

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公表特許公報** ( A ) (11)特許出願公表番号

**特表2003 - 525032**

(P2003 - 525032A)

(43)公表日 平成15年8月26日 (2003.8.26)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09		A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 35/00	4 B 0 2 4
A 6 1 P 35/00		43/00 105	4 B 0 6 3
43/00 105		C 1 2 P 21/00	C 4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10		C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 5

審査請求 有 予備審査請求 (全128数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 539874(P2001 - 539874)

(86)(22)出願日 平成12年10月11日(2000.10.11)

(85)翻訳文提出日 平成14年5月29日(2002.5.29)

(86)国際出願番号 PCT/US00/28082

(87)国際公開番号 W001/038532

(87)国際公開日 平成13年5月31日(2001.5.31)

(31)優先権主張番号 09/449,589

(32)優先日 平成11年11月29日(1999.11.29)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 PCT/US00/09286

(32)優先日 平成12年4月7日(2000.4.7)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ボード オブ トラスティーズ オブ ザ  
ユニヴァースティ オブ イリノイ  
アメリカ合衆国 61801 イリノイ州 アー  
バナ サウス ライト ストリート 506  
ヘンリー アドミニストレーション ビル  
ディング 352

(72)発明者 チャン、 ベイ - ディー  
アメリカ合衆国 イリノイ州 60148 ロン  
バード カンプリア レーン 1116

(74)代理人 弁理士 三好 秀和 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C D K阻害剤により調節される遺伝子の発現を同定および変調する試薬および方法

(57)【要約】

本発明は、細胞の進行、増殖促進、アポトーシスの変調、細胞の老化および加齢に關与する遺伝子を同定する方法および試薬、並びに、細胞の老化を阻害または増強する化合物を同定する方法を提供する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 哺乳動物 p 2 1 遺伝子をコードする、組換え発現作成物を含む、組換え哺乳動物線維肉腫細胞であって、p 2 1 はそれによって線維肉腫細胞で発現される、前記組換え哺乳動物線維肉腫細胞。

【請求項2】 誘導性異種プロモーターにより転写的に制御される、哺乳動物 p 2 1 遺伝子をコードする組換え発現作成物を含む、組換え哺乳動物線維肉腫細胞であって、組換え発現作成物からの p 2 1 の発現は、組換え細胞を、誘導性プロモーターからの転写を誘導する誘導剤と接触させることにより、または、該プロモーターからの転写を阻害する因子を除去することにより仲介される、前記組換え哺乳動物線維肉腫細胞。

【請求項3】 ヒト HT 1 0 8 0 である、請求項1または2に記載の組換え哺乳動物線維肉腫細胞。

【請求項4】 哺乳動物 p 2 1 遺伝子は、ヒト p 2 1 遺伝子またはその CD K 結合断片である、請求項1または2に記載の組換え哺乳動物線維肉腫細胞。

【請求項5】 細菌ラクトースリプレッサーをコードする組換え発現作成物をさらに含み、その転写は哺乳動物プロモーターにより制御され、哺乳動物 p 2 1 遺伝子をコードする組換え発現作成物はラクトースリプレッサー応答性プロモーター要素を含み、p 2 1 の転写は該ラクトース - リプレッサー応答性プロモーター要素により制御され、組換え発現作成物からの p 2 1 の発現は、組換え細胞をラクトースリプレッサー特異的誘導剤と接触させることにより仲介される、請求項2に記載の組換え哺乳動物線維肉腫細胞。

【請求項6】 細胞はヒト HT 1 0 8 0 線維肉腫細胞である、請求項5の組換え哺乳動物線維肉腫細胞。

【請求項7】 細菌ラクトースリプレッサーをコードする組換え発現作成物は 3 ' S S である、請求項5の組換え哺乳動物線維肉腫細胞。

【請求項8】 哺乳動物 p 2 1 遺伝子は、ヒト p 2 1 遺伝子またはその CD K 結合断片である、請求項5の組換え哺乳動物線維肉腫細胞。

【請求項9】 第二発現作成物は LN p 2 1 C O 3 である、請求項5の組換え哺乳動物線維肉腫細胞。

【請求項10】 ラクトースリプレッサー特異的誘導剤が - ガラクトシドである、請求項5の組換え哺乳動物線維肉腫細胞。

【請求項11】 A.T.C.C.受託番号PTA1664(p21-9)により同定される、請求項5の組換え哺乳動物線維肉腫細胞。

【請求項12】 CDK阻害剤により仲介される細胞遺伝子発現の変調を阻害する化合物を同定する方法であって、該方法は、(a)CDK阻害剤の発現を哺乳動物細胞で生じ；

(b)該化合物の存在下で、発現がCDK阻害剤により変調される細胞遺伝子の発現の変化について細胞をアッセイし；そして

(c)下位区分(b)の細胞遺伝子の発現が化合物の存在下でより低い程度で変化した場合、CDK阻害剤により仲介される細胞遺伝子発現の変調の阻害剤として該化合物を同定する段階を含む、前記方法。

【請求項13】 CDK阻害剤がp16またはp21である、請求項12の方法。

【請求項13】 哺乳動物細胞は請求項2に記載の細胞であり、CDK阻害剤がp21であり、p21発現は、細胞を、誘導性プロモーターからの転写を誘導する誘導剤と接触させるか、または該プロモーターからの転写を阻害する物質を除去することにより生じる、請求項12の方法。

【請求項15】 哺乳動物細胞は請求項226に記載の細胞であり、CDK阻害剤がp16であり、p16発現は、細胞を、誘導性プロモーターからの転写を誘導する誘導剤と接触させるか、または、該プロモーターからの転写を阻害する物質を除去することにより生じる、請求項12の方法。

【請求項16】 細胞遺伝子の発現はp21により抑制される、請求項12の方法。

【請求項17】 細胞遺伝子の発現はp16により抑制される、請求項13の方法。

【請求項18】 細胞遺伝子は表Iに同定される、請求項16の方法。

【請求項19】 細胞遺伝子は表Iに同定される、請求項14Aの方法。

【請求項20】 細胞遺伝子の発現はp21により誘導される、請求項12

の方法。

【請求項21】 細胞遺伝子の発現はp16により誘導される、請求項13の方法。

【請求項22】 細胞遺伝子は表IIに同定される、請求項20の方法。

【請求項23】 細胞遺伝子は表IIに同定される、請求項21の方法。

【請求項24】 細胞遺伝子の発現は、免疫学的試薬を使用して検出される、請求項12または13の方法。

【請求項25】 細胞遺伝子の発現は、細胞遺伝子産物の活性についてアッセイすることにより検出する、請求項12または13の方法。

【請求項26】 細胞遺伝子の発現は、相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出する、請求項12または13の方法。

【請求項27】 発現がCDK阻害剤により変調される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子をコードする第一組換え発現作成物、並びに、哺乳動物CDK阻害剤遺伝子をコードする第二組換え発現作成物を含む哺乳動物細胞であって、CDK阻害剤の発現は、これにより哺乳動物細胞で実験的に誘導される、前記哺乳動物細胞。

【請求項28】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項27に記載の哺乳動物細胞。

【請求項29】 哺乳動物CDK阻害剤遺伝子をコードする組換え発現作成物は、誘導性異種プロモーターの転写制御下にあり、組換え発現作成物からのCDK阻害剤の発現は、組換え細胞を、誘導性プロモーターからの転写を誘導する誘導剤と接触させるか、または、該プロモーターからの転写を阻害する物質を除去することにより仲介される、請求項27の哺乳動物細胞。

【請求項30】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項29の哺乳動物細胞。

【請求項31】 リポーター遺伝子が、ホタルルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、緑蛍光タンパク質またはアルカリホスファターゼをコードする、請求項27または28の哺乳動物細胞。

【請求項32】 リポーター遺伝子が、発現がCDK阻害剤により抑制される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にある、請求項27または28に記載の哺乳動物細胞。

【請求項33】 哺乳動物遺伝子プロモーターが、表Iに同定した哺乳動物遺伝子のプロモーターである、請求項32に記載の哺乳動物細胞。

【請求項34】 リポーター遺伝子は、発現がCDK阻害剤により誘導される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にある、請求項27または28に記載の哺乳動物細胞。

【請求項35】 哺乳動物遺伝子プロモーターは、表IIに同定した哺乳動物遺伝子のプロモーターである、請求項34に記載の哺乳動物細胞。

【請求項36】 発現がCDK阻害剤により阻害される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子をコードする組換え発現作成物を含む哺乳動物細胞であって、該プロモーターは、ORC1、PRC1、XRCC9、CDC2、サイクリンB1、AIK1、CENP-A、CENP-F、MAD2、BUBR1、MCAK、HSET、CHL1、チモポエチン、MPP2、MPP5、CDC47/MCM7、CDC21/MCM4、DNAリガーゼI、DNA重合酵素、Rad54、エキソヌクラーゼHEX1/RAD2、PLK1、DHFRまたはシトロンキナーゼの遺伝子由来である、前記哺乳動物細胞。

【請求項37】 発現がCDK阻害剤により誘導される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子をコードする組換え発現作成物を含む哺乳動物細胞であって、該プロモーターは、血清アミロイドA、補体C3、結合組織増殖因子、インテグリン-3、アクチビンA、ナチュラルキラー細胞タンパク質4、プロサポシン、Mac2結合タンパク質、ガレクチン-3、スーパーオキシドジスムターゼ2、グラニューリン/エピセリン、p66<sup>shc</sup>、リソソーム-ガラクトシダーゼ、またはカテプシンBの遺伝子由来である、前記哺乳動物細胞。

【請求項38】 CDK阻害剤により仲介される細胞遺伝子発現の変調を阻害する化合物を同定する方法であって、該方法は、

(a) 該化合物の存在下または非存在下で、請求項27または28に記載の哺乳動物細胞においてCDK阻害剤の発現を生じ；

(b) リポーター遺伝子の発現の変化について細胞をアッセイし；そして

(c) リポーター遺伝子の発現が、化合物の存在下でより低い程度で変化した場合、CDK阻害剤により仲介される細胞遺伝子発現の変調の阻害剤として該化合物を同定する段階を含む、前記方法。

【請求項39】 リポーター遺伝子は、発現がp21により抑制される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にある、請求項38の方法。

【請求項40】 リポーター遺伝子は、発現がp16により抑制される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にある、請求項38の方法。

【請求項41】 哺乳動物遺伝子プロモーターは、表Iに同定した哺乳動物遺伝子のプロモーターである、請求項39または40の方法。

【請求項42】 リポーター遺伝子は、発現がp21により誘導される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にある、請求項38の方法。

【請求項43】 リポーター遺伝子は、発現がp16により誘導される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にある、請求項38の方法。

【請求項44】 哺乳動物遺伝子プロモーターは、表IIに同定した哺乳動物遺伝子のプロモーターである、請求項42または43の方法。

【請求項45】 リポーター遺伝子の発現は、免疫学的試薬を使用して検出される、請求項38の方法。

【請求項46】 リポーター遺伝子の発現は、リポーター遺伝子産物の活性についてアッセイすることにより検出する、請求項38の方法。

【請求項47】 リポーター遺伝子の発現は相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出する、請求項38の方法。

【請求項48】 CDK阻害剤により仲介される細胞遺伝子発現の変調を阻害する化合物を同定する方法であって、該方法は、

(a) 該化合物の存在下または非存在下で、請求項36に記載の哺乳動物細胞においてCDK阻害剤の発現を生じ；

(b) リポーター遺伝子の発現の変化について細胞をアッセイし；そして

(c) リポーター遺伝子の発現が、該化合物の存在下でより低い程度で変化した場合、CDK阻害剤により仲介される細胞遺伝子発現の変調の阻害剤として該化合物を同定する段階を含む、前記方法。

【請求項49】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項48の方法。

【請求項50】 CDK阻害剤により仲介される細胞遺伝子発現の変調を阻害する化合物を同定する方法であって、該方法は、

(a) 該化合物の存在下または非存在下で、請求項37に記載の哺乳動物細胞においてCDK阻害剤の発現を生じ；

(b) リポーター遺伝子の発現の変化について細胞をアッセイし；そして

(c) リポーター遺伝子の発現が該化合物の存在下でより低い程度で変化した場合、CDK阻害剤により仲介される細胞遺伝子発現の変調の阻害剤として該化合物を同定する段階を含む、前記方法。

【請求項51】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項50の方法。

【請求項52】 哺乳動物細胞の老化を阻害する化合物を同定する方法であって、該方法は、

(a) 該化合物の存在下および非存在下で哺乳動物細胞を物質で処理するか、または、老化を誘導する条件下で哺乳動物細胞を培養し；

(b) CDK阻害剤遺伝子発現により抑制または誘導される、遺伝子の抑制または誘導について哺乳動物細胞をアッセイし；そして

(c) 該化合物の非存在下よりも該化合物の存在下の方が、CDK阻害剤により抑制される遺伝子がより低い程度で抑制されるか、または、CDK阻害剤により誘導される遺伝子がより低い程度で誘導される場合、老化阻害剤として該化合物を同定する段階を含む、前記方法。

【請求項53】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項52の方法。

【請求項54】 哺乳動物細胞をCDK阻害剤により誘導される遺伝子についてアッセイする、請求項52の方法。

【請求項55】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項54の方法。

【請求項56】 遺伝子は表IIに同定される、請求項54または55の方法。

【請求項57】 哺乳動物細胞を、CDK阻害剤により抑制される遺伝子についてアッセイする、請求項52の方法。

【請求項58】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項43の方法。

【請求項59】 遺伝子は表Iに同定される、請求項57または58の方法。

【請求項60】 細胞遺伝子の発現は、免疫学的試薬を使用して検出される、請求項52または53の方法。

【請求項61】 細胞遺伝子の発現は、細胞遺伝子産物の活性についてアッセイすることにより検出する、請求項52または53の方法。

【請求項62】 細胞遺伝子の発現は、相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出する、請求項52または53の方法。

【請求項63】 哺乳動物細胞の老化を阻害する化合物を同定する方法であって、該方法は、

(a) 該化合物の存在下または非存在下で哺乳動物細胞を物質と接触させるか、または、哺乳動物細胞を老化を誘導する条件下で培養し、ここでの該細胞は、発現がCDK阻害剤により変調される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子を含み；

(b) リポーター遺伝子の発現の変化について細胞をアッセイし；そして

(c) リポーター遺伝子の発現が、該化合物の非存在下よりも存在下の方がより低い程度で変化する場合、老化阻害剤として該化合物を同定する段階を含む、前記方法。

【請求項64】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項63の方法。

【請求項65】 リポーター遺伝子は、発現がCDK阻害剤により誘導され

る哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にある、請求項63の方法。

【請求項66】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項65の方法。

【請求項67】 哺乳動物遺伝子プロモーターは、表IIに同定した哺乳動物遺伝子のプロモーターである、請求項65または66の方法。

【請求項68】 リポーター遺伝子は、発現がCDK阻害剤により抑制される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にある、請求項63の方法。

【請求項69】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項68の方法。

【請求項70】 哺乳動物遺伝子プロモーターは、表Iに同定した哺乳動物遺伝子のプロモーターである、請求項68または69の方法。

【請求項71】 細胞遺伝子の発現は免疫学的試薬を使用して検出される、請求項68または69の方法。

【請求項72】 細胞遺伝子の発現は、細胞遺伝子産物の活性についてアッセイすることにより検出する、請求項68または69の方法。

【請求項73】 細胞遺伝子の発現は、相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出する、請求項68または69の方法。

【請求項74】 哺乳動物細胞の老化を阻害する化合物を同定する方法であって、該方法は、

(a) 請求項36に記載の哺乳動物細胞を、該化合物の存在下または非存在下で、物質と接触させるか、または、老化を誘導する条件下で哺乳動物細胞を培養し；

(b) リポーター遺伝子の発現の変化について細胞をアッセイし；そして

(c) リポーター遺伝子の発現が、該化合物の非存在下よりも該化合物の存在下の方が、より低い程度で変化する場合、老化阻害剤として該化合物を同定する段階を含む、前記方法。

【請求項75】 哺乳動物細胞の老化を阻害する化合物を同定する方法であって、該方法は、

(a) 請求項37に記載の哺乳動物細胞を、該化合物の存在下または非存在下

で、物質と接触させるか、または、老化を誘導する条件下で哺乳動物細胞を培養し；

(b) リポーター遺伝子の発現の変化について細胞をアッセイし；そして

(c) リポーター遺伝子の発現が、該化合物の非存在下よりも存在下の方がより低い程度で変化する場合、老化阻害剤として該化合物を同定する段階を含む、前記方法。

【請求項76】 細胞の老化を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項12の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項77】 細胞の老化を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項38の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項78】 細胞の老化を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項48の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項79】 細胞の老化を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項50の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項80】 細胞の老化を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項52の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項81】 細胞の老化を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項63の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項82】 細胞の老化を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項74の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項83】 細胞の老化を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項75の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

。

【請求項84】 哺乳動物細胞における疾病関連遺伝子産物の産生を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項12の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項85】 哺乳動物細胞における疾病関連遺伝子産物の産生を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項38の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項86】 哺乳動物細胞における疾病関連遺伝子産物の産生を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項48の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項87】 哺乳動物細胞における疾病関連遺伝子産物の産生を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項50の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項88】 哺乳動物細胞における疾病関連遺伝子産物の産生を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項52の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項89】 哺乳動物細胞における疾病関連遺伝子産物の産生を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項63の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項90】 哺乳動物細胞における疾病関連遺伝子産物の産生を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項74の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項91】 哺乳動物細胞における疾病関連遺伝子産物の産生を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項75の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項92】 CDK阻害剤により仲介される細胞遺伝子発現の変調の効果を増強する化合物を同定する方法であって、該方法は、

- (a) 哺乳動物細胞においてCDK阻害剤の発現を生じ；
- (b) 該化合物の存在下または非存在下で、発現がCDK阻害剤により誘導ま

たは抑制される細胞遺伝子の発現の変化について細胞をアッセイし；

(c) 下位区分(b)の細胞遺伝子の発現が、該化合物の非存在下よりも存在下の方がより大きな程度で誘導または抑制される場合、CDK阻害剤により仲介される細胞遺伝子発現の変調の増強剤として化合物を同定する段階を含む、前記方法。

【請求項93】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項92の方法。

【請求項94】 哺乳動物細胞は請求項2に記載の細胞であり、p21が発現され、p21発現は、細胞を、誘導性プロモーターからの転写を誘導する誘導剤と接触させることにより生じる、請求項92の方法。

【請求項95】 哺乳動物細胞は請求項226に記載の細胞であり、p16が発現され、p16発現は、細胞を、誘導性プロモーターからの転写を誘導する誘導剤と接触させることにより生じる、請求項92の方法。

【請求項96】 細胞遺伝子の発現はCDK阻害剤により抑制される、請求項92の方法。

【請求項97】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項92の方法。

【請求項98】 細胞遺伝子は表Iに同定される、請求項96または97の方法。

【請求項99】 細胞遺伝子の発現はCDK阻害剤により誘導される、請求項92の方法。

【請求項100】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項99の方法。

【請求項101】 細胞遺伝子は表IIに同定される、請求項99または100の方法。

【請求項102】 細胞遺伝子の発現は免疫学的試薬を使用して検出される、請求項92または93の方法。

【請求項103】 細胞遺伝子の発現は細胞遺伝子産物の活性についてアッセイすることにより検出する、請求項92または93の方法。

【請求項104】 細胞遺伝子の発現は、相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出する、請求項92または100の方法。

【請求項105】 CDK阻害剤は、細胞において、その効果が細胞でのCDK阻害剤発現の最大効果よりも低い程度で産生される、請求項92の方法。

【請求項106】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項105の方法。

【請求項107】 老化を増強する化合物を同定する方法であって、該方法は、

(a) 哺乳動物細胞を、該化合物の存在下または非存在下で、物質と接触させるか、または、老化を誘導する条件下で哺乳動物細胞を培養し、ここでは該細胞は、発現がCDK阻害剤により変調される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子を含み；

(b) リポーター遺伝子の発現の変化について細胞をアッセイし；そして

(c) リポーター遺伝子の発現が、該化合物の非存在下よりも存在下の方がより大きな程度で変化する場合、老化増強剤として該化合物を同定する段階を含む、前記方法。

【請求項108】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項107の方法。

【請求項109】 哺乳動物細胞は請求項2に記載の細胞であり、CDK阻害剤がp21であり、老化は、細胞を、誘導性プロモーターからのp21転写を誘導する誘導剤と接触させることにより生じる、請求項107の方法。

【請求項110】 哺乳動物細胞は請求項226に記載の細胞であり、CDK阻害剤がp16であり、老化は、細胞を、誘導性プロモーターからのp16転写を誘導する誘導剤と接触させることにより生じる、請求項84の方法。

【請求項111】 リポーター遺伝子は、発現がCDK阻害剤により誘導される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にある、請求項107の方法。

【請求項112】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項111の方法。

【請求項113】 遺伝子は表IIに同定される、請求項111または111

2の方法。

【請求項114】 リポーター遺伝子は、発現がCDK阻害剤により抑制される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にある、請求項107の方法。

【請求項115】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項114の方法。

【請求項116】 遺伝子は表Iに同定される、請求項114または115の方法。

【請求項117】 リポーター遺伝子の発現は、免疫学的試薬を使用して検出される、請求項107または108の方法。

【請求項118】 リポーター遺伝子の発現は、細胞遺伝子産物の活性についてアッセイすることにより検出する、請求項107または108の方法。

【請求項119】 リポーター遺伝子の発現は、相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出する、請求項107または108の方法。

【請求項120】 哺乳動物細胞の老化を促進する化合物を同定する方法であって、該方法は、

(a) 哺乳動物細胞を物質で処理するか、または、該化合物の存在下で老化を誘導する条件下で哺乳動物細胞を培養し；

(b) CDK阻害剤遺伝子発現により抑制または誘導される遺伝子の抑制または誘導について哺乳動物細胞をアッセイし；そして

(c) 該化合物の存在下で、CDK阻害剤により抑制される遺伝子がさらに抑制されるか、または、CDK阻害剤により誘導される遺伝子がさらに誘導される場合、老化の誘導を促進する化合物と同定する段階を含む、前記方法。

【請求項121】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項120の方法。

【請求項122】 哺乳動物細胞を、CDK阻害剤により誘導される遺伝子についてアッセイする、請求項120の方法。

【請求項123】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項122の方法。

【請求項124】 遺伝子は表IIに同定される、請求項122または123

3の方法。

【請求項125】 哺乳動物細胞は、CDK阻害剤により抑制される遺伝子についてアッセイする、請求項120の方法。

【請求項126】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項125の方法。

【請求項127】 遺伝子は表Iに同定される、請求項125または126の方法。

【請求項128】 細胞遺伝子の発現は、免疫学的試薬を使用して検出される、請求項120または121の方法。

【請求項129】 細胞遺伝子の発現は、細胞遺伝子産物の活性についてアッセイすることにより検出する、請求項120または121の方法。

【請求項130】 細胞遺伝子の発現は、相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出する、請求項120または121の方法。

【請求項131】 哺乳動物細胞の老化の誘導を促進する化合物を同定する方法であって、該方法は、

(a) 哺乳動物細胞を、該化合物の存在下または非存在下で物質と接触させるか、または、老化を誘導する条件下で哺乳動物細胞を培養し、該細胞は、発現がCDK阻害剤により変調される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子を含み；

(b) リポーター遺伝子の発現の変化について細胞をアッセイし；そして

(c) リポーター遺伝子の発現が、該化合物の非存在下よりも存在下の方がより大きな程度で変化する場合、老化の誘導を促進する化合物と同定する段階を含む、前記方法。

【請求項132】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項131の方法。

【請求項133】 リポーター遺伝子は、発現がCDK阻害剤により誘導される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にある、請求項131の方法。

【請求項134】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項133の方法。

【請求項135】 遺伝子は表I Iに同定される、請求項133または134の方法。

【請求項136】 リポーター遺伝子は、発現がCDK阻害剤により抑制される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にある、請求項131の方法。

【請求項137】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項136の方法。

【請求項138】 遺伝子は表Iに同定される、請求項136または137の方法。

【請求項139】 細胞遺伝子の発現は、免疫学的試薬を使用して検出される、請求項131または132の方法。

【請求項140】 細胞遺伝子の発現は、細胞遺伝子産物の活性についてアッセイすることにより検出する、請求項131または132の方法。

【請求項141】 細胞遺伝子の発現は、相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出する、請求項131または132の方法。

