても、M A R 内に位置する染色体 12q13 - q15 切断点が存在することの最初の徴候である。この観察に関する適当な説明を可能にするためには、さらに脂肪腫の事例について試験する必要がある。

10

【0151】

検討

我々は、この研究において、3 種の原発性多形態性唾液腺腫及びこの腫瘍から由来した 7 種の樹立細胞系における 12 番染色体の切断点をマッピングした。すべての切断点は、先に分子クローニングし確認された、約 1.7 M b の大きさの、12 番染色体の長腕上の染色体 D N A 断片内に位置するようであり、そのうち 5 種は、500 k b 未満の D N A 区間に密集していた。1.7 M b D N A 領域は、明らかにこの型の腫瘍の大きな切断点クラスター領域を含んでいた。我々は、先の研究において、多形態性唾液腺腫細胞系 A d - 312 / S V 40 における 12 番染色体切断点の確認を報告した（クールズら、1995 年）。この細胞系の切断点は、現在ここに報告された大きな切断点クラスターから遠位に 2 M b より大きな距離に位置することが知られている。A d - 312 / S V 40 切断点が、群がった切断点の影響を受けたもの以外の病的に関係がある遺伝子配列を含む可能性がある。しかし、B 細胞悪性腫瘍における 11q13 切断点が想起されるように（レイノードら、1993 年）、今までマッピングされた多形態性唾液腺腫における 12q13 - q15 切断点のすべてが同じカテゴリーに属し、この染色体の比較的大きな D N A 領域に亘って分散する可能性もまだ排除されるべきでない。種々の切断点に関するさらに精細な指摘により、これに対してさらに光を注ぐことができるであろう。

20

30

【0152】

多形態性唾液腺腫の群がった 12q 切断点を含む D N A 断片が、最近 U L C R 12 として知られる（シェンメーカーズら、1994 年 b）12 番染色体切断点の子宮平滑筋種クラスター領域として定義された D N A 領域と一致するとの観察結果は重要である。この 12 番染色体領域が、原発性脂肪腫及び 12q13 - q15 異常をもつ原発性腫瘍に由来する脂肪腫細胞系の切断点をも含むことにはさらに興味がある。全体として、すべてのこれらの研究の結果は、ここに、3 種の明確な充実性腫瘍型における 12 番染色体切断点と同じ 12 番染色体長腕上の 1.7 M b ゲノム領域に位置することを明らかに示すが、これは、この領域が多重異常領域であることを確認するものである。この特徴を反映するため、我々は、この D N A 断片を M A R と命名した。

40

【0153】

染色体領域 12q13 - 15 が関係する遺伝子異常は、既述の 3 種以外の種々の充実性腫瘍における細胞遺伝学的研究に関係がある。12q13 - q15 の関係は、子宮内膜ポリープ（ウォルターら、1989 年；パニら、1993 年）、再発性 t (12; 22) (q13; q13) を特徴とする明細胞肉腫（フレッチャー、1992 年；リーブスら、1992 年；ロドリゲスら、1992 年）、横紋筋肉腫亜群（ロバーツら、1992 年）お

50

よび血管外皮腫（マンダールら、1993年b）軟骨腫様腫瘍（マンダールら、1989年；ブリッジら、1992年；ヒラバヤシら、1992年；マンダールら、1993年b）、及び肺過誤腫（ダル・チンら、1993年）についても報告された。最後に、染色体領域12q13-q15が関与する充実性腫瘍の若干の事例の報告が発表された - - 例え、乳腫瘍（パードサルら、1992年；ローエンら、1993年）、散在性星状細胞腫（ジェンキンスら、1989年）、及び骨巨細胞腫（ノゲラら、1989年）。細胞遺伝学的研究の結果に基づいても、これらの腫瘍型の相対的切断点分布に関して全く予言はできない。本研究の結果に照らすと、これらの充実性腫瘍の何れかにおける切断点がMAR内または近傍に位置するか否かを知ることには興味があるであろう。入手できる種々のコスミドクローンが今これを容易に試験する手段を提供する。

10

【0154】

少なくとも3種の異なる型の充実性腫瘍における12q切断点と同じDNA領域に位置するという観察結果は、それが、MAR内の同じ遺伝子配列が種々の組織における腫瘍の発生に病的に關係する可能性を指向し得るため、興味をそそられる。もしそうならば、遺伝子異常を含む遺伝子（類）は成長の調節に關係するかも知れないということを考えることができる。他方、観察されたMAR内遺伝子異常の群がりには、単に、種々の充実性腫瘍で明らかになるこの領域内の遺伝子の不安定性を反映しているという理由から、MARの遺伝子配列が病的に關係しない可能性もまだ除外することができない。これに対するより多くの洞察を得るためには、MAR内に存在する遺伝子を同定確認することが必要であり、これは若干の技術を用いた種々の方法で達成することができる（パリッシュ及びネルソン、1993年）。

20

【0155】

謝辞

常務取締役G・エベラーツの組織上の支持に感謝する。著者は、本報で研究した充実性腫瘍の検体提供について、P・ダル・チン、J・ハウブリッヒ、R・ヒル、G・ステンマン及びI・ド・ウエーバーに対し；優れた技術的補助につきC・ハイスマンズ、E・マイアン、K・マイアールポルト、R・モルス及びM・ウイレムスに対し；図版につきM・レイスに対し感謝する。本研究は、ドイツ・フォルシュングスミッテルシャフト及びテンイエス・ファクト・スティフトウングのバイオメド1プログラム「モレキュラー・サイトジェネティクス・オブ・ソリッド・テュマー」、「ヘコンセルテルデ・オンデルゼカクティース1992-1996」、ザ・ナショナル・ファンド・フォー・サイエンティフィック・リサーチ（NFWO；コム・オブ・テーヘン・カンカー）、「ALSK-プログラマ・フォル・カンケロンデルゼク」、「シュベルブントプログラム：モレクラーレ・ウント・クラシッシェ・テュモルチトゲンエティク」を通してECにより一部支援された。本書は、ベルジアン・ステート、プライム・ミニスターズ・オフィス、サイエンス・ポリシー・プログラミングにより提出されたベルジアン・プログラム・オン・インターユニバーシティ・ポールズ・オブ・アトラクションの結果を提示するものである。科学的信頼性は著者が責任を負う。J・W・M・ゲーツはザ・ナショナル・ファンド・フォー・サイエンティフィック・リサーチ（NFWO；コム・オブ・テーヘン・カンカー）の「アスピラント」である。

30

40

【0156】

文献

Aman P, Ron D, Mandahl N, Fioretos T, Heim S, Arheden K, Willed H, Rydholm A, Mitelman F (1992) Rearrangement of the transcription factor gene CHOP in myxoid liposarcomas with t(12;16)(q13;p11). *Genes Chromosom Cancer* 5:278-285.

Birdsal SH, MacLennan KA, Gustafson, BA (1992) t(6;12) (q23;q13) and t(10;16) (q22;p11) in a phyllodes tumor of the breast. *Cancer Genet Cytogenet* 60:74-77. 10

Bridge JA, Persons DL, Neff JR, Bhatia P (1992) Clonal karyotypic aberrations in enchondroma. *Cancer Detect Prev* 16:215-219.

Bullerdiek J, Wobst G, Meyer-Bolte K, Chilla R, Haubrich J, Thode B, Bartnitzke S (1993):Cytogenetic subtyping of 220 salivary gland pleomorphic adenomas:correlation to occurrence, histological subtype, and in vitro cellular behavior. *Cancer Genet Cytogenet* 65: 27-31. 20

Craig IW, Gedde-Dahl T, Gemmill R, Kucherlapati R (1993) Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 12. *Genome Prior Rep* 1:402-418.

Crozat A, Aman P, Mandahl N, Ron D (1993) Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma. *Nature* 363: 640-644.

Dal Cin P, Kooks P, De Jonge I, Moerman Ph, Van de Ven W, Van den Berghe H (1993) Rearrangement of 12q14-15 in pulmonary chondroid hamartoma. *Genes Chromosom Cancer* 8: 131-133. 30

Fletcher JA (1992)Translocation (12;22)(q13-14;q12) is a nonrandom aberration in soft-tissue clear-cell sarcoma. *Genes Chromosom Cancer* 5: 184.

【 0 1 5 7 】 40

Geurts JMW, Schoenmakers HFPM, Mols R, Van de Ven WJM (1994) An improved procedure to quickly isolate and sequence the termini of DNA inserts of yeast artificial chromosomes. *Meth Mol Cell Biol* 4: 257-265.

Green ED, Olson MV (1990) Systematic screening of yeast artificial-chromosome libraries using the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1213-1217.

Hirabayashi Y, Yoshida MA, Ikeuchi T, Ishida T, Kojima T, Higaki S, Machinami R, Tonomura A (1992) Chromosome rearrangements at 12q13 in two cases of chondrosarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 60: 35-40.

Jenkins RB, Kimmell DW, Moertel CA, Schulz CA, Menzies RM, Scheihauer B, Kelly PJ, Dewald GW (1989) Recurrent cytogenetic abnormalities in 80 gliomas. *Cytogenet Cell Genet* 51: 1019.

Kazmierczak B, Bartnitzke S, Hartl M, Bullerdiek J (1990) : In vitro transformation by the SV40 "early region" of cells from a human benign salivary gland tumour with a 12q13→q15 rearrangement. *Cytogenet Cell Genet* 53: 37-39.

Keats B, Ott J, Conneally M (1989) Report of the committee on linkage and gene order. *Cytogenet Cell Gene* 51: 459-502.

Kievits T, Dauwerse JG, Wiegant J, Devilee P, Breuning MH, Cornelisse CJ, van Ommen G, Pearson PL (1990) Rapid subchromosomal localization of cosmids by nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-136.

Kooks PFJ, Roebroek AJM, Van de Velde HJK, Marynen p, Bullerdiek J, Van de Ven WJM (1993): Regional mapping of the human NSP gene to chromosome 14q21-q22 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 66:48-50.

Kooks PFJ, Wanschura S, Schoenmakers HFPM, Geurts JWM, Mols R,

Kazmierczak B, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1995)

【 0 1 5 8 】

10

20

30

40

Identification of the chromosome 12 translocation breakpoint region of a pleomorphic salivary gland adenoma with t(1;12)(p22;q15) as the sole cytogenetic abnormality. *Cancer Genet Cytogenet*, In Press, 1955.

Kucherlapati R, Craig I, Marynen P (1994) Report of the second international workshop on human chromosome 12 mapping 1994. *Cytogenet Cell Genet* 67: 245-276.

Mandahl N, Heim S, Arheden K, Rydholm A, Willen H, Mitelman F (1989) Chromosomes rearrangements in chondromatous tumors. *Cancer* 65: 242-248.

Mandahl N, Orndal C, Heim S, Willen H, Rydholm A, Bauer HCF, Mitelman F (1993a) Aberrations of chromosome segment 12q13-15 characterize a subgroup of hemangiopericytomas. *Cancer* 71: 3009-3013.

Mandahl N, Willen H, Rydholm A, Mitelman F (1993b) Rearrangement of band q13 on both chromosomes 12 in a periosteal chondroma. *Genes Chrom Cancer* 6: 121-123.

Mitelman F (1991): *Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer*. 4th ed., New York. Alan R. Liss.

Montgomery KT, LeBlanc JM, Tsai P, McNinch JS, Ward DC, De Jong PJ, Kucherlapati R, Krauter KS (1993) Characterization of two chromosome 12 cosmid libraries and development of STSs from cosmids mapped by FISH. *Genomics* 17:682-693.

Nelson DL, Ledbetter SA, Corbo L, Victoria MF, Ramirez-Solis R, Webster TD, Ledbetter DH, Caskey CT (1989) Alu polymerase chain reaction: A method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6686-6690.

Nilbert M, Heim S (1990) Uterine leiomyoma cytogenetics. *Genes Chromosomes Cancer* 2:3-13.

Noguera R, Llombart-Bosch A, Lopez-Gines C, Cards C, Fernandez CI (1989) Giant-cell tumor of bone, stage II, displaying translocation

【 0 1 5 9 】

10

20

30

40

t(12;19)(q13;q13). Virchows Archly A Pathos Anat 415: 377-382.

Pandis N, Heim S, Bardi G, Flodérus U-M, Willén H, Mandahl N, Mitelman F (1991) Chromosome analysis of 96 uterine leiomyomas. Cancer Genet Cytogenet 55:11-18.

Parrish JE, Nelson DL (1993) Methods for finding genes a major rate-limiting step in positional cloning. GAT 10: 29-41.

Rabbitts TH, Forster A, Larson R, Nathan P (1993) Fusion of the dominant negative transcription regulator CHOP with a novel gene FUS by translocation t(12;16) in malignant liposarcoma. Nature Genet 4: 175-180.

Raynaud SD, Bekri S, Leroux D, Grosgeorge J, Klein B, Bastard C, Gaudray P, Simon MP (1993) Expanded range of 11q13 breakpoints with differing patterns of cyclic D1 expression in B-cell malignancies. Genes Chromosom Cancer 8: 80-87.

Reeves BR, Fletcher CDM, Gustarson BA (1992) Translocation t(12;22)(q13;q13) is a nonrandom rearrangement in clear cell sarcoma. Cancer Genet Cytogenet 64: 101-103.

Roberts P, Browne CF, Lewis IJ, Bailey CC, Spice RD, Williams J, Backup G (1992) 12q13 Abnormality in rhabdomyosarcoma. A nonrandom Occurrence? Cancer Genet Cytogenet 60: 135-140.

Rodriguez E, Sreekantaiah C, Reuter VE, Motzer RJ, Chaganti RSK (1992) t(12;22)(q13;q13) and trisomy 8 are nonrandom aberrations in clear-cell sarcoma. Cancer Genet Cytogenet 64: 107-110.

Rehem C, Bonk U, Staats B, Bartnizke S, Bullerdiek J (1993) Two human breast tumors with translocations involving 12q13-15 as the sole cytogenetic abnormality. Cancer Genet Cytogenet 69: 68-71.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring
[0 1 6 0]

10

20

30

40

Harbor, NY.

Sandros J, Stenman G, Mark J (1990): Cytogenetic and molecular observations in human and experimental salivary gland tumours. *Cancer Genet Cytogenet* 44: 153-167.

Schoenmakers HFPM, Kooks PFJ, Kazmierczak B, Bullerdiek J, Claussen U, Horsthemke B, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1993) Isolation of a somatic cell hybrid retaining the der(16)t(12;16) (q13;p11. 2) from a myxoid liposarcoma cell line. *Cell Genet Cytogenet* 62: 159-161.

10

Schoenmakers HFPM, Kools PFJ, Mols R, Kazmierczak B, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Dal Cin P, De Jong PJ, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1994a) Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myxoid liposarcoma. *Genomics* 20: 210-222.

20

Schoenmakers HFPM, Mols R, Wanschura S, Kooks PFJ, courts JMW, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1994b) Identification, molecular cloning and characterization of the chromosome 12 breakpoint cluster region of uterine leiomyomas. *Genes Chromosom Cancer* 11: 106-118.

Second International Chromosome 12 Workshop, New Haven, CT, USA, June 20-22, 1994.

30

Seifert G, Miehlike A, Haubrich J, China R (1986): Diseases of the salivary glands. Pathology. Diagnosis. Treatment. Facial nerve surgery. Translated by P.M. Stell. Thieme, Stuttgart, New York, pp 182-194.

Smit VTHBM, Weasels JW, Mollevanger P, Schrier PI, Raap AK, Beverstock GC, Cornelisse CJ (1990) Combined GTG-banding and nonradioactive in situ hybridization improves characterization of complex karyotypes. *Cytogenet Cell Genet* 54:20-23.