【請求項142】 哺乳動物細胞の老化の誘導を促進する化合物を同定する方法であって、該方法は、

(a) 請求項28に記載の哺乳動物細胞を、該化合物の存在下または非存在下で、物質と接触させるか、または、老化を誘導する条件下で哺乳動物細胞を培養し；

(b) リポーター遺伝子の発現の変化について該細胞をアッセイし；そして

(c) リポーター遺伝子の発現が、該化合物の非存在下よりも存在下の方がより大きい程度で変化する場合、老化の誘導を促進する化合物と同定する段階を含む、前記方法。

【請求項143】 哺乳動物細胞の老化の誘導を促進する化合物を同定する方法であって、該方法は、

(a) 請求項37に記載の哺乳動物細胞を、該化合物の存在下または非存在下で物質と接触させるか、または、老化を誘導する条件下で哺乳動物細胞を培養し；

(b) リポーター遺伝子の発現の変化について該細胞をアッセイし；そして

(c) リポーター遺伝子の発現が、該化合物の非存在下よりも存在下の方がより大きい程度で変化する場合、老化の誘導を促進する化合物と同定する段階を含む、前記方法。

【請求項144】 細胞の老化を促進する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項92または93の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項145】 細胞は腫瘍細胞、過形成細胞、または過度の増殖に因り病的または疾病の原因となる細胞である、請求項144の方法。

【請求項146】 細胞の老化を促進する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項107または108の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項147】 細胞は腫瘍細胞、過形成細胞、または、過度の増殖に因り病的または疾病の原因となる細胞である、請求項146の方法。

【請求項148】 細胞の老化を促進する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項120または121の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項149】 細胞は腫瘍細胞、過形成細胞、または、過度の増殖に因り病的または疾病の原因となる細胞である、請求項148の方法。

【請求項150】 細胞の老化を促進する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項131または132の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項151】 細胞は、腫瘍細胞、過形成細胞、または、過度の増殖に因り病的または疾病の原因となる細胞である、請求項150の方法。

【請求項152】 細胞の老化を促進する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項142の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項153】 細胞は、腫瘍細胞、過形成細胞、または、過度の増殖に因り病的または疾病の原因となる細胞である、請求項152の方法。

【請求項154】 細胞の老化を促進する方法であって、該方法は、該細胞

を、請求項147の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項155】 細胞は、腫瘍細胞、過形成細胞、または、過度の増殖に因り病的または疾病の原因となる細胞である、請求項154の方法。

【請求項156】 CDK阻害剤による細胞遺伝子発現の変調を阻害する化合物であって、該化合物は、

(a) 哺乳動物細胞でのCDK阻害剤の発現を誘導し；

(b) 該細胞を、該化合物の存在下または非存在下で、発現がCDK阻害剤により変調される細胞遺伝子の発現の変化についてアッセイし；そして

(c) 下位区分(b)の細胞遺伝子の発現が、該化合物の非存在下よりも存在下の方がより低い程度で変化する場合、CDK阻害剤により仲介される細胞遺伝子発現の変調の阻害剤として該化合物を同定する段階を有する方法により製造する、前記化合物。

【請求項157】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項156の方法。

【請求項158】 CDK阻害剤による細胞遺伝子発現の変調を阻害する化合物であって、該化合物は、

(a) 該化合物の存在下または非存在下で、請求項27に記載の哺乳動物細胞でのCDK阻害剤の発現を生じ；

(b) リポーター遺伝子の発現の変化について細胞をアッセイし；そして

(c) リポーター遺伝子の発現が、該化合物の存在下でより低い程度で変化する場合、CDK阻害剤により仲介される細胞遺伝子発現の変調の阻害剤として該化合物を同定する段階を有する方法により製造する、前記化合物。

【請求項159】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項158の方法。

【請求項160】 哺乳動物細胞の老化を阻害する化合物であって、該化合物は、

(a) 哺乳動物細胞を、該化合物の存在下で物質で処理するか、または、老化を誘導する条件下で哺乳動物細胞を培養し；

(b) 哺乳動物細胞を、CDK阻害剤遺伝子発現により抑制または誘導される遺伝子の抑制または誘導についてアッセイし；そして

(c) 該化合物の存在下で、CDK阻害剤により抑制される遺伝子がより低い程度で抑制されるか、または、CDK阻害剤により誘導される遺伝子がより低い程度で誘導される場合、老化阻害剤として該化合物を同定する段階を有する方法により製造する、前記化合物。

【請求項161】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項160の方法。

【請求項162】 哺乳動物細胞の老化を阻害する化合物であって、該化合物は、

(a) 哺乳動物細胞を、該化合物の存在下または非存在下で物質と接触させるか、または、哺乳動物細胞を、老化を誘導する条件下で培養し、ここでの該細胞は、発現がCDK阻害剤により変調される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子を含み；

(b) 該細胞を、リポーター遺伝子の発現の変化についてアッセイし；そして

(c) リポーター遺伝子の発現が該化合物の存在下でより低い程度で変化する場合、老化阻害剤として該化合物を同定する段階を有する方法により製造する、前記化合物。

【請求項163】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項162の方法。

【請求項164】 哺乳動物細胞の老化を増強する化合物であって、該化合物は、

(a) 哺乳動物細胞でCDK阻害剤の発現を生じ；

(b) 発現がCDK阻害剤により誘導または抑制される細胞遺伝子の発現の変化について細胞をアッセイし；そして

(c) 下位区分(b)の細胞遺伝子の発現が、該化合物の非存在下よりも該化合物の存在下の方がより大きい程度で誘導または抑制される場合、老化の増強剤として該化合物を同定する段階を有する方法により製造される、前記化合物。

【請求項165】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項16

4の方法。

【請求項166】 哺乳動物細胞の老化を増強する化合物であって、該化合物は、

(a) 哺乳動物細胞を、該化合物の存在下で物質で処理するか、または、哺乳動物細胞を、老化を誘導する条件下で培養し；

(b) CDK阻害剤遺伝子発現により抑制または誘導される遺伝子の抑制または誘導について哺乳動物細胞をアッセイし；そして

(c) 該化合物の存在下で、CDK阻害剤により抑制される遺伝子がより大きい程度で抑制されるか、またはCDK阻害剤により誘導される遺伝子がより大きい程度で誘導される場合、老化の増強剤として該化合物を同定する段階を有する方法により製造される、前記化合物。

【請求項167】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項166の方法。

【請求項168】 哺乳動物細胞の老化を増強する化合物であって、該化合物は、

(a) 哺乳動物細胞を、該化合物の存在下または非存在下で物質と接触させるか、または、老化を誘導する条件下で哺乳動物細胞を培養し、ここでの該細胞は、発現がCDK阻害剤により変調される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子を含み；

(b) リポーター遺伝子の発現の変化について細胞をアッセイし；そして

(c) リポーター遺伝子の発現が、該化合物の非存在下よりも存在下の方がより大きい程度で変化する場合、老化増強剤として該化合物を同定する段階を有する方法により製造される、前記化合物。

【請求項169】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項168の方法。

【請求項170】 哺乳動物細胞から抗アポトーシスまたは有糸分裂誘起因子を産生する方法であって、該方法は、哺乳動物細胞でCDK阻害剤遺伝子発現を産生し、細胞を、細胞培養培地中で、抗アポトーシスまたは有糸分裂誘起因子を産生するに十分な時間培養する段階を含む、前記方法。

【請求項171】 哺乳動物細胞は、請求項2に記載の哺乳動物細胞であり、CDK阻害剤がp21であり、p21発現は、誘導性プロモーターからの転写を誘導する誘導剤を含む培養培地中で哺乳動物細胞を培養することにより、または、該プロモーターからの転写を阻害する物質を除去することにより誘導する、請求項170の方法。

【請求項172】 哺乳動物細胞は、請求項226に記載の細胞であり、CDK阻害剤がp16であり、p16発現は、誘導性プロモーターからの転写を誘導する誘導剤を含む培養培地中で哺乳動物細胞を培養することにより、または、該プロモーターからの転写を阻害する物質を除去することにより誘導される、請求項170の方法。

【請求項173】 哺乳動物細胞により産生される抗アポトーシスまたは有糸分裂誘起化合物は、発現がCDL阻害剤により誘導される化合物である、請求項170に記載の方法。

【請求項174】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項173の方法。

【請求項175】 CDK阻害剤を発現する哺乳動物細胞の増殖により馴化した、哺乳動物細胞培養培地。

【請求項176】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項175の哺乳動物細胞培養培地。

【請求項177】 哺乳動物細胞は、請求項2に記載の哺乳動物細胞であり、CDK阻害剤がp21であり、p21発現は、誘導性プロモーターからの転写を誘導する誘導剤を含む培養培地中で哺乳動物細胞を培養することにより、または、該プロモーターからの転写を阻害する物質を除去することにより誘導する、請求項175に記載の哺乳動物細胞培養培地。

【請求項178】 哺乳動物細胞は、請求項226に記載の哺乳動物細胞であり、CDK阻害剤がp16であり、p16発現は、誘導性プロモーターからの転写を誘導する誘導剤を含む培養培地中で哺乳動物細胞を培養することにより、または、該プロモーターからの転写を阻害する物質を除去することにより誘導する、請求項175に記載の哺乳動物細胞培養培地。

【請求項179】 細胞周期進行に関与する遺伝子について強化した複数の核酸種を得る方法であって、該方法は、

- (a) 哺乳動物細胞でCDK阻害剤の発現を誘導し；
- (b) CDK阻害剤を段階(a)に従って誘導する前および後に哺乳動物細胞から細胞mRNAを得；
- (c) CDK阻害剤を誘導する前に細胞から得た細胞mRNAの発現を、CDK阻害剤を誘導した後の細胞mRNAの発現と比較し；そして
- (d) CDK阻害剤が誘導された後に細胞において発現が抑制される遺伝子について強化した複数の核酸種を得る段階を含む、前記方法。

【請求項180】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項179の方法。

【請求項181】 老化および年齢関連疾病に関与するパラクリン機能およびタンパク質を有する分泌タンパク質をコードする遺伝子について強化した複数の核酸種を得る方法であって、該方法は、

- (a) CDK阻害剤の発現を哺乳動物細胞で誘導し；
- (b) CDK阻害剤を誘導する前および後に哺乳動物細胞から細胞mRNAを得；そして
- (c) CDK阻害剤発現が誘導された後に細胞で発現が誘導される遺伝子について強化された、複数の核酸種を得る段階を含む、前記方法。

【請求項182】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項181の方法。

【請求項183】 細胞老化のマーカである、複数の細胞遺伝子を同定する方法であって、

- (a) 第一個体群の哺乳動物細胞においてCDK阻害剤の発現および第二個体群の哺乳動物細胞において休止を誘導し；
- (b) 各個体群の細胞からmRNAを得；
- (c) CDK阻害剤を誘導した前および後に第一個体群での細胞の遺伝子発現パターンを、細胞が休止となる前および後に第二個体群中の細胞の遺伝子発現パターンと比較し；

(d) CDK阻害剤誘導細胞で強力に誘導される複数の遺伝子を、休止細胞で強力に誘導される複数の遺伝子と比較し；そして

(e) 休止細胞では強力に誘導されないCDK阻害剤誘導細胞で強力に誘導される遺伝子を同定する段階を含む、前記方法。

【請求項184】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項183の方法。

【請求項185】 哺乳動物細胞の老化を検出する方法であって、該方法は、結合組織増殖因子、血清アミロイドA、インテグリン-3、アクチビンA、ナチュラルキラー細胞タンパク質4、Mac2結合タンパク質、または組織トランスグルタミナーゼの遺伝子からなる群から選択される遺伝子の発現を検出する段階を含む、前記方法。

【請求項186】 哺乳動物細胞の老化を誘導する化合物を同定する方法であって、該方法は、

(a) 哺乳動物細胞を、該化合物の存在下および非存在下で、発現がCDK阻害剤により変調される遺伝子の発現についてアッセイし；そして

(b) 該化合物の存在下で、CDK阻害剤により抑制される遺伝子の発現が細胞において抑制されるか、またはCDK阻害剤により誘導される遺伝子の発現が細胞において増加する場合に休止を誘導する化合物を同定する段階を含む、前記方法。

【請求項187】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項186の方法。

【請求項188】 遺伝子はCDK阻害剤により誘導される、請求項186の方法。

【請求項189】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項188の方法。

【請求項190】 遺伝子は表IIに同定される、請求項188または189の方法。

【請求項191】 遺伝子はCDK阻害剤により抑制される、請求項186の方法。

【請求項192】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項191の方法。

【請求項193】 遺伝子は表Iに同定される、請求項191または192の方法。

【請求項194】 遺伝子の発現は免疫学的試薬を使用して検出される、請求項186または187の方法。

【請求項195】 遺伝子の発現は、細胞遺伝子産物の活性についてアッセイすることにより検出する、請求項186または187の方法。

【請求項196】 遺伝子の発現は相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出する、請求項186または187の方法。

【請求項197】 下位区分(b)のアッセイは、抗癌薬の存在下で実施する、請求項186の方法。

【請求項198】 哺乳動物細胞は誘導性p21遺伝子を含み、下位区分(a)のアッセイは、p21発現を誘導する量の物質の存在下で実施し、これによりp21誘導の程度は、p21により阻害される遺伝子の完全な阻害には不十分である、請求項186の方法。

【請求項199】 哺乳動物細胞は誘導性p16遺伝子を含み、下位区分(a)のアッセイは、p16発現を誘導する量の物質の存在下で実施し、これによりp16誘導の程度は、p16により阻害される遺伝子の完全な阻害には不十分である、請求項186の方法。

【請求項200】 哺乳動物細胞の老化を誘導する化合物を同定する方法であって、該方法は、

(a)哺乳動物細胞を該化合物と接触させ、ここで、該細胞は、発現がCDK阻害剤により変調される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子を含み；

(b)リポーター遺伝子の発現の変化について細胞をアッセイし；そして

(c)細胞を該化合物と接触させた場合に、リポーター遺伝子の発現が、CDK阻害剤により抑制される遺伝子のプロモーターの転写制御下にある場合に減少するか、またはリポーター遺伝子の発現が、CDK阻害剤による誘導される遺伝

子の転写制御下にある場合には増加する場合、老化を誘導する化合物と同定する段階を含む、前記方法。

【請求項201】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項200の方法。

【請求項202】 リポーター遺伝子は、発現がCDK阻害剤により誘導される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にある、請求項200の方法。

【請求項203】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項202の方法。

【請求項204】 遺伝子は表IIに同定される、請求項202または203の方法。

【請求項205】 リポーター遺伝子は、発現がCDK阻害剤により抑制される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にある、請求項200の方法。

【請求項206】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項205の方法。

【請求項207】 遺伝子は表Iに同定される、請求項205または206の方法。

【請求項208】 リポーター遺伝子の発現は、免疫学的試薬を使用して検出される、請求項200または201の方法。

【請求項209】 リポーター遺伝子の発現は、細胞遺伝子産物の活性についてアッセイすることにより検出する、請求項200または201の方法。

【請求項210】 リポーター遺伝子の発現は、相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出する、請求項200または201の方法。

【請求項211】 発現がCDK阻害剤により阻害される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子をコードする組換え発現作成物。

【請求項212】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項211の組換え発現作成物。

【請求項213】 プロモーターは、ORC1、PRC1、XRCC9、CDC2、サイクリンB1、AIK1、CENP-A、CENP-F、MAD2、

BUBR1、MCAK、HSET、CHL1、チモポエチン、MPP2、MPP5、CDC47/MCM7、CDC21/MCM4、DNAリガーゼI、DNA重合酵素、Rad54、エキソヌクレーゼHEX1/RAD2、PLK1、DHF Rまたはシトロンキナーゼの遺伝子由来である、請求項211または212に記載の組換え発現作成物。

【請求項214】 発現がCDK阻害剤により誘導される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子をコードする組換え発現作成物。

【請求項215】 CDK阻害剤がp21またはp16である、請求項214の組換え発現作成物。

【請求項216】 プロモーターは、血清アミロイドA、補体C3、結合組織増殖因子、インテグリン-3、アクチビンA、ナチュラルキラー細胞タンパク質4、プロサポシン、Mac結合タンパク質、ガレクチン-3、スーパーオキシドジスムターゼ、グラニューリン/エピセリン、p66<sup>shc</sup>、リソソーム-ガラクトシダーゼ、またはカテプシンBの遺伝子由来である、請求項214または215に記載の組換え発現作成物。

【請求項217】 哺乳動物細胞における有糸分裂誘起または抗アポトーシス化合物の産生を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項12または13の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項218】 哺乳動物細胞における有糸分裂誘起または抗アポトーシス化合物の産生を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項38または39の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項219】 哺乳動物細胞における有糸分裂誘起または抗アポトーシス化合物の産生を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項48または49の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項220】 哺乳動物細胞における有糸分裂誘起または抗アポトーシス化合物の産生を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項50または51の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項221】 哺乳動物細胞における有糸分裂誘起または抗アポトーシ

ス化合物の産生を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項52または53の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項222】 哺乳動物細胞における有糸分裂誘起または抗アポトーシス化合物の産生を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項63または64の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項223】 哺乳動物細胞における有糸分裂誘起または抗アポトーシス化合物の産生を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項74の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項224】 哺乳動物細胞における有糸分裂誘起または抗アポトーシス化合物の産生を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、請求項75の方法に従って製造した化合物と接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項225】 哺乳動物 p 1 6 遺伝子をコードする組換え発現作成物を含む組換え哺乳動物線維肉腫細胞であって、p 1 6 がこれにより線維肉腫細胞で発現される、前記組換え哺乳動物線維肉腫細胞。

【請求項226】 誘導性異種プロモーターにより転写的に制御される哺乳動物 p 1 6 遺伝子をコードする組換え発現作成物を含む、組換え哺乳動物線維肉腫細胞であって、組換え発現作成物からの p 1 6 の発現は、組換え細胞を、誘導性プロモーターからの転写を誘導する誘導剤と接触させることにより、または、該プロモーターからの転写を阻害する物質を除去することにより仲介される、前記哺乳動物線維肉腫細胞。

【請求項227】 ヒト HT 1 0 8 0 である、請求項225または226に記載の組換え哺乳動物線維肉腫細胞。

【請求項228】 哺乳動物 p 1 6 遺伝子はヒト p 1 6 遺伝子である、請求項225または226の組換え哺乳動物線維肉腫細胞。

【請求項229】 細菌ラクトースリプレッサーをコードする組換え発現作成物をさらに含み、その転写は、哺乳動物プロモーターにより制御され、哺乳動物 p 1 6 遺伝子をコードする組換え発現作成物は、ラクトースリプレッサー応答性プロモーター要素を含み、p 1 6 の転写は、該ラクトース - リプレッサー応答性プロモーター要素により制御され、組換え発現作成物からの p 1 6 の発現は、

組換え細胞をラクトースリプレッサー特異的誘導剤と接触させることにより仲介される、請求項226に記載の組換え哺乳動物線維肉腫細胞。

【請求項230】 細胞は、ヒトHT1080線維肉腫細胞である、請求項229の組換え哺乳動物線維肉腫細胞。

【請求項231】 細菌ラクトースリプレッサーをコードする組換え発現作成物は3'5Sである、請求項229の組換え哺乳動物線維肉腫細胞。

【請求項232】 哺乳動物p16はヒトp16遺伝子である、請求項229の組換え哺乳動物線維肉腫細胞。

【請求項234】 第二発現作成物はLNp16RO2である、請求項229の組換え哺乳動物線維肉腫細胞。

【請求項235】 ラクトースリプレッサー特異的誘導剤が -ガラクトシドである、請求項229の組換え哺乳動物線維肉腫細胞。

【請求項236】 A.T.C.C.受託番号 (HT1080/LNp16RO2) またはそのクローン化誘導体により同定される、請求項229の組換え哺乳動物線維肉腫細胞。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(発明の背景)**

本出願は、国立保健研究所からの認可、R01CA62099番により援助された。政府は本発明に特定の権利を有し得る。

**【0002】****1. 発明の分野**

本発明は、細胞の老化、および、老化に伴う細胞遺伝子発現の変化に関する。特に、本発明は、その発現が、老化の開始時に細胞において誘導される、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)阻害剤と称される1クラスの細胞遺伝子産物により変調される遺伝子の同定に関する。より特定すると、本発明は、その発現が該CDK阻害剤により誘導または抑制される遺伝子である、細胞の老化のマーカーを提供する。本発明は、これらのマーカー遺伝子の抑制または誘導の阻害を検出することにより、細胞の老化を阻害または増強する化合物を同定する方法を提供する。また、実験的に誘導可能なp21およびp16という2つの異なる細胞CDK阻害剤をコードする組換え発現作成物を含む組換え哺乳動物細胞、および、CDK阻害剤により調節される遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子を発現する組換え発現作成物を含む組換え哺乳動物細胞である、試薬も提供する。

**【0003】****2. 関連分野の要約**

細胞周期進行は、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)として知られる、1セットのセリン/トレオニンキナーゼにより大部分調節される。CDK阻害剤として知られる特殊な群のタンパク質は、CDKと相互作用して阻害し、よって、種々の生理的状況で細胞周期停止を引き起こす(Sieleckiら、2000、J. Med. Chem. 43:1~18および本明細書の文献参照)。CDK阻害剤には2つのファミリーが存在する。Cip/Kipとして知られる最初のは、p21<sup>Waf1/Cip1/Sdi1</sup>、p27<sup>Kip1</sup>、およびp57<sup>Kip</sup><sup>2</sup>を含む。第二ファミリーのInk4は、p16<sup>Ink4</sup>、p14<sup>ARF</sup>、p1

5<sup>Ink4b</sup>、p18<sup>Ink4c</sup>、およびp19<sup>Ink4d</sup>を含む。特異的CDK阻害剤の発現は、異なる因子により活性化される。例えば、接触阻害はp27およびp16を誘導し(Dietrichら、1997、Oncogene 15:2743~2747)、細胞外抗有糸分裂誘起因子、例えばTGF $\beta$ はp15を誘導し(Reynisdottirら、1995、Gene Dev. 9:1831~1845)、血清枯渴はp27を誘導し(Polyakら、1994、Genes Dev 8:9~22)、UV照射はp16を誘導する(Wangら、1996、Cancer Res. 56:2510~2514)。さらに、全ての上記処置、並びに、異なる形のDNA傷害は、既知のCDK阻害剤の中で最も多面発現性であるp21を誘導する(Dotto、2000、BBA Rev. Cancer 1471:M43~M56)。

#### 【0004】

本発明の分野で特に重要である、2つのCDK阻害剤のp21およびp16は、哺乳動物細胞の老化の過程に緊密に関連している。分裂的老化(Alcortaraら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:13742~13747)および傷害誘導老化加速(Robles & Adami、1998、Oncogene 16:1113~1123)の開始時の、p21誘導により細胞増殖は停止する。しかし、このp21の急増加は一過性であり、その後、安定なp16の活性化が起こり、これは、老化細胞の増殖停止の維持に関与すると考えられている。p21(Brownら、1997、Science 277:831~834)またはp16(Serranoら、1996、Cell 85:27~37)のノックアウトにより、老化の開始は遅延または予防される。さらに、p21またはp16のいずれかの異所的過剰発現により、正常および腫瘍細胞の両方において、老化の表現型マーカーを伴った増殖停止が誘導される(Vogtら、1998、Cell Growth Differ. 9:139~146; McConnellら、1998、Curr. Biol. 8:351~354; Fangら、1999、Oncogene 18:2789~2797)。

#### 【0005】

p21は、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)に結合し阻害するタンパク質として(Harperら、1993、Cell 75:805~816)、野生型p53により正の制御を受ける遺伝子として(El-Deiryら、1993、Cancer Res. 55:2910~2919)、および、老化線維芽細胞で過剰発現される増殖阻害遺伝子として(Nodaら、1994、Exp. Cell Res. 211:90~98)として、数グループにより独立的に同定されている。p53調節増殖停止におけるその中心的な役割から、p21は通常腫瘍抑制剤と捉えられる。それにも関わらず、ヒト癌におけるp21変異は稀であり(Hall & Peters、1996、Adv. Cancer Res. 68:67~108)、p21ノックアウトマウスは正常に発達し、腫瘍形成速度の増加を示さない(Dengら、1995、Cell 82:675~684)。

#### 【0006】

p21の細胞レベルは、DNA傷害および分化剤を含む、種々の刺激にตอบสนองして増加する。これらのいくつかの応答は、p53によるp21遺伝子の転写活性化により仲介されるが、p21は、種々のp53とは独立した因子によっても調節される(Gartel & Tyner、1999、Exp. Cell Res. 227:171~181に総説)。

#### 【0007】

p21の一過性誘導は、細胞がDNA傷害を修復できる一過性停止、並びに、DNA傷害または発癌性RAS(Serranoら、1997、Cell 88:593~602)の導入により、正常線維芽細胞(DiLeonardoら、1994、Genes Develop 8:2540~2551;Robles & Adami、1998、Oncogene 16:1113~1123)および腫瘍細胞(Changら、1999、Cancer Res. 59:3761~3767)において誘導される永久的な増殖停止(「老化加速」とも称される)を含む、種々の形の傷害誘導増殖停止を仲介する。p21発現の急増加はまた、加齢中の線維芽細胞の分裂的老化中の終末増殖停止(Nodaら、1994、同上;Alcortaら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci

. USA 93:13742~13747; Steinら、1999、Mol. Cell. Biol. 2109~2117) および有糸分裂後細胞の終末分化 (El-Deiryら、1995、同上; Gartelら、1996、Exp. Cell. Res. 246:280~289) の開始と同時に起こる。

#### 【0008】

p21はそれ自体転写因子ではないが、遺伝子発現に対して間接的な効果を有し、これはその細胞機能に役割を果たし得る (Dotto、2000、BBA Rev. Cancer 1471:M43~M56および本明細書の文献)。p21によるCDK阻害の結果の1つはRbの脱リン酸化であり、これにより、DNA複製および細胞周期進行に關与する多くの遺伝子を調節するE2F転写因子が阻害される (Neivins、1998、Cell Growth Differ. 9:585~593)。p21発現細胞 (p21+/+) とp21非発現細胞 (p21-/-) の比較により、細胞周期進行に關与する数個の遺伝子の放射線誘導阻害においてp21が關与した (de Toledoら、1998、Cell Growth Differ. 9:887~896)。p21によるCDK阻害の別の結果は、転写補因子p300の刺激であり、これはNf Bを増大させる (Perkinsら、1988、Science 275:523~527)。多くの誘導性転写因子を増強する、ヒストンアセチルトランスフェラーゼp300の活性化は、遺伝子発現に対して多面的発現効果を有し得る (Snowden&Perkins、1988、Biochem. Pharmacol. 55:1947~1954)。p21はまた、JNKキナーゼアポトーシスシグナル調節キナーゼ1Mycおよびその他などの、CDK以外の多くの転写調節因子および補調節因子とのその相互作用を介して遺伝子発現に影響を及ぼし得る (Dotto、2000、BBA Rev. Cancer 1471:M43~M56)。これらの相互作用は、対応する経路により調節される遺伝子の発現に影響を及ぼし得る。

#### 【0009】

本発明に特に關連した別のCDK阻害剤はp16<sup>INK4A</sup>であり; ヒトタンパク質はSerranoら (1993、Nature 366:704~707)

により記載されている。上記したように、p16は、哺乳動物細胞における老化の必須調節因子である。それは、真正な腫瘍サプレッサーであり、ヒト癌における最も一般的な変異遺伝子の1つである(Hall & Peters、1996、Adv. Cancer Res. 68:67~108)。p16は、CDK4およびCDK6を直接阻害することが知られ、同様にCDK2も間接的に阻害し得る(McConnellら、1999、Molec. Cell. Biol. 19:1981~1989)。

#### 【0010】

当分野では、その発現が、p21およびp16などのCDK阻害剤遺伝子の誘導により変調される遺伝子を同定することが依然として必要である。当分野ではまた、細胞の老化、発癌および年齢関連疾病に対する化合物の効果を評価するための標的を開発することも必要である。

#### 【0011】

(発明の要約)

本発明は、その発現が、CDK阻害剤遺伝子発現の誘導により変調される遺伝子を同定する試薬および方法を提供する。本発明はまた、細胞の老化、発癌および年齢関連疾病を予防するための、または抗癌治療の効力を増加するための、合理的な薬物設計の第一段階として、細胞遺伝子発現に対するp21およびp16などのCDK阻害剤の効果を阻害または増強する化合物を同定する試薬および方法も提供する。

#### 【0012】

第一の態様において、本発明は、誘導性のCDK阻害剤遺伝子を含む哺乳動物細胞を提供する。好ましい実施形態において、CDK阻害剤遺伝子は、p21またはp16をコードする。好ましい実施形態において、哺乳動物細胞は、誘導性p21遺伝子または誘導性p16遺伝子をコードする組換え発現作成物を含む、組換え哺乳動物細胞である。より好ましくは、作成物は、誘導性プロモーターの転写制御下にある、p21、最も好ましくはヒトp21をコードするヌクレオチド配列を含む。追加のより好ましい実施形態において、作成物は、誘導性プロモーターの転写制御下にある、p16、最も好ましくはヒトp16をコードするヌ

クレオチド配列を含む。別の実施形態において、作成物は、CDK結合ドメインを含む、より好ましくはp21アミノ酸配列のアミノ酸1から78を含む、p21のアミノ末端部分をコードするヌクレオチド配列を含む。好ましい実施形態において、誘導性プロモーターは、細胞を、誘導性プロモーターからの転写を誘導する誘導剤、より好ましくは生理的に中性の誘導剤と接触させることにより、または、該プロモーターからの転写を阻害する物質を除去することにより誘導できる。好ましい実施形態において、哺乳動物細胞は線維肉腫細胞である。

### 【0013】

本発明の第一の態様の別の実施形態において、リポーター遺伝子は、発現がCDK阻害剤、最も好ましくはp21またはp16により変調される細胞遺伝子から得られたプロモーターの転写制御下にある、組換え発現作成物を含む組換え哺乳動物細胞を提供する。好ましい実施形態において、プロモーターは、発現がp21またはp16などのCDK阻害剤により抑制される、細胞遺伝子から得られる。これらの実施形態において、プロモーターは最も好ましくは、表Iに同定した遺伝子から得られる。最も好ましくは、プロモーターは、ORC1、PRC1、XRCC9、CDC2、サイクリンB1、AIK1、CENP-A、CENP-F、MAD2、BUBR1、MCAK、HSET、CHL1、チモポエチン、MPP2、MPP5、CDC47/MCM7、CDC21/MCM4、DNAリガーゼI、DNA重合酵素、Rad54、エキソヌクレアーゼHEX1/RAD2、PLK1、DHFR、またはシトロンキナーゼから得られる。他の好ましい実施形態において、プロモーターは、発現がp21またはp16などのCDK阻害剤により誘導される細胞遺伝子から得られる。これらの実施形態において、プロモーターは最も好ましくは、表IIに同定した遺伝子から得られる。最も好ましくは、プロモーターは、血清アミロイドA、補体C3、結合組織増殖因子、インテグリン $\alpha$ -3、アクチビンA、ナチュラルキラー細胞タンパク質4、プロサポシン、Mac2結合タンパク質、ガレクチン-3、スーパーオキシドジスムターゼ2、グラニューリン/エピセリン、p66<sup>shc</sup>、リソソーム $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、またはカテプシンBから得られる。本発明の組換え発現作成物を含む好ましいリポーター遺伝子は、ホタルルシフェラーゼ、クロラムフェニコール

アセチルトランスフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、緑蛍光タンパク質、またはアルカリホスファターゼを含む。

【0014】

追加の好ましい実施形態において、本発明は、発現がCDK阻害剤、最も好ましくはp21またはp16により変調される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子をコードする第一組換え発現作成物、並びに、哺乳動物CDK阻害剤遺伝子をコードする第二組換え発現作成物を含む哺乳動物細胞を提供し、これによりCDK阻害剤の発現は哺乳動物細胞で実験的に誘導される。好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp16またはp21である。好ましい実施形態において、哺乳動物CDK阻害剤遺伝子をコードする組換え発現作成物は、誘導性異種プロモーターの転写制御下にあり、ここでは、組換え発現作成物からのCDK阻害剤の発現は、組換え細胞を、誘導性プロモーターからの転写を誘導する誘導剤と接触させることにより、または、該プロモーターからの転写を阻害する物質を除去することにより仲介される。好ましくは、作成物は、p21、最も好ましくはヒトp21をコードするヌクレオチド配列を含む。別の好ましい実施形態において、作成物は、p16、最も好ましくはヒトp16をコードするヌクレオチド配列を含む。他の実施形態において、作成物は、CDK結合ドメインを含む、より好ましくはp21アミノ酸配列のアミノ酸1から78を含む、p21のアミノ末端部分をコードするヌクレオチド配列を含む。好ましい実施形態において、プロモーターは、発現がp21またはp16などのCDK阻害剤により抑制される細胞遺伝子から得られる。これらの実施形態において、プロモーターは最も好ましくは、表Iに同定した遺伝子から得られる。他の好ましい実施形態において、プロモーターは、発現がp21またはp16などのCDK阻害剤により誘導される細胞遺伝子から得られる。これらの実施形態において、プロモーターは最も好ましくは、表IIに同定した遺伝子から得られる。本発明の組換え発現作成物を含む好ましいリポーター遺伝子は、ホタルルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、緑蛍光タンパク質、またはアルカリホスファターゼを含む。好ましい実施形態において、哺乳動物細胞は線維肉腫細胞である。

## 【0015】

第二の態様において、本発明は、培地を、CDK阻害剤を発現している細胞によって馴化している、馴化細胞培養培地、並びに、該馴化培地を作成する方法を提供する。好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。好ましい実施形態において、馴化培地は、哺乳動物細胞培養培地、最も好ましくは血清添加剤を含まない合成培地中で、p21またはp16発現細胞を培養することにより作成する。本発明のこの態様に有用なCDK阻害剤発現は、内因性CDK阻害剤発現、並びに、誘導性プロモーターの転写制御下にあるCDK阻害剤をコードする組換え発現作成物の誘導性発現の両方を含む。好ましいCDK阻害剤は、p21およびp16を含む。好ましい細胞は、哺乳動物細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、より好ましくはマウスまたはヒト細胞を含む。特に好ましい実施形態は、線維肉腫細胞、より好ましくはヒト線維肉腫細胞、最も好ましくはヒトHT1080線維肉腫細胞系およびその誘導体である。

## 【0016】

本発明のこの態様はまた、哺乳動物細胞において、CDK阻害剤の誘導する有糸分裂誘起または抗アポトーシス因子の発現を阻害する化合物を同定するスクリーニング法を提供する。好ましい実施形態において、該方法は、化合物の存在下または非存在下、細胞中で、CDK阻害剤、最も好ましくはp21またはp16の発現を誘導し、そして、馴化培地中、有糸分裂誘起物質または抗アポトーシス化合物またはその複数の発現を比較する段階を含む。CDK阻害剤作用の阻害剤は、該化合物の非存在下よりも該化合物の存在下の方が、馴化培地中で、より少ない量の有糸分裂誘起物質または抗アポトーシス化合物またはその複数を含むことにより同定する。本発明のこの態様に提供される方法では、任意のCDK阻害剤発現細胞、最も好ましくはp21またはp16発現細胞が有用であり、該細胞中のp21またはp16発現は、内因性p21またはp16を誘導することにより、または、本発明に記載のp21またはp16をコードする誘導性発現作成物を含む細胞を使用することにより達成できる。好ましい細胞は、哺乳動物細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、より好ましくはマウスまたはヒト細胞を含む。特に好ましい実施形態では、線維肉腫細胞、より好ましくはヒト線維肉腫

細胞、最も好ましくはヒトHT1080線維肉腫細胞系およびその誘導体である。

#### 【0017】

別の実施形態において、本発明は、哺乳動物細胞においてCDK阻害剤により誘導される有糸分裂誘起または抗アポトーシス因子の発現を阻害する化合物を同定する方法を提供し、ここでは、該細胞は、p21またはp16などのCDK阻害剤により誘導される細胞遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子をコードする組換え発現作成物を含む。好ましい実施形態において、プロモーターは、CTGF、アクチビンA、エピセリン/グラニューリン、ガレクチン-3およびプロサポシンのプロモーターを含む。好ましいレポーター遺伝子は、ホタルルシフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼおよび緑蛍光タンパク質を含むがこれに限定されない。これらの実施形態において、CDK阻害剤の仲介するリポーター遺伝子発現誘導の阻害を使用して、CDKI阻害剤発現細胞において有糸分裂誘起物質または抗アポトーシス因子の誘導を阻害する化合物を同定する。

#### 【0018】

この態様において、本発明はまた、哺乳動物細胞における有糸分裂誘起または抗アポトーシス因子または化合物の産生を阻害する方法を提供し、該方法は、該細胞を、有糸分裂誘起または抗アポトーシス因子の産生を阻害する化合物と接触させる段階を含み、該化合物は、本発明のこの態様の前記の方法により同定する。好ましい実施形態において、有糸分裂誘起または抗アポトーシス因子の産生が阻害される、阻害化合物と接触させた哺乳動物細胞は、線維芽細胞、最も好ましくは間質線維芽細胞である。

#### 【0019】

第三の態様において、本発明は、CDK阻害剤により仲介される細胞遺伝子発現の変調を阻害する化合物を同定する方法を提供する。これらの方法は、哺乳動物細胞においてCDK阻害剤を誘導または別様に産生し；該化合物の存在下で、発現がCDK阻害剤により変調される細胞遺伝子の発現の変化について細胞をアッセイし；そして、細胞遺伝子の発現が、該化合物の非存在下よりも該化合物

の存在下の方が、より低い程度で変化する場合、CDK阻害剤により仲介される細胞遺伝子発現の変調を阻害する化合物と同定する段階を含む。好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。好ましい実施形態において、細胞遺伝子はCDK阻害剤により抑制され、阻害剤は、CDK阻害剤を該化合物の非存在下で発現した場合に検出されるレベルよりも高いレベルの遺伝子の発現を検出することにより検出される。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。好ましい実施形態において、遺伝子を表Iに同定する。別の好ましい実施形態において、細胞遺伝子はCDK阻害剤により誘導され、阻害剤は、CDK阻害剤を該化合物の非存在下で発現した場合に検出されるレベルよりも低いレベルの遺伝子の発現を検出することにより検出される。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。好ましい実施形態において、遺伝子を表IIに同定される。さらに別の実施形態において、該方法は、発現がCDK阻害剤により変調される遺伝子から得られたプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子を含む、組換え哺乳動物細胞を使用して実施する。CDK阻害剤により抑制される遺伝子から得られたプロモーターを含む作成物を使用したこれらの実施形態において、リポーター遺伝子産物は、該化合物がCDK阻害剤により仲介される遺伝子発現変調の阻害剤である場合、該化合物の非存在下よりも存在下の方が、より高いレベルで産生される。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。これらの実施形態において、プロモーターは、最も好ましくは表Iに同定した遺伝子から得られる。最も好ましくは、プロモーターは、ORC1、PRC1、XRCC9、CDC2、サイクリンB1、AIK1、CENP-A、CENP-F、MAD2、BUBR1、MCAK、HSET、CHL1、チモポエチン、MPP2、MPP5、CDC47/MCM7、CDC21/MCM4、DNAリガーゼI、DNA重合酵素、Rad54、エキソヌクレアーゼHEX1/RAD2、PLK1、DHFRまたはシトシンキナーゼから得られる。CDK阻害剤により誘導される遺伝子から得られたプロモーターを含む作成物を使用した場合、レポーター遺伝子産物は、該化合物がCDK阻害剤の仲介する遺伝子発現変調の阻害剤である

場合、該化合物の非存在下よりも存在下の方がより低いレベルで産生される。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。これらの実施形態において、プロモーターは最も好ましくは、表IIに同定した遺伝子から得られる。最も好ましくは、プロモーターは、血清アミロイドA、補体C3、結合組織増殖因子、インテグリン-3、アクチビンA、ナチュラルキラー細胞タンパク質4、プロサポシン、Mac2結合タンパク質、ガレクチン-3、スーパーオキシドジスムターゼ2、グラニューリン/エピセリン、p66<sup>shc</sup>、リソソーム-ガラクトシダーゼ、またはカテプシンBから得られる。本発明の組換え発現作成物を含む好ましいレポーター遺伝子は、ホタルルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、-ガラクトシダーゼ、緑蛍光タンパク質、またはアルカリホスファターゼを含む。他の好ましい実施形態において、細胞は、発現がCDK阻害剤により変調される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるレポーター遺伝子をコードする第一組換え発現作成物、並びに、哺乳動物CDK阻害剤遺伝子をコードする第二組換え発現作成物を含み、それによって、CDK阻害剤の発現が哺乳動物細胞で実験的に誘導される。CDK阻害剤により誘導または抑制されるレポーター遺伝子または内因性遺伝子の産物は、免疫学的試薬を使用して、遺伝子産物の活性についてアッセイすることにより、または相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出する。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。

#### 【0020】

第四の態様において、本発明は、哺乳動物細胞の老化を阻害する化合物を同定する方法を提供する。これらの方法は、哺乳動物細胞を該化合物の存在下で物質で処理するか、または、老化を誘導する条件下で哺乳動物細胞を培養し；哺乳動物細胞を、CDK阻害剤遺伝子発現により抑制または誘導される遺伝子の抑制または誘導についてアッセイし；そして、該化合物の存在下で、CDK阻害剤により抑制される遺伝子が抑制されない場合、またはCDK阻害剤により誘導される遺伝子が誘導されない場合、老化阻害剤として該化合物を同定する段階を含む。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21ま

たはp 1 6である。好ましい実施形態において、細胞遺伝子はC D K阻害剤により抑制され、老化阻害剤は、C D K阻害剤を該化合物の非存在下で発現した場合に検出されるレベルよりも高いレベルで遺伝子の発現を検出することにより同定される。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、C D K阻害剤はp 2 1またはp 1 6である。好ましい実施形態において、遺伝子を表Iに同定される。別の好ましい実施形態において、細胞遺伝子はC D K阻害剤により誘導され、老化阻害剤は、C D K I阻害剤を該化合物の非存在下で発現した場合に検出されるレベルよりも低いレベルで遺伝子の発現を検出することにより検出される。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、C D K阻害剤はp 2 1またはp 1 6である。好ましい実施形態において、遺伝子を表I Iに同定する。さらに別の実施形態において、該方法は、発現がC D K阻害剤により変調される、遺伝子から得られたプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子を含む、組換え哺乳動物細胞を使用して実施する。これらの実施形態において、C D K阻害剤により抑制される遺伝子から得られたプロモーターを含む作成物を使用した場合に該化合物の非存在下よりも存在下の方がより高いレベルでリポーター遺伝子産物を産生、または、C D K阻害剤により誘導される遺伝子から得られたプロモーターを含む作成物を使用した場合に該化合物の非存在下よりも存在下の方がより低いレベルでリポーター遺伝子産物を産生が、該化合物が老化阻害剤である場合に検出される。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、C D K阻害剤はp 2 1またはp 1 6である。プロモーターは好ましくは、表I (C D K阻害剤により抑制される遺伝子) または表I I (C D K阻害剤により誘導される遺伝子) に同定された遺伝子から得られる。p 2 1抑制遺伝子では、プロモーターは最も好ましくは、O R C 1、P R C 1、X R C C 9、C D C 2、サイクリンB 1、A I K 1、C E N P - A、C E N P - F、M A D 2、B U B R 1、M C A K、H S E T、C H L 1、チモポエチン、M P P 2、M P P 5、C D C 4 7 / M C M 7、C D C 2 1 / M C M 4、D N AリガーゼI、D N A重合酵素、R a d 5 4、エキソヌクレアーゼH E X 1 / R A D 2、P L K 1、D H F Rまたはシトロンキナーゼから得られる。C D K阻害剤により誘導される遺伝子では、プロモーターは最も好ましくは、血清アミロイドA、補体C 3、結合組織増殖因

子、インテグリン - 3、アクチビンA、ナチュラルキラー細胞タンパク質4、プロサポシン、Mac2結合タンパク質、ガレクチン - 3、スーパーオキシドジスムターゼ2、グラニューリン/エピセリン、p66<sup>shc</sup>、リソソーム - ガラクトシダーゼまたはカテプシンBから得られる。他の好ましい実施形態において、細胞は、発現がCDK阻害剤により変調される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子をコードする第一組換え発現作成物、並びに、哺乳動物CDK阻害剤遺伝子をコードする第二組換え発現作成物を含み、これによって、CDK阻害剤の発現が哺乳動物細胞において実験的に誘導される。CDK阻害剤により誘導または抑制されるリポーター遺伝子または内因性遺伝子の産物は、免疫学的試薬を使用して、遺伝子産物の活性をアッセイすることにより、または相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出する。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。

#### 【0021】

第五の態様において、本発明は、細胞の老化、年齢関連疾病または年齢関連遺伝子産物を阻害する方法を提供し、該方法は、細胞を、本発明の前記の態様に提供した方法を使用して決定したような老化を阻害する化合物と接触させる段階を含む。

#### 【0022】

第六の態様において、本発明は、哺乳動物細胞の老化を増強する化合物を同定する方法を提供する。これらの方法は、該化合物の存在下および非存在下で哺乳動物細胞においてCDK阻害剤の発現を誘導し；CDK阻害剤遺伝子発現により抑制または誘導される遺伝子の抑制または誘導について哺乳動物腫瘍細胞をアッセイし；そして、該化合物の存在下で、CDK阻害剤により抑制される遺伝子がより大きな程度で抑制されるか、またはCDK阻害剤により誘導される遺伝子がより大きな程度で誘導される場合、該化合物を老化増強剤と同定する段階を含む。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。好ましい実施形態において、細胞遺伝子はCDK阻害剤により抑制され、増強剤は、CDK阻害剤を該化合物の非存在下で発現した場合に

検出されるレベルよりも低いレベルで細胞遺伝子の発現を検出することにより検出される。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。好ましい実施形態において、遺伝子を表Iに同定する。別の好ましい実施形態において、細胞遺伝子はCDK阻害剤により誘導され、増強剤は、CDK阻害剤を該化合物の非存在下で発現した場合に検出されるレベルよりも高いレベルで細胞遺伝子の発現を検出することにより検出される。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。好ましい実施形態において、遺伝子を表IIに同定する。さらに別の実施形態において、該方法は、発現がCDK阻害剤により変調される遺伝子から得られたプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子を含む組換え哺乳動物細胞を使用して実施し、ここでは該細胞は、発現がCDK阻害剤により変調される遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子を有する作成物を含む。これらの実施形態において、CDK阻害剤により抑制される遺伝子から得られたプロモーターを含む作成物を使用した場合に該化合物の非存在下よりも存在下の方がより低いレベルでリポーター遺伝子産物を産生、または、CDK阻害剤により誘導される遺伝子から得られたプロモーターを含む作成物を使用した場合に該化合物の非存在下よりも存在下の方がより高いレベルでリポーター遺伝子産物を産生が、該化合物が老化増強剤である場合に検出される。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。好ましい実施形態において、プロモーターは、発現がCDK阻害剤により抑制される遺伝子、最も好ましくは表Iに同定した遺伝子から得られる。最も好ましくは、プロモーターは、ORC1、PRC1、XRCC9、CDC2、サイクリンB1、AIK1、CENP-A、CENP-F、MAD2、BUBR1、MCAK、HSET、CHL1、チモポエチン、MPP2、MPP5、CDC47/MCM7、CDC21/MCM4、DNAリガーゼI、DNA重合酵素、Rad54、エキソヌクレアーゼHEX1/RAD2、PLK1、DHFRまたはシトロンキナーゼから得られる。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。別の好ましい実施形態において、プロモーターは、発現がCDK阻害剤により誘導される遺伝

子、最も好ましくは表 I I に同定した遺伝子から得られる。最も好ましくは、プロモーターは、血清アミロイド A、補体 C 3、結合組織増殖因子、インテグリン - 3、アクチビン A、ナチュラルキラー細胞タンパク質 4、プロサポシン、M a c 2 結合タンパク質、ガレクチン - 3、スーパーオキシドジスムターゼ 2、グラニュリン / エピセリン、p 6 6<sup>shc</sup>、リソソーム - ガラクトシダーゼ、またはカテプシン B から得られる。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、C D K 阻害剤は p 2 1 または p 1 6 である。他の好ましい実施形態において、細胞は、発現が C D K 阻害剤により変調される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子をコードする第一組換え発現作成物、並びに、哺乳動物 C D K 阻害剤遺伝子をコードする第二組換え発現作成物を含み、これによって、C D K 阻害剤の発現は哺乳動物細胞において実験的に誘導される。C D K 阻害剤により誘導または抑制されるリポーター遺伝子または内因性遺伝子の産物は、免疫学的試薬を使用して、遺伝子産物の活性をアッセイすることにより、または相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出する。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、C D K 阻害剤は p 2 1 または p 1 6 である。