40

Sreekantaiah C, Lying SLP, Karakousis CP, McGee DL, Rappaport WD, Villar
【 0 1 6 1 】

HV, Neal D, Fleming S, Wankel A, Harrington PN, Carmona R, Sandburg AA

(1991) Cytogenetic profile of 109 lipomas. *Cancer Res* 51: 422-433.

Vanni R, Dal Cin P, Madras S, Moerman Ph, Andrea M, Valdes E, Deprest J,

and Van den Berghe H (1993) Endometrial polyp: Another benign tumor

characterized by 12q13-15 changes. *Cancer Genet Cytogenet* 68:32-33.

Walter TA, Xuan Fan S, Medchill MT, Bergen CS, Decker H-JH, Sandberg AA

(1989) Inv(12)(p11.2q13) in an endometrial polyp. *Cancer Genet Cytogenet*

41: 99-103.

Wanschura S, Belge G, Shenman G, Kools P, Dal Chin P., Schoenmakers E,

Huysmans C, Bartnizke S, Van de Ven W, and Bullerdiek J (submitted for

publication). Mapping of the translocation breakpoints of primary

pleomorphic adenomas and lipomas within a common region of chromosome

12.

【 0 1 6 2 】

付属文書 1 の図の説明

図 1 . この研究で試験した 7 種の多形態性唾液腺腫細胞系について得られた F I S H マッピングデータの略図。F I S H マッピング研究でプローブとして用いたコスミドクローンは、重複 Y A C クローンで得られた配列標識部位に位置する。これらは、枠内に示すように、S T S の頭文字にしたがって命名され、その相対的順位は図示のようである。R M 6 9 と R M 7 2 間の D N A 区間は約 2 . 8 M b と推定される。実線は、種々の細胞系の切断点が位置する D N A 区間を示す。点線は、分子プローブとして上記の S T S に対応するコスミドクローンをを用いて種々の細胞系の中期染色体に実施した F I S H 実験を示す。M A R 及び U L C R 1 2 の相対的位置は図の下部に示す。A d : 多形態性唾液腺腫、M A R : 多重異常領域、U L C R 1 2 : 1 2 番染色体切断点の子宮平滑筋腫クラスター領域。

【 0 1 6 3 】

図 2 . a : d e r (8) , d e r (1 2) , d e r (1 8) 及び対応する正常染色体を示す A d - 2 9 5 / S V 4 0 の部分的核型。b : 分子プローブとしてコスミドクローン c R M 7 6 の D N A を用いた A d - 2 9 5 / S V 4 0 細胞中期染色体の F I S H 分析。1 2 番正常染色体 (矢印) 及び d e r (1 2) (矢頭) のハイブリダイゼーションシグナル。c : b に示した A d - 2 9 5 / S V 4 0 中期染色体の G T G - バンド形成パターン。d : 分子プローブとしてコスミドクローン c R M 1 0 3 の D N A を用いた A d - 2 9 5 / S V 4 0 細胞中期染色体の F I S H 分析。1 2 番正常染色体 (矢印) 及び d e r (1 8) (矢頭) のハイブリダイゼーションシグナル。

【 0 1 6 4 】

図 3 . 原発性多形態性唾液腺腫、子宮平滑筋腫及び脂肪腫並びにこれら充実性腫瘍に由来する細胞系について得られた 1 2 番染色体マッピングデータの略図。結果は、原発性子宮平滑筋腫 (バンシュラら、投稿中) 及びこれらの腫瘍由来の細胞系 (シェーンメーカーら、1 9 9 4 年 b) に対するデータと比較して示す。F I S H マッピング研究に用いたコスミドクローンは重複 Y A C クローンから得られた配列標識部位に対応する。コスミドクローンは、枠内に示すように、S T S の頭文字にしたがって命名され、その相対的順位は図示のようである。S T S 間の D N A 区間の推定サイズは図に示す。A d : 多形態性唾液腺腫、L i : 脂肪腫、L M : 子宮平滑筋腫。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 5 】

付属文書 2
LEAD ARTICLE

Identification of the Chromosome 12 Translocation Breakpoint region of a Pleomorphic Salivary Gland Adenoma with t(1;12)(p22;q15) as the Sole Cytogenetic Abnormality

Patric F.J. Kools, Sylke Wanschura, Eric F.P.M. Schoenmakers, Jan W.M. Geurts, Raf Mols, Bernd Kazmierczak, Jörn Bullerdiek, Herman Van den Berghe and Wim J.M. Van de Ven

10

ヒト遺伝学センター(P.F.J.K., E.F.P.M.S., J.W.M.G., R.M., H.V.D.B., W.J.M.V.D. V.), ベルギー国、ルーベン、ルーベン大学、およびヒト遺伝学センター(S.W., B. K., J.B.), ドイツ連邦共和国、ブレーメン、ブレーメン大学

20

P.F.J. クールズ及びシルク・バンシュラは本研究に均等に関与したので共同第一著者と考えるべきである

別刷請求宛先：ベルギー国、B-3000ルーベン、ヘレストラート49、ルーベン大学、ヒト遺伝学センター、Wim J.M. Van de Ven博士

1994年4月13日受付、1994年7月6日受理。

【 0 1 6 6 】

要約：t(1;12)(p22;q15)をもつ原発性多形態性唾液腺腫由来の細胞系 Ad-312/SV40を、蛍光系内ハイブリダイゼーション(FISH)で使用して、その12番染色体上の転座切断点を確認した。先の研究結果によると、Ad-312/SV40の12番染色体切断点は、D12S8座の近位でCHOP遺伝子の遠位に位置している。ここでは、我々は、我々がD12S8及びCHOPを出発点とする染色体歩行プロジェクトに関係して分離した2種の部分的重複酵母人工染色体(YAC)クローンY4854(500kbp)及びY9091(460kbp)を報告する。ついで、我々は、これらYACクローンの挿入物内に位置する種々の配列標識部位(STS類)に対応するコスミドクローンを分離した。これらは、cRM51、cRM69、cRM85、cRM90、cRM91、cRM110、およびcRM111を含むものであった。

30

我々は、これら2種のYACクローンの挿入物を包含する複合長距離制限地図を提示し、FISH分析により、両YACがAd-312/SV40細胞に存在する12番染色体切断点にまたがることを示す。FISH研究では、コスミドクローンcRM85、cRM90及びcRM111は12番染色体切断点の遠位に位置すると思われたが、他方コスミドクローンcRM51、cRM69、cRM91及びcRM110はその近位に位置することが見出された。これらの結果から、Ad-312/SV40の12番染色体切断点は165kbpより小さいDNA領域に帰属される。他の5種の多形態性唾液腺腫細胞系12番染色体切断点のFISH分析の評価は、これらがSTS RM91から0.9Mbより大きな距離でAd-312/SV40のもの近位に位置することを示した。これらの結果は、12番染色体上の重要と思われる領域を指向するものであるが、また他の場所に位置する染色体12q13-q15配列が関与する可能性に関する証拠をも提供するもの

40

50

である。

【0167】

緒論

多形態性唾液腺腫は、大及び小唾液腺から由来する良性上皮性腫瘍の構成要素である。これは最も一般的な型の唾液腺腫であり、この器官の全新生物中のほぼ50%を説明する。腫瘍の約85%は耳下腺に見られ、10%は小唾液腺に、5%は顎下腺に見られる[1]。これらアデノームの約50%は正常な核型をもつようであるが、細胞遺伝学的研究は、頻発する特異的染色体異常を明らかにした[2, 3]。頻繁に見られる異常は、通常8q12 - q13領域が関係する8番染色体の異常、最も一般的な異常であるt(3; 8)(p21; q12)及び通常12q13 - q15が関係する転座である12番染色体の異常を含む。非頻発性のクローン性染色体異常も報告されている。一貫して8q12 - q13及び12q13 - q15切断点をもつ染色体再編成の高度に特異的なパターンは、この染色体領域が、これらの腫瘍の発生と関係を持つ可能性がある遺伝子類を宿していることを示唆する。染色体切断点の分子クローニング及び接合フラグメントの確認は、病的に
10

関係がある遺伝子類の同定に通ずる可能性がある。現在、これらの腫瘍に関してこのような分子データはまだ報告されていない。

蛍光系内ハイブリダイゼーション(FISH)データに基づいて、最近、6種の多形態性唾液腺腫細胞系の12番染色体切断点が、12q13 - q15領域、さらに詳細にはD12S19とD12S8間のゲノム区間にマッピングされることが示された[4, 5]。このゲノムDNA区間の性平均遺伝子サイズは、HGM10において7cMであると報告された[6]。また我々は、多形態性唾液腺腫の12番染色体切断点がCHOP遺伝子の遠位に位置すると報告したが、これは、唾液腺腫の12q13 - q15転座切断点が粘液腫様脂肪肉腫のそれと異なることを示す以前の研究を支持する[7]。本報では、我々は、唯一の細胞遺伝学的異常としてt(1; 12)(p22; q15)を有する多形態性唾液腺腫細胞系Ad-312/SV40における12番染色体切断点の物理的マッピングについて報告する。
20

【0168】

材料及び方法

腫瘍細胞系

この研究に用いたヒト腫瘍細胞系は、既報の多形態性唾液腺腫細胞系Ad-248/SV40、Ad-263/SV40、Ad-295/SV40、Ad-302/SV40、Ad-312/SV40、及びAd-366/SV40[5, 8]を含んでいる。細胞は20%ウシ胎児血清を補充したアール塩含有TC199培地中で増殖させた。この研究に用いたその他の細胞系としては、ハムスターの遺伝背景中に唯一のヒト染色体として12番染色体を含む体細胞雑種PK89-12[9]及び体細胞雑種LIS-3/SVB40/A9-B4[4]を含んでいる。後者の細胞系は、特異的t(12; 16)(q13; p11.2)を有する粘液腫様脂肪肉腫細胞系LIS-3/SV40とマウスA9細胞の融合で得られた。この体細胞雑種は、先にder(16)を含むことが示されているが、der(12)も正常な12番染色体も含まない[4]。PK89-12及びLIS-3/SVB40/A9-B4細胞は、10%ウシ胎児血清を補充したDMA-F12培地で増殖させた。細胞系は、標準的細胞遺伝学的技術により規則的な間隔をおいて分析した。
30

【0169】

YAC及びコスミドクローンの分離

我々は、詳細を他の場所で報告する(シェーンメーカーズら、準備中)ヒトゲノムマッピング研究に関連して、第1世代CEPH YACライブラリー[10]からYACクローンY4854及びY9091を分離し、12番染色体特異配列コスミドライブラリーLINLNC01[11]からコスミドクローンcRM51、cRM69、cRM85、cRM90、cRM91、cRM103、cRM110、及びcRM111を分離した。YAC及びコスミドクローンは、既報のように分離した[5]。YAC及びコスミドライブラリーの最初のスクリーニングは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を含むスクリーニン
40

10

20

30

40

50

グ法 [1 2] を用いて実施した。最終スクリーニング段階として、既報 [5] のようにフィルターハイブリダイゼーション分析を使用した。コスミドクローンは S T S 類を用いて分離し、Y A C クローン Y 4 8 5 4 及び Y 9 0 9 1 の挿入物内の S T S 類に対応するものは、図 1 に示す。S T S 類は、ベクトレット P C R [1 3] または A l u - P C R [1 4 , 1 5] を用いて Y A C 挿入物末端の回収後に得た。P C R 産物は、直接固相蛍光配列決定法により配列決定した。コスミドクローンは標準的方法 [1 6] により増殖させ処理した。Y A C クローンは、既報 [5] のように、パルスフィールドゲル電気泳動 [1 7] 、制限地図作製及びハイブリダイゼーションにより確認した。

【 0 1 7 0 】

染色体調製及び蛍光系内ハイブリダイゼーション

多形態性唾液腺腫瘍細胞系は、コルセミド (0 . 0 4 μ g / m l) で 3 0 分間処理し、次いで常法により採取した。腫瘍細胞の中期塗抹は、既報 [4] のように調製した。F I S H 実験における染色体の同一性を確認するため、同じ中期塗抹の G バンド形成後に F I S H 分析を行った。G バンド形成は、基本的にシュミットら [1 8] が報告したように実施した。系内ハイブリダイゼーションは、キービッツら [1 9] が報告したプロトコルに従い若干の小修正を施して [5 , 2 0] 行った。コスミド及び Y A C の D N A は、先に報告したように [5] ビオチン - 1 1 - d U T P (ベーリンガーマンハイム) またはビオチン - 1 4 - A T P (B R L 、 ゲザースパーグ) で標識した。染色体は、よう化プロピディウムで対比染色後、F I T C フィルター (ツァイス) を用いてツァイスアクシオフォト蛍光顕微鏡で分析した。結果は、スコッチ (3 M) の A S A 6 4 0 フィルムに記録した。

【 0 1 7 1 】

結果

多形態性唾液腺腫瘍細胞系 A d - 3 1 2 / S V 4 0 における 1 2 番染色体切断点にまたがる Y A C クローンの分離と確認

我々は、先の研究 [5] において、D 1 2 S 8 座の近位で C H O P の遠位にある 6 種の多形態性唾液腺腫瘍細胞系 1 2 番染色体切断点をマッピングした。これらの座間の D N A 区間は 7 c M より若干小さかったが (D 1 2 S 8 と D 1 2 S 1 9 座間の推定距離 [6]) 、それでも本質的に大きかった。A d - 3 1 2 / S V 4 0 の転座切断点を分子的に明確にするため、我々は、D 1 2 S 8 座と C H O P 遺伝子間の D N A 区間についてヒトゲノムマッピング実験を行った。D 1 2 S 8 と C H O P 遺伝子から出発する直接染色体歩行法において、我々は、重複 Y A C クローン Y 9 0 9 1 及び Y 4 8 5 4 を得た。Y 9 0 9 1 の D N A 挿入物は 4 6 0 k b p であり、Y 4 8 5 4 のそれは 5 0 0 k b p であると思われた。さらに、下に示すように、Y A C クローンの D N A 挿入物は、A d - 3 1 2 / S V 4 0 の 1 2 番染色体切断点にまたがるようであった。これら Y A C クローン類の挿入物の長距離制限地図を、パルスフィールドゲル電気泳動とハイブリダイゼーション分析を用いて作成した (図 1) 。S T S 含量マッピング及びサザンプロット分析に基づくと、Y A C クローン Y 9 0 9 1 及び Y 4 8 5 4 の挿入物は図 1 に示すように重複するようであった。試験した S T S 類は、ここに記載しない他の重複 Y A C クローンの末端配列または A l u 間 P C R により得られた配列に対応する。これらの中、R M 9 0 及び R M 9 1 はこの Y A C Y 9 0 9 1 末端 S T S 類を表し、R M 1 1 0 及び R M 1 1 1 は A l u 間 P C R 由来 S T S 類を表す。Y A C クローン Y 4 8 5 4 と Y 9 0 9 1 挿入物内にマッピングする幾つかの S T S 類について、対応コスミドを F I S H 分析に使用するために分離したが、その例は、c R M 5 1 、 c R M 6 9 、 c R M 8 5 、 c R M 9 0 、 c R M 9 1 、 c R M 1 1 0 、 及び c R M 1 1 1 である。

【 0 1 7 2 】

2 種の重複する Y A C クローンの挿入物は、以下の観察から推論されるように、全くキメラとは思われない。Y 4 8 5 4 または Y 9 0 9 1 を分子プローブとする正常ヒトリンパ球中期染色体の F I S H 分析は、染色体領域 1 2 q 1 3 - q 1 5 でのみハイブリダイゼーションシグナルを示した。Y 9 0 9 1 については、これはさらにコスミドクローン c R M

90またはcRM91をプローブとするFISH実験での観察により確認された。これら2種のコスミドそれぞれにおけるDNA挿入物は、もう一つのYACクローンY9091末端配列に対応する。最後に、ハムスター遺伝子背景中における唯一のヒト染色体としてヒト12番染色体を含むPK89-12、及び粘液腫様脂肪肉腫の特異的t(12;16)からのder(16)を含むがder(12)も正常12番染色体も含まないことが前に示されているLIS-3/SV40/A9-B4[4]に対するPCR分析で確認されたように、Y9091の末端配列STS類は、12番染色体上で、CHOP遺伝子の遠位に位置するようであった。染色体歩行実験から、我々は、2種のYACクローンの重複挿入物が、染色体12q上でD12S8とCHOP間に位置する約640kbpのDNA領域を表すと結論した。YAC整列群の640kbp複合体長距離制限地図は少なくとも全領域を2重にカバーして構成されているので、この点での微小欠失は排除できないけれども、640kbp領域が染色体DNAと連続すると仮定するのは合理的でない。

10

【0173】

染色体歩行は、常にYACクローン及び/またはYAC挿入物配列に対応するコスミドクローンのFISHマッピングにより調べた。染色体の同定については、殆どの場合G-バンド形成を使用したことに注意すべきである。このG-バンド形成に基づき、ハイブリダイゼーションシグナルが既知の存在としての染色体のものとして最終的に帰属決定された。これは、時に観察される交差及び背景ハイブリダイゼーションシグナルをもつ場合に重要である。時にFISH分析前のG-バンド形成が弱いハイブリダイゼーションシグナルまたは不明確なバンドパターンをもたらした。したがって、我々は、調べるべきYAC及びコスミドクローンを参照プローブと組み合わせて使用するFISH実験を行った。コスミドライブラリーのスクリーニング中に幸運に得られたコスミドクローンcPK12qterを、参照マーカーとして選択した。正常リンパ球中期染色体のFISH分析(図2A)は、cPK12qterが12番染色体の長腕テロメア領域に位置することを明らかにした。この実験における12番染色体を同定するため、12番動原体特異的プローブp12H8[21]を使用した。YACクローンY4854(図2B)またはY9091(図2C)を参照プローブcPK12qterと組み合わせて用いるAd-312/SV40細胞中期染色体のFISH分析は、何れの場合にも、der(1)及びder(12)上のYAC挿入物のハイブリダイゼーションシグナルを示した。これらの結果から、我々は、各YACクローンの挿入物DNAがこの細胞系の12番染色体切断点にまたがると結論した。Gバンド形成が、図2Cにおける12番染色体短腕が関与するテロメア会合を明らかにしたことに注意すべきである。YACクローンY9091がAd-312/SV40における12番染色体切断点にまたがるという観察結果が、コスミドクローンcRM90またはcRM91を分子プローブとするFISH実験で独立に確認された。それらは、別のY9091末端配列を含むことが示された。cRM90は、12番染色体切断点の遠位に位置するようであり、cRM91は近位に位置することがわかった(データは記載せず)。これらの結果から、また図1に示すYAC整列群の染色体上の配向をも確認した。要約すると、我々は、これらのFISH実験から、Ad-312/SV40の12番染色体転座切断点が2種のYACクローンの重複配列(約300kbp)に対応するDNA区間に位置すべきと結論した。

20

30

40

【0174】

Ad-312/SV40の12番染色体転座切断点の精細マッピング

Ad-312/SV40の12番染色体転座切断点をさらに狭める方法として、YACクローンY9091内に異なるマッピング位置をもつコスミドクローンを分離した。これらは、cRM69、cRM85、cRM110、及びcRM111を含む。cRM65及びcRM85は、ここに記載しないYACクローンのSTS配列に基づいて分離した。cRM110及びcRM111は、Alu間PCRを経て得られた。cRM110は、ザンプロット分析で、テロメア末端配列としてのRM69をもつ重複YACクローンのDNA挿入物ではなく、Y9091の末端MluI断片にハイブリダイズすることが示された。RM110の位置は図1に示すとおりである。RM111は、Y9091のBssHI

50

I、M1uI、PvuI及びSfiI断片にハイブリダイズすることが示され、したがってSTS RM 48もまた位置するY9091のPvuI-SfiI断片内に位置する(図1)。cRM69またはcRM110をプローブとするAd312/SV40中期染色体のFISH分析は、図3AでcRM69について示すように、これらコスミドのDNA挿入物がこの細胞系の12番染色体転座切断点の近位に位置することを示した。続いて行ったcRM85またはcRM111をプローブとするAd-312/SV40のFISH分析は、図3BでcRM111について示すように、転座切断点の遠位にハイブリダイゼーションシグナルを示した。cRM85及びcRM111による結果は、YACクローンY4854のテロメア末端をマークするSTS RM 48の遠位にcRM85が位置し近くにcRM111が位置するので、YACクローンY4854により観察された切断点の広がりと一致している。結論として、Ad-312/SV40の12番染色体転座切断点は、図4に略示するように、cRM110とcRM111間のDNA区間に位置するはずである。

10

【0175】

その他の多形態性唾液腺腫細胞系における12番染色体切断点のFISH評価

Ad-312/SV40との関係で12番染色体切断点の位置を決定するため、図4に略示するように、5種の他の多形態性唾液腺腫細胞系をFISH分析により調べた。原発性腫瘍から開発した[5, 8]これらの細胞系は、Ad-248/SV40、Ad-263/SV40、Ad-295/SV40、Ad-302/SV40およびAd-366/SV40を含むものであった。これらの細胞系の染色体異常を図4に示す。cRM91を用いたこれらの細胞系中期染色体のFISH分析は、これらの細胞系すべての12番染色体切断点がこのコスミドクローンの近位に位置することを示した(データは記載せず)。同様なFISH分析を、プローブとして配列標識部位RM103に対応するコスミドクローンを用いて行った。RM103は、RM91の近位に約0.9Mbpの距離で位置することがわかった。全ての場合に、cRM103は12番染色体転座切断点の遠位に位置するようであり、このことは、これら5種の多形態性唾液腺腫細胞系における12番染色体切断点が、Ad312/SV40のそれから比較的大きな距離で位置することを示す。

20

【0176】

検討

ここに提示する研究において、我々は、多形態性唾液腺腫細胞系Ad-312/SV40の転座切断点が位置すると思われる12番染色体長腕上の、分子クローンされ確認された染色体領域を同定した。先の研究[5]において、我々は、既にこの細胞系の12番染色体切断点がD12S8とCHOP間に位置することの証拠を提出した。ここに記載する2種の切断点に拡がるYACクローンは、最初の出発点としてD12S8及びCHOP遺伝子を用いる指向性染色体歩行実験で得られたので、ここに提出する12番染色体切断点マッピング結果は先に示した我々の主張を確認した。分子プローブとしてY9091の完全YAC挿入物を用いて得たFISH結果は、独立に、このYACクローンの挿入物の種々の領域に対応する配列を含むコスミドクローンを用いたFISH実験で確認された。独立の確認結果は、Y9091完全挿入物で見られる分裂シグナルが、YACに示される配列の実際の分裂以外のもので説明できる可能性を減らすので、このことは重要である。例えば、染色体切断点の両側にある関連性が高い遺伝子配列は、もしYAC挿入物のFISH結果のみに基づくならば容易に誤った結論に導くであろう。最後に、我々のマッピング実験はまた、この研究で我々が作り出した長距離制限地図の染色体配向を決定的に確認するものであった。この配向は、2色FISH実験(未公表の観察結果)に基づいて既に予想されていたものである。

30

40

【0177】

ここに記載するFISH実験により、我々は、Ad312-/SV40細胞における12番染色体切断点を、確認されているSTS RM 48とRM69間の190kbp区間にマッピングするのが可能になった。しかし、切断点領域は、以下に基づいてさらに若干狭めることができる。Y4854が切断点にまたがることを示されたということは、少

50

なくともこのYACクローンのテロメア半片のかなりの部分が切断点の遠位に位置べきことを示している。精細に確認されていないことがまだ多く残存する。他方、STS RM 69は、コスミドクローンcRM69 DNA挿入物のほぼ中央に位置すると思われ、これは切断点がRM69のほぼ25 kbp遠位にあることを示唆する。さらに、cRM69はRM110を欠くと思われ(データは記載せず)、cRM110はAd-312/SV40細胞の12番染色体切断点の近位に見られるので、切断点は先に述べた25 kbpよりもさらにRM69の遠位にあるべきである。全体的に見て、このことは12番染色体切断点領域を、165 kbpよりかなり小さくあるべきDNA区間に狭める。さらに、切断点へ鋭く指向することにより、我々が、12番染色体を分子クローニングし、病理学的に關係がある配列の同定を導く可能性がある切断点結合領域の遺伝子配列を確認することができた。配列決定、直接ハイブリダイゼーション、直接選択またはエクソトラッピングによるYACクローンY4854及びY9091 DNA挿入物内遺伝子の同定は、多形態性唾液腺腫の腫瘍化に病理学的に必要である可能性があるこの12番染色体長腕領域内の遺伝子の同定のための別の有用な方法をなす可能性がある。

10

【0178】

他の多形態性唾液腺腫における12番染色体切断点が、12番染色体長腕上の、離れた、より近位の領域に位置するという観察には、興味がそそられる。これは、多形態性唾液腺腫における12番染色体切断点が、B細胞悪性腫瘍における11q13切断点[22]を思わせるような、12番染色体長腕の比較的大きなDNA領域に亘って分散することを示唆する可能性がある。他の多形態性唾液腺腫細胞系における12番染色体切断点の精細な解明がこの問題にさらに光を注ぐ可能性がある。他方、それは、重要であるかも知れない、おそらく多形態性唾液腺腫の成長調節のような、12番染色体長腕上の別の配列を指向する可能性がある。ここに記載する12番染色体切断点領域が今までAd-312細胞系でしか見つかっていないということは、染色体の12q13-q15異常をもつ多数の唾液腺腫を分析して、研究した細胞系に対する12番染色体配列の影響が腫瘍形成と関連性をもつ可能性を検討する必要を生じさせるものである。もしこの12番染色体の特定領域の異常が多く事例に見つかるならば、これらの腫瘍が臨床的に亜群を形成するかどうかを知ることに興味がそそられる。最後に、ヒト12番染色体のq13-q15領域が關係する染色体転座は他の種々の充実性腫瘍：良性脂肪組織腫、子宮平滑筋腫、横紋筋肉腫、血管外皮腫、明細胞肉腫、軟骨腫様腫瘍及び肺過誤腫について報告されている。これらの腫瘍の幾つかにおいて12番染色体切断点がAd-312/SV40のそれと同一領域内に位置するか否かについてはまだ確認されていない。本報告に記載したYAC及びコスミドクローンはこれを研究するための有用な手段を構成する。

20

30

【0179】

第1世代CEPH YACライブラリー[10]の複製及び配置12番染色体特異的コスミドライブラリー(LINL12NC01)[11]の複写の入手につき深く感謝する。コスミドライブラリーは、契約番号W-7405-Eng-48のアメリカエネルギー省LLNLの援助下のナショナル・ラボラトリー・ジーン・ライブラリー・プロジェクトの一部として構築された。著者は、優れた技術的補助につきM.ドヘイン、C.ハイスマンス、E.マイアン、K.マイアールト及びM.ウイレムスに対し感謝し、図版につきM.レイスに対し感謝する。本研究は、ドイチェ・フォルシュングスミッテルシャフト及びテンイエス・ファクト・スティフトウングのバイオメド1プログラム「モレキュラー・サイトジェネティクス・オブ・ソリッド・テュマー」、「ヘコンセルテールデ・オンデルゼカクティース1992-1996」、ザ・ナショナル・ファンド・フォー・サイエンティフィック・リサーチ(NFWO;コム・オブ・テーヘン・カンカー)、「ALSK-プログラマ・フォル・カンケロンデルゼク」、「シュベルプンクトプログラム：モレクラーレ・ウント・クラシッシェ・テュモルチトゲンエティク」を通してECにより一部支援された。本書は、ベルジアン・ステート、プライム・ミニスターズ・オフィス、サイエンス・ポリシー・プログラミングにより提出されたベルジアン・プログラム・オン・インターユニバーシティ・ポールズ・オブ・アトラクションの結果を提示するものである。科

40

50

学的信頼性は著者が責任を負う。J. W. M. ゲーツはザ・ナショナル・ファンド・フォー・サイエンティフィック・リサーチ (NFWO ; コム・オブ・テーヘン・カンカー) の「アスピラント」である。

【 0 1 8 0 】

文献

1. Seifert G, Miehlike A, Haubrich J, China R (1986): Diseases of the

【 0 1 8 1 】

salivary glands. Pathology. Diagnosis. Treatment. Facial nerve surgery.

Translated by P.M. Stell. Thieme, Stuttgart, New York, pp 1820194.

2. Sandros J, Sherman G, Mark J (1990): Cytogenetic and molecular observations in human and experimental salivary gland tumours. *Cancer Genet Cytogenet* 44:

3. Bullerdiek J, Wobst G, Meyer-Bolte K, China R, Haubrich J, Thuds B, Bartnitzke S (1993): Cytogenetic subtyping of 220 salivary gland pleomorphic adenomas: correlation to occurrence, histological subtype, and in vitro cellular behavior. *Cancer Genet Cytogenet* 65: 27-31. 10

4. Schoenmakers HFFM, Kooks PFJ, Kazmierczak B, Bullerdiek J, Claussen U, Horsthemke B, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1993): Isolation of a somatic cell hybrid retaining the der(16)t(12:16) (q13;p11. 2) from a myxoid liposarcoma cell line. *Cell Genet Cytogenet* 62: 159-161. 20

5. Schoenmakers HFFM, Kooks PFJ, Mols R, Kazmierczak B, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Dal Cin p, De Jong PJ, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1993): Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myxoid liposarcoma. *Genomics*, 20:210-222.

6. Keats B, Ott J, Conically M (1989) : Reports of the committee on linkage and gene order. *Cytogenet Cell Genet* 51: 459-502. 30

7. Sherman G, Sahlin P, Mark J, Chaganti RKS, Kindblom LS, Aman p (1993): The 12q13-q15 translocation breakpoints in pleomorphic adenoma and clear-cell sarcoma of tendons and aponeuroses are different from that in myxoid liposarcoma. *Genes Chrom Cancer* 7: 178-180.

8. Kazmierczak B, Bartnitzke S, Harts M, Bullerdiek J(1990) : In vitro transformation by the SV40 "early region" of cells from a human benign salivary gland tumour with a 12q13-q15 rearrangement. *Cytogenet Cell Genet* 53: 37-39. 40

【 0 1 8 2 】

9. Warburton D, Gersen S, Yu M-T, Jackson C, Handelin B, Hoffman D (1990) : Monochromosomal rodent-human hybrids from microcell fusion of human lymphoblastoid cells containing an inserted dominant delectable marker. *Genomics* 6: 358-366.
10. Albertsen HM, Abderrahim H, Cann HM, Dausset J, Le Pallier D, Cohen D (1990) : Construction and characterization of a yeast artificial chromosome library containing seven haploid human genome equivalents. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4256-4260. 10
11. Montgomery KT, LeBlanc JM, Tsai P, McNinch JS, Ward DC, De Jong PJ, Kucherlapati R, Krauter KS (1993): Characterization of two chromosome 12 cosmid libraries and development of STSS from cosmids mapped by FISH. *Genomics* 17:682-693.
12. Green ED, Olson MV (1990) : Systematic screening of yeast artificial-chromosome libraries using the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1213-1217. 20
13. Geurts JMW, Schoenmakers HFPM, Mols R, Van de Ven WJM (1994) : Improved procedure for rapid isolation and sequencing of DNAs termini in yeast artificial chromosomes. *Meth Mol Cell Biol*, In Press.
14. Nelson DL, Ledbetter SA, Combo L, Victoria MF, Ramirez-Solis R, Webster TD, Ledbetter DH, Caskey CT (1989) : Alu polymerase chain reaction. A method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6686-6690. 30
15. Breaker C, Wijnen J, Trops C, Van de Klift H, Dauwerse H, Mecca Khan P (1990) : Vector-Alu PCR: a rapid step in mapping cosmids and YACs. *Nucl Acids Res* 18: 3097. 40
16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

【 0 1 8 3 】

17. Chu G, Vollrath D, Davis RW(1986): Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234: 1582-1585.

18. Smit VTHBM, Weasels JW, Mollevanger p, Schrier PI, Raap EK, Beverstock GC, Cornelisse cJ (1990): Combined GTG-banding and nonradioactive in situ hybridization improves characterization of complex karyotypes. *Cytogenet Cell Genet* 54: 20-23.