#### 【 0 0 2 3 】

第七の態様において、本発明は、腫瘍細胞、過形成細胞または過度の増殖に因り病的または疾病の原因となる細胞である任意の細胞型において、細胞の老化を促進または増強する方法を提供し、該方法は、細胞を、本発明の前記の態様に提供した方法を使用して決定したような老化を増強する化合物と接触させる段階を含む。

#### 【 0 0 2 4 】

第八の態様において、本発明は、本明細書に開示したような本発明の方法のいずれかを使用して同定した化合物を提供する。

#### 【 0 0 2 5 】

第九の態様において、本発明は、細胞周期進行に關与する遺伝子の強化された複数の核酸種を得る方法を提供する。これらの方法は、哺乳動物細胞において C D K 阻害剤の発現を誘導し ; p 2 1 誘導前並びに p 2 1 を誘導し細胞増殖が停止

した後、哺乳動物細胞から細胞mRNAを得；そして、細胞周期進行に關与する遺伝子の強化された複数の核酸種を得る段階を含む。好ましい実施形態において、細胞周期進行遺伝子の強化された複数の核酸種は、当分野で既知のサブトラクティブハイブリダイゼーションにより得、これによりp21発現細胞で不十分に提示される核酸種を選択的に強化する。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。

#### 【0026】

第十の態様において、本発明は、パラクリン機能を有する分泌タンパク質並びに老化および年齢関連疾病に關与するタンパク質をコードする遺伝子について強化した複数の核酸種を得る方法を提供する。これらの方法は、哺乳動物細胞においてCDK阻害剤の発現を誘導し；CDK阻害剤を誘導する前および後に哺乳動物細胞から細胞mRNAを得；そして、CDK阻害剤が誘導された後に細胞で発現が増加した遺伝子について強化された複数の核酸種を得る段階を含む。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。好ましい実施形態において、タンパク質のパラクリン機能は、有糸分裂誘起および抗アポトーシス作用である。好ましい実施形態において、パラクリン機能を有する分泌タンパク質並びに老化および年齢関連疾病に關与するタンパク質をコードする遺伝子について強化された複数の核酸種は、当分野で既知のサブトラクティブハイブリダイゼーションにより得、これによりCDK阻害剤発現細胞で過剰提示される核酸種は選択的に強化される。

#### 【0027】

第十一の態様において、本発明は、細胞老化マーカーである遺伝子を同定する方法を提供し、該方法は、第一個体群の哺乳動物細胞においてCDK阻害剤の発現を生じ、そして第二個体群の哺乳動物細胞において休止を誘導し；各個体群の細胞からmRNAを得；細胞におけるCDK阻害剤の産生前および後の細胞における遺伝子発現パターンを、細胞が休止となる前および後の細胞における遺伝子発現パターンと比較し；CDK阻害剤が産生された後に細胞において強力に誘導された複数の遺伝子を、休止細胞で強力に誘導された複数の遺伝子と比較し；そして、休止細胞では強力に誘導されていないCDK阻害剤を産生する細胞で強力

に誘導される遺伝子を同定する段階を含む。本発明のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。

【0028】

第十二の態様において、本発明は、哺乳動物細胞の老化を検出する方法を提供する。これらの方法は、老化のマーカである遺伝子の発現を検出する段階を含む。好ましい実施形態において、好ましい老化マーカーは、結合組織増殖因子（CTGF）、血清アミロイドA、インテグリン-3、アクチビンA、ナチュラルキラー細胞タンパク質4、Mac2結合タンパク質、または組織トランスグルタミナーゼを含む。

【0029】

第十三の態様において、本発明は、哺乳動物細胞の老化の誘導を促進する化合物を同定する方法を提供する。これらの方法は、哺乳動物細胞を物質で処理するか、または、哺乳動物細胞を、該化合物の存在下で老化を誘導する条件下で培養し；哺乳動物腫瘍細胞を、CDK阻害剤遺伝子発現により抑制または誘導される遺伝子の抑制または誘導についてアッセイし；そして、該化合物の存在下で、CDK阻害剤により抑制される遺伝子がさらに抑制、すなわちより大きな程度で抑制、またはCDK阻害剤により誘導される遺伝子がさらに誘導、すなわちより大きな程度で誘導される場合、該化合物を老化増強剤と同定する段階を含む。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。好ましい実施形態において、細胞遺伝子はCDK阻害剤により抑制され、老化誘導を促進する化合物は、CDK阻害剤を該化合物の非存在下で発現した場合に検出されるレベルよりも低いレベルで細胞遺伝子の発現を検出することにより検出される。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。好ましい実施形態において、遺伝子を表Iに同定する。別の好ましい実施形態において、細胞遺伝子はCDK阻害剤により誘導され、老化誘導を促進する化合物は、CDK阻害剤を該化合物の非存在下で発現した場合に検出されるレベルよりも高いレベルで細胞遺伝子の発現を検出することにより検出される。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。好ましい実施形態において

、遺伝子を表 I I に同定する。さらに別の実施形態において、該方法は、発現が C D K 阻害剤により変調される遺伝子から得られたプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子を含む組換え哺乳動物細胞を使用して実施し、ここでの細胞は、発現が C D K 阻害剤により変調される遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子を有する作成物を含む。これらの実施形態において、C D K 阻害剤により抑制される遺伝子から得られたプロモーターを含む作成物を使用する場合に該化合物の非存在下よりも存在下の方がより低いレベルでリポーター遺伝子産物を産生、または、C D K 阻害剤により誘導される遺伝子から得られたプロモーターを含む作成物を使用する場合に該化合物の非存在下よりも存在下の方がより高いレベルでリポーター遺伝子産物を産生が、該化合物が老化の誘導を促進する場合に検出される。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、C D K 阻害剤は p 2 1 または p 1 6 である。好ましい実施形態において、プロモーターは、発現が C D K 阻害剤により抑制される遺伝子、最も好ましくは表 I に同定した遺伝子から得られる。最も好ましくは、プロモーターは、O R C 1、P R C 1、X R C C 9、C D C 2、サイクリン B 1、A I K 1、C E N P - A、C E N P - F、M A D 2、B U B R 1、M C A K、H S E T、C H L 1、チモポエチン、M P P 2、M P P 5、C D C 4 7 / M C M 7、C D C 2 1 / M C M 4、DNAリガーゼ I、DNA重合酵素、R a d 5 4、エキソヌクレアーゼ H E X 1 / R A D 2、P L K 1、D H F R または シトロンキナーゼから得られる。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、C D K 阻害剤は p 2 1 または p 1 6 である。別の好ましい実施形態において、プロモーターは、発現が C D K 阻害剤により誘導される遺伝子、最も好ましくは表 I I に同定した遺伝子から得られる。最も好ましくは、プロモーターは、血清アミロイド A、補体 C 3、結合組織増殖因子、インテグリン - 3、アクチビン A、ナチュラルキラー細胞タンパク質 4、プロサポシン、M a c 2 結合タンパク質、ガレクチン - 3、スーパーオキシドジスムターゼ 2、グラニューリン / エピセリン、p 6 6<sup>shc</sup>、リソソーム - ガラクトシダーゼ、またはカテプシン B から得られる。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、C D K 阻害剤は p 2 1 または p 1 6 である。他の好ましい実施形態において、細胞は、発現が C D K 阻害剤により変

調される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子をコードする第一組換え発現作成物、並びに、哺乳動物CDK阻害剤遺伝子をコードする第二組換え発現作成物を含み、これによって、CDK阻害剤の発現が哺乳動物細胞において実験的に誘導される。CDK阻害剤により誘導または抑制されるリポーター遺伝子または内因性遺伝子の産物は、免疫学的試薬を使用して、遺伝子産物の活性についてアッセイすることにより、または相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出する。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。

#### 【0030】

第十四の態様において、本発明は、哺乳動物細胞の老化を誘導する化合物を同定する方法を提供する。これらの方法は、哺乳動物細胞を、該化合物の存在下および非存在下で、CDK阻害剤遺伝子発現により抑制または誘導される遺伝子の抑制または誘導についてアッセイし；そして、該化合物の存在下で、CDK阻害剤により抑制される遺伝子が抑制されるか、またはCDK阻害剤により誘導される遺伝子が誘導される場合に、老化を誘導する化合物と同定する段階を含む。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。好ましい実施形態において、細胞遺伝子はCDK阻害剤により抑制され、老化を誘導する化合物は、該化合物の非存在下で検出されるレベルよりも低いレベルで細胞遺伝子の発現を検出することにより検出する。好ましい実施形態において、遺伝子を表Iに同定する。別の好ましい実施形態において、細胞遺伝子はCDK阻害剤により誘導され、老化を誘導する化合物は、該化合物の非存在下で検出されるレベルよりも高いレベルで細胞遺伝子の発現を検出することにより検出する。好ましい実施形態において、遺伝子を表IIに同定する。さらに別の実施形態において、該方法は、発現がCDK阻害剤により変調される遺伝子から得られたプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子を含む、組換え哺乳動物細胞を使用して実施し、ここでは、該細胞は、発現がCDK阻害剤により変調される遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子を有する作成物を含む。これらの実施形態において、CDK阻害剤により抑制される遺伝子から得られたプロモーターを含む作成物を使用した場合に該化合物の非

存在下よりも存在下の方がより低いレベルでリポーター遺伝子産物を産生、または、CDK阻害剤により誘導される遺伝子から得られたプロモーターを含む作成物を使用する場合に該化合物の非存在下よりも存在下の方がより高いレベルでリポーター遺伝子産物を産生が、該化合物が老化を誘導する場合に検出される。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。好ましい実施形態において、プロモーターは、発現がCDK阻害剤により抑制される遺伝子、最も好ましくは表Iに同定した遺伝子から得られる。最も好ましくは、プロモーターは、ORC1、PRC1、XRCC9、CDC2、サイクリンB1、AIK1、CENP-A、CENP-F、MAD2、UBR1、MCAK、HSET、CHL1、チモポエチン、MPP2、MPP5、CDC47/MCM7、CDC21/MCM4、DNAリガーゼI、DNA重合酵素、Rad54、エキソヌクレアーゼHEX1/RAD2、PLK1、DHFRまたはシトロンキナーゼから得られる。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。別の好ましい実施形態において、プロモーターは、発現がCDK阻害剤により誘導される遺伝子、最も好ましくは表IIに同定した遺伝子から得られる。最も好ましくは、プロモーターは、血清アミロイドA、補体C3、結合組織増殖因子、インテグリン $\alpha$ -3、アクチビンA、ナチュラルキラー細胞タンパク質4、プロサポシン、Mac2結合タンパク質、ガレクチン-3、スーパーオキシドジスムターゼ2、グラニューリン/エピセリン、p66<sup>shc</sup>、リソソーム $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、またはカテプシンBから得られる。CDK阻害剤により誘導または抑制されるリポーター遺伝子または内因性遺伝子の産物は、免疫学的試薬を使用して、遺伝子産物の活性をアッセイすることにより、または相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出する。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。

#### 【0031】

本発明の特定の好ましい実施形態は、以下のある好ましい実施形態のより詳細な説明および特許請求の範囲から明らかとなる。

#### 【0032】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

本発明は、CDK阻害剤誘導細胞老化の仲介に関与する遺伝子を同定するための試薬および方法、並びに、哺乳動物細胞の老化または休止を阻害または増強できる化合物を提供する。特に、細胞の老化に関与し、CDK阻害剤p21またはp16により誘導される遺伝子を同定するための該試薬および方法の実施形態を提供する。

【0033】

本発明の目的では、「CDK阻害剤」なる語は、サイクリン依存性キナーゼ阻害の酵素活性を有する哺乳動物遺伝子ファミリーのメンバーを包含するものとする。この定義に明確に含まれるのは、CDK阻害剤p27、p15、p14、p18、および特にp16およびp21であり、その後者の2つが、本発明の試薬および方法の特に好ましい実施形態である。

【0034】

本発明の目的では、「細胞 (cell)」または「細胞群 (cells)」への言及は等価であると捉え、特に、当分野で既知のように増殖し維持した哺乳動物細胞のインビトロ培養液を包含する。

【0035】

本発明の目的では、複数形の「細胞遺伝子」への言及は、1つの遺伝子並びに2つ以上の遺伝子を包含するものとする。細胞遺伝子発現の変調の効果、または細胞遺伝子から得られたプロモーターの転写制御下にあるリポーター作成物は、第一遺伝子において検出でき、その後、その効果を、第二または任意の数の追加の遺伝子またはリポーター遺伝子作成物を試験することにより繰返すことができることは、当業者により理解される。別に、2つ以上の遺伝子またはリポーター遺伝子作成物の発現を、本発明の範囲内で同時にアッセイできる。

【0036】

本発明の目的では、「休止」なる語は、血清枯渇の条件下で培養哺乳動物細胞において生じるような、細胞増殖およびDNA複製の一時的停止を包含すると理解する。

【0037】

本発明の目的では、「老化」なる語は、正常細胞の増殖寿命の終了時に、または細胞毒性薬物、DNA傷害または他の細胞襲撃に応答して正常または腫瘍細胞で生じるような、増殖因子により逆転できないDNA複製および細胞増殖の永久的な停止を含むと理解する。

【0038】

老化は多くの方法で哺乳動物細胞に誘導できる。第一は、インビボまたはインビトロでの正常細胞増殖の天然の結果である：老化になる前に正常細胞が受けることのできる細胞分裂、継代または世代の数は限られている。正確な数は細胞型および起源種により変化する(Hayflick & Moorhead、1961、Exp. Cell Res. 25:585~621)。任意の細胞型において老化を誘導する別の方法は、大半の抗癌薬、放射線および細胞分化剤などの細胞毒性薬物での処置である。Changら、1999、Cancer Res. 59:3761~3767参照。老化はまた、その細胞に腫瘍抑制遺伝子(p53、p21、p16またはRbなど)を形質導入し、そこで該遺伝子を発現することにより、任意の哺乳動物細胞に迅速に誘導できる。Sugrueら、1997、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:9648~9653; Uhrbomら、1997、Oncogene 15:505~514; Xuら、1997、Oncogene 15:2589~2596; Vogtら、1998、Cell Growth Differ. 9:139~146参照。

【0039】

本発明の試薬は、CDK阻害剤遺伝子、最も好ましくはp21遺伝子またはp16遺伝子の発現を誘導できる(該遺伝子は遺伝子工学により導入された内因性遺伝子または外来性遺伝子である)、任意の哺乳動物細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、より好ましくはマウス細胞、最も好ましくはヒト細胞を含む。実施例は、誘導性p21およびp16遺伝子をコードする組換え発現作成物を含む組換え哺乳動物細胞を開示するが、これらの実施形態は単に実験設計選択肢および簡便性の問題であり、本発明は完全にp21およびp16などの内因性CDK阻害剤遺伝子の誘導を包含することを理解する。

【0040】

好ましい実施形態において、本発明は、誘導性哺乳動物 p 2 1 遺伝子をコードする組換え発現作成物を含む哺乳動物細胞を提供する。好ましい実施形態において、p 2 1 遺伝子は、本明細書に参考として取り込む、米国特許第 5 , 4 2 4 , 4 0 0 号に示されるようなヌクレオチドおよびアミノ酸配列を有するヒト p 2 1 である。別の実施形態において、p 2 1 遺伝子は、好ましくは天然ヒト p 2 1 タンパク質（参考として取り込む米国特許第 5 , 8 0 7 , 6 9 2 号に開示したような）の 1 から 7 8 のアミノ酸残基を含み、より好ましくは天然ヒト p 2 1 タンパク質（Nakanishiら、1995、EMBO J . 1 4 : 5 5 5 ~ 5 6 3）のアミノ酸 2 1 ~ 7 1 を含む CDK 結合ドメインを含む、ヒト p 2 1 遺伝子のアミノ末端部分である。好ましい宿主細胞は、哺乳動物細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、より好ましくはマウスまたはヒト細胞を含む。特に好ましい実施形態は、線維肉腫細胞、より好ましくはヒト線維肉腫細胞、最も好ましくはヒト HT 1 0 8 0 線維肉腫細胞系およびその誘導体である。最も好ましい細胞系は、2000年4月6日に米国バージニア州マナッサス所在アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに受託番号 P T A 1 6 6 4 で寄託された、p 2 1 - 9 として同定される HT 1 0 8 0 線維肉腫細胞系誘導体である。

#### 【0041】

別の好ましい実施形態において、本発明は、誘導性哺乳動物 p 1 6 遺伝子をコードする、組換え発現作成物を含む、哺乳動物細胞を提供する。好ましい実施形態において、p 1 6 遺伝子は、本明細書に参考として取り込む、Serranoら、1993、Nature 366 : 704 ~ 707 に示したようなヌクレオチドおよびアミノ酸配列を有するヒト p 1 6 である。好ましい宿主細胞は、哺乳動物細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、より好ましくはマウスまたはヒト細胞を含む。特に好ましい実施形態は、線維肉腫細胞、より好ましくはヒト線維肉腫細胞、最も好ましくはヒト HT 1 0 8 0 線維肉腫細胞系およびその誘導体である。最も好ましい細胞系は、2000年10月10日に米国バージニア州マナッサス所在アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに受託番号 で寄託された、HT 1 0 8 0 / L N p 1 6 R O 2 として同定される HT 1 0 8 0 線維肉腫細胞系誘導体である。

## 【0042】

組換え発現作成物は、当業者に理解されるような適切な哺乳動物細胞に導入できる。該作成物の好ましい実施形態は、当分野で公知のような、伝達可能なベクター、より好ましくはウイルスベクター、最も好ましくはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、およびワクシニアウイルスベクターで産生される。一般に哺乳動物細胞バイオテクノロジー；実践的なアプローチ（Butler編）オックスフォード大学出版：ニューヨーク、1991、57～84項参照。

## 【0043】

追加の好ましい実施形態において、本発明の組換え細胞は、誘導性CDK阻害剤遺伝子をコードする作成物を含み、該遺伝子は、誘導性プロモーターの転写制御下にある。より好ましい実施形態において、誘導性プロモーターは、その効果を誘導剤により変調できるトランス作用因子に応答性である。誘導剤は、温度および最も好ましくは誘導剤の存在または非存在を含む、実験的に操作できる任意の因子であり得る。好ましくは誘導剤は、トランス作用因子に特異的である、化学的化合物、最も好ましくは生理的に中性の化合物である。本明細書に開示したような誘導性プロモーターを含む作成物の使用において、組換え発現作成物からのCDK阻害剤の発現は、組換え細胞を、誘導性プロモーターからの転写を誘導する誘導剤と接触させることにより、または該プロモーターからの転写を阻害する物質を除去することにより仲介される。本発明の方法のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。細胞培養液の温度を上昇することにより活性化できる熱ショックプロモーター、およびより好ましくはtetプロモーターおよびそれと哺乳動物転写因子の融合物などのプロモーター/因子対（米国特許第5,654,168号、第5,851,796号および第5,968,773号に開示したような）、およびラクトースオペロンおよびその同族lacIリプレッサータンパク質の細菌lacプロモーターを含む、種々の誘導性プロモーターおよび同族トランス作用因子が従来技術で公知である。好ましい実施形態において、組換え細胞は、lacIリプレッサータンパク質、および、1つまたは複数のlac応答性要素を含むプロモーターの制御下でヒ

ト p 2 1 をコードする組換え発現作成物を発現し、ここで p 2 1 の発現は、細胞を、生理的に中性の誘導剤であるイソプロピルチオ - - ガラクトシドと接触させることにより誘導できる。この好ましい実施形態において、l a c I リプレッサーは、3 ' S S ( C A 州ラホーヤ所在ストラタジーンから市販されている ) として同定される組換え発現作成物によりコードされる。別の好ましい実施形態において、組換え細胞は、l a c I リプレッサータンパク質、および、1 つまたは複数の l a c 応答性要素を含むプロモーターの制御下にあるヒト p 1 6 遺伝子をコードする組換え発現作成物を発現し、ここで、p 1 6 の発現は、細胞を、生理的に中性の誘導剤であるイソプロピル - - ガラクトシドと接触させることにより誘導できる。この好ましい実施形態において、l a c I リプレッサーは、3 ' S S 組換え発現作成物 ( ストラタジーン ) によりコードされる。

#### 【 0 0 4 4 】

本発明はまた、リポーター遺伝子が、発現が p 2 1 または p 1 6 などの C D K 阻害剤により変調される遺伝子のプロモーターの転写制御下にある、組換え発現作成物を提供する。これらは、発現が、C D K 阻害剤により誘導される遺伝子、および、発現が C D K 阻害剤により抑制される遺伝子を含む。本発明のこの態様の好ましい実施形態において、C D K 阻害剤は p 2 1 または p 1 6 である。好ましい実施形態において、プロモーターは、発現が C D K 阻害剤により抑制される遺伝子から得られ、表 I に同定する。最も好ましくは、プロモーターは、O R C 1、P R C 1、X R C C 9、C D C 2、サイクリン B 1、A I K 1、C E N P - A、C E N P - F、M A D 2、B U B R 1、M C A K、H S E T、C H L 1、チモポエチン、M P P 2、M P P 5、C D C 4 7 / M C M 7、C D C 2 1 / M C M 4、DNA リガーゼ I、DNA 重合酵素、R a d 5 4、エキソヌクレアーゼ H E X 1 / R A D 2、P L K 1、D H F R または シトロンキナーゼから得られる。追加の好ましい実施形態において、プロモーターは、発現が、C D K 阻害剤発現により誘導されるか別様に増加する遺伝子から得られ、表 I I に同定する。最も好ましくは、プロモーターは、血清アミロイド A、補体 C 3、結合組織増殖因子、インテグリン - 3、アクチビン A、ナチュラルキラー細胞タンパク質 4、プロサポシン、M a c 2 結合タンパク質、ガレクチン - 3、スーパーオキシドジ

スルターゼ2、グラニューリン/エピセリン、p66<sup>shc</sup>、リソソーム - ガラクトシダーゼ、またはカテプシンBから得られる。その後、これらのリポーター遺伝子は、CDK阻害剤遺伝子発現効果の感度の高く簡便な指示剤として使用し、哺乳動物細胞におけるCDK阻害剤発現の効果を増強または阻害する化合物を容易に同定することが可能となる。これらの作成物用の宿主細胞は、CDK阻害剤遺伝子発現を誘導できる任意の細胞であり得、好ましくは、上記したような誘導性CDK阻害剤遺伝子を含む組換え発現作成物を含む細胞も含む。本発明のこの態様の実践に有用なリポーター遺伝子は、ホタルルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 - ガラクトシダーゼ、緑蛍光タンパク質、およびアルカリホスファターゼを含むがこれに限定されない。

#### 【0045】

好ましい実施形態において、本発明に記載の細胞は、発現がCDK阻害剤により変調される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子をコードする第一組換え発現作成物、並びに、哺乳動物CDK阻害剤遺伝子をコードする第二組換え発現作成物の両方を含み、これによってCDK阻害剤発現を哺乳動物細胞において実験的に誘導できる。本発明のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。

#### 【0046】

別の実施形態において、本発明は、発現がCDK阻害剤により抑制される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子をコードする組換え発現作成物を含む哺乳動物細胞を提供し、該プロモーターは、ORC1、PRC1、XRCC9、CDC2、サイクリンB1、AIK1、CENP-A、CENP-F、MAD2、BUBR1、MCAK、HSET、CHL1、チモポエチン、MPP2、MPP5、CDC47/MCM7、CDC21/MCM4、DNAリガーゼI、DNA重合酵素、Rad54、エキソヌクレアーゼHEX1/RAD2、PLK1、DHFRまたはシトロンキナーゼの遺伝子由来である。本発明のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。さらに別の実施形態において、本発明は、発現がCDK阻害剤により誘導される哺乳動物遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺

伝子をコードする組換え発現作成物を含む哺乳動物細胞を提供し、該プロモーターは、結合組織増殖因子、血清アミロイドA、補体C3、インテグリン - 3、アクチビンA、ナチュラルキラー細胞タンパク質4、プロサポシン、Mac2結合タンパク質、ガレクチン - 3、スーパーオキシドジスムターゼ2、グラニューリン/エピセリン、p66<sup>shc</sup>、リソソーム - ガラクトシダーゼ、またはカテプシンBの遺伝子由来である。本発明のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。