19. Kievits T, Dauwerse JG, Wiegant J, Devilee P, Breuning MH, Cornelisse CJ, van Ommen G, Pearson PL (1990): Rapid subchromosomal localization of cosmids by nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-136.

20. Kooks PFJ, Roebroek AJM, Van de Verde HJK, Marynen P, Bullerdiek J, Van de Ven WJM (1993): Regional mapping of the human NIP gene to chromosome 14q21-q22 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet*

21. Looijenga LEJ, Smit VTHBM, Weasels JW, Mollevanger P, Oosterhuis JW, Cornelisse CJ (1990) : Localization and polymorphism of a chromosome 12-specific a satellite DNA sequence. *Cytogenet Cell Genet* 53: 216-218.

22. Raynaud SD, Bekri S, Leroux D, Grosgeorge J, Klein B, Bastard C, Gaudray p, Simon MP (1993): Expanded range of 11q13 breakpoints with differing patterns of cyclic DI expression in B-cell malignancies. *Genes Chrom Cancer* 8: 80-87.

【 0 1 8 4 】

付属文書 2 の図の説明

図 1 . Y A C クローン Y 4 8 5 4 及び Y 9 0 9 1 の重複 DNA 挿入物の複合物理的地図。Y A C クローンの相対的位置は、長距離物理的地図の下の横線により示す。ここに記載しない Y A C を含めた Y A C 類の末端クローンに対応する配列標識部位 (S T S 類) は、制限地図上のに枠内 R M コードにより示す。A l u 間 P C R 産物から得られた S T S 類は制限地図の下に示し、そのマッピングに対する DNA 領域は矢印で示す。B : B s s H I I ; M : M l u I ; P : P v u I ; S f : S f i I 。

【 0 1 8 5 】

図 2 . A) 1 2 番染色体長腕テロメア領域に対するコスミドクローン c P K 1 2 q t e r のマッピング。1 2 番動原体特異的プローブ p 1 2 H 8 を、1 2 番染色体の同定確認に使用した。対照ヒトリンパ球の中期染色体について F I S H 分析を実施した。c P K 1 1 2 q t e r のハイブリダイゼーションシグナルは小矢頭で示し、1 2 番動原体特異的プローブに対するそれはアスタリスクで示す。B) , C) Y A C クローン Y 4 8 5 4 (B) または Y 9 0 9 1 (C) の DNA を分子プローブとし参照マーカーとしてコスミドクローン c P K 1 2 q t e r を組み合わせ用いる A d - 3 1 2 / S V 4 0 細胞中期染色体の F I S H 分析。1 2 番染色体上の Y A C クローンのハイブリダイゼーションシグナルは大矢頭で示し、d e r (1) 上のもは大矢印で、d e r (1 2) 上のもは小矢印でそれぞれ

10

20

30

40

50

示す。コスミドクローン c P K 1 2 q t e r のハイブリダイゼーションシグナルは小矢頭で示す。

【 0 1 8 6 】

図 3 . コスミドクローン。 R M 6 9 (A) または c R M 1 1 1 (B) を分子プローブとし参照マーカーとしてコスミドクローン c P K 1 2 q t e r を組み合わせて用いる A d - 3 1 2 / S V 4 0 細胞中期染色体の F I S H 分析。 c P K 1 2 q t e r のハイブリダイゼーションシグナル位置は小矢頭で示す。(A) において、正常 1 2 番染色体上の c R M 6 9 のハイブリダイゼーションシグナル位置は大矢頭で、 d e r (1 2) のものは小矢印で示す。(B) において、正常 1 2 番染色体上の c R M 1 1 1 のハイブリダイゼーションシグナル位置は大矢頭で、 d e r (1) のものは大矢印で示す。

10

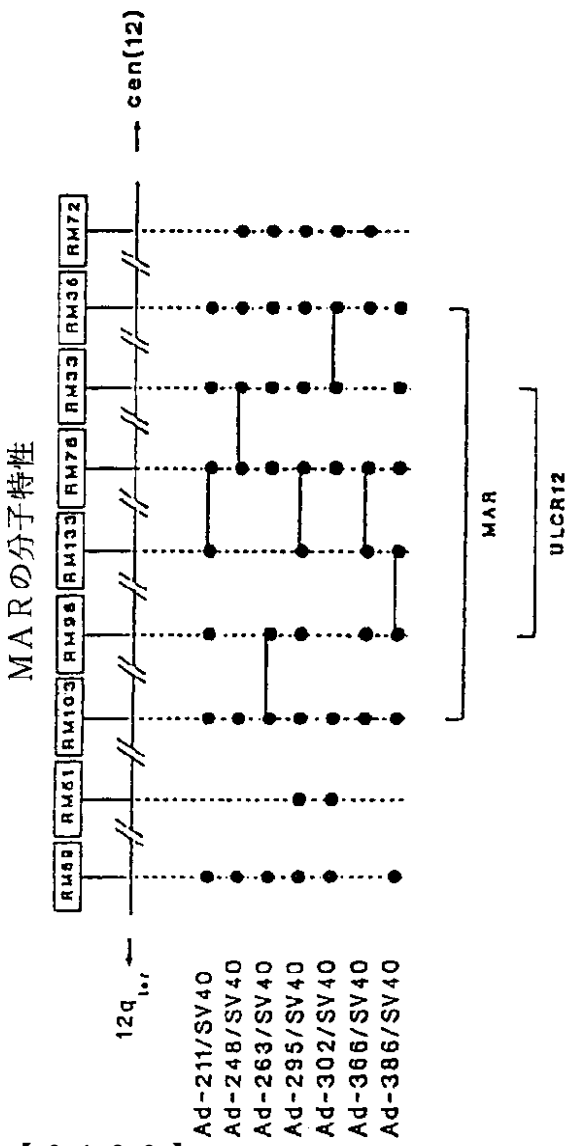
【 0 1 8 7 】

図 4 . この研究で試験した 6 腫の多形態性唾液腺腫細胞系で得た F I S H マッピングデータの略図。種々の細胞系における特異的 1 2 番染色体異常を示す。 F I S H マッピング実験でプローブとして用いたコスミドクローンは重複 Y A C クローンから得た配列標識部位に対応する。個々の F I S H 実験は点で示す。コスミドクローンは、枠内に示すように、 S T S の頭文字により命名し、これらの相対的順位を提示した。 R M 9 0 と R M 1 0 3 間の D N A 区間は約 1 . 3 M b と推定される。挿入図： t (1 ; 1 2) (p 2 2 ; q 1 5) を有する A d - 3 1 2 / S V 4 0 細胞系の G バンド形成性誘導染色体 d e r (1) 及び d e r (1 2) の略図。 A d - 2 4 8 / S V 4 0 、 A d - 2 6 3 / S V 4 0 、 A d - 2 9 5 / S V 4 0 、 A d - 3 0 2 / S V 4 0 および A d - 3 6 6 / S V 4 0 の 1 2 番染色体切断点の位置は矢印で示すように R M 1 0 3 の遠位である。

20

【 0 1 8 8 】

付属文書 1 図 1

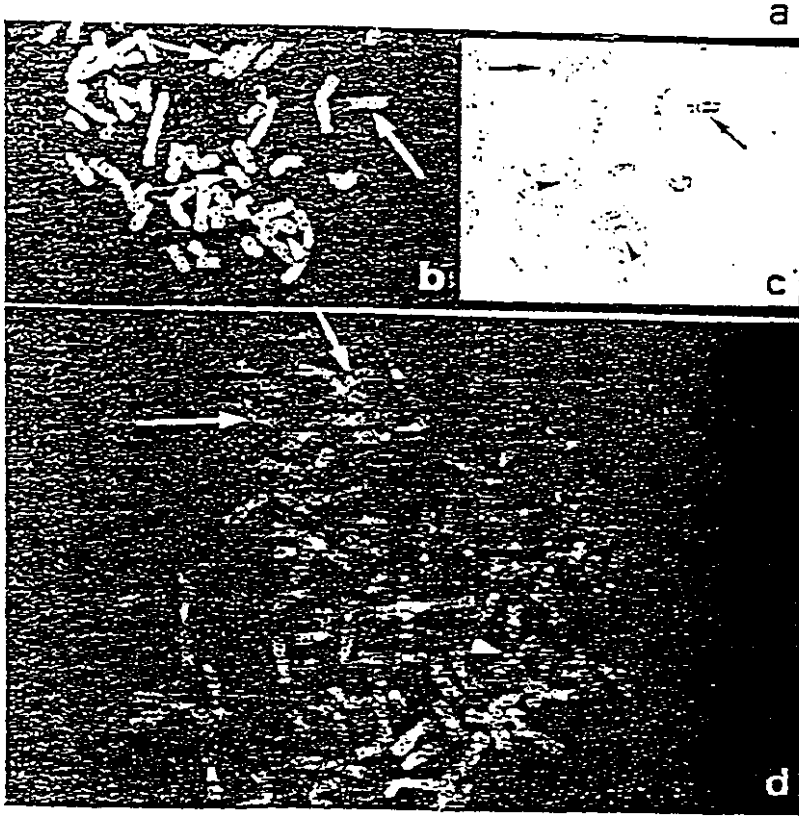
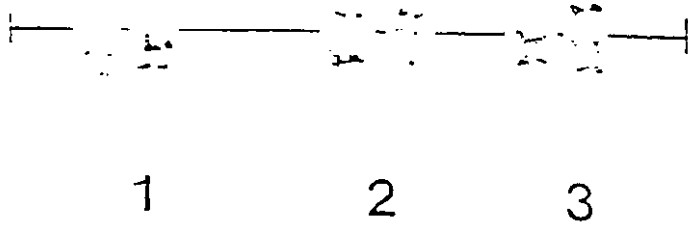


10

20

30

【 0 1 8 9 】
 付 属 文 書 1 図 2



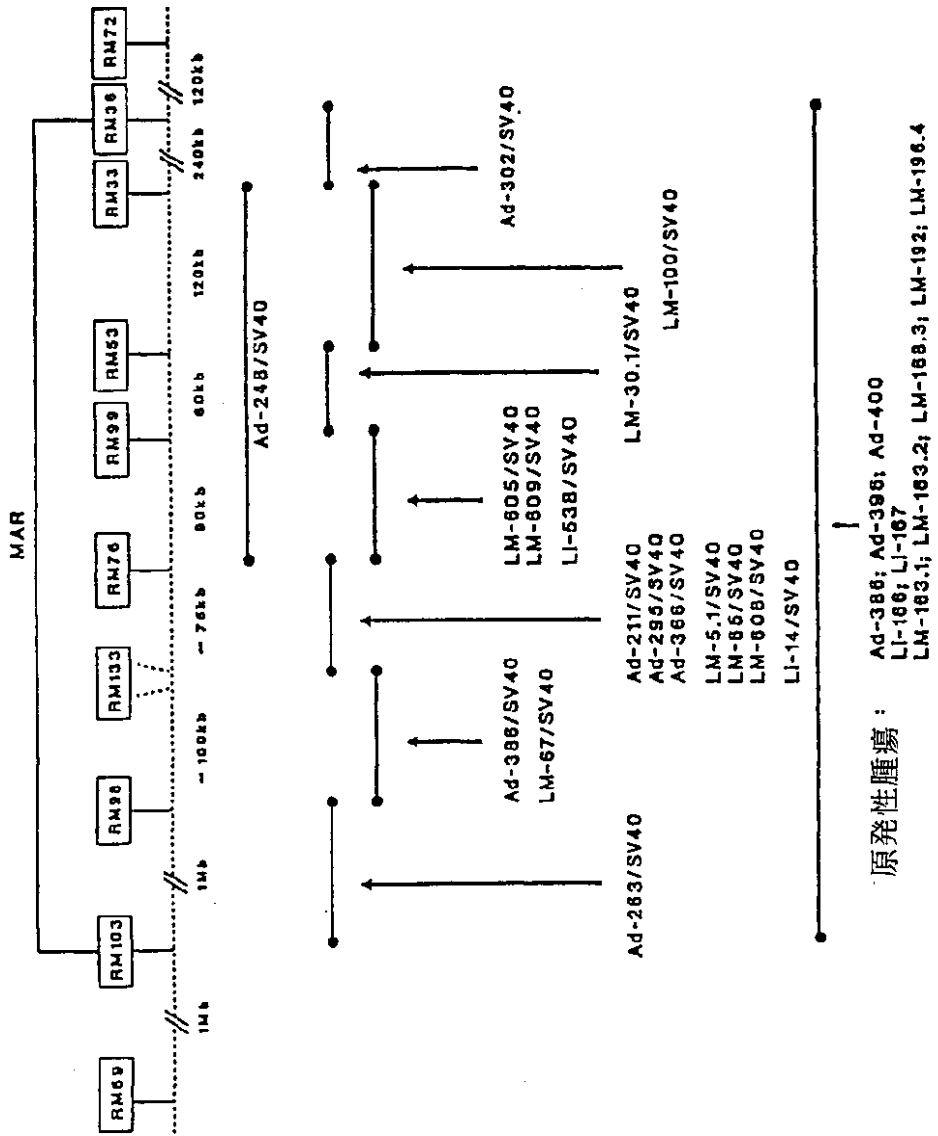
10

20

30

【0190】
付属文書1 図3

MARの分子特性

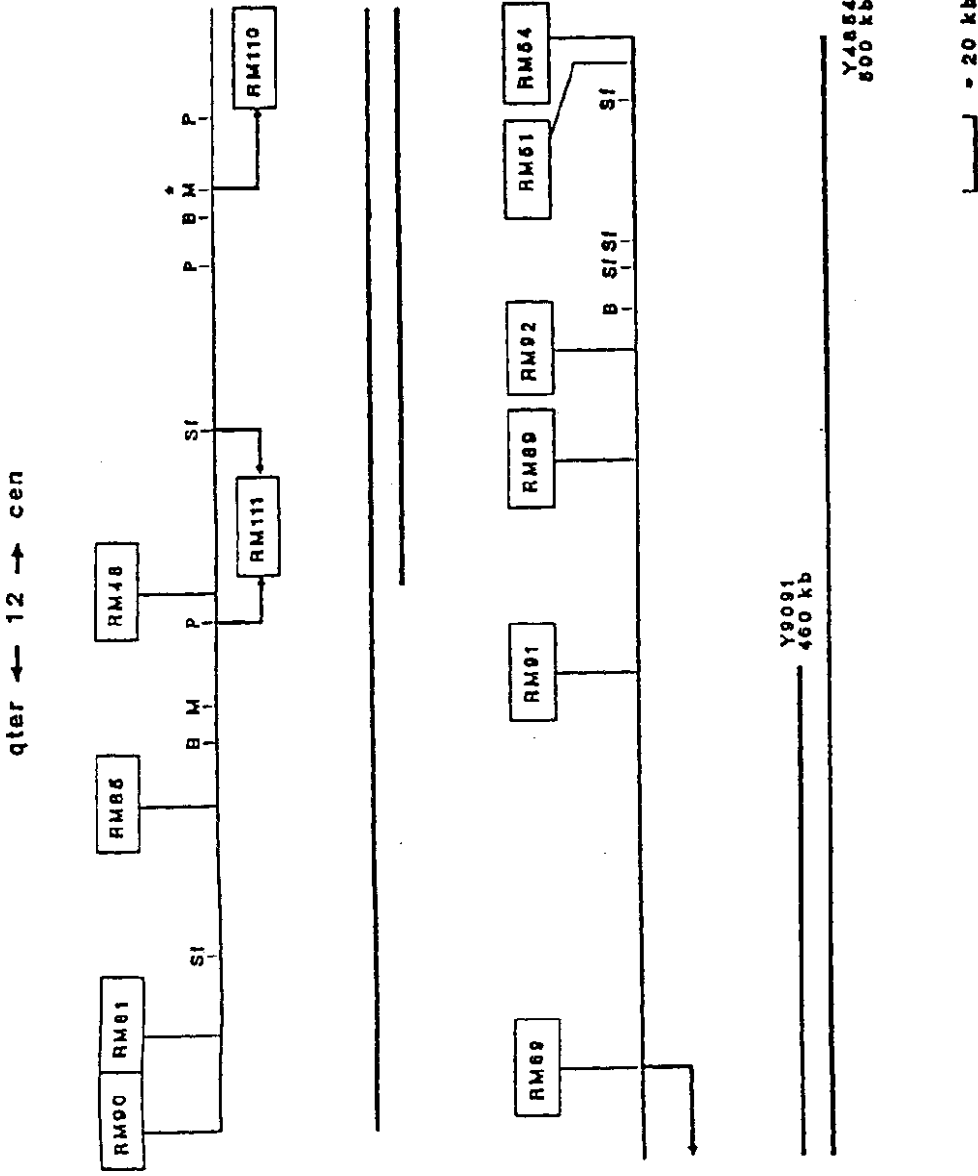


【0191】
付属文書2 図1

10

20

30

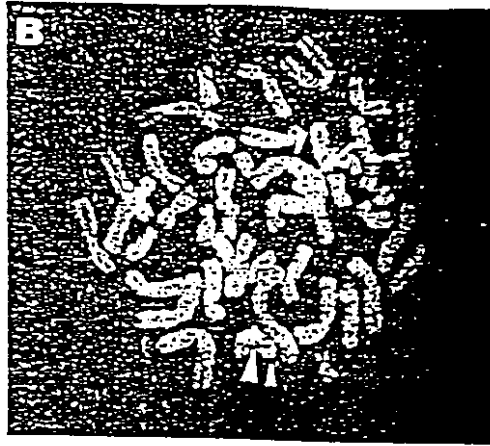


【 0 1 9 2 】
付属文書 2 图 2

10

20

30

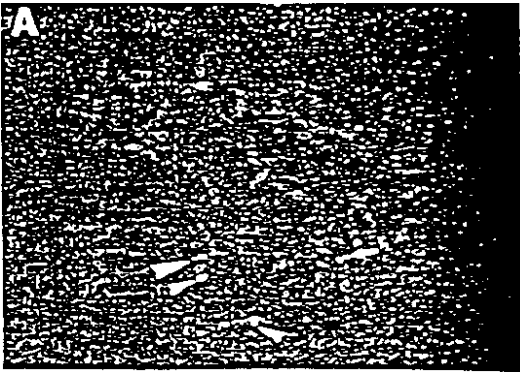


10



20

【 0 1 9 3 】
 付属文書 2 図 3



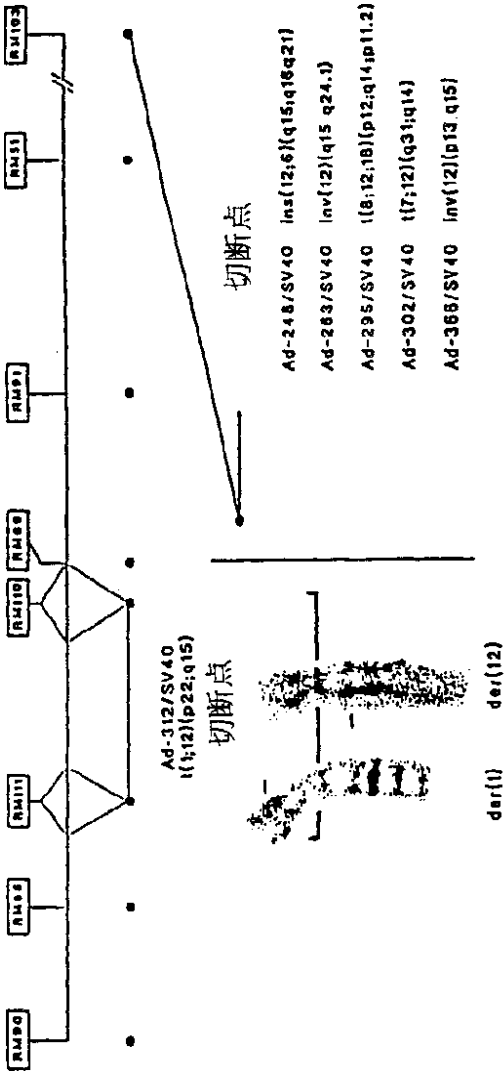
30



40

【 0 1 9 4 】
 付属文書 2 図 4

50



10

20

【図面の簡単な説明】

【0195】

30

【図1-1】75個の重複CEPH YACクローンから構成され、様々な良性充実性腫瘍に存在する12番染色体q切断点に及びYACコンテグ由来の、ヒト12番染色体長腕上にある6Mb領域の長距離物理的地図。YAC挿入物によりカバーされる複合ゲノムDNAの長距離物理的地図は、示した微量切断酵素の様々な制限部位の相対位置と共に黒線で示す。特定の制限酵素の付加的切断部位がみられるDNA領域は矢印で示す。多様な種類の制限エンドヌクレアーゼ部位はアスタリスクで示す。他の研究者により単離され定義されたDNAマーカーは緑で示す。我々が得たDNAマーカーはボックスで示し、頭文字で標識する(図IおよびII参照)。これらのDNAマーカーの長距離物理的地図における相対位置を示し、特定のYAC末端に対応する位置を点線でこれらと結ぶ。DNAマーカーのいくつかはDNA区間にあたり、これは矢印で示す。白いボックス中のDNAマーカーとして、STSが成長され、プライマーセットを表IIに示す。黄色のボックス中のものについては、何のプライマーセットも成長されていない。RAP1B、EST01096、またはIFNG含有のDNA区間を表示する。適用可能な場合においては、D番号割り当てを示す。長距離物理的地図の下流には、共通した長距離の制限地図に一致する重複YACクローンのサイズおよび相対位置を青の線で示す。共通の長距離の制限地図中に適合しないYAC挿入物のDNA領域は点線の青い線で示す。YACクローンのCEPHマイクロタイターアドレスを載せる。12番染色体上にあるYACコンテグの方位が与えられる。ULCR12およびMARの相対位置が対応する頭文字により表示された赤い線により示す。STSのアクセス番号は表Iには載せていない: CH9(#U27142); RM1(#U29049); RM110(#U29022); RM111(#U2

40

50

9 0 2 3) ; R M 1 3 0 (# U 2 7 1 3 9) ; R M 1 3 1 (# U 2 9 0 0 1) ; R M 1 3 2 (# U 2 7 1 3 8) ; R M 1 3 3 (# U 2 7 1 3 7) 。 制限部位 : B : B s s H I I ; K : K s p I (= S a c I I) ; M : M l u I ; N : N o t I ; P : P v u I ; S f : S f i I 。

【図 1 - 2】図 1 - 1 の続きを示す図である。

【図 1 - 3】図 1 - 2 の続きを示す図である。

【図 1 - 4】図 1 - 3 の続きを示す図である。

【図 2】約 4 4 5 k b の M A R 断片に及び、重複コスミドのコンティグ、長い範囲の制限および S T S 地図。コンティグ成分を数え、下記のリストで定義する。L L 1 2 N C 0 1 - 由来のコスミドクローンはそのマイクロタイタープレートアドレスにちなんで名前がついている。様々な S T S の遺伝子バンク・アクセス番号 (#) が下記に記載されている。S T S は略語で記載し、例えば S T S 1 2 - R M 3 3 ではなく R M 3 3 と記載する。コスミドコンティグ中の S T S " K " および " O " の間の 4 0 k b の差は クローン (クローン 3 8 および 4 0) および P C R 産物 (クローン 3 7 および 3 9) によりカバーされている。1 2 番染色体上の長腕上のコンティグの方位、ならびに 3 7 個の S T S の順序も与えられる (ボックス内に示すか、または丸で囲んだ大文字で表記) 。図の上端にあるいくつかの S T S 記号のまわりの斜めの線および矢印は、特定の S T S が割り当てられている領域を示す。コスミドコンティグは大量でないことを認識すべきであり ; 黒い四角はコスミド末端の S T S を示しており、ここで内部コスミド配列に対応する S T S の存在は点で表現されている。長い範囲の制限地図 : B s : B s s H I I ; K : K s p I (= S a c I I) ; M : M l u I ; N : N o t I ; P : P v u I ; S f : S f i I 。図の末端に、詳細な制限地図において H M G I - C 遺伝子のエキソン (下記のボックス) を含んでいる領域が示されている。非コード領域が白抜きのボックスで、コード領域が黒のボックスで示す。イントロンの推定サイズ (k b) を表示する。H M G I - C 遺伝子中の翻訳開始コドン (A T G) および終止コドン (T A G) の相対位置ならびに可能性あるポリ - アデニル化信号を矢印で示す。詳細な制限地図 : B : B a m H I ; E : E c o R I ; H : H i n d I I I 。 M A R : 複合異常領域 ; D B D : D N A 結合ドメイン。 1=140A3, 2=202A1, 3=78F11, 4=80C9, 5=109B12, 6=148C12, 7=14H6, 8=51F8, 9=57C3, 10=86A10, 11=142G8, 12=154A10, 13=163D1, 14=42H7, 15=113A5, 16=191H5, 17=248E4, 18=33H7, 19=50D7, 20=68B12, 21=124D8, 22=128A7, 23=129F9, 24=181C1, 25=238E1, 26=69B1, 27=260C7, 28=156A4, 29=27E12, 30=46G3, 31=59A1, 32=101D8, 33=175C7, 34=185H2, 35=189C2, 36=154B12, 37=pRM150, 38=pRM144, 39=PKXL, 40=pRM147, 41=128A2, 42=142H1, 43=204A10, 44=145E1, 45=245E8, 46=154F9, 47=62D8, 48=104A4, 49=184A9, 50=56C2, 51=65E6, 52=196E1, 53=215A8, 54=147G8, 55=211A9, 56=22D8, 57=116B7, 58=144D12, A = STS 12-EM12(#U27145), I = STS 12-CH12(#U27153), Q = STS 12-RM120(#U27161), B = STS 12-EM30(#U27146), J = STS 12-EM10(#U27154), R = STS 12-RM118(#U27162), C = STS 12-EM14(#U27147), K = STS 12-EM37(#U27155), S = STS 12-RM119(#U27163), D = STS 12-EM31(#U27148), L = STS 12-RM146(#U27156), T = STS 12-EM2(#U27164), E = STS 12-CH11(#U27149), M = STS 12-RM145(#U27157), U = STS 12-EM4(#U27165), F = STS 12-EM18(#U27150), N = STS 12-RM151(#U27158), V = STS 12-EM3(#U27166), G = STS 12-EM11(#U27151), O = STS 12-EM16(#U27159), W = STS 12-EM15(#U27167), H = STS 12-CH10(#U27152), P = STS 12-EM1(#U27160), X = STS 12-EM17(#U27168), STS 12-CH5(#U27136), STS 12-CH9(#U27142), STS 12-RM33(#U27131), STS 12-RM53(#U27134), STS 12-RM76(#U27132), STS 12-RM86(#U27133), STS 12-RM98(#U26647), STS 12-RM99(#U27130), STS 12-RM103(#U26689), STS 12-RM130(#U27139), STS 12-RM132(#U27138), STS 12-RM133(#U27137), STS 12-RM151(#U27158)

【図 3】我々の以前の F I S H 研究に続く連続した実験において、8 個の脂肪腫、1 0 個の子宮平滑筋腫、および 8 個の多形態性唾液腺腫細胞系を含めた 1 2 番染色体 q 1 3 - q 1 5 異常を有する腫瘍細胞系で得られた F I S H 地図の図示。使用したプローブはファージクローン p R M 1 4 4 (対応する S T S : R M 8 6 および R M 1 3 0) および p R M 1

47 (RM151)、およびコスミドクローン7D3または152F2 (RM103)、154F9 (CH9)、27E12 (EM11)、211A9 (RM33)、245E8 (RM53)、185H2 (RM76)、202A1 (RM98)、142H1 (RM99)、154B12 (RM132)、および124D8 (RM133)。RM33およびRM98の間のDNA区間は約445 kbであると推定されている。点は、分子プローブとして上記のボックスで与えられたSTSを含むクローンを使用して、特定の細胞系の中期染色体上で行われたFISH実験を示す。線は、DNA区間を示し、特定の細胞系の切断点が位置づけられている。白抜きの三角形はFISH解析中に観察された欠失を示す。白抜きの丸は、細胞遺伝学的に正常な3番染色体上のハイブリダイゼーション信号と共にLi-501/SV40細胞の中期染色体上のFISH実験の結果を示す。MARの外に位置する腫瘍細胞系の12番染色体の切断点の位置は矢印で示す。LM-30.1/SV40およびLM-608/SV40の分子的にクローン化した切断点はアスタリスクで示す。コスミド27E12 (EM11)を分断している様々な子宮平滑筋細胞系中の切断点は『二重斜線』で示す。

10

【図4】HMG I - C遺伝子の一部およびLPP遺伝子の一部間の接合部位を含む3'-RACE産物。使用したプライマーおよび接合部位を示している。cDNA合成は内部的にプライムし、真のポリ(A)テイル上ではない。

【図5-1】LPP遺伝子の部分的cDNA配列

【図5-2】図5-1の続きを示す図である。

【図5-3】図5-2の続きを示す図である。

20

【図6】LPP遺伝子のアミノ酸配列。LIMドメインを四角で囲む。切断点を矢印で示す。

【図7-1】HMG I - C (U28749)であればヌクレオチド配列。Manfioletti et al. が提案した翻訳開始部位を図示。(67)を開始部位として任意に選択した。配列は完全なコード配列を含む。