#### 【0047】

本発明は、培地がCDK阻害剤を発現する細胞によりならされている馴化細胞培養培地、および、該馴化培地を作成する方法を提供する。本明細書に使用したような「馴化培地」なる語は、有糸分裂誘起または抗アポトーシス因子を含むCDK阻害剤を発現する細胞の増殖によりならされている細胞培養培地を包含するものとする。馴化培地は、好ましい実施形態において、CDK阻害剤を発現している細胞を哺乳動物細胞培養培地、最も好ましくは血清添加剤を含まない合成培地中で培養することにより作成する。任意のCDK阻害剤発現細胞が、該馴化培地の作成に有用であり、該細胞でのCDK阻害剤発現は、内因性CDK阻害剤を誘導することにより(DNA傷害剤、イオン化剤または紫外線照射または接触阻害での処理などにより)または本発明に記載の誘導性CDK阻害剤発現作成物を含む細胞を使用し、細胞を生理的に中性の誘導剤中で培養することにより行なうことができる。本発明のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。好ましい細胞は、哺乳動物細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、より好ましくはマウスまたはヒト細胞を含む。特に好ましい実施形態は、線維肉腫細胞、より好ましくはヒト線維肉腫細胞、最も好ましくはヒトHT1080線維肉腫細胞系およびその誘导体である。

#### 【0048】

本発明はまた、哺乳動物細胞においてCDK阻害剤の誘導する有糸分裂誘起または抗アポトーシス因子の発現を阻害する化合物を同定するスクリーニング法も提供する。好ましい実施形態において、CDK阻害剤発現は、哺乳動物細胞培養液中で、CDK阻害剤の誘導する有糸分裂誘起または抗アポトーシス因子の発現

の阻害剤として同定すべき化合物の存在下または非存在下で誘導する。化合物は、細胞中でCDK阻害剤の発現を誘導し、該化合物の存在下における有糸分裂誘起または抗アポトーシス因子またはその複数の発現の程度を、該化合物の非存在下における発現と比較し、該化合物の存在下で、有糸分裂誘起または抗アポトーシス因子またはその複数の発現量の減少した化合物として阻害剤を同定することにより、阻害剤として同定する。本発明のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。任意のCDK阻害剤発現細胞が該馴化培地の作成に有用であり、該細胞でのCDK阻害剤発現は、内因性CDK阻害を誘導することにより（例えば、DNA傷害剤および他の細胞毒性化合物、およびイオン化または紫外線照射、または接触阻害での処理により）、または本発明に記載の誘導性CDK阻害剤発現作成物を含む細胞を使用し、生理的に中性の誘導剤中で細胞を培養することにより行なうことができる。本発明のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。好ましい細胞は、哺乳動物細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、より好ましくはマウスまたはヒト細胞を含む。特に好ましい実施形態は線維肉腫細胞、より好ましくはヒト線維肉腫細胞、最も好ましくはヒトHT1080線維肉腫細胞系およびその誘導体である。本発明のこの特に好ましい実施形態に記載の例示的な細胞系は、2000年4月6日に米国バージニア州マナッサス所在アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに受託番号PTA1664で寄託されたHT1080線維肉腫細胞系誘導体である。本発明のこの特に好ましい実施形態に記載の別の例示的な細胞系は、2000年10月10日に米国バージニア州マナッサス所在アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに受託番号 で寄託されたHT1080/LNp16RO2として同定されるHT1080線維肉腫細胞系誘導体である。

#### 【0049】

別の実施形態において、本発明は、哺乳動物細胞においてCDK阻害剤の誘導する有糸分裂誘起または抗アポトーシス因子の発現を阻害する化合物を同定する方法を提供し、ここで該細胞は、CDK阻害剤により誘導される細胞遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子をコードする組換え発現作成物

を含む。本発明のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。好ましいプロモーターは、結合組織増殖因子(CTGF)、血清アミロイドA、補体C3、インテグリン-3、アクチビンA、ナチュラルキラー細胞タンパク質4、プロサポシン、Mac2結合タンパク質、ガレクチン-3、スーパーオキシドジスムターゼ2、グラニューリン/エピセリン、p66<sup>shc</sup>、リソソーム-ガラクトシダーゼ、およびカテプシンBのプロモーターを含む。好ましいリポーター遺伝子は、ホタルルシフェラーゼ、-ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼおよび緑蛍光タンパク質を含むがこれに限定されず、これは全部市販されている。これらの実施形態において、CDK阻害剤発現は細胞において誘導され、化合物の存在下でのリポーター遺伝子の発現の程度を、化合物の非存在下での発現と比較する。阻害剤は、化合物の存在下において発現量の減少したりリポーター遺伝子を提供する化合物として同定する。任意のCDK阻害剤発現細胞が本発明のこの態様に有用であり、該細胞でのCDK阻害剤発現は、内因性阻害剤遺伝子を誘導することにより(例えば、DNA傷害剤または他の細胞毒性化合物、イオン化または紫外線照射、または接触阻害での処理により)、または本発明に記載の誘導性CDK阻害剤発現作成物を含む細胞を使用し、細胞を、生理的に中性の誘導剤中で培養することにより行なうことができる。本発明のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。好ましい細胞は、哺乳動物細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、より好ましくはマウスまたはヒト細胞を含む。特に好ましい実施形態は、線維肉腫細胞、より好ましくはヒト線維肉腫細胞、最も好ましくはヒトHT1080線維肉腫細胞系およびその誘導体である。

#### 【0050】

本発明は、老化を阻害または促進する化合物を同定する方法を提供し、ここでは、該化合物の効果は、発現がCDK阻害剤により変調される遺伝子の誘導または抑制を化合物が阻害または増強するかどうかを決定することによりアッセイする。本発明の方法の実施において、CDK阻害剤を誘導できる培養哺乳動物細胞を、例えばイオン化または紫外線照射、または接触阻害処理または細胞毒性薬による処理により、阻害剤遺伝子を誘導するように処理するか、CDK阻害剤をコ

ードする伝達可能なベクターで形質導入する。本発明のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。より好ましくは、細胞をIPTGと接触させることによりp21を誘導できるp21-9細胞を使用するか、または、p16をIPTGで誘導できるHT1080/LNp16RO2細胞を使用する。典型的には、細胞を適切な培養培地中で増殖する（例えばp21-9細胞では10%ウシ胎児血清（FCS）を補充したDMEM）。p21-9細胞において、p21遺伝子発現はIPTGを約50 $\mu$ Mの濃度で培養培地に添加することにより誘導される。典型的には、CDK阻害剤は、これらの細胞中で、本発明の方法に従って試験すべき化合物の存在下または非存在下で誘導する。その後、mRNAを、CDK阻害剤を誘導した細胞から単離し、CDK阻害剤により調節される遺伝子の発現を解析する。CDK阻害剤が化合物の存在下で誘導される細胞における発現を、化合物の非存在下で誘導される発現と比較し、差異を使用して、本明細書に示した方法に従って細胞遺伝子発現に影響を及ぼす化合物を同定する。ある実施形態において、細胞遺伝子発現は、市販されているようなオリゴヌクレオチドまたは細胞cDNAのマイクロアレイを使用して解析する（例えば、ミズーリ州セントルイス所在ゲノム・システムズから）。別の実施形態において、CDK阻害剤により誘導または抑制されることが知られる遺伝子をアッセイする。遺伝子発現は、1つまたは複数のCDK阻害剤変調遺伝子について細胞mRNAまたはタンパク質を解析することによりアッセイできる。本発明のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。最も好ましくは、これらのアッセイに使用した遺伝子は表IおよびIIに同定した遺伝子である。

#### 【0051】

別の実施形態において、該化合物は、CDK阻害剤の指令する実験操作とは独立的に同定する。該アッセイでは、細胞を、細胞毒性薬での処理、照射または細胞分化剤、または腫瘍サプレッサー遺伝子の導入を含むがこれに限定されない、上記に開示した方法のいずれかで老化を誘導するように処理する。CDK阻害剤により抑制または誘導される遺伝子の発現を、試験化合物の存在下または非存在下で解析する。最も好ましくは、これらのアッセイに使用した遺伝子は、遺伝子

発現解析について上記に考察した型のmRNAおよびタンパク質アッセイを使用して、表IおよびIIに同定した遺伝子である。

#### 【0052】

別の実施形態において、CDK阻害剤を誘導する細胞は、さらに、CDK阻害剤により誘導または抑制される細胞遺伝子のプロモーターの転写制御下にあるリポーター遺伝子をコードする組換え発現作成物を含む。本発明のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。好ましい実施形態において、細胞遺伝子は、CDK阻害剤により抑制される遺伝子であり、プロモーターは、表Iに同定した遺伝子から得られる。該遺伝子の既知のプロモーターの例は、ORC1、PRC1、XRCC9、CDC2、サイクリンB1、AIK1、CENP-A、CENP-F、MAD2、BUBR1、MCAK、HSET、CHL1、チモポエチン、MPP2、MPP5、CDC47/MCM7、CDC21/MCM4、DNAリガーゼI、DNA重合酵素、RAD54、HEX1/RAD2、PLK1、DHFRまたはシトロンキナーゼを含む。好ましい実施形態において、細胞遺伝子は、CDK阻害剤により誘導される遺伝子であり、プロモーターは表IIに同定した遺伝子から得られる。該遺伝子の既知のプロモーターの例は、結合組織増殖因子(CTGF)、血清アミロイドA、補体C3、インテグリン $\alpha$ -3、アクチビンA、ナチュラルキラー細胞タンパク質4、プロサポシン、Mac2結合タンパク質、ガレクチン-3、スーパーオキシドジスムターゼ2、グラニューリン/エピセリン、p66<sup>shc</sup>、リソソーム $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、またはカテプシンBを含む。好ましいリポーター遺伝子は、ホタルルシフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼおよび緑蛍光タンパク質を含むがこれに限定されず、これは全部市販されている。本発明のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。

#### 【0053】

本発明はまた、CDK阻害剤の誘導する細胞老化の効果を仲介する遺伝子を同定する方法を提供する。CDK阻害剤の誘導は、老化に関連した細胞増殖停止、末端分化および細胞傷害に対する応答の不可欠な部分であることが判明する。以

下の実施例に記載のように、cDNAアレイハイブリダイゼーションを使用して、これらの効果が、p21の誘導する遺伝子発現の変化に因るものかどうかを調べた。この解析により、p21は、有糸分裂、DNA複製、分離および修復の制御に関与する複数の遺伝子を選択的に阻害することが示された。これらの実験でp21により誘導される多くのタンパク質が、老化および加齢に関連しているか、または、アテローム硬化症、アルツハイマー病、アミロイド症および関節炎を含む年齢関連疾病に関与している。これらの知見により、p21誘導の蓄積効果が、癌および年齢関連疾病の病理発生に寄与し得ることが示唆される。さらに、多くのp21活性化遺伝子は、細胞増殖およびアポトーシスに対してパラクリン効果の可能性を有する分泌タンパク質をコードする。この観察に一致して、p21誘導細胞からの馴化培地は、有糸分裂誘起および抗アポトーシス活性を示した。

#### 【0054】

以下の実施例に開示した解析は、細胞周期進行遺伝子の阻害は、単に、CDK阻害剤の誘導する増殖停止の結果ではないことが示された。p21誘導系で示されるように、これらのいくつかの遺伝子の遮断が、細胞増殖停止と共に起こり、p21からの遊離時の全試験遺伝子の再発現が、細胞周期への細胞の再侵入に先行した。ORC1(DNA複製の開始に必要とされる)、トポイソメラーゼII(これはG2のDNA分離に中心的である)およびPLK1(有糸分裂の開始に関与)などの即時応答性の遺伝子の性質により、その発現の阻害が、事実、p21による増殖停止の誘導に原因的な役割を果たし得ることが示唆された。これらの観察は、本発明の方法の1つの態様の基本を形成し、これは、哺乳動物細胞での細胞周期進行に関与する遺伝子を同定する方法を提供する。

#### 【0055】

さらに、即時および早い応答の遺伝子の両方の生物学的機能により、その遮断は、CDK阻害剤誘導増殖停止を維持するように作用することが示される。本発明の試薬および方法の使用により、p21誘導増殖停止からの遊離により、核内倍加および有糸分裂異常が生じることが実証された。DNA複製および有糸分裂は、IPTGからの遊離後、全てのp21阻害遺伝子が再発現されるまで再開さ

れず、DNA複製は有糸分裂のかなり前に再開した。以下の実施例に開示した結果により、p21誘導延長により、複製または有糸分裂の「質的制御」に關与する多くのタンパク質を含む、細胞周期進行に關与する多くのタンパク質の崩壊が生じることが示される。細胞がp21からの遊離後に細胞周期に再侵入する時までには該タンパク質のプールを再生できない結果、異常な複製および異常な有糸分裂が結果として起こる。例えば、多倍数体細胞の産生が、延長されたp21誘導細胞増殖停止からの遊離後に觀察された。細胞の多倍数体化をもたらす過程である核内倍加は、有糸分裂チェックポイント制御の廃止の結果であり得(Hixonら、1998、Mol. Cell. Biol. 18:6224~37)、これはMAD2およびBUBR1などの、p21の阻害するチェックポイント制御タンパク質の欠失から生じ得る。さらに、多倍数体細胞は、我々がp21により阻害されることを見出した、細胞質分裂關連タンパク質Prc1、Aim1およびシトロンキナーゼの欠失により引き起こされ得る、細胞質分裂の失敗に起因して生じ得る。

#### 【0056】

p21からの遊離後に觀察された異なる有糸分裂異常は、MAD2、BUBR1、PLK1、AIL-1、CENP-A、CHL1およびMCAKなどの該p21により阻害される遺伝子産物を含む、適切な染色体整列および分離を制御するタンパク質の変異または阻害から生じることが以前に判明した(Li & Ben Ezra、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10436~10440; Gloverら、1998、Genes Devel. 12:3777~3787; Chanら、1999、J. Cell Biol. 146:941~954)。p21誘導有糸分裂異常における該タンパク質の役割は、有糸分裂制御タンパク質の崩壊および再合成の時間経過の解析により支持される。従って、有糸分裂再開時(遊離の36時間後)に、有糸分裂の開始に必要とされるCdc2およびPlk1のプールは、無処理細胞に匹敵するレベルまで再生される(図7Bに示したように)。これに対し、MAD2(その機能は、染色体が適切に有糸分裂紡錘体に付着していない場合に後期を防ぐことである)は、はるかに低い効率で再合成される(図7B)。さらに、IPTGの1

日間の処理後に残留するMAD2レベルは、3日以上後のそれよりはるかに高く(図7B)、これは1日間のp21誘導後に遊離された細胞中の異常有糸分裂の程度がより低いことに一致する。

【0057】

p21過剰発現は、DNA修復を阻害すると報告されている(Panら、1995、J. Biol. Chem. 270:22008~22016; Umarら、1996、Cell 87:65~73)。我々の結果に照らして、p21のこの効果は、XRCC9、RAD54、HEX1/RAD2、RAD21相同体およびDNAリガーゼIなどのDNA修復遺伝子の阻害に起因し得る。DNA修復阻害はまた、p21誘導増殖停止から回復する細胞の変異頻度を増加するようであり、これは、該細胞の全体的な遺伝子不安定性に寄与する。

【0058】

正常細胞におけるp21誘導遺伝子不安定化はまた、発癌作用の可能性を有し得る。老化細胞の増殖停止は、一過性p21誘導により引き起こされ、一方、p16は、p21の崩壊後の増殖停止の維持に関与するようである(Alcortaraら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:13742~13747)。p16(p21とは顕著に対照的である)は、本研究に使用したHT1080線維肉腫細胞を含むヒト腫瘍で頻繁に変異している(Hall&Peters、1996、Adv. Cancer Res. 68:67~108)。p16変異の主な発癌作用が頓挫性老化である場合、変異p16を発現する細胞は、p21誘導延長を経験する。本明細書に開示した結果に一致して、これらの条件下での細胞周期への再侵入は、核型異常の発生をもたらすと期待される。p16と異なり、p21は、この過程で腫瘍サプレッサーとしてよりも発癌遺伝子として作用し、これは癌におけるp21の変異が稀であることを説明できる。

【0059】

従って、本発明は、CDK阻害剤の誘導時に細胞分裂を制御する遺伝子のダウンレギュレーションを阻害することにより、抗癌作用を有する化合物を同定する方法を提供する。これらの方法により産生された化合物は、核型異常を有する細

胞の発達を最小限にできると期待され、これは次いで、該細胞が悪性疾病に発達する可能性を低減すると期待される。

#### 【0060】

さらに、実施例により、p16の誘導発現は、p21遺伝子発現の作用を模倣し、発現がp21遺伝子発現により変調される同じ遺伝子はp16遺伝子発現によっても変調されることが実証される(図11参照)。従って、本発明の方法は、内因性p16遺伝子の誘導により、またはp16をコードする誘導性発現作成物を含む組換え細胞において、p16遺伝子発現が誘導されている細胞を含むように拡張する。

#### 【0061】

本発明はまた、老化を誘導または促進する化合物を同定する方法も提供する。この態様において、本発明は、CDK阻害剤発現により阻害される遺伝子の阻害を増加する化合物を提供する。細胞分裂および細胞周期進行制御遺伝子の阻害は、本明細書で、CDK阻害剤発現の誘導後に細胞周期に細胞が再侵入するのを防ぎ、不可逆的な増殖停止をもたらす。従って、CDK阻害剤により誘導される該遺伝子の抑制を誘導または増強する化合物は、細胞の老化および終末増殖停止に効果的である。本発明のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。従って、本発明は、細胞周期進行を制御する細胞遺伝子、最も好ましくは表Iに同定した遺伝子を阻害する化合物を同定する方法を提供する。好ましい実施形態において、該化合物は、哺乳動物細胞、最も好ましくは腫瘍細胞、過形成細胞、または、過度の増殖に因り病的または疾病の原因となる任意の細胞型の老化を促進するのに使用する。本発明のこの態様の好ましい実施形態において、該方法は、哺乳動物細胞において、該化合物の存在下または非存在下でCDK阻害剤発現を誘導し；CDK阻害剤により抑制される遺伝子の発現について細胞をアッセイし；そして、該化合物の非存在下よりも該化合物の存在下の方が遺伝子がより大きい程度で抑制される場合に老化増強剤として該化合物を同定する段階を含む。本発明のこの態様の好ましい実施形態において、CDK阻害剤はp21またはp16である。本発明の方法の他の態様において、哺乳動物細胞で老化を促進する化合物は、例えば、上記に開示した方法のいずれか

で細胞の老化を誘導することにより、CDK阻害剤に向けられた実験操作とは独立して同定する。当分野では、老化は、p21欠損細胞でさえ誘導でき(Changら、1999、Oncogene 18:4808~4818およびPantajaら、1999、Oncogene 18:4974~4982)、MCF-7細胞を全トランスレチノイン酸で処理するなどのいくつかの老化誘導処理(Changら、1999、Cancer Res. 59:3761~3767)は、p21の細胞レベルの増加よりもむしろ減少に関連する(Zhuら、1997、Exp. Cell Res. 234:293~299)。同様に、数個の抗癌薬またはイオン化照射は、HT1080線維肉腫またはHCT116大腸癌などのp16欠損細胞系の老化を誘導できる(Changら、1999、Oncogene 18:4808~4818)。

#### 【0062】

本発明はまた、細胞を、本発明の方法により同定される化合物と接触させる段階を含む、哺乳動物細胞の老化を増強する方法も提供する。好ましい実施形態において、哺乳動物細胞は、腫瘍細胞、過形成細胞、または、過度の増殖に因り病的または疾病の原因となる任意の細胞型である。別の実施形態において、該方法は、細胞を放射線または抗癌薬、細胞毒性薬または抗増殖薬と接触させる追加の段階を含む。

#### 【0063】

遺伝子発現に対する、CDK阻害剤誘導、特にp21およびp16誘導の観察される効果により、細胞の老化および臓器の加齢に関連した変化との数多くの相関が示される。これらのいくつかの相関は、CDK阻害剤により阻害される遺伝子の解析から得られる。従って、老化線維芽細胞は、我々がp21誘導時にも観察したように、低いレベルのRbを発現すると報告された(Steinら、1999、Mol. Cell. Biol. 19:2109~2117)。また、3つのCDK阻害剤により阻害される遺伝子であるCHL1、CDC21およびRAD54が、ヘリカーゼファミリーのメンバーをコードすることは興味深い。ヘリカーゼ群の別のタンパク質の欠損は、早期加齢、および、細胞レベルでは培養液中の細胞の老化加速に関連した臨床容態である、ウェルナー症候群の原因として

同定されている (Grayら、1997、Nature Genet. 17:100~103)。

【0064】

しかし、老化の表現型との最も強力な相関は、CDK阻害剤誘導遺伝子の同定から得られ、その多くは、分裂的老化または臓器加齢中にそのレベルを増加することが知られている。ECMタンパク質の過剰発現は、分裂的老化の既知の顕著な特徴であり、この群の2つのCDK阻害剤誘導遺伝子であるフィブロネクチン1およびプラスミノゲンアクチベーター阻害剤1 (PAI-1)は、頻繁に、細胞の老化に関連している (Crisofalo & Pignolo、1996、Exp. Gerontol. 31:111~123に総説)。老化線維芽細胞で過剰発現すると報告された他のCDK阻害剤誘導遺伝子は、組織型プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) (Westら、1996、Exp. Gerontol. 31:175~193)、カテプシンB (diPaoloら、1992、Exp. Cell Res. 201:500~505)、インテグリン 3 (Hashimotoら、1997、Biochem. Biophys. Res. Commun. 240:88~92)、およびAPP (Adlerら、1991、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:16~20)を含む。t-PAおよびPAI-1 (Hashimotoら、1987、Thromb. Res. 46:625~633)、カテプシンB (Bernsteinら、1990、Brain Res. Bull. 24:43~549)、アクチピンA (Loriaら、1998、Eur. J. Endocrinol 139:487~492)、プロサポシン (Mathurら、1994、Biochem. Mol. Biol. Int. 34:1063~1071)、APP (Ogomoriら、1988、J. Gerontol. 43:B157~B162)、SAA (Rosenthal & Franklin、1975、J. Clin. Invest. 55:746~753)、およびt-TGase (Singhalら、1997、J. Investig. Med. 45:567~575)を含む、数個のCDK阻害剤誘導タンパク質の発現が、臓器の加齢に関連していることが示された。

## 【0065】

最も一般的に使用される細胞老化のマーカーは、SA-β-gal活性である (Dimriら、1995、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9363~9367)。この遺伝子は、IPTG処理p21-9細胞中で強く上昇する (Changら、1999、Oncogene 18:4808~4818)。SA-β-galは、リソソームβ-ガラクトシダーゼの活性の増加および局在化の変化を示すと示唆され (Dimriら、1995、同上)、他の研究は、老化細胞でのリソソーム活性の上昇を記載する (Cristofalo & Kabakjian、1975、Mech. Aging Dev. 4:19~28)。N-アセチルガラクトサミン-6-硫酸スルファターゼ (GALNS)、カテプシンB、酸性β-グルコシダーゼ、酸性リパーゼAおよびリソソームペプスタチン非感受性プロテアーゼを含む、5つのリソソーム酵素が表IIに現れる。p21はまた、ミトコンドリアタンパク質SOD2、メタジンおよび2,4-ジエノイル-CoA還元酵素の遺伝子を正の制御をし、これは、老化細胞で過剰発現される異なるミトコンドリア遺伝子の報告と相関する (Doggettら、1992、Mech. Aging Dev. 65:239~255; Kodamaら、1995、Exp. Cell Res. 219:82~86; Kumazakiら、1998、Mech. Aging Dev. 101:91~99)。

## 【0066】

以下の実施例に開示したように、p21-9細胞でのp21誘導の効果と、正常線維芽細胞での老化に関連した変化の間には多くの類似性がある。特に、老化細胞は、転移を促進し得る、異なる増殖因子およびECMタンパク質を過剰産生することが示された (Campisiら、1998、J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. 3:1~5)。数個の増殖因子および増殖因子受容体も、強力なp21誘導条件下で、p53依存的に照射により誘導される遺伝子間で同定されている (Komarovaら、1998、Oncogene 17:1089~1096)。興味深いことに、大半のこれらの遺伝子は、そのプロモーターにp53結合部位を含まなかった。我々の結果により、p5