【図7-2】図7-1の続きを示す図である。

【図8】実施例5に記載のようにして得たPCR産物のゲル。

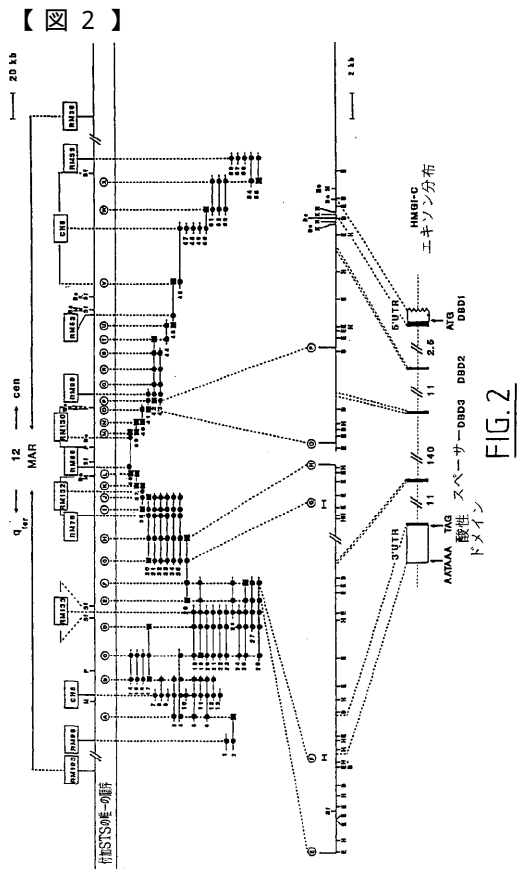


FIG. 2

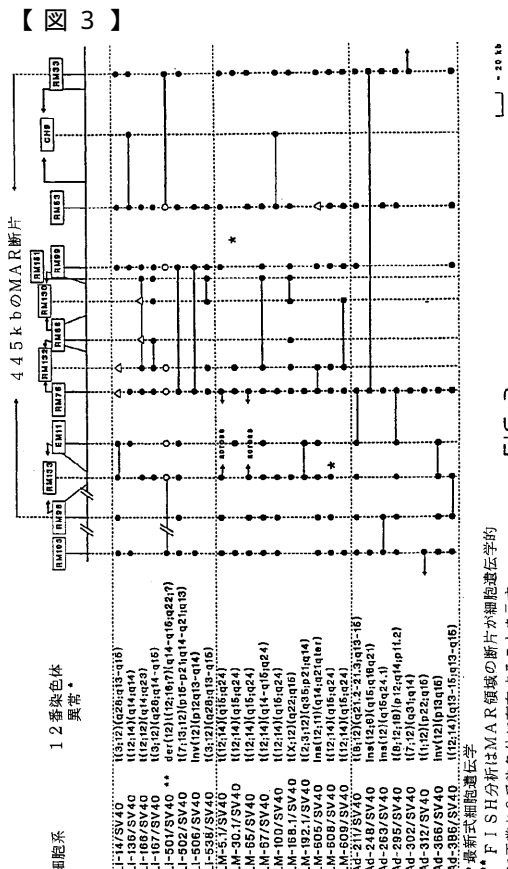


FIG. 3

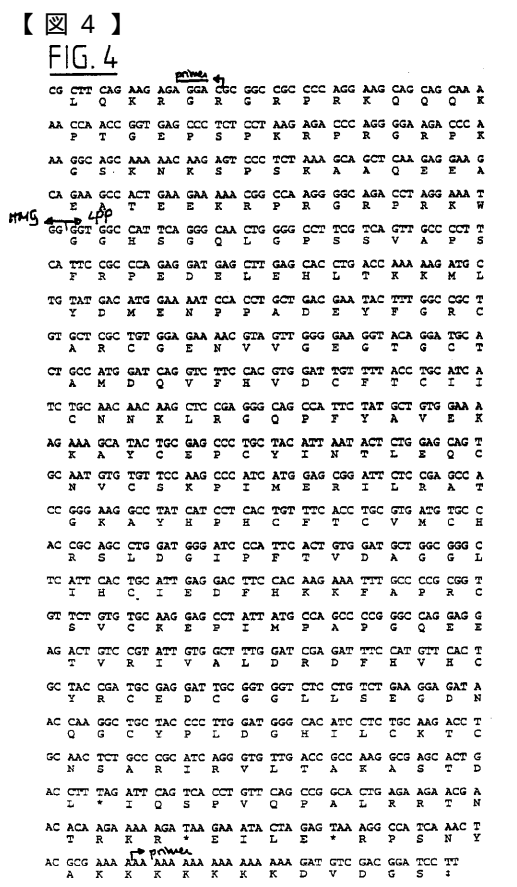


FIG. 4



FIG. 5-1

FISH分析はMAR領域の断片が細胞遺伝学的に正常な3番染色体に存在することを示す。

最新式細胞遺伝学

【 5 - 2 】
FIG. 5-2

GTGGAAAGR AAGCATACTG CGAGCCCTGC TACATTAATA CTCTGGAGCA GTGCAATGTG 1680
TGTTCACAGC CCATCATGGA GCGGATCTCT CGAGCCACCG GGAAGSCOTA TCATCCTCAC 1740
TGTTCACACT GGTGATGTTG CCACCGCAGC CTGGATGGGA TOCCATTCAC TGTGGATGCT 1800
GGCGGGTCA TFCACAGCAT TTAGGACTTC CACAGAAAT TGGCCCGCGG GTGTTCCTGT 1860
TGCANGAGC CTATATGTCG AGUCGCGCGG CAGGAGGAGA CTCTCCGATG TGTGGCTTTG 1920
GATCGAGATT TCCAATGTTA GTCGATCCGA TCGGAGGATT GCGGTGCTCT CCTCTCGAAA 1980
GGAGATAACC AAGGCTGCTA CCGCTTGGAT GGGCACATCC TGTGCAAGAC CTGCAACTCT 2040
GCCCGCATCA GGTGTGTCAG CCGCAAGGCG AGCACTGACC TTAGATTTCA GTACCCCTTT 2100
CAGCCGGCAC TGAAGAGAC GAACCAAGA AAAAGATAAG AATACTAGA GTAAAGGCCA 2160
TCAAACTACG CGATAGTCTC TGTCTTCTAT CTGCTATATA CCTTGGCTTA GAAACACATA 2220
AATRTGAGA TTTTCTTTA AAGTGTGTA CCAAAATAC ACATTCACAT GAATCATGTA 2280
GGATCTTGA GGGCCTTTG TCCCAAGAC TCCGACATTT TCGACAGAT TATGCTCCAT 2340
CCCTTCACT CTGCACTCT GAACTTTTGA ATCCCTATGT TTTTCTCAT TTTTCACTGG 2400
TGAATGGCT TTTCTTAGG TGTGATTTGC TGTCAACAG TTTTTCCTG GGTGAGTCTG 2460
CCAACATCA GGTGCTTTA GGTCTGAAT TGTCACTTGA TCAATTCCTG TTTGCTCTG 2520
ACTGTAAAG GTAGCCATTC TTTTCCAGG TATTGAAGG GATATCTTC TGTGCTTTA 2580
TACTACTCAC GTCTTGGGG AGGAAATGC ACAATTTTT TTTTGTAGG TGTAAAGAA 2640
TTAAGTGTG AATYACATA GTTGAACAA GCCCAATTT AATTGCAAC CATCAGAAT 2700
CGAATCTAT AGTAGCAAT GATCAAGCTT AATTTGAAA GAGTTATCG CCGATAGCTA 2760
ATAAGTAGT ACAGACACC AAGCTTCAAT ATTTTTCTAA AGAAATACA GGTGGGAT 2820
GCTAGAAAAG GCATTTTGGG GTATGTTTAA AAAAATCAT ATTTGCCCAC AATATTACT 2880
TAAGTTTTT CTTTCCGCA CTACCTGAAC ATTTAATAC AGACAACTT GATTTCTCT 2940
AGAAGTAAAC ATTTTCAATA CTCTCCACT TGTCACTTA AAAATATGT CATCTTAT 3000
CTAATATCCA ACGCAACTT CAAAATGCT TTTTCTATA GAGGATGAG GCTGTGAAA 3060
AACGCTTCAA ATCTCTCTT TTTTCTTTT TATTACCAG TCAATTTTC CTGACAAITG 3120
CAATCAGAG CATAAATAA AATCTGTCG AGTTTTGTT GGTTACTTT CAAAAGATA 3180
GAAGCTTGA AAGATTCTG AATTCACAT TTTCTATTC TCAATCTCT TGTGCAACTG 3240
AAATACATA TCGAGGAGA CAATTCATA TGTCAATGT GACATTTACA CCGACTTTC 3300
AAAGACAATC ACTGAAACA AATTTCTCT TATGAGTAA AATATGAGC AATCTCTCC 3360

【 5 - 3 】
FIG. 5-3

TGAACTTCT ATTCAACTT TTAATAGCA GTGAAACCT TGCTTGCAC CTGCCAAGCC 3420
ATACTTATA AGTTGGAACA TGTTCACAT AAGGAGAGAC ACCTAGCTTA GTCATGGCAA 3480
GTTGCCATT TGTAACTAA GGTATTTGGA CTGAGATTTT TAAATCTTT CTTCAAATCT 3540
CCCAACATA TACTACTTAA AATATGAGG TATTTTAACT CTACAAAAG GTATAAATA 3600
TAATATAAG AATTCCTATA TACCTAATC CCAATTTAAG ACACCAATA TAACAAGTAT 3660
AATTCATCC TCAATGATC GGTCTCTTA TCCACAGAT ATCTTTTCA TTTATGTGAA 3720
GTATGTTCA GATTTCTGT TTTTCTTCT AGTTTTHAT TTTACATCA GAACCTGAAT 3780
AAAAAATAT GATACCTGT TTTGAATTC AALATATCC TCAAGGATTC CAATTAAT 3840
TATTTTACT GAATAGGAT GATCATAAA GTGATTTCT TTTTGTACT AGAATCTCT 3900
AAGCCGATG TCACTAAGC TCACTCTAA TGTATGGCT ATTTGCTTT GTCACTAAC 3960
GGTTTTGTG TAGAACACC AAAATATAG CTATTAGAG CTCTCTTGA CCACTGACT 4020
TTTCTACCC TACTCTCTT ATCTTTGATG GATATTTCT CATAAGTGA AATATGATG 4080
GATTCATTA GGGGAGCAT GTTATTTTG GGAGGCAAT TCAATCTGT CTCTGAATTC 4140
CTGTCTTCA AATTTAGCC AGACACTGT GATGACCTA AGTAGCACTG ACTATTTGAC 4200
AATAGGCTG AATAGTAA CCGCTGAAT TTTGACTTA TAACTTTA TGTAACTCT 4260
TCGGAGAAAT TCTTTTAGC ACAAAGCAG GATCCAAAT TATTAGGGA TAGATGTAT 4320
CTC 4323

【 6 】
FIG. 6

MSHPSMLPFKSTGEPLGHVPRMETHSFGNPSLSVSTQPPAKFAPVVPKPKY
NPKYQPGGDEFLPPPPFLDDSSALPISGNFPPPPFLDEEAKVQNGPGRKL
KERRSLDAEIDSLTSLADLECSSPKPKRPPQSTGTAAPVFPVTPVTKRNV
IENQPLTAKRSLKPKPQAGLIEVAPLGLTKPQPFVPSYITASTSRPT
FNVQVSAQPSFHYMAAPSSGQIYGGSGQYNTQPVFVSGQCFPPSTGRMDYAF
LFPFGLQEPFGYIAPNQGRYYEYAAAGPGYGRNDSEYITGQGHFNKRFP
GTFPPGAGNPNPMPYVTEPKRITLIDFVSAPCAPLQKGGHSGQLGSSVAP
LIM 2
SERFEDELEHAKKMLYDMPNPADEYFRCARCENVVGGPCTAMQVPHV
LIM 3
CFCTICMNLKRGPFYAVEKKAJCEPCTYITLQCNVCSKPFMERILRATGKAY
LIM 5
HFHCPTVMCHRSLDGLPFTVDAGLLHCLIEDFKKFAPELCSVCKEPLMPAPGQE
LIM 5
ETVRIVALDRDFVHCYRCEDCGLLSEGDNGCYFLDGLLCKTNCARIRVLT
AKASTDL*

【 7 - 1 】
FIG. 7-1

BASE COUNT 1119 a 988 o 791 g 1169 t
GCGGCT 1
1 cttgtaattt ggggggaa cctgaaaac ttcagagcc ggcagagcc gttgtgtg 1
61 agaatagga gtagagaa gttocccct agatctctg gtcgagcc gtcgipoto 1
121 ggcataoela gggggagay tgcacacac Lactotctg tgcgagcc gtcgipoto 1
181 ggcataoela gggggagay tgcacacac cctttctct cccatctct agggatct 1
241 aatataat cctctctct cctctctct cctctctct cctctctct cctctctct 1
301 tctctctct ggcagagay ggcagagay ggcagagay tttccccc taactctct 1
361 ggcagagay tgcacacac gttocccct ttcagagcc gttocccct gttocccct 1
421 ggcagagay tgcacacac gttocccct ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
481 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
541 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
601 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
661 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
721 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
781 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
841 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
901 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
961 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
1021 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
1081 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
1141 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
1201 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
1261 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
1321 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
1381 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
1441 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
1501 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
1561 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
1621 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
1681 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
1741 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
1801 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
1861 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
1921 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
1981 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
2041 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
2101 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
2161 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
2221 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
2281 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
2341 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
2401 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
2461 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
2521 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
2581 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
2641 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
2701 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
2761 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
2821 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
2881 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
2941 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
3001 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
3061 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
3121 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
3181 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
3241 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
3301 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1
3361 ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay ggcagagay 1

【 7 - 2 】
FIG. 7-2

3721 acagtaaga uatuuuuaa tttttata tategttat ttttggga gataatit
3781 ataggatgt tttttgtt gttttgtt gttttgtt gttttgtt gttttgtt
3841 gttttgtt gttttgtt gttttgtt gttttgtt gttttgtt gttttgtt
3901 gttttgtt gttttgtt gttttgtt gttttgtt gttttgtt gttttgtt
3961 gttttgtt gttttgtt gttttgtt gttttgtt gttttgtt gttttgtt
4021 gttttgtt gttttgtt gttttgtt gttttgtt gttttgtt gttttgtt

【 8 】

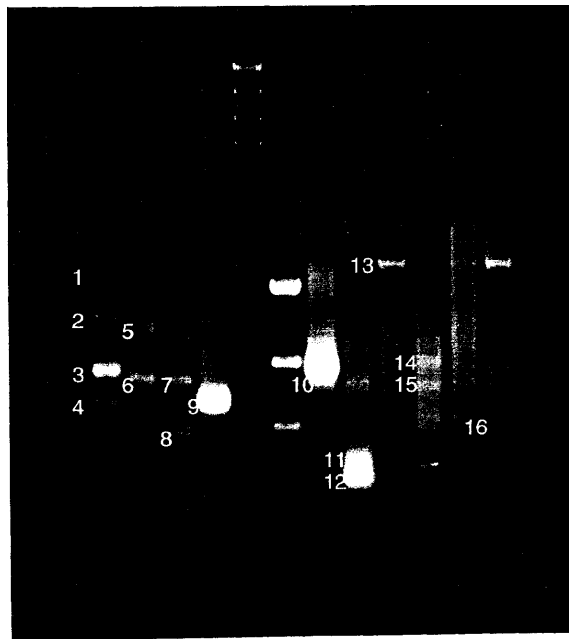


FIG. 8

【手続補正書】

【提出日】平成19年12月6日(2007.12.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

L I Mタンパク質遺伝子(その修飾体を含む)の成員の一つの鎖の一つのヌクレオチド配列を有する多重腫瘍異常生長(M A G)遺伝子。

【請求項2】

図5に示されたL P P遺伝子のヌクレオチド配列またはその相補的鎖(両鎖の修飾体または伸長体を含む)を基本的に有する、請求項1の多重腫瘍異常生長因子。

【請求項3】

ヒトまたは動物における非生理的増殖現象の処置のための適切な発現調節の化合物または技術を設計するための開始点として使用する、請求項1または2の多重腫瘍異常生長因子。