3による増殖因子の誘導は、p21誘導により仲介される、間接的な作用であり得ることが示唆される。

【0067】

従って、本発明は、細胞の老化に関連した遺伝子、特に老化中に、特にCDK阻害剤発現により誘導される遺伝子を同定する方法を提供する。本発明はまた、CDK阻害剤の仲介する該遺伝子の誘導を阻害できる化合物を同定する方法を提供する。該化合物は、CDK阻害剤により仲介される遺伝子発現の誘導に対するその効果により、細胞の老化を減少、抑制または逆転する能力を示すと期待される。

【0068】

顕著には、我々がp16およびp21の両方により誘導されることを見出した多くの遺伝子産物が、アルツハイマー病、アミロイド症、アテローム硬化症および関節炎を含む、年齢関連疾病に関連している。従って、APPは、アルツハイマーアミロイド斑の主成分である - アミロイドペプチドを生じる。補体C3 (Veehuisら、1995、Virchows Arch. 426:603~610) およびAMPデアミナーゼ (Simsら、1998、Neurobiol. Aging 19:385~391) も、アルツハイマー病に役割を果たしていることが示唆された。p21により最も迅速に誘導され、細胞分化、発癌、アポトーシスおよび加齢の多面的発現メディエーターとして記載されているt-TGase (Parkら、1999、J. Gerontol. A. Biol. Sci. 54: B78~B83) は、アルツハイマー病およびアミロイド症の両方に関連した斑の形成に関与することは特に興味深い (Dudek & Johnson、1994、Brain Res. 651:129~133)。後者の疾病は、別のCDK阻害剤誘導遺伝子産物であるSAAの沈着に起因し、これはアテローム硬化症、骨粗鬆症および関節リウマチにも関与している (Jensen & Whitehead、1998、Biochem. J. 334:489~503)。2つの他のCDK阻害剤の正の制御をする分泌タンパク質である結合組織増殖因子 (CTGF) およびガレクチン3は、アテローム硬化症に関与している (Oemarら、1997、Circulation 95:831~839; Na

chtigalら、1998、Am. J. Pathol. 152:1199~1208)。さらに、カテプシンB (Howieら、1985、J. Pathol. 145:307~314)、PAI-1 (Cerinicら、1998、Life Sci. 63:441~453)、フィブロネクチン (Chevalier、1993、Semin. Arthritis Rheum. 22:307~318)、GALNSおよびMac-2結合タンパク質 (Sekiら、1998、Arthritis Rheum. 41:1356~1364)は、骨粗鬆症および/または関節リウマチに関連している。さらに、PAI-1発現増加などの、ECMタンパク質の老化関連変化は、皮膚および他の組織の構造の年齢特異的劣化を生じると提案された (Campisiら、1998、J. Invest. Dermatol. Symp. Proc. 3:1~5)。細胞の加齢によるフィブロネクチン産生増加も、ECMでのフィブロネクチンネットワークの密度を増加させると示唆され、これは、加齢個体のより遅い創傷治癒の一因となり得る (Albinら、1988、Coll. Relat. Res. 8:23~37)。

#### 【0069】

本明細書に開示した結果により、CDK阻害剤誘導は、癌または年齢関連疾病の発達の可能性を増加させ得るように、細胞遺伝子発現に影響を及ぼすことが示される。CDK阻害剤発現の急増加は、正常分裂的老化だけでなく、細胞傷害に反応しても生じ；どちらの場合にも、CDK阻害剤誘導の望ましくない作用が、年齢依存的に蓄積すると期待される。遺伝子発現に対するp16およびp21などのCDK阻害剤のこれらの効果に關与する、特異的分子相互作用および調節経路の解明により、癌および年齢関連疾病の予防への新しいアプローチが示唆され得る。

#### 【0070】

従って、本発明は、年齢関連疾病に関連した遺伝子を同定する方法を提供する。本発明はまた、CDK阻害剤により仲介される該遺伝子の誘導を阻害できる、化合物を同定する方法を提供する。該化合物は、年齢関連疾病を予防、遅延または逆転する治療効力を示すと期待される。

## 【0071】

発現がCDK阻害剤により変調される遺伝子を同定することに向けられた本発明の方法は、CDK阻害剤発現を実験的に誘導できる能力を利用する。p16およびp21遺伝子などの誘導性CDK阻害剤遺伝子を含む本発明により提供されるような細胞を使用して、CDK阻害剤発現により誘導、抑制および不変化である遺伝子の発現状態を反映する細胞mRNAを単離できる。CDK阻害剤発現が誘導されていない無処理細胞は、細胞mRNAの同等な対照源を提供する。サブトラクティブハイブリダイゼーション法を使用して異なるcDNAライブラリーを作成することにより、誘導または抑制遺伝子に特異的である、複数の核酸、最も好ましくは細胞mRNAのcDNAコピーを得ることができる。例えば、Diatchenkoら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:6025~6030参照。CDK阻害剤誘導前および後に単離したmRNAまたはcDNAはまた、整列または非整列cDNAライブラリーを使用して、ハイブリダイゼーション解析用のプローブとして使用でき、差次的に発現される遺伝子を、該ハイブリダイゼーションから同定できる。一般に、Sambrookら、1990、分子クローニング：実験マニュアル、コールドスプリングハーバー研究所プレス：ニューヨーク参照。別に、差し引いたcDNA個体群のディファレンシャルディスプレイを実施して、CDK阻害剤発現により正の制御または負の制御を受けた遺伝子セットを得ることができる。

## 【0072】

追加の実施形態において、CDK阻害剤発現により正の制御または負の制御を受ける遺伝子を、当分野で公知の分子クローニング技術を使用して単離できる。Sambrookら、同上。上記のように作成した差次的cDNAライブラリーを、適切なcDNA個体群のプローブを強化するサブトラクティブハイブリダイゼーション法を使用して、例えばp16またはp21により誘導または抑制される遺伝子に特異的なプローブを用いてスクリーニングできる。別に、該プローブを使用して、全長または全長に近いcDNAを含むコロニーの比率を最大化するように作成した慣用的に調製したcDNAライブラリーをスクリーニングし、CDK阻害剤により変調される遺伝子、特に本発明の方法を使用して同定した新規

遺伝子のクローニングを容易にできる。該遺伝子も、本発明の範囲内に該当するものとする。

【0073】

以下の実施例は、本発明のある好ましい実施形態をさらに説明するものであり、限定するものではない。

【0074】

(実施例1)

誘導性p21遺伝子を含む哺乳動物細胞の作製

ヒト線維肉腫細胞系HT1080の組換え誘導体p21-9は、Changら(1999、Oncogene18:4808~4818、本明細書に参考として取込む)に実質的に従って作製した。この細胞系は、イソプロピル-β-D-チオガラクトシド(IPTG)により調節されるプロモーターの転写制御下にあるp21コード配列を含んだ。p21の発現は、十分量のIPTGの存在下で、これらの細胞を培養することにより誘導でき、よってp21発現の結果を、内因性p21遺伝子の誘導が誘起し得る任意の追加の効果の非存在下で研究することができる。この細胞系は、2000年4月6日にVA州マナッサス所在アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(A.T.C.C.)に寄託され、受託番号PTA1664を与えられた。

【0075】

簡潔には、ネズミ異所性レトロウイルス受容体およびプラスミド3'SS(ストラタジーン)によりコードされる修飾細菌lacIリプレッサーを発現するHT1080の亜系(Chang&Roninson、1996、Gene33:703~709、参考として取込む)を、組換えレトロウイルスLNp21C03(この構造を図1に示す)を含むレトロウイルス粒子で感染する。このレトロウイルスベクターは、レトロウイルス長末端反復プロモーターの転写制御下にある細菌ネオマイシン耐性遺伝子(neo)を含む。p21コード配列は、neo遺伝子の転写方向とは逆の向きで、修飾ヒトサイトメガロウイルスプロモーターの制御下にクローニングする。特に、CMVプロモーターは、プロモーターからの発現を、細胞で発現されるlacIリプレッサーに感受性にする、細菌lac

c オペレーター配列の3倍反復配列を含む。LNp21CO3は、p21コード配列を含むDNAの492bp断片を、親ベクターLNXC03 (Chang & Roninson、同上に開示) のNotIおよびBglII部位にクローニングすることにより作製した。

#### 【0076】

感染後、LNp21CO3Xベクターで感染した細胞を、細胞を、400µg/mLのG418 (MD州ゲーサースバーグ所在BRL - ギブコから得る) の存在下で培養することにより選択した。クローン系p21-9は、クローン細胞系が得られるまで終点希釈により、LNp21CO3形質導入G418耐性の細胞系から得た。

#### 【0077】

(実施例2)

#### 細胞増殖アッセイ

実施例1に記載のように作製したp21-9細胞を、細胞増殖アッセイに使用して、p21が細胞中で発現された場合に生じる細胞増殖の変化の程度を決定した。

#### 【0078】

p21-9細胞でのLNp21CO3ベクターからのp21発現は、10%ウシ胎児血清 (Hyclone、Logan、UT) およびIPTGを含むDMEM培地中で細胞を培養することにより誘導した。これらのアッセイの結果を図2Aおよび2Bに示す。図2Aは、50µM IPTGの存在下で培養した細胞でのp21タンパク質産生の時間経緯を示す。p21発現は、IPTGを増殖培地に導入した6ないし12時間後に増加し、この発現は、導入の約24時間後にピークに達した。IPTG含有培地から細胞を取り出すと、p21発現は、上昇したのと同じ位迅速に下降し、IPTGを除去した約24時間後に誘導前レベルに戻った (図2B)。

#### 【0079】

IPTGの存在下での細胞増殖を3つの方法でアッセイした：<sup>3</sup>Hチミジン取り込み (「標識係数」と称する) を測定；顕微鏡による培養液中の有糸分裂細胞の

数を観察（「有糸分裂係数」と称する）；および異なる細胞周期の割合における培養細胞の分布の決定（「細胞周期分布」と称する）。これらの結果を図3Aから3Cに示す。

#### 【0080】

$^3\text{H}$ -チミジン取込みアッセイは、Dimriら（1995、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9363~9367）に実質的に記載のように実施した。細胞を、 $^3\text{H}$ -チミジンの存在下で3時間培養し、その後、オートラジオグラフィーにより解析した。DNA複製は、IPTGを培養培地に添加した9時間後までに完全に停止し、オートラジオグラフィーにより決定した（図3A）。有糸分裂係数は、細胞を顕微鏡で観察し、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ の4,6-ジアミノ-2-フェニルインドール（DAPI）で染色した後に有糸分裂中の細胞数を計算することにより決定し、像を、Leica DMIRB蛍光顕微鏡およびVaytek（Fairfield, Iowa）造影システムを使用して集めた。顕微鏡で検出可能な有糸分裂細胞は、2段階でIPTGの存在下でこれらの培養液から消失した：最初は、IPTG添加の0~4時間後に生じ（有糸分裂係数は、無処理細胞の約15%から、IPTG処理細胞の約5%まで下降した）、その後、再度、IPTG添加の約10~14時間後に生じた（有糸分裂係数は、IPTG添加の約13時間後にゼロに下降した（図3B））。

#### 【0081】

細胞周期分布は、ベクトン・ディッキンソンFACSsortを使用して、Jordanら（1996、Cancer Res. 56:816~825）により記載のようなヨウ化プロピジウムで染色した後にDNA含量のFACS解析を使用して決定した。細胞周期分布は、IPTG処理の24時間後に安定化した（図3Cに示す）。この時間までに、42~43%のIPTG処理細胞がG1およびG2でそれぞれ停止し、約15%の細胞が、S期のDNA含量で停止した。

#### 【0082】

p21発現の効果はまた、細胞培養培地からIPTGを除去することにより、p21の効果から細胞を遊離することにより調べた。IPTG処理p21-9細胞は、形態学的老化マーカーを示すことは既知であった（Changら、199

9、同上)。図2Bに示したように、p21-9細胞でのp21遺伝子発現レベルは、IPTGの除去後24時間以内に基底レベルまで戻った。ここで、IPTG処理p21-9細胞が、IPTGの除去後にクローン産生能の消失を示すかどうかを決定した。これらの実験結果を図4Aから4Dに示す。

#### 【0083】

IPTG処理からの回復に関するコロニーアッセイを、DMEM/10%FCS中、IPTGの存在または非存在下で、10cm培養皿あたり約2,000個のp21-9細胞を播種することにより実施した。細胞に、10日間コロニーを形成させ、その後、そのクローン産生能を決定した。p21-9細胞を、3つの濃度のIPTG: 0.5  $\mu$ M、5  $\mu$ Mおよび50  $\mu$ Mで処理した。これらの処理は、それぞれ、基底p21レベルを超える測定可能な増加は全くない(0.5  $\mu$ M)、最大の半分(5  $\mu$ M)または最大増加(50  $\mu$ M)のp21遺伝子発現を誘導した。図4Aに示したように、p21-9細胞の、0.5  $\mu$ M IPTGによる処理は、コロニー形成を阻害しなかった。これに対し、細胞を、5  $\mu$ Mまたは50  $\mu$ M IPTGに連続的に曝露することにより、p21-9細胞のクローン産生性はそれぞれ80%および100%減少した。IPTGを12または14時間後に除去した場合、5  $\mu$ M IPTGで処理した細胞は、実質的に消失していないコロニー形成を示した。しかし、50  $\mu$ M IPTG処理細胞は、58~63%のクローン産生性の減少を示した。3~5日間の処理後、5  $\mu$ M IPTG中で培養した細胞は、55~58%のクローン産生性の減少を示し、50  $\mu$ M IPTG中で培養した細胞は、95~99%のクローン産生性の減少を示した。これらの結果により、細胞がp21遺伝子発現崩壊後に回復する能力は、p21の誘導レベルおよびp21誘導持続時間に反比例的に相関した。この結果は、他の細胞培養系で他の研究者により得られた結果と一致した(Fangら、1999、Oncogene 18:2789~2797)。

#### 【0084】

クローン産生性の消失の原因は以下のように調べた。DNA複製の再開は、上記したような<sup>3</sup>H-チミジン取込みアッセイを使用して、IPTGから遊離した約20時間後に初めて検出された。これらの結果を図4Bに示す。これらの細胞

の有糸分裂の再開は、IPTG遊離の約30時間後に初めて検出され、これは上記したような有糸分裂係数から決定した。これらの結果を図4Cに示す。細胞周期のSまたはM期に侵入する細胞の比率は、IPTGで5日間処理したものよりも1日間処理した細胞の方が高かったが(図4Bおよび4Cで各々の曲線を比較)、差異は、図4Aに示したようなクローン産生性回復の対応する差異を説明するほど有意に十分ではなかった。

#### 【0085】

クローン産生アッセイ由来の培養プレートの顕微鏡検査により、50  $\mu$ M IPTGで3日以上処理したプレートは、コロニーへと発達できなかった、数多くの単一細胞および小さな細胞クラスターを含むことが示された。さらに、IPTGからの遊離は、IPTG遊離後の最初の2日間中の浮遊細胞の出現に関連し、該細胞の数は、細胞を、1日間IPTGで誘導後よりも3日間誘導後の方がはるかに高かった(図4Dに示したように)。大半のこれらの浮遊細胞は死滅し、これは、トリパンブルー染色および100から1,000倍のクローン産生性の減少により示された。

#### 【0086】

これらの細胞でのp21誘導の効果をさらに、延長IPTG処理から遊離後に出現した、増殖遅延および死滅細胞のDNA含量を調べることにより試験した。増殖遅延細胞は、細胞膜に安定に取り込まれ、娘細胞間で均一に分けられる親油性フルオロフォアであるPKH2保持増加に基づいて、FACSを使用して単離し;これにより、各回の細胞分裂毎に細胞蛍光は比例的に減少し、非分裂または死細胞は減少しない(Horan & Slezak, 1989, Nature 340:167~168)。これらのアッセイは、Changら(1999, Cancer Res. 59:3761~3767)に記載の通りに実施した。無処理p21-9細胞および50  $\mu$ M IPTGで5日間処理した細胞を、PKH2で標識し、IPTG非含有培地中に播種し、そのPKH2蛍光を連続的な日に解析した。図5Aに示したように、IPTG処理細胞は、対照細胞よりも遅く分裂し始め、増殖細胞のピークおよび高いPKH2蛍光を有する増殖遅延細胞の肩が出現した、不均質なPKH2プロファイルを展開した。増殖遅延細胞はまた、老化細

胞に特徴的である側面散乱の増加を示した (Changら、1999、同上)。増殖中 ( $PKH2^{lo}SS^{lo}$ ) および増殖遅延 ( $PKH2^{hi}SS^{hi}$ ) 細胞個体群は、IPTGからの遊離の6日後にFACSにより分離し、そのDNA含量をPI染色により解析した。増殖遅延画分は、より高いG2/M画分および4C DNA含量よりも多い多数の細胞を有する点で、増殖中の細胞とは異なった (図5Bに示す)。後者の細胞の倍数体性質は、染色体18および21用の特異的プローブを用いて、間期核の蛍光インサイツハイブリダイゼーション (FISH) により確認し; これらの実験は、Changら (1999、同上) に記載の通りに実施した。高い倍数体およびG2/M画分も、IPTGからの遊離後に集めた浮遊死細胞間に観察され (図5Cに示す); 顕微鏡解析により、多くのこれらの死細胞が有糸分裂中であることが示された。

#### 【0087】

倍数体細胞の起源を調べるために、IPTGからの遊離後の全細胞個体群のDNA含量の変化の時間経緯を決定した。倍数体細胞の数は、遊離の24~28時間後に大きく増加し (図5Dに示したように)、DNA合成の再開が同時に起こる (図4Bと比較)。この結果により、遊離された細胞の多くが、計画されていない回のDNA複製である核内倍加を受けていることが示された。しかし、核内倍加の時間経緯および大きさは、1日間のIPTG阻害後 (図5D) または3~5日間の阻害後に遊離された細胞間で非常に類似していた。

#### 【0088】

しかし、5日間IPTGにより阻害した細胞と比較した1日間IPTGにより阻害した細胞の間の主な差異は、IPTGからの遊離の1~2日後に生じる付着した有糸分裂細胞の形態を調べる場合に出現した。これらの結果を図6に示す。無処理細胞の有糸分裂図の圧倒的な大多数が、形態学的に正常のようであったが (図6、左)、IPTGH処理後に遊離された細胞の有糸分裂図の大半は、多極有糸分裂、不均一染色体分布および前期停止を含む、数多くの異常を示した (図6、右)。1日間および5日間IPTG処理した細胞における正常有糸分裂の比率はそれぞれ45%および2%であり、これは、クローン産生性回復の対応する値に近い (38%および1%)。これらの結果により、異常な有糸分裂が、核内

倍加と共に、p21からの遊離後のクローン産生性の消失に關与することが示唆される。

【0089】

これらの結果により、p21の誘導発現は、遺伝子が発現されている間の細胞に対する顕著な作用だけでなく、その作用は、消えず、細胞周期および増殖への細胞の正常な回復を干渉することが示された。

【0090】

(実施例3)

p21遺伝子発現により変調される遺伝子発現の解析

実施例2に開示した結果により、p21誘導の形態学および細胞周期結果は、細胞周期進行を制御する遺伝子の抑制の結果であり得ると示唆された。細胞遺伝子発現に対するp21誘導の効果を以下のように調べた。

【0091】

逆転写酵素-重合酵素連鎖反応(RT-PCR)解析を実施して、細胞周期チェックポイント進行の制御に關与することが知られる遺伝子の発現を調べた。細胞周期制御およびDNA複製に關与する27個の遺伝子の予備RT-PCR解析により、これらの8個の遺伝子が、p21-9細胞においてIPTGにより阻害されることが判明した。全RNAを、IPTG処理および遊離中の異なる時間点で集めたp21-9細胞から抽出した。負の制御を受けた遺伝子に關する遺伝子発現の変化のRT-PCR解析を、Noonanら(1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7160~7164)に実質的に記載されたように実施した。

【0092】

より包括的な解析を、ポリ(A)<sup>+</sup>RNAを無処理p21-9細胞から、および50 μm IPTGで3日間処理した細胞から単離することにより実施した。cDNAを、ポリ(A)<sup>+</sup>RNAから調製し、4,000以上の配列の多様な既知のヒト遺伝子および3,000個のESTを含む、ヒトUniGEM VcDNAマイクロアレイを用いた差次的ハイブリダイゼーションのプロープとして使用した(MO州セントルイス所在ゲノムシステムズ社の実施したように)。2,

500個より多い遺伝子およびESTが、無処理およびIPTG処理p21-9細胞の両方由来のプローブと測定可能なハイブリダイゼーションシグナルを示した。平衡差次的発現 2.5で負の制御を受けた、または平衡差次的発現 2.0で正の制御を受けた遺伝子を、それぞれ表IおよびIIに列挙する。

#### 【0093】

これらの遺伝子の69個の発現を個々に、マイクロアレイに存在するcDNAクローンの挿入断片から得られたプローブとのRT-PCRまたはノザンハイブリダイゼーションにより試験し；これらのcDNAはゲノムシステムズ社から得た。さらに、p21タンパク質の酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)測定を、記載のように(Changら、1999、Oncogene 18:4808~4818)、WAF1ELISAキット(NY州ユニオンデール所在オンコジーン・サイエンスから得る)を使用して実施した。以下の一次抗体をイムノプロットに使用した：Cdc2(サンタクルス)、サイクリンA(ネオマーカー)、Plk1(ザイムド)およびRb(ファーミンゲン)に対するマウスモノクローナル抗体；MAD2(BadCo)、p107(サンタクルス)、CTGF(Fisp-12；L.Lau博士の贈呈)、Prc1(W.Jiang博士およびT.Hunter博士の贈呈)およびトポイソメラーゼII(Ab0284；W.T.Beck博士の贈呈)に対するウサギポリクローナル抗体、およびSOD2(カルバイオケム)に対するヒツジポリクローナル抗体。使用したセイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)コンジュゲート二次抗体は、ヤギ抗マウスおよびヤギ抗ウサギIgG(サンタクルス)およびウサギ抗ヒツジIgG(KPL)であった。全試料中のタンパク質濃度は、バイオラッドタンパク質アッセイキットによる測定後に均等化した。イムノプロットを、標準的な手順により実施し、シグナルはLumiGlo(KPL)を使用して化学発光により検出した。

#### 【0094】

これらの結果を図7Aから7Cに示す。上記のマイクロアレイアッセイにより予測された遺伝子発現の変化を、39中38個の負制御および30中27個の正制御遺伝子について確認した。大半の試験した遺伝子についてノザンハイブリダ

イゼーションまたはRT-PCRにおいて観察されたシグナル差異(図7Aから7C)は、cDNAアレイから決定した平衡差次的発現の値より高いようであり(表IおよびII)、これは、cDNAアレイハイブリダイゼーションは、遺伝子発現に対するp21の効果の程度を過小評価する傾向があることを示唆する。6個の負制御および4個の正制御遺伝子の発現の変化も、イムノプロット(図7B)または酵素電気泳動法(示していない)によりタンパク質レベルで試験し、試験した全ての場合において確認した。

#### 【0095】

p21により仲介される遺伝子発現の変化は、p21誘導細胞増殖停止後の短期および長期効果を含むことが認識された。この目的で、IPTG添加および除去後の、p21阻害(図7B)およびp21誘導遺伝子(図7C)のサブセットのRNAレベルの変化の時間経緯を決定した。イムノプロットを使用して、Rbリン酸化(電気泳動度により示される)、および、cDNAアレイに従ってRb並びにp21により阻害される数個のタンパク質の細胞レベルのp21誘導変化の時間経緯を解析し;これらの結果を図7Bに示す。Rbは、IPTGの添加の早くも6時間後に脱リン酸化となることが判明した。さらに、Rbタンパク質レベルは、12~24時間の間に鋭く下降したが(図7Bに示す)、Rb mRNAレベル(データは示していない)には有意な変化は検出されなかった。類似の減少が、Rb関連タンパク質p107に観察された(図7Aに示す)。

#### 【0096】

##### 1. p21により阻害される遺伝子発現

試験した全p21誘導遺伝子が、p21誘導および遊離に対して迅速な応答を示した。これらの5個の遺伝子(トポイソメラーゼII、ORC1、PLK1、PRC1およびXRCC9)が、IPTGの添加の4ないし8時間後に、RNAおよびタンパク質レベルの両方で有意な阻害を示した(図7B)。このパターンは、「即時応答」と称され、これは、細胞増殖停止およびRb脱リン酸化の動態と平行する。他のp21阻害遺伝子(例えばCDC2またはDHFR)は、DNA複製および有糸分裂の停止後に僅かに遅れる「早い応答」を示し、IPTGの添加の12時間後にのみ放出可能なmRNAレベルの大きな減少を伴う。しか

し、全てのp21誘導遺伝子が、細胞が依然として増殖停止し、DNA複製および有糸分裂の再開前の時である、IPTG除去の12~16時間後にその発現を再開した(図7B)。この解析により、p21阻害遺伝子の発現の変化は、p21誘導および遊離の短期効果であり、細胞増殖停止および回復の結果ではないことが示された。

#### 【0097】

要約すると、69個の遺伝子および3個のESTが、平衡差次的発現2.5~12.6でもって、p21誘導細胞で負の制御を受けるとして、cDNAマイクロアレイにより同定され(表IA)；IPTG処理細胞で負の制御を受けるとして、我々の以前のアッセイにより同定した5個の追加の遺伝子を表IBに列挙する。cDNAアレイにより同定した負制御遺伝子の顕著に高い割合(69中43個)が、有糸分裂、DNA複製、分離および修復およびクロマチン会合に関連し、これは、p21により仲介される遺伝子発現の阻害の高度な選択性を示す。

#### 【0098】

p21負制御遺伝子の最大の群は、有糸分裂のシグナル伝達、遂行および制御に関与しているものである。これらの遺伝子は、有糸分裂開始複合体を形成するCDC2およびサイクリンB1、有糸分裂開始、有糸分裂チェックポイント制御および細胞質分裂に役割を果たすポロ様キナーゼ(PLK1)(Gloverら、1998、Genes Develop 12:3777~3787)、および、有糸分裂チェックポイント制御の標的であるCDC2相互作用タンパク質KsHs1(Hixonら、1998、Mol. Cell. Biol. 18:6224~37)を含む。この群の他の遺伝子は、クセノプスコンデンシンタンパク質XCAP-Hの相同体、姉妹染色分体粘着に関与するRad21修復タンパク質の相同体(Losadaら、1998、Gene Develop 12:1986~1997)および有糸分裂組換え(McKayら、1996、Genomics 36:305~315)、紡錘体形成に関与する中心体関連キナーゼAIK1(Kimuraら、1997、J. Biol. Chem. 272:13766~13771)、動原体タンパク質CENP-AおよびCENP-F、並びに、紡錘体チェックポイント制御に中心的な役割を果たすMAD2およびB

UBR1タンパク質(LiおよびBenezra, 1996, Science 274:246~248; Chanら, 1999, J. Cell Biol. 146:941~954)、有糸分裂動原体会合キネシン(MCAK)、間期中心体および有糸分裂紡錘体に位置するキネシン様タンパク質HSET、CHL1ヘリカーゼ(有糸分裂中の適切な染色体分布に役割を果たす酵母タンパク質の相同体; Gerringら, 1990, EMBO J. 9:4347~4358)、および細胞質分裂に関与する3つのタンパク質、Prc1、Aim1/Aik2およびシトロンキナーゼ(Jiangら, 1998, Mol. Cell 2:877~885; Teradaら, 1998, EMBO J. 17:667~676; Madauleら, 1988, Nature 394:491~494)をコードする。p21は、核エンベロープタンパク質ラミンB1およびラミンB2、核会合に関与するラミン会合ポリペプチド(チモポエチン)、およびM期リンタンパク質MPP2およびMPP5をコードする遺伝子も阻害する。上記の多くのタンパク質の欠損により、異常な染色体分離および倍数体化が生じることが知られ、同事象を、我々は、IPTGからの遊離後にp21-9細胞において観察した。

#### 【0099】

多くのp21阻害遺伝子が、DNA複製および分離、クロマチン会合およびDNA修復に関与している。これらのいくつかの遺伝子が、リボヌクレオチド葉酸サブユニットM1およびM2、チミジンキナーゼ、チミジル酸合成酵素、ウリジン過リン酸分解酵素およびジヒドロ葉酸還元酵素を含む、ヌクレオチド生合成に関与する酵素をコードする。複製ライセンス因子Cdc47/Mcm4、Cdc45相同体、転写開始点認識複合体のOrc1タンパク質、DNA重合酵素、B-Myb、複製因子Cの37-kDサブユニット、およびDNAリガーゼIを含む、他のタンパク質も、DNA複製に関与している。この群は、複製DNAの分離(トポイソメラーゼII)、後成的に決定した染色体状態の遺伝(クロマチン会合因子-Iのp60サブユニット)、および他のクロマチン成分、例えば高い移動度の群のタンパク質1および2に関与する遺伝子も含む。DNA複製後修復または細胞周期チェックポイント制御(deWinterら, 1998, Na

t Genet. 20:281~283)、Rad54組換え修復タンパク質、エキソヌクレアーゼHex1/Rad2、および上記のRad21相同体およびDNAリガーゼIに関与し得る、XRCC9を含む、数個のp21阻害遺伝子が、DNA修復に関連している。

#### 【0100】

cDNAアレイの60%を超えるp21阻害遺伝子が、有糸分裂、DNA複製、分離および修復に関与している。該生物学的選択性は、大規模の発現プロファイリング研究には前例がない。この観察に対する結果は、機能が現在不明であるp21阻害遺伝子は、細胞周期進行に役割を果たすようであるというものである。実際に、6個のp21阻害遺伝子は、最初に、ESTまたは機能の不明な遺伝子としてcDNAアレイに列挙されたが、データベース探索により、その産物の3つが、DNA修復の細胞分裂に関連された。1つの場合では、最初の同定したESTは、ゲノムクローンにおいて、シトロンキナーゼのコード配列の3'にマッピングされることが判明し；その後、p21によるシトロンキナーゼの阻害は、そのコード配列に基づいたRT-PCRにより実証された。追加のp21阻害遺伝子のクローニングは、哺乳動物細胞分裂に役割を果たす新規遺伝子を生じるようである。

#### 【0101】

これらの結果により、また、治療介入の標的となる、p21誘導老化の細胞プログラム成分を発見する機会がさらに示唆される。p21により仲介される遺伝子発現の阻害は、E2F阻害の結果であることが示唆された(de Toledoら、1998、Cell Growth Differ. 9:887~896)。この解釈に一致して、我々のp21阻害遺伝子のサブセット(例えばCDC2、ORC1、DHFR、サイクリンA1)は、そのプロモーターにE2F部位を含む。一方、いくつかのp21阻害遺伝子(例えばサイクリンB1)のプロモーターにはE2F部位が全く見られず、いくつかのE2F依存性遺伝子(例えばサイクリンE)は、p21誘導により影響を受けなかった(データは示していない)。E2Fに加えて、依然として同定されていない調節因子であるいくつか、それ故、p21の仲介する遺伝子発現の阻害に関与し得る。かかる追加の遺

伝子には、新規医薬の標的を示し、該標的の存在および実体は、本発明により提供される方法および試薬を使用して解明に利用できる。

#### 【0102】

##### 2. p21により誘導される遺伝子発現

p21発現により抑制される遺伝子に加えて、上記のアッセイは、p21により誘導される遺伝子も検出した。p21誘導遺伝子の遺伝子発現パターンを図7Cに示す。p21阻害遺伝子とは対照的に、p21正制御遺伝子は、IPTGの添加の48時間後にのみ、すなわち全細胞での増殖停止の開始後にその発現を増加させた。唯一つの試験遺伝子の組織トランスグルタミナーゼ(t-TGase)が、IPTGの添加の12時間後に検出可能な増加を示したが、その発現は48時間までにのみ最大に到達した(図7Cに示すように)。さらに、全ての試験遺伝子(t-TGaseを除く)の発現上昇が、細胞周期の再開の十分後に、IPTGからの遊離後少なくとも3日間持続した(示していない)。この「遅い応答」動態により、該遺伝子のp21誘導は、p21の仲介する増殖停止に比べて遅延効果であることが示された。

#### 【0103】

48個の既知の遺伝子および6個のESTまたは機能の不明な遺伝子を、p21誘導細胞で正の制御を受けるとして同定し、平衡差次的発現は2.0~7.8であった(表II)。この群における非常に高い割合(48中20)の同定可能な遺伝子が、細胞外マトリックス(ECM)成分(例えばフィブロネクチン1、ラミニン2、Mac-2結合タンパク質)、他の分泌タンパク質(例えばアクチビンA、結合組織増殖因子、血清アミロイドA)、またはECM受容体(例えばインテグリン3)をコードする。これらの数個のタンパク質、並びに、大きな群のp21誘導細胞内タンパク質(表II)は、異なる形のストレス応答で誘導されるか、または、ストレス関連シグナル伝達に役割を果たすことが知られている。顕著には、我々がp21により誘導されると見出した多くの遺伝子はまた、細胞の老化、臓器の加齢、または異なる年齢関連疾病で正の制御を受ける。

#### 【0104】

p21阻害遺伝子とは対照的に、p21により誘導されることが見出されたど

の遺伝子も、細胞増殖停止を引き起こし得る、既知の機能を全く有さない。さらに、該遺伝子の誘導は、増殖停止の開始にはるかに遅れる遅い応答である。興味深いことに、スーパーオキシドジスムターゼ2 (SOD2) (Jonesら、1997、Mol. Cell. Biol. 17:6970~6981、) t-TGase (Mirzaら、1997、Amer. J. Physiol. 272:G281~G288)、アルツハイマー - アミロイド前駆体タンパク質 (APP) (Grilliら、1996、J. Biol. Chem. 271:15002~15007) および炎症タンパク質血清アミロイドA (SAA) (JensenおよびWhitehead、1998、Biochem. J. 334:489~503) を含む、数個のp21誘導遺伝子は、NF- $\kappa$ Bにより正に調節される。p21は、転写補因子p300に対するその効果により、NF- $\kappa$ B依存的転写を活性化するので (Perkinsら、1997、Science 275:523~527)、p300または関連転写補因子の活性化は、いくつかの正制御遺伝子に対するp21の効果に関与し得ることが可能である。しかし、p21の仲介する遺伝子発現誘導の遅延動態により、この誘導は、p21の即座の効果のはるかに下流で生じることが示唆される。

#### 【0105】

これらの結果、および、表IIに示した遺伝子の性質により、これらの遺伝子の発現は、p21の増殖停止機能に関与しないことが示される。しかし、我々がp21活性化遺伝子の産物間に見出す豊富な分泌タンパク質は、重要な生理的結果を有する。以下の実施例5に開示したように、p21誘導細胞からの馴化培地は、p21正制御遺伝子の性質により予測される2つの生物学的効果を示す：細胞増殖の刺激およびアポトーシスの抑制。この知見は、p21誘導細胞における上記に考察した遺伝子不安定化と合わせて、p21の「パラクリン」効果は、隣接細胞に対する腫瘍促進作用による発癌に寄与し得ることが示唆される。これは、p21により仲介される遺伝子誘導の抑制は、抗発癌作用を達成する方法を提供し得、p21仲介遺伝子誘導経路は、新世代の癌予防薬の合理的な薬物設計の標的であるという可能性をもたらす。

#### 【0106】

p21誘導の観察されたパラクリンの抗アポトーシス作用は、我々がp21により誘導されると見出した分泌タンパク質である、プロサポシンおよびガレクチン-3の報告された活性に一致する(表II)。抗アポトーシス活性はまた、p21誘導細胞内タンパク質SOD2(Mannaら、1998、J. Biol. Chem. 273:13245~13254)およびR-Ras(Suzukiら、1998、FEBS Lett. 437:112~116)に関連している。逆説的には、p21誘導t-TGaseおよびカテプシンB(Singhalら、1997、J. Investig. Med. 45:567~575)は、アポトーシス前機能に帰せ得る。アポトーシスに対するp21の作用に関して文献に矛盾した報告がある。いくつかの系では、p21過剰発現はアポトーシスを誘導したが(Prabhuら、1996、Clin. Cancer Res. 2:1221~1229; Tsaoら、1999、J. Virol. 73:4983~4990)、他の研究では、p21は、数個の型の処理により誘導されるアポトーシスから細胞を保護した(Gorospeら、1997、Oncogene 14:929~935; Luら、1998、Oncogene 16:705~712; Bissonnette&Hunting、1998、Oncogene 16:3461~3469)。p21は、抗アポトーシスおよびアポトーシス前遺伝子の両方を誘導するという本明細書に開示した結果は、アポトーシスに対するp21の効果に関する矛盾した報告を説明し得る。

#### 【0107】

(実施例4)

IPTG処理細胞と血清枯渇p21-9細胞を比較することによるp21誘導の特異性の同定

細胞増殖停止の結果をもたらすようである、p21の誘導する細胞遺伝子発現の変化の同定は、以下のように決定した。

#### 【0108】

増殖停止(休止)は、細胞を血清非含有培地中で4日間培養することにより産生された血清枯渇により、p21-9細胞で誘導した。血清枯渇細胞では、IPTG処理p21-9細胞とは異なり、細胞は、老化の形態を発達せず、非常に弱

いS A - - g a l 発現しか示さなかった。血清枯渴細胞における p 2 1 レベルは、僅か約 2 倍増加し、これに対し、I P T G 処理細胞では 1 5 ~ 2 0 倍の増加が見られた。図 7 D は、血清非含有培地中で 4 日後または 5 0 μ M I P T G の存在下で 3 日後に増殖停止した、p 2 1 - 9 細胞における p 2 1 阻害および p 2 1 誘導遺伝子の群の発現の、上記のように実施した、R T - P C R 解析を示す。培養培地が 5 0 μ M I P T G を含む場合に、p 2 1 - 9 細胞で完全に阻害された遺伝子はまた、血清枯渴細胞でも阻害されたが、これらの大半の遺伝子は、I P T G 処理細胞よりも低い程度で阻害された。

#### 【 0 1 0 9 】

発現が p 2 1 により誘導される遺伝子は、3 つの別個のパターンを示した。第一群は、発現が、老化細胞と同じ程度に休止細胞でも強力に誘導される遺伝子である。これらは、ガレクチン - 3、スーパーオキシドジスムターゼ 2、補体 C 3、およびプロサポシンを含み、これは、その誘導が、細胞増殖停止の結果であるか、または、該遺伝子は、僅かに上昇した p 2 1 レベルに極めて感受性であることを示す。第二の群は、休止細胞で正の制御を受けるが、老化細胞ほど強力に正の制御を受けない、遺伝子である。これらの遺伝子は、フィブロネクチン - 1、M a c 2 結合タンパク質およびアルツハイマー前駆タンパク質血清アミロイド A を含む。第三の群は、休止細胞で検出可能に誘導されないが、老化細胞では強力に誘導される遺伝子である。これらの遺伝子は、C T G F、プラスミノゲンアクチベーター阻害剤 1、組織トランスグルタミナーゼまたはナチュラルキラー細胞マーカータンパク質 N K 4、インテグリン 3 およびアクチビン A を含む。

#### 【 0 1 1 0 】

血清枯渴による休止の誘導に対する特定の遺伝子の応答と、I P T G の誘導する p 2 1 の過剰発現による細胞老化に対する特定の遺伝子の応答の間の差異により、これらの遺伝子は、老化の診断マーカーとして同定された。さらに、ここで、新規老化マーカーは、p 2 1 発現細胞と休止細胞の間のその発現を比較することにより同定できる。

#### 【 0 1 1 1 】

( 実施例 5 )

有糸分裂因子を含む馴化培地の作製および有糸分裂活性アッセイ

CTGF (Bradhamら、1991、J. Cell. Biol. 114 : 1285~1294)、アクチビンA (Sakuraiら、1994、J. Biol. Chem. 269 : 14118~14122)、エピセリン/グラニュリン (Shoyabら、1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 7912~7916)、およびガレクチン-3 (Inoharaら、1998、Exp Cell Res 245 : 294~302) およびより低い程度でクラステリン (Koch-Brandt & Morgans、1996、Prog. Mol. Subcell. Biol. 16 : 130~149)、プロスタサイクリン刺激因子 (PSF; Yamauchiら、1994、Biochem. J. 303 : 591~598)、血管内皮増殖因子-C (VEGF-C; Joukovら、1996、EMBO J. 15 : 290~298)、ゲルソリン (Ohtsuら、1997、EMBO J. 16 : 4650~4656) およびメタロプロテイナーゼ-1の組織阻害剤 (TIMP-1; Hayakawaら、1992、FEBS Lett. 298 : 29~32) を含む、数個のp21正制御分泌タンパク質は、増殖因子として作用する。これらの結果により、p21誘導は、パラクリン有糸分裂作用を引き起こし得ることが示唆された。さらに、ガレクチン-3 (Akahaniら、1997、Cancer Res. 57 : 5272~5276) およびプロサポシン (Hiraiwaら、1997、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 : 4778~4781) は抗アポトーシス活性を有することが示された。IPTG処理p21-9細胞からの馴化培地を試験し、細胞増殖およびアポトーシスに対する効果を有するかどうかを調べた。

**【0112】**

これらの実験で、馴化培地を、15cmのプレートあたり、 $10^6$ 個のp21-9細胞を、DMEM/10%FCSの存在下で播種することにより調製した。次の日、IPTGを加えて、最終濃度を50 $\mu$ Mとし、この培地を、3日後に、0.5%FCSおよび50 $\mu$ M IPTGを補充したDMEMと交換した。2日後 (IPTGの処理の3~5日後)、この馴化培地を集め、4 で使用前の15

日間まで保存した。対照培地は、IPTG非含有DMEM/0.5%FCSを、IPTG処理細胞と同じ密度まで増殖した無処理細胞に加え、該培地をその2日後に集めることにより調製した。

#### 【0113】

増殖の遅いヒト線維肉腫細胞系HS15.Tを使用して、これらの馴化培地中の有糸分裂活性を検出した。有糸分裂活性アッセイのために、両方の型の馴化培地、並びに、新しい培地および馴化培地と新しい培地の1:1混合物を使用して、有糸分裂誘起活性を試験した。これらの実験で、馴化培地に、1%または2%FCSを補充した。簡潔には、HS15.T細胞を、12ウェルプレートに1ウェルあたり15,000個の細胞で播種した。2日後、これらの細胞を、異なる型の培地中で培養した。細胞を馴化培地中で60時間増殖し、3.13  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ の濃度の $^3\text{H}$ -チミジンを加え、24時間インキュベートした。その後、細胞を集め、その $^3\text{H}$ -チミジン取込みをMoscaら(1992、Mol. Cell Biol. 12:4375~4383)に記載のように決定した。

#### 【0114】

IPTGの新しい培地への添加は、このアッセイで全く効果を示さなかった(示していない)。図8Aに示したように、新しい培地と、無処理p21-9細胞由来の馴化培地との有意な差異は全くなかった。これに対し、IPTG処理細胞からの馴化培地は、 $^3\text{H}$ -チミジン取込みを3倍まで増加させた(図8A)。IPTG処理細胞からの馴化培地によるHS15.Tの増殖刺激はまた、メチレンブルー染色により検出可能であった(データは示していない)。

#### 【0115】

アポトーシスに対するこの馴化培地の効果も決定した。これらの実験は、E1Aにより不死化した、マウス胚線維芽細胞系C8を使用した。この細胞系は、血清枯渴(Loweら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2026~2030)を含む、異なる刺激により誘導されたアポトーシスに非常に感受性である(Loweら、1994、Science 266:807~810; Niki forovら、1996、Oncogene 13:1709~1719)。アポトーシスは、6cmプレートあたり $3 \times 10^5$ 個の

C8細胞を播種し、次の日に培地を、0.4%血清を補充した新しい培地または馴化培地（新しい血清を添加せず）と交換することにより解析した。DNA含量解析およびDAPI染色を24時間および48時間後に実施し、相対的細胞数を、血清の少ない培地中で48時間後にメチレンブルー染色（Perryら、1992、Mutat. Res. 276:189~197）により測定した。

#### 【0116】

血清の少ない新しい培地またはIPTG処理または無処理細胞からの馴化培地の添加により、C8細胞に迅速にアポトーシスが誘導され、これは細胞脱着およびアポトーシス形態が、DAPI染色後も大半の細胞に検出可能であることにより証明される（示していない）。しかし、IPTG処理細胞からの馴化培地は、新しい培地および無処理細胞からの馴化培地に比べて細胞生存度を強く増加させ、これは、48時間後に付着したまま留まる細胞のメチレンブルー染色により測定した（図8Bに示す）。p21誘導細胞からの馴化培地の効果は、細胞DNA成分のFACS解析でさらにより明確であり、これは、培地交換の24時間および48時間後に合わせて付着した浮遊しているC8細胞で実施した（図8B）。多くの他の細胞系と異なり、C8細胞のアポトーシスは、DNAの量の減少した（サブG1）僅か数個の細胞しか産生せず、G2/M DNA含量をもつ細胞の選択的消失により特徴づけられる（Nikiforovら、1996、同上）。IPTG処理細胞からの馴化培地中の血清枯渇細胞は、G2/M画分を保持し、血清の豊富な培地中で増殖している対照細胞に似た細胞周期プロファイルを示した（図8B）。IPTG単独での添加は、C8細胞のアポトーシスに対して全く効果はなかった（示していない）。従って、HT1080細胞におけるp21誘導は、p21正制御遺伝子の性質により予測されるような、有糸分裂および抗アポトーシス因子の分泌をもたらす。

#### 【0117】

（実施例6）

p21応答性プロモーターにより発現されるリポーター遺伝子を含む組換え発現作成物の作製

プロモーター - リポーター作成物は、以下のように、ヒトPLK1、NK4お

よびSAAプロモーターから調製した。重合酵素連鎖反応(PCR)によるプロモーター特異的DNAの増幅を、鋳型として、HT1080p21-9細胞からのゲノムDNAを使用して実施した。PCRを、PfuTurboDNA重合酵素(ストラタジーン)および表IIIaに列挙したプライマーセットを使用して実施した。各プライマーセットのPCR条件を表IIIbに記載する。PCR産物を得、TOPO TAクローニングベクターpCR2.1/TOPO(PLK1およびSAAでは)またはpCRII/TOPO(NK4では)にクローニングした。これらの作成物は、シーケンスにより確認し、その後、正しい配向でプロモーターを含むKpnI-XhoI断片を、ルシフェラーゼリポーターベクターpGL2ベシック(WI州マジソン所在プロメガ)のKpnIおよびXhoI部位に、標準的な組換え遺伝子技術(Sambrookら、同上)を使用して挿入した。

#### 【0118】

各プロモーター作成物の2つの別々に単離したプラスミドクローンを、一過性トランスフェクションアッセイにより、p21調節について試験した。各プロモーター-ルシフェラーゼ作成物を、pCMV-gal(プロメガ)プラスミドと、1:1の比で混合し、HT1080p21-9細胞に、リポフェクタミン2000(MD州ゲーサースバーグ所在ライフ・テクノロジー社)により導入した。6から8時間後、50μM IPTGを含むまたは含まない培地をトランスフェクト細胞に加え、細胞抽出物を、これらの細胞から60~72時間後に調製し、ルシフェラーゼ活性についてアッセイした(ルシフェラーゼアッセイシステム、プロメガ)。-ガラクトシダーゼアッセイを、トランスフェクション効率の正規化対照として使用した。

#### 【0119】

図9は、これらの実験結果を示す。トランスフェクト細胞におけるp21誘導時に、p21阻害遺伝子PLK1から調製したプロモーター作成物の発現は減少し(3~5倍)、p21誘導遺伝子NK4およびSAAから調製したプロモーター作成物からの発現は増加した(NK4では7~10倍、SAAでは20~30倍)。これらの結果により、p21は、これらの遺伝子の発現を、そのプロモ-

ターを調節することにより正制御または負の制御をし、該遺伝子のプロモーター作成物を使用して、p 2 1により仲介される遺伝子発現の調節についてアッセイできることが示された。

## 【0120】

## 【表1】

表 IIIa プライマー配列

プロモーター	センスプライマー(5'→3')	アンチセンスプライマー(5'→3')
PLK1	CCTGTAATCCCAGCATTGG (配列番号1)	AGACCTCGATCCGAGCAGA (配列番号2)
NK4	TGGAGCTAGAAGAGCCCGTAGG (配列番号3)	GCCAAAAGTTCAAGGAGCCAA (配列番号4)
SAA	CAGAGTTGCTGCTATGTCCACCA (配列番号5)	CACTCCTTGTGTGCTCCTCAC C(配列番号6)