【請求項4】

非生理的増殖能を有する細胞を野生型細胞と比較して(臨床的に/医学的に)診断するための適切なヌクレオチド・プローブを設計するための開始点として使用する、請求項1または2の多重腫瘍異常生長因子。

【請求項5】

非生理的増殖能を有する細胞を野生型細胞と比較して(臨床的に/医学的に)診断するための適切な抗体を製造するための開始点として使用する、請求項1または2の多重腫瘍異常生長因子。

【請求項6】

M A G遺伝子の誘導体がセンスおよびアンチセンスc D N Aまたはそのフラグメント、該遺伝子の転写物またはその実際に用い得るフラグメント、アンチセンスR N A、該遺伝子のフラグメントまたはその相補的鎖、該遺伝子よりコードされたタンパク質またはそのフラグメント、該遺伝子、該c D N A、該転写物、該タンパク質またはそれらのフラグメントに対する抗体および抗体フラグメントからなる群より選ばれ、診断および治療的組成物の調製に使用される、請求項1または2のM A G遺伝子の、またはその直接の近隣の誘導体。

【請求項7】

下記の段階

a) 請求項1または2のM A G遺伝子のヌクレオチド配列から得られる情報に基づく1セットのヌクレオチド・プローブを設計する(該プローブの一つは、野生型遺伝子の対応領域として、同じ座に実質的に位置する異常遺伝子の領域にハイブリダイズ可能であり、他のプローブは、野生型遺伝子の対応領域より異なる座に位置する異常遺伝子の領域にハイブリダイズ可能である)段階、

b) 非生理的増殖能を有する1以上の中間層または間層染色体または細胞をプローブと共にハイブリダイズ条件でインキュベートする段階、

c) プローブと遺伝子とのハイブリダイゼーションを可視化する段階、

の少なくともいくつかを含む、非生理的増殖能を有する細胞を診断するためのインサイトウ診断法。

【請求項8】

下記の段階

a) 診断すべき細胞の生検を採取する段階、

b) 前記生検より適当なM A G遺伝子関連マクロ分子を単離する段階、

c) 前記得られたマクロ分子を望ましくは同じ個体からの野生型参考分子と比較することにより分析する段階、
 の少なくともいくつかを含む、非生理的増殖能を有する細胞を診断する方法。

【請求項 9】

下記の段階

a) 診断すべき細胞の生検を採取する段階、
 b) 前記生検の全 RNA を抽出する段階、
 c) 全 RNA 抽出物中の mRNA 種の少なくとも一つの第一鎖 cDNA (cDNA は適当なテイルを有する) を調製する段階、
 d) MAG 遺伝子特異 cDNA を増幅するために、MAG 遺伝子特異プライマーおよびテイル - 特異および / または相手特異 / 整列プライマーを用いて PCR および / または RT - PCR を行う段階、
 e) バンドのパターンを得るために、ゲル上で PCR 産物を分離する段階、
 f) 異常バンドの存在を、望ましくは同じ個体からの野生型バンドとの比較により調べる段階、
 の少なくともいくつかを含む、請求項 8 の方法。

【請求項 10】

下記の段階

a) 診断すべき細胞の生検を採取する段階、
 b) 前記生検から全タンパク質を単離する段階、
 c) 基本的に個々のバンドを得るためにゲル上で全タンパク質を分離し、そして任意でバンドをウエスタン・プロットに移行する段階、
 d) 前記得られたバンドを、MAG 遺伝子の残り部分によりコードされるタンパク質の部分に対する、および MAG 遺伝子の置換部分によりコードされたタンパク質の部分に対する抗体と共にハイブリダイズする段階、
 e) 抗原 - 抗体反応を可視化し、望ましくは同じ個体の野生型タンパク質のバンドと比較して、異常バンドの存在を確認する段階、
 の少なくともいくつかを含む、請求項 8 の方法。

【請求項 11】

下記の段階

a) 診断すべき細胞の生検を採取する段階、
 b) 前記生検から全 DNA を単離する段階、
 c) 前記 DNA を 1 以上のいわゆる “希切断” 制限酵素で消化する段階、
 d) 分離パターンを得るために、前記調製した消化物を分離する段階、
 e) 任意で分離パターンをサザンプロットに移行する段階、
 f) ゲル中またはプロット上の分離パターンを 1 以上の情報プローブと共にハイブリダイズ条件でハイブリダイズする段階、
 g) ハイブリダイゼンションを可視化し、望ましくは同じ個体からの野生型タンパク質のバンドとの比較で異常バンドの存在を確認する段階、
 の少なくともいくつかを含む、請求項 8 の方法。

【請求項 12】

下記の段階

a) 診断すべき細胞の生検を採取する段階、
 b) 前記生検から mRNA を抽出する段階、
 c) MAG 遺伝子から誘導される mRNA の存在または (比較の) 量を確認する段階、
 d) 段階 c) の結果を望ましくは同じ個体からの野生細胞での同様の実験結果と比較する段階、
 の少なくともいくつかを含む、請求項 8 の方法。

【請求項 13】

非生理的増殖能を有する細胞が、間葉腫瘍過誤腫 (例えば乳房および肺)、脂肪性組織

腫瘍（例えば脂肪腫）、多形態性唾液腺腫、子宮平滑筋腫、血管筋腫、胸部線維腺腫、子宮内膜のポリープ、動脈硬化性プラークおよび他の良性腫瘍、さらに肉腫（例えば横紋筋肉腫、骨肉腫）および癌腫（例えば乳房、肺、皮膚、甲状腺の）などの種々の悪性腫瘍、さらに白血病およびリンパ腫のような血液学的悪性腫瘍からなる群より選択される、請求項 7 - 1 2 のいずれかの方法。

【請求項 1 4】

非生理的増殖能を有する細胞が関与する疾患を該遺伝子の発現を調節することにより処置するのに用いる、請求項 1 または 2 の M A G 遺伝子のアンチセンス分子。

【請求項 1 5】

非生理的増殖能を有する細胞が関与する疾患の処置に用いる、請求項 1 または 2 の M A G 遺伝子の阻害剤または促進剤（リボチームを含む）などの発現調節剤。

【請求項 1 6】

非生理的増殖能を有する細胞が関与する疾患の処置に用いる、請求項 1 または 2 の M A G 遺伝子の m R N A 分子に相補的なアンチセンス R N A 分子および / または M A G 遺伝子の遺伝子産物に対する抗体。

【請求項 1 7】

標識ヌクレオチド・プローブの適当なセットを含む、請求項 7 の方法を実施するための診断キット。

【請求項 1 8】

標識ヌクレオチド・プローブの適当なセットを含む、請求項 9 の方法を実施するための診断キット。

【請求項 1 9】

標識 M A G 遺伝子特異的およびテイル特異的 P C R プライマーの適当なセットを含む、請求項 1 0 の方法を実施するための診断キット。

【請求項 2 0】

標識プローブの適当なセットおよび適当な希切断制限酵素を含む、請求項 1 0 の方法を実施するための診断キット。

【請求項 2 1】

請求項 6 の誘導体を 1 以上および / または請求項 1 5 の発現調節剤を 1 以上含む、非生理的増殖能を有する細胞における M A G 遺伝子発現レベルを低下せしめるための医薬組成物。

【請求項 2 2】

非生理的増殖能を有する細胞が、間葉腫瘍過誤腫（例えば乳房および肺）、脂肪性組織腫瘍（例えば脂肪腫）、多形態性唾液腺腫、子宮平滑筋腫、血管筋腫、胸部線維腺腫、子宮内膜のポリープ、動脈硬化性プラークおよび他の良性腫瘍、さらに肉腫（例えば横紋筋肉腫、骨肉腫）および癌腫（例えば乳房、肺、皮膚、甲状腺の）などの種々の悪性腫瘍、さらに白血病およびリンパ腫のような血液学的悪性腫瘍からなる群より選択される、請求項 2 1 の医薬組成物。

【請求項 2 3】

非生理的増殖能を有する細胞に関連する疾患または障害の診断または処置のための診断キットまたは医薬組成物の製造のための請求項 6 の誘導体の使用方法。

【請求項 2 4】

非生理的増殖能を有する細胞に関連する疾患または障害の診断または処置のための診断キットまたは医薬組成物の製造のための請求項 1 5 の発現調節剤の使用方法。

【請求項 2 5】

非生理的増殖能を有する細胞が、間葉腫瘍過誤腫（例えば乳房および肺）、脂肪性組織腫瘍（例えば脂肪腫）、多形態性唾液腺腫、子宮平滑筋腫、血管筋腫、胸部線維腺腫、子宮内膜のポリープ、動脈硬化性プラークおよび他の良性腫瘍、さらに肉腫（例えば横紋筋肉腫、骨肉腫）および癌腫（例えば乳房、肺、皮膚、甲状腺の）などの種々の悪性腫瘍、さらに白血病およびリンパ腫のような血液学的悪性腫瘍からなる群より選択される、請求

項 2 3 および 2 4 の使用方法。

【請求項 2 6】

分子ツール（プローブ、プライマーなど）を設計するための M A G タンパク質の少なくとも一部分を用いて腫瘍細胞における融合遺伝子、融合転写物または融合タンパク質の存在に基づく他の M A G 遺伝子を単離するための方法。

【請求項 2 7】

請求項 2 6 の方法により得られる M A G 遺伝子。

【請求項 2 8】

診断的または治療的方法に使用するための請求項 2 7 の M A G 遺伝子。

【請求項 2 9】

動物がそのゲノムに M A G 遺伝子を所有する形質転換動物である、非生理的増殖能を有する細胞に関連する疾患または障害の処置における化合物または組成物の有用性検定のための動物モデル。

【請求項 3 0】

M A G 遺伝子が、遺伝子の残り部分およびその転座相手の置換部分の融合産物などの異常 M A G 遺伝子である、請求項 2 9 の動物モデル。

【請求項 3 1】

M A G 遺伝子が非生理的発現レベルを示す、請求項 2 9 の動物モデル。

【請求項 3 2】

動物がその細胞の、少なくとも部分のゲノムにおいて請求項 1 または 2 の M A G 遺伝子に影響を及ぼす特異的遺伝子異常を所有し、その異常が胚胎幹細胞における相同組換えを經由して誘導される、非生理的増殖能を有する細胞に関連する疾患または障害の処置における化合物または組成物の有用性検定のための動物モデル。

【請求項 3 3】

動物が哺乳動物、特にマウス、ラット、イヌ、ブタまたはチンパンジーのような高等霊長動物である、請求項 2 9 - 3 2 のいずれかの動物モデル。

【請求項 3 4】

表 2 および図 5 に開示したポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド・プローブおよびプライマー。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 1】

本発明は、種々の良性および悪性いずれの腫瘍にも見られる異常細胞生長にしばしば関連する遺伝子ファミリーとして、高速移動群（HMG）タンパク質遺伝子ファミリーの同定に関する。本発明は特に、多くの腫瘍に關与する広範な作用の 1 2 番染色体切断点領域遺伝子として、多くの HMG 遺伝子ファミリーの同定に関する。これらの腫瘍には、限定はしないが、間葉腫瘍過誤腫（例えば乳房および肺）、脂肪腫、多形態性唾液腺腫、子宮平滑筋腫、血管筋腫、胸部線維腺腫、子宮内膜のポリープ、動脈硬化性プラークおよび他の良性腫瘍、さらに肉腫（例えば横紋筋肉腫、骨肉腫）および癌腫（例えば乳房、肺、皮膚、甲状腺の）などの種々の悪性腫瘍、さらに白血病およびリンパ腫が含まれる。本発明は、また 6 番染色体の切断に關連するのが見い出された HMG 遺伝子ファミリーの他の成員にも關する。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 0 2 8 】

他の実施態様において、該方法は、診断すべき細胞の生検を採取し、それから全タンパク質を単離し、ゲル上でタンパク質を分離して基本的に個人のバンドを得、任意でバンドをウエスタン・プロットに転移し、得たバンドを、MAG遺伝子の残りの部分によりコードされるタンパク質の部分に対する、およびMAG遺伝子の置換部分によりコードされるタンパク質の部分に対する抗体と共にハイブリダイズし；抗原-抗体反応を可視化し、そして異常バンドの存在を、野生型タンパク質からのバンド、望ましくは同じ個体から得たバンドと比較して確認する段階を含む。

【 手 続 補 正 4 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 2 9

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 0 2 9 】

更なる実施態様において、該方法は、診断すべき細胞の生検を採取し、その全DNAを単離し、1以上のいわゆる"希切断"制限酵素(典型的には"6-または以上の切断")をもってDNAを消化し、ゲル上に調製された消化物を分離して、分離パターンを得、任意で分離パターンをサーザン・プロットに転移し；ゲル中またはプロット上の分離パターンを一組のプローブとハイブリダイズ条件でハイブリダイズし；ハイブリダイゼーションを可視化し、そして異常バンドの存在を野生型バンド、望ましくは同一個体から得たバンドとの比較により確認する段階を含む。

【 手 続 補 正 5 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 3 2

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 0 3 2 】

本発明の診断方法は、非生理的増殖能を有する細胞が間葉腫瘍過誤腫(例えば乳房および肺)、脂肪性組織腫瘍(例えば脂肪腫)、多形態性唾液腺腫、子宮平滑筋腫、血管筋腫、胸部線維腺腫、子宮内膜のポリープ、動脈硬化性プラークおよび他の良性腫瘍、さらに肉腫(例えば横紋筋肉腫、骨肉腫)および癌腫(例えば乳房、肺、皮膚、甲状腺の)などの種々の悪性腫瘍からなるグループから選択される疾患に用いられる。本発明は、いわゆる良性または悪性固形腫瘍の診断および治療に限定されず、その原理は、白血病およびリンパ腫のような血液学的悪性腫瘍にも適用できることが分かった。

【 手 続 補 正 6 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 1 2 1

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 1 2 1 】

STS 12-	5'-3'	bp
CH1	tgggactaacggattttcaa tgtggttcattcatgcatta	213
CH2	tccatcatcatctcaaaaca ctctaccaaataaataaacag	145
CH5	gcagctcaggctccttccca tggcttctgaaacgcgaga	143
CH8	tctccactgcttccattcac acacaaaaccactgggggtct	147
CH9	cagctttggaatcagtgagg cctggggaagaggagtaaag	262
RM1	gagcttcctatctcatcc atgcttggtgtgagtgagg	308
RM4	tttgctaagctaggtgcc agcttcaagacccatgag	235
RM5	cagttctgagactgcttg taatagcagggactcagc	324
RM7	cttgtctcattcttttaaagg cacccttttagatcctac	533
RM13	gaatgttcatcacagtgctg aatgtgaggttctgctgaag	±500
RM14	ttctcatgggtaaggacag aaagctgcttatataggaatc	158
RM16	ccttggttagatatgatacac gctcttcagaaatcctatgg	252
RM21	ccttagcagttgcttgtctg tcgtcacaggacatagtcac	290
RM26	tctatggtatgttatacaagatg cagtgagatcctgtctcta	102
RM31	tctgtgatgttttaagccacttag aattctgtgtccctgccacc	239
RM33	attcttcctcacctcccacc aatctgcagagaggtccagc	±600
RM34	aattctccatctgggcctgg gaacgctaagcatgtgggag	±600
RM36	ctccaaccatggtccaaaac gacctccagtggctcttttag	296
RM46	accatcagatctggcactga ttacattggagctgtcatgc	241
RM48	tccaggacatcctgaaaatg agtatcctgcacttctgcag	391
RM51	gatgaactctgaggtgcctc tcaaaccagctttgactcc	311
RM53	gtcttcaaaacgctttcctg tggtttgcataatggtgatg	333
RM60	tacactactctgcagcacac tctgagtcaatcacatgtcc	94
RM69	ctcccagatgatctctttc cggtaggaaataaaggagag	236
RM72	tatttactagctggccttgg catctcaggcacacacaatg	101
RM76	attcagagaagtggccaagt	496

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 2 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 2 2】

	gggataggtcttctgcaatc	
RM85	tccaacaatactgagtgacc	435
	tccatttcaactgtagcactg	
RM86	gtaatcaaccattcccctga	203
	aaaatagctggatgggaggc	
RM90	actgctctagttttcaagga	257
	aatttacctgacagtttcct	
RM93	gcatttgacgtccaatattg	347
	attccattggctaacaacaag	
RM98	gcaaaactttgactgaaacg	356
	cacagagtatcgactgcat	
RM99	aagagatttcccatgttgtg	240
	ctagtgccttcacaagaacc	
RM103	aattcttgaggggttcaactg	199
	tccacactgagagcttttca	
RM108	gtggttctgtacagcagtgg	439
	tgagaaaatgtctgccaat	
RM110	gctctaccaggcatacagtg	328
	attcctagcatcttttcacg	
RM111	atatgcattaggctcaacc	312
	atcccacaggtcaacatgac	
RM130	atccttacatttccagtggcattca	336
	cccagaagaccacattcctcat	
RM131	ttttaagtttctccagggaggagac	226
	aataggctctttggaagctggagt	
RM132	tctcagcttaatccaagaaggacttc	376
	ggcatattcctcaacaatttatgctt	
RM133	tggagaagctatgggtgcttcctatg	225
	tgacaaataggtgagggaaagtgttat	
EST01096	tcacacgctgaatcaatctt	188
	cagcagctgatacaagcttt	
IFNG	tgttttctttcccgataggt	150
	ctgggatgctcttcgacctc	
Rap1B	ccatccaacatcttaaatggac	149
	cagctgcaaactctaggactatt	

【手続補正 8】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 7 - 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 図 7 - 1 】

Figure 7

```

1  cttgaatcctt  ggggcaggaa  ctcaaaaaac  ttccagcccg  ggcagcgcgc  gcttgggtgca
61  agactcagga  gctagcagcc  cgtccccctc  cgactctccg  gtgccgcgcg  tgccctgctcc
121  cgccacccta  ggaggcgcgg  tgccaccacc  tactctgtcc  tctgctgtg  ctccgtgccc
181  gaccctatcc  cggcggagtc  tccccatcct  cctttgcttt  ccgactgcc  aaggcacttt
241  caatctcaat  ctctctctc  tctctctctc  tctctctgtc  tctctctctc  tctctctctc
301  tctctctctc  gcaggggtgg  gggaagagga  ggaggaattc  tttccccgcc  taacatttca
361  agggacacaa  ttcactcaa  gtctcttccc  tttccaagcc  gcttccgaag  tgctccgggt
421  gcccgcaact  cctgatcca  acccgcgaga  ggagcctctg  cgacctcaa  gcctctcttc
481  cttctccctc  gcttccctcc  tcctcttgct  acctccacct  ccaccgccac  ctccacctcc
541  ggcaccacc  caccgcgcg  gccgccaccg  gcagcgctc  ctctctctct  cctcctcctc
601  ccctcttctc  tttttggcag  ccgctggacg  tccggtggtg  atggtggcag  cggcggcagc
661  ctaagcaaca  gcagccctcg  cagcccgcc  gctcgcgctc  gccccgccgg  cgtccccagc
721  cctatcacct  catctcccga  aaggtgctgg  gcagctccgg  ggcggtcgag  gcgaagcggc
781  tgcagcggcg  gtacggcg  cgggagcgag  gatgagcgca  cgcggtgagg  gcgcggggca
841  gccgtccact  tcagcccag  gacaacctgc  cgccccagcg  cctcagaaga  gaggacgcgg
901  ccgccccagg  aagcagcagc  aagaaccaac  cggtgagccc  tctcctaaga  gacccagggg
961  aagacccaaa  ggcagcaaaa  acaagagtcc  ctctaaagca  gctcaaaaaga  aagcagaagc
1021  cactggagaa  aaacggccaa  gaggcagacc  taggaaatgg  ccacaacaag  ttgttcagaa
1081  gaagcctgct  caggaggaaa  ctgaagagac  atcctcaca  gactctgccg  aagaggacta
1141  gggggcgcaa  cgttcgattt  ctacctcagc  agcagttgga  tcttttgaag  ggagaagaca
1201  ctgcagtgc  cacttattct  gtattgccat  ggtctttcca  ctttcatctg  ggtgggggtg
1261  ggggtgggggtg  ggggaggggg  ggggtgggggtg  gggagaaatc  acataacctt  aaaaaggact
1321  atattaatca  ccttctttgt  aatcccttca  cagtcccagg  tttagtgaag  aactgctgta
1381  aacacagggg  acacagctta  acaatgcaac  ttttaattac  tgttttcttt  tttcttaacc
1441  tactaatagt  ttgttgatct  gataagcaag  agtgggcggg  tgagaaaaac  cgaattgggt
1501  ttagtcaatc  actgcactgc  atgcaaaaa  gaaacgtgtc  acacttgtga  cgtcgggcac
1561  tcatatagga  agaacgcggg  gtgtaacct  gtgtacacct  caaataccac  ccaaacccac
1621  tccctgtagt  gaatcctctg  tttagaacac  caagataag  gactagatac  tactttctct
1681  ttttctgata  atctgtaga  cacttacttg  atgattttta  actttttatt  tctaaatgag
1741  acgaaatgct  gatgtatcct  ttcattcagc  taacaaacta  gaaaagggta  tgttcaattt
1801  tcaaaaaggg  aagtaagcaa  acaaatattg  ccaactcttc  tatttatgga  tatcacacat
1861  atcagcagga  gtaataaatt  tactcacagc  acttgttttc  aggacaacac  ttcattttca
1921  ggaaatctac  ttctacaga  gccaaaatgc  catttagcaa  taataaacac  ttgtcagcct
1981  cagagcattt  aaggaaacta  gacaagtaaa  attatcctct  ttgtaattta  atgaaaagg
2041  acaacagaat  aatgcatgat  gaactcacct  aattatgagg  tgggaggagc  gaaatctaaa
2101  tttcttttgc  tatagttata  catcaattta  aaaagcaaaa  aaaaaaggg  gggggcaatc
2161  tctctctgtg  tcttctctc  tctctctccc  tctccctctc  tcttttcatg  tgtatcagtt
2221  tccatgaaag  acctgaatac  cacttacctc  aaattaagca  tatgtgttac  tcaagtaat
2281  acgttttgac  ataagatggt  tgaccaaggt  gcttttcttc  ggcttgagtt  caccatctct
2341  tcattcaaac  tgcactttta  gccagagatg  caatataatc  ccactactca  ataactactc
2401  tgaatgttac  aacgaattta  cagtctagta  cttattacat  gctgctatac  acaagcaatg
2461  caagaaaaaa  acttactggg  taggtgattc  taatcatctg  cagttctttt  tgcactta
2521  attacgttta  aagaagcaat  ctccttactg  tgtttcagca  tgactatgta  ttttctatg
2581  tttttttaat  taaaatttt  taaaatactt  gtttcagctt  ctctgctaga  tttctacatt
2641  aacttgaaaa  ttttttaacc  aagtgcctcc  taggttctta  aggataaatt  tcctcaatca
2701  cactacacat  cacacaagat  ttgactgtaa  tatttaata  ttaccctcca  agtctgtacc
2761  tcaaatgaat  tctttaagga  gatggactaa  ttgacttgca  aagacctacc  tccagacttc
2821  aaaaggaaatg  aacttgttac  ttgcagcatt  cttttgtttt  ttcaatgttt  gaaatagttc
2881  aaactgcagc  taaccctagt  caaaactatt  tttgtaaaag  acatttgata  gaaaggaaca
2941  cgtttttaca  tacttttgca  aaataagtaa  ataataaata  aaataaagcc  aacctcaaaa
3001  gaacttgaag  ctttgtaggt  gagatgcaac  aagccctgct  tttgcataat  gcaatcaaaa
3061  atatgtgttt  ttaagattag  ttgaatataa  gaaaatgctt  gacaaatatt  tcatgtatt
3121  ttacacaaat  gtgatttttg  taatatgtct  caaccagatt  tattttaaac  gcttcttatg
3181  tagagttttt  atgcctttct  ctctagtga  gtgtgctgac  tttttaacat  ggtattatca
3241  actgggccag  gaggtagttt  ctcatgacgg  cttttgtcag  tatggctttt  agtactgaag
3301  ccaaatgaaa  ctcaaaacca  tctctcttcc  agctgcttca  gggaggtagt  ttcaaggcc
3361  acatacctct  ctgagactgg  cagatgcctc  actggtgtga  atcaccaaa  gagctatgga
3421  gagaattaaa  ctgacaact  actgttaact  gtgcgttaaa  taagcaata  aacagtggct
3481  cataaaaaata  aaagtgcgat  tccatatctt  tggatgggcc  ttttagaaac  ctcatggcc
3541  agctcataaa  atggaagcaa  ttgctcatgt  tggccaaaca  tggtgaccgc  agtgatttcc
3601  atctctggta  aagttacact  tttatttct  gtatgttgta  caatcaaac  aactactac

```

【手續補正9】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図7 - 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図7 - 2】

```
3661 ctcttaagtc ccagtatacc tcatttttca tactgaaaaa aaaagcttgt ggccaatgga
3721 acagtaagaa catcataaaa tttttatata tatagtttat ttttgtggga gataaathtt
3781 ataggactgt tctttgctgt tgttggctgc agctacataa gactggacat ttaacttttc
3841 taccatttct gcaagttagg tatgtttgca ggagaaaagt atcaagacgt ttaactgcag
3901 ttgactttct cctgttcoot ttgagtgtct tctaacttta ttctttgttc tttatgtaga
3961 attgctgtot atgattgtac tttgaatcgc ttgcttggtg aaaatatttc tctagtgtat
4021 tatcactgtc tgtttctgcac aataaacata acagcctctg tgatccc
```

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
	A 6 1 P 43/00	1 0 5

(72)発明者 ブラーディーク、イエルン

ドイツ連邦共和国 デー - 2 8 3 5 5 ブレーメン、ヴァイスドルンプファート 1 4 番

(72)発明者 シューンマーケルス、ヘンリクス・フランシスクス・ペトルス・マリア

オランダ、エヌエル - 5 6 6 3 ハーエー・ヘルドロップ、コーレンラント 2 8 番

(72)発明者 モルス、ラファエル

ベルギー、ペー - 2 2 2 0 ハラルル、ベルトートラン 1 番

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA61 BA80 CA04 CA09 CA11 CA20 DA02 EA04
GA11 HA01 HA11
4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55
QR59 QR62 QS25 QS32 QX01
4C084 AA13 AA17 AA19 MA02 NA14 ZA45 ZB21 ZB26 ZB27
4C085 AA03 AA13 AA14 BB01 CC21 CC31 CC32 DD62 EE01 EE03
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 NA14 ZA45 ZB21 ZB26
ZB27
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	多发肿瘤异常生长基因		
公开(公告)号	JP2008099698A	公开(公告)日	2008-05-01
申请号	JP2007290671	申请日	2007-11-08
[标]申请(专利权)人(译)	模糊狄叫喊下来		
申请(专利权)人(译)	模糊狄, 乔恩		
[标]发明人	ファンデフェンヴィレムヤンマリー ブラーディークイエレン シューンマーケルスヘンリクスフランシスクスペトルスマリア モルスラファエル		
发明人	ファン・デ・フェン, ヴィレム・ヤン・マリー ブラーディーク, イエレン シューンマーケルス, ヘンリクス・フランシクス・ペトルス・マリア モルス, ラファエル		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/02 C07K16/32 A01K67/027 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 A61K45/00 A61P9/10 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 A61K31/70 A61K38 /00 A61K38/17 A61K38/46 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K19/00 C12N15/11 C12N15/12 C12Q1/6841 C12Q1/6886 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61P9/10 A61P31/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 C07K14/4702 C07K14/705 C12Q1 /6841 C12Q1/6886 C12Q2600/112 C12Q2600/156 C12Q2600/158		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A C12Q1/02 C07K16/32 A01K67/027 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K39/00.H A61K39/395.E A61K39/395.T A61K48/00 A61K45/00 A61P9/10.101 A61P35/00 A61P35 /02 A61P43/00.105 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12Q1/6841.C C12Q1/6841.Z C12Q1/6886.C C12Q1/6886.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024 /CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063 /QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QX01 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/AA19 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZA45 4C084/ZB21 4C084/ZB26 4C084/ZB27 4C085 /AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/CC21 4C085/CC31 4C085/CC32 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086 /MA04 4C086/NA14 4C086/ZA45 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045 /FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	95200390.3 1995-02-17 NL 95201951.1 1995-07-14 NL		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供与各种良性和恶性肿瘤中发现的异常细胞生长相关的基因和蛋白质。 解决方案：多种肿瘤异常生长 (MAG) 基因和多种肿瘤生长因子，其具有高速移动组蛋白基因或LIM蛋白基因的一条链的核苷酸序列 (包括其修饰)。基因及其衍生物可用于诊断具有非生理增殖，各种肿瘤，其他诊断和治疗用途的细胞。 【选择图】无

CEPH-コード	大きさ(kb)	標準 左側	#	標準 右側	#	キメラ特性
183F3	715			[RM10]		YES (L → R)
70E1	430	RM29	U27125			ND
95F1	390			RM30	U2954	ND
201H7	320				U2953	ND
186G12	320	RM13	U29051	RM14		ND
354B6	280					YES (R)
129C8	610					ND
258F11	615	RM4	U29052			ND
320F8	290	RM5	U29050			ND
234G11	475	RM7	U29046	RM21	U29047	ND
375H5	290					ND
252E10	510	[RM15]		RM16	U29048	YES (L)
181C8	475			RM28	U29045	ND
107D1	345	RM31	U29043			ND
490C5	320	RM44	U29044	RM46	U29037	ND
340B6	325					ND
532C12	400	RM45	U29041			ND
138C5	510	[RM59]		RM65	U29042	YES (L)
145F2	490	RM60	U29030	RM66	U29040	ND
105E8	345	RM57	U29033	RM63	U29038	ND
55E1	365	RM56	U29031	RM62	U29039	ND
103G7	370	RM55	U29025	RM80	U29035	ND
285R10	265	RM77	U29036	RM81	U29026	ND
338C2	200	RM79	U29034	RM82	U29029	ND
291C12	160	[RM79]		RM85	U29027	YES (L)
476A11	225	[RM67]		RM84	U29032	YES (L)
138F3	460	RM90	U29028	RM91	U29019	ND
226E7	500	RM48	U29024	RM54	U29015	ND
490E9	375	RM51	U29016			YES (R)
312F10	550	[RM50]		RM69	U29021	ND
828G7	550			RM69	U29013	ND
345E	315	RM88	U29020			YES (L)
94A7	610					YES (R)
305B2	650					YES
379H1	280	RM104	U29014	RM105	U29008	ND
444E6	350	RM82	U29017	RM93	U29010	ND
440I3	370	RM94	U29011	RM95	U29018	ND
403B12	390					ND
281E5	500	RM102	U29012	RM103	U26689	ND
789I1	425					ND
921B9	1670					ND
929H2	1750					ND
189H7	360					ND
142F4	360					ND
404E12	360					ND
164A3	375					ND
244B12	415	RM106	U29007	RM107	U29008	ND
272I4	345	RM108	U29004	RM109	U29005	ND
320F9	370					ND
21F8	430					ND
242A2	160	CH1	U29006			ND

[0 1 2 0]