表 IIIb PCR条件

プロモーター	変性	アニーリング	伸長	サイクル	産物サイズ
PLK1	94°, 1分	68°, 1分	72°, 1分 40秒	32	990 bp
NK4	94°, 1分	65°, 1分	72°, 1分 40秒	32	877 bp
SAA	94°, 1分	68°, 1分	72°, 1分 40秒	32	1000 bp

## 【0121】

## (実施例7)

## 誘導性p 1 6 遺伝子を含む哺乳動物細胞の作製

誘導性p 1 6 遺伝子を含む哺乳動物細胞系を、一般に、誘導性p 2 1含有細胞系の作製のために、実施例1に記載のように作製した。細菌lac I 遺伝子をコードし、ネズミ異所性レトロウイルス受容体(HT 1 0 8 0 3' SS6; Chang & Roninson, 1996, Gene 183: 137~142)を発現している、組換え発現作成物を含むヒトHT 1 0 8 0 線維肉腫細胞系の組換え誘導体を使用して、誘導性p 1 6 含有細胞を作成した。ヒトp 1 6 の471 bpのコード配列を含むDNA断片(米国特許第5, 889, 169号に開示、参考として取込む)を、IPTG調節レトロウイルスベクターLN X R O 2 (Chang & Roninson, 1996, Gene 183: 137~142)に

クローニングした。このレトロウイルスベクターは、細菌ネオマイシン耐性遺伝子 (neo) を、レトロウイルス長末端反復プロモーターの制御下に含み、G418 (BRL - ギブコ) を使用した選択が可能となる。LNp16RO2 と称される得られた作成物を、図10に図解する。この作成物をHT1080 3'SSに、慣用的なレトロウイルス感染法を使用して導入した。感染後、LNp16RO2ベクターで感染した細胞を、細胞を、400 µg / mL G418 (BRL - ギブコから得る) の存在下で培養することにより選択した。LNp16RO2形質導入細胞のG418により選択した個体群を、HT1080 / LNp16RO2 と称した。この細胞個体群は、VA州マナッサス所在アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (A.T.C.C.) に2000年10月10日に寄託され、受託番号 を受けた。

#### 【0122】

(実施例8)

#### 細胞増殖および遺伝子発現アッセイ

実施例7に記載したようなIPTGで誘導できるヒトp16遺伝子を有するHT1080誘導体を、以下のように、細胞増殖および遺伝子発現アッセイに使用した。

#### 【0123】

細胞を、50 µM IPTGの存在下および非存在下で、6日間の経緯をかけて増殖させ、培養液中の細胞数を、600 nmでの光散乱により決定した。これらの結果を図11に示す。これらの細胞を50 µM IPTGの存在下で培養し、よってp16遺伝子発現を誘導することにより、IPTGの非存在下で増殖した細胞に比べて、増殖は阻害された。

#### 【0124】

その後、RNAをこれらの細胞から得、50 µM IPTGの存在下または非存在下で3日間培養した。その後、これらのRNA試料を、 $\beta_2$ -ミクログロブリンではなくむしろ  $\alpha$ -アクチンを正規化に使用することを除き、実施例3および6に実質的に上記したように実施したRT-PCRアッセイに使用した。p21により阻害されると上記で示された9個の遺伝子、および、p21により誘導

されると上記で示された18個の遺伝子を、これらの細胞のIPTG処理により誘導されたp16遺伝子発現の効果について解析した。これらの結果を図12に示す。全ての試験したp21により阻害される遺伝子は、IPTG誘導p16発現によっても阻害され、全ての試験p21誘導遺伝子は、IPTG誘導p16発現によっても誘導された。試験した阻害遺伝子は、細胞周期進行に關与する遺伝子であり、試験した誘導遺伝子は、p21発現誘導に關して上記したような、アルツハイマー病、アミロイド症、關節炎、アテローム硬化症、およびパラクリンアポトーシスおよび有糸分裂誘起効果に關与する。図12に示した結果も、p16発現が、p21発現に対して検出された効果を全く示さないことを示す。

【0125】

前記の開示は、本發明のある特定の實施形態を強調し、全ての修飾または別のその均等物も、添付の特許請求の範圍に示したような本發明の精神および範圍内であることを理解すべきである。

【0126】

【表2】

表 I

## p21 誘導により負の制御を受ける遺伝子

## A. UniGemV アレイにより同定された p21-阻害遺伝子 :

遺伝子	受託番号	平衡差次発現	確認方法 <sup>a</sup>
有糸分裂に関連 :			
CDC2	X05360	2.5	R, W
CKsHs1(CDC2 キナーゼ)	X54941	5.5	R
PLK1(ポロ様キナーゼ)	U01038	5.1	R, W
XCAP-H 濃縮相同体	D38553	6	R
CENP-A(動原体タンパク質 A)	U14518	5.3	R
CENP-F(動原体タンパク質 F)	U30872	2.5	R
MAD2	U65410	6.6	R, W
BUBR1	AF053306	5.9	R
MCAK(分裂動原体会合キネシン)	U63743	3.8	R
HSET キネシン様タンパク	AL021366	3.6	R
CHL1 ヘリカーゼ	U75968	3.3	R
AIK-1(オーロラ/1PL1 近縁キナーゼ)	D84212	4.6	R
AIM-1(AIK-2;オーロラ/1PL1 近縁キナーゼ)	AF004022	10.2	R
PRC1(細胞質分裂 1 制御タンパク)	AF044588	12.6	R, W
シトロンキナーゼ	H10809	2.7	R
ラミン B1	L37747	7	
ラミン B2	M94362	2.7	
LAP-2(ラミン関連タンパク質 2)	U18271	4.6	R
MPP2(M 期リンタンパク質 2)	U74612	3.7	R
MPP5(M 期リンタンパク質 5)	X98261	3.7	
DNA 複製分離と染色質構築に関連 :			
チミジンキナーゼ 1	K02581	2.9	R
チミジル酸合成酵素	X02308	3.9	R
ウリジン過リン酸分解酵素	X90858	2.5	
リボ核酸還元酵素 M1	X59543	4.6	R
リボ核酸還元酵素 M2	X59618	10.7	R
CDC47 相同体(MCM7)	D55716	9.6	R
CDC21 相同体(MCM4)	X74794	2.7	R
CDC45 相同体(Porc-PI)	AJ223728	4.1	R
HsORC1(転写開始点認識複合体 1)	U40152	2.7	R
DNA 重合酵素 $\alpha$	X06745	2.8	R
複製因子 C(37-kD)	M87339	2.6	
B-MYB	X13293	9.1	
HPV16 E1 タンパク質結合タンパク質	U96131	3.7	
トポイソメラーゼ II $\alpha$	J04088	8.6	R
クロマチン会合因子-I(p60 サブユニット)	U20980	2.7	R
高移動度群染色体タンパク質 2	X62534	3.7	R
高移動度群染色体タンパク質 1	D63874	3.6	R
ヒストン H2A F/Z 変異体	AA203494	2.8	
DNA 修復に関連 :			
XRCC9	U70310	3.6	R
RAD54 相同体	X97795	5.4	R
HEX1 5'-3'エキソヌクレアーゼ	AF042282	5.2	R
ATP-依存性 DNA リガーゼ I	M36067	2.5	R
RAD21 相同体	D38551	2.9	R

転写およびRNA プロセッシングに関連：			
推定転写因子 CA150	AF017789	2.8	
転写補活性体 ALY	AF047002	3.3	
WHSC1/MMSET(SET ドメインタンパク質)	AA401245	2.9	
NN8-4AG(SET ドメインタンパク質)	U50383	2.8	
EZH2(zeste 相同体 2 エンハンサー)	U61145	2.8	
PTB-会合スプライシング因子	X70944	2.5	
AU-リッチ要素 RNA 結合タンパク質 AUF1	U02019	2.8	
U-snRNP-関連サイクロフィリン	AF016371	2.8	
その他遺伝子：			
3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素	AF006043	4.8	
L-型アミノ酸輸送体、サブユニット LAT1	M80244	4.1	R
ヒアルロン酸媒介運動性受容体	U29343	4	
ホルボリン I (PKC 誘導性)	U03891	3.9	
PSD-95 結合ファミリータンパク質	D13633	3.7	R
HTRIP(TNF 受容体成分)	U77845	3.6	
NAD 依存メチルテトラヒドロ葉酸脱水素酵素	X16396	3.4	
膜糖タンパク質 4F2 抗原重鎖	J02939	3.2	
ムチン様タンパク質	D79992	3.2	
MAC30(髄膜腫内で差次的に発現)	L19183	2.9	
P52rIPK(インターフェロン誘導タンパク質合成制御)	AF007393	2.8	
推定ホスホセリン転移酵素	AA192483	2.8	
グルコース 6 リン酸転移酵素	Y15409	2.7	
カルサイクリン結合タンパク質	AF057356	2.6	
オルニチンデカルボキシラーゼ 1	X16277	2.6	R
トロフィニン支持タンパク質(タスチン)	U04810	2.5	
アシル補酵素 A コレステロールアシルトランスフェラーゼ'	L21934	2.5	
ピニン/SDK3	Y10351	2.5	
機能が未知の遺伝子：			
EST	AA975298	2.7	
EST	AA034414	2.5	
EST	AA482549	2.5	

B. RT-PCR により同定された p21-阻害遺伝子：

遺伝子	受託番号	UniGemV 結果 <sup>b</sup>
サイクリン A1	U66838	IS
サイクリン B1	M25753	IS
CDC25A	NM_001789	A
ジヒドロ葉酸還元酵素	J00140	1.5
ING1	NM_005537	A

<sup>a</sup>略語： R, RT-PCR； W, ウェスタンブロッティング

<sup>b</sup>略語： IS, 不十分なシグナル； A, アレイに存在せず

【表 3】

表 I I

## p21 誘導により正の制御を受ける遺伝子

遺伝子	受託番号	平衡差次発現	確認方法 <sup>a</sup>
分泌タンパク質および細胞外基質に会合したタンパク質:			
フィブロネクチン 1	X02761	5.7	R
プラスミノゲン活性化因子阻害剤 I 型	M14083	3.7	R, N
プラスミノゲン活性化因子組織型	M15518	2.8	Z
ラミニン $\beta$ 2	X79683	2.1	
デスモコリン 2a/bb	X56807	3.5	
ポドカリキシン様タンパク質	U97519	2	
アクチピンA(インヒピン $\beta$ A)	J03634	2	R
ガレクチン 3 (Mac-2)	AB006780	2.4	N
Mac-2 結合タンパク質	L13210	2	R, N
プロサポシン	J03077	2.9	N
CTGF(結合組織増殖因子)	M92934	3.3	N
グラニューリン/エピセリン	AF055008	2.1	N
カテプシン B	L04288	2.4	N
組織トランスグルタミナーゼ	M55153	2.5	R, N, W
P37NB(スリット相同体)	U32907	2.1	
血清アミロイド A タンパク質前駆体	M26152	4	R, N, W
アルツハイマー病アミロイド A4 タンパク質前駆体	D87675	2	R, N
補体 C3 前駆体	K02765	5.9	R, N
テスチカン	X73608	2.1	N
インテグリン $\beta$ 3	M35999	2.1	R, N
リソソームタンパク質:			
N-アセチルガラクトサミン-6-硫酸ルファターゼ	U06088	2.3	N
酸性アルファ-グルコシダーゼ	X55079	2.4	N
酸性リパーゼ A(コレステロールエステル分解酵素)	X76488	2.1	N
リソソーム $\alpha$ マンノシド-非感受性タンパク分解酵素	AF017456	2.5	
ミトコンドリアタンパク質:			
スーパーオキシドジスムターゼ	X07834	3.5	R, N, W
メタキシン	J03060	3.4	
2,4-ジエノイル-CoA 還元酵素	U78302	2	
ストレス応答およびシグナル伝達に関連したその他の遺伝子:			
ユビキチン会合酵素(UbcH8)	AF031141	2	
ユビキチン特異的プロテアーゼ 8	D29956	2	
RTP/Cap43/Drg1/Ndr1(ニッケル、レチノイド、ホモシステインおよび ER ストレスにより誘導可能)	D87953	2.5	
C-193 筋アンキリン反復核酸タンパク質(サイトカイン誘導性)	X83703	3	
多剤耐性関連 LRP 主要円蓋タンパク質	X79882	2.2	N
$\beta$ アレスチン関連 HHCPA78 相同体(ビタミン D3 により正の制御)	S73591	4.1	N
R-RAS	M14949	2.4	
RAB13 小 GTP アーゼ	X75593	2.2	
P66 SHC(ski 発癌遺伝子)	U73377	2	N
MK-STYX(MAPキナーゼ 3 様タンパク質)	N75168	2	
H73 核酸抗原/MA-3 アポトーシス関連/TIS(トポイソメラーゼ阻害剤抑制)	U96628	2.4	

その他の遺伝子：			
ナチュラルキラー細胞タンパク質 4	M59807	4.4	R
TXK チロシンキナーゼ(T細胞特異的)	L27071	3.8	
X 関連 PEST-含有輸送体	U05321	2.1	
AMP デアミダーゼ 2	M91029	2	N
FIP2/HYPL ハンチンチン相互作用タンパク質	AF061034	2	
DNASE I 相同体	X90392	2.5	N
転写因子 11	X77366	2	
ヒストン H2A.2	L19779	2.8	
ヒストン H2B	AL021807	2.4	
機能が未知の遺伝子：			
23808	AF038192	2.1	
CGI-147	AA307912	2.1	N
EST	W89120	2.8	
EST	AI026140	2.5	
EST	AA218982	2.4	
EST	W63684	2	

<sup>a</sup>略語： R、RT-PCR； N、ノザンハイブリダイゼーション； W、ウェスタンブロットティング； Z、酵素電気泳動法

## 【図面の簡単な説明】

### 【図 1】

図 1 は、ヒト HT1080 線維肉腫細胞系変異体 p21-9 の作製に使用した IPTG 調節レトロウイルスベクター LNp21CO3 の図解である。

### 【図 2】

図 2 A は、50  $\mu$ M の IPTG の添加後の p21 誘導の時間経過のグラフであり、ここでの p21 レベルは ELISA により決定した。

図 2 B は、IPTG の除去後の p21 減衰の時間経過のグラフである。

### 【図 3】

図 3 A は、50  $\mu$ M の IPTG の添加後の <sup>3</sup>H - チミジン 標識係数 (オートラジオグラフィにより決定) の変化の時間経過のグラフである。

図 3 B は、50  $\mu$ M の IPTG の添加後の有糸分裂誘起係数 (DAPI 染色後に顕微鏡により決定) の変化の時間経過のグラフである。

図 3 C は、50  $\mu$ M の IPTG の添加後の細胞周期分布 (ヨウ化プロピジウム後の蛍光活性化細胞選別 (FACS) 解析により決定) の変化の時間経過のグラ

フである； - - : 細胞周期G1期の細胞； - - : 細胞周期のG2/M期の細胞； - - : 細胞周期のS期の細胞。

#### 【図4】

図4Aは、p21-9細胞によるコロニー形成に対する、異なる用量のIPTGによる処理持続期間の効果を示すグラフである； - - : 0.5  $\mu$ M IPTG； - - : 5  $\mu$ M IPTG； - - : 50  $\mu$ M IPTG。

図4Bは、50  $\mu$ M IPTGの除去後の<sup>3</sup>H-チミジン標識係数（オートラジオグラフィにより決定）の変化の時間経過のグラフである； - - : 1日目； - - : 5日目。

図4Cは、50  $\mu$ M IPTGの除去後の有糸分裂誘起係数（顕微鏡により決定）の変化の時間経過のグラフである； - - : 1日目； - - : 5日目。

図4Dは、1日間または3日間の処理後の50  $\mu$ M IPTGの除去後の浮遊細胞の比率の変化の時間経過のグラフである； - - : 無処理； - - : 1日目； - - : 3日目。

#### 【図5】

図5Aは、FACSにより決定した、無処理細胞（左）、および、5日間50  $\mu$ MのIPTGで処理し、IPTG非含有培地中に放出された細胞（右）のPKH2蛍光プロファイルの変化を示すヒストグラムである。

図5Bは、50  $\mu$ M IPTGで5日間処理し、PKH2で標識し、IPTGを用いずに6日間増殖させた後にFACSにより単離した、PKH2<sup>lo</sup>SS<sup>1</sup>°（薄い線）およびPKH2<sup>hi</sup>SS<sup>hi</sup>（太い線）細胞個体群のDNA含量のFACSプロファイルのグラフ表示である。

図5Cは、50  $\mu$ M IPTGで3日間処理したものから（左）および無処理細胞（右）から放出された48時間後に回収した、浮遊細胞のDNA含量のFACSプロファイルのグラフ表示である。図5Dは、1日間IPTG処理したものから放出された0時間、12時間、24時間、28時間、36時間および48時間目の付着細胞のDNA含量のFACSプロファイルのグラフ表示である。

#### 【図6】

図6は、IPTGから放出された1～2日後に観察された正常（左）および異

常(右)有糸分裂誘起図の例を示した顕微鏡写真である。

【図7】

図7Aは、RT-PCR実験(左)、細胞mRNA発現のノザンプロット解析(中間)および示した遺伝子の発現のIPTG誘導変化についてのイムノプロットアッセイのゲル電気泳動パターンの写真である; C: 対照の無処理p21-9細胞; I: 3日間50 $\mu$ M IPTGで処理した細胞。2-ミクログロブリン(2-M)を、RT-PCRの正規化対照として、ノザンハイブリダイゼーションにS14リボソームタンパク質遺伝子を使用した。

図7Bは、IPTG添加および放出時の示したp21阻害遺伝子の発現の変化の時間経過を示した、RT-PCR実験(左)およびイムノプロット解析(右)のゲル電気泳動写真である。

図7Cは、IPTG添加時の示したp21誘導遺伝子の発現の変化の時間経過のRT-PCR実験(左)およびノザンハイブリダイゼーション解析(右)のゲル電気泳動パターンの写真である。図7Dは、無処理対照p21-9細胞(C)、血清の枯渇した休止細胞(Q)およびIPTG処理老化細胞(I)における遺伝子発現の比較である。

【図8】

図8Aは、新しい培地(F)、IPTG処理(I)または無処理p21-9細胞(U)からの馴化培地、および、1%または2%血清を補充した馴化および新しい培地(I/FおよびU/F)の1:1混合物の、HS15.T細胞による<sup>3</sup>H-チミジン取込みに対する効果を示したヒストグラムである。

図8Bは、10%血清(対照)、血清の少ない新しい培地(F)またはIPTG処理(I)または無処理(U)p21-9細胞からの馴化培地中で24時間または48時間インキュベートした後の、合わせ付着し浮遊しているC8細胞のDNA含量のFACSプロファイルのグラフ表示である。同じ培地中で48時間インキュベートした後の付着細胞の相対数(メチレンブルー染色により決定)を各セットのヒストグラムの下に列挙する。

【図9】

図9は、ルシフェラーゼが、発現がp21により変調される遺伝子由来のプロ

モーターの転写制御下にある、作成物を含む、細胞中でのルシフェラーゼ活性のヒストグラムである。p21発現の非存在下 (IPTGなし、白抜きの棒として示す) および存在下 (50  $\mu$ M IPTGを添加、影のある棒として示す) での発現を、ポロ様キナーゼ (PLK1)、ナチュラルキラー細胞タンパク質4 (NK4)、および血清アミロイドA (SAA) 由来のプロモーターを含む実施例6に従って調製した作成物について示し; 各プロモーター作成物を、2つの独立的な作成物のクローンを使用して試験した。

【図10】

図10は、ヒトHT1080線維肉腫細胞系変異体HT1080/LNp16RO2の作製に使用したIPTG調節レトロウイルスベクターLNp16RO2の図解である。

【図11】

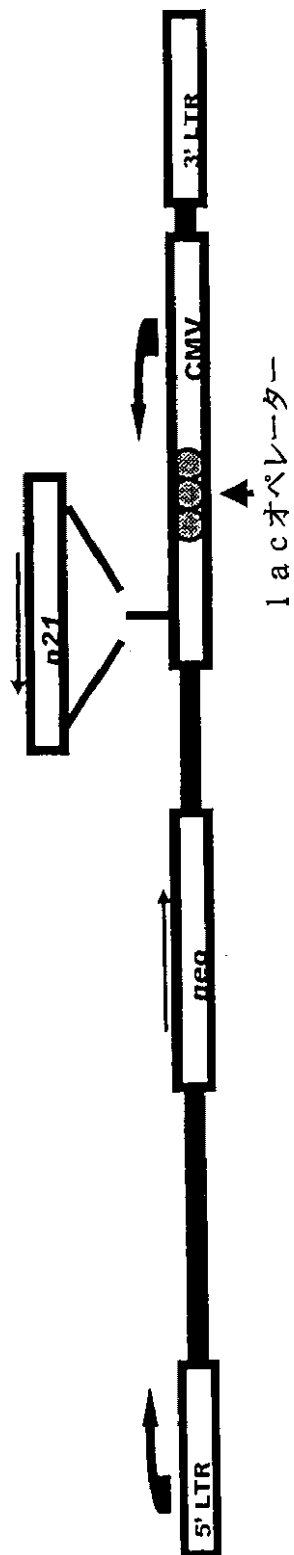
図11は、50  $\mu$ M IPTGの添加後のLNp16RO2 (600 nmでの光散乱により決定) を含むHT1080 3' SS6細胞の細胞増殖の時間経過のグラフである; - - : 無処理; - - : IPTG処理。

【図12】

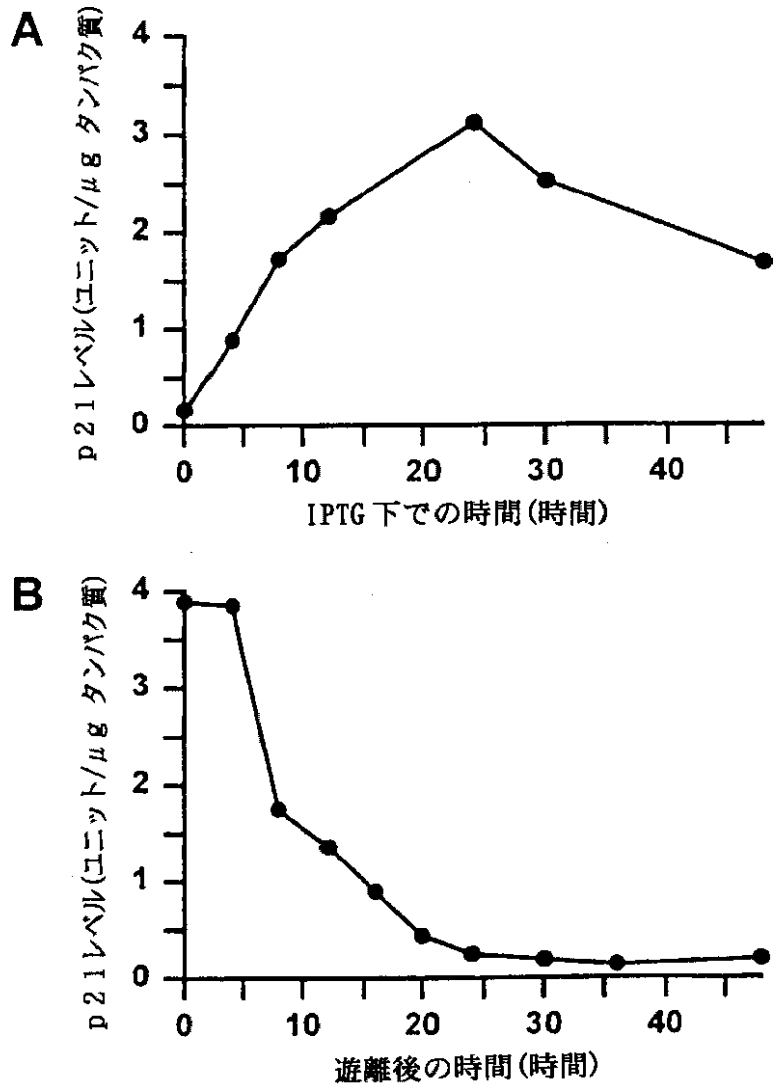
図12は、示した遺伝子の発現のIPTG誘導変化を検出するために、LNp16RO2を含む細胞を使用したRT-PCR実験のゲル電気泳動パターンの写真である; C: 対照無処理細胞; I: 3日間50  $\mu$ M IPTGで処理した細胞。 - - - アクチンを、RT-PCRの正規化対照として使用した。

【図1】

図1 IPTGにより制御されるレトロウイルスベクター-LNP21C03



【図2】



*Fig. 2*

【図3】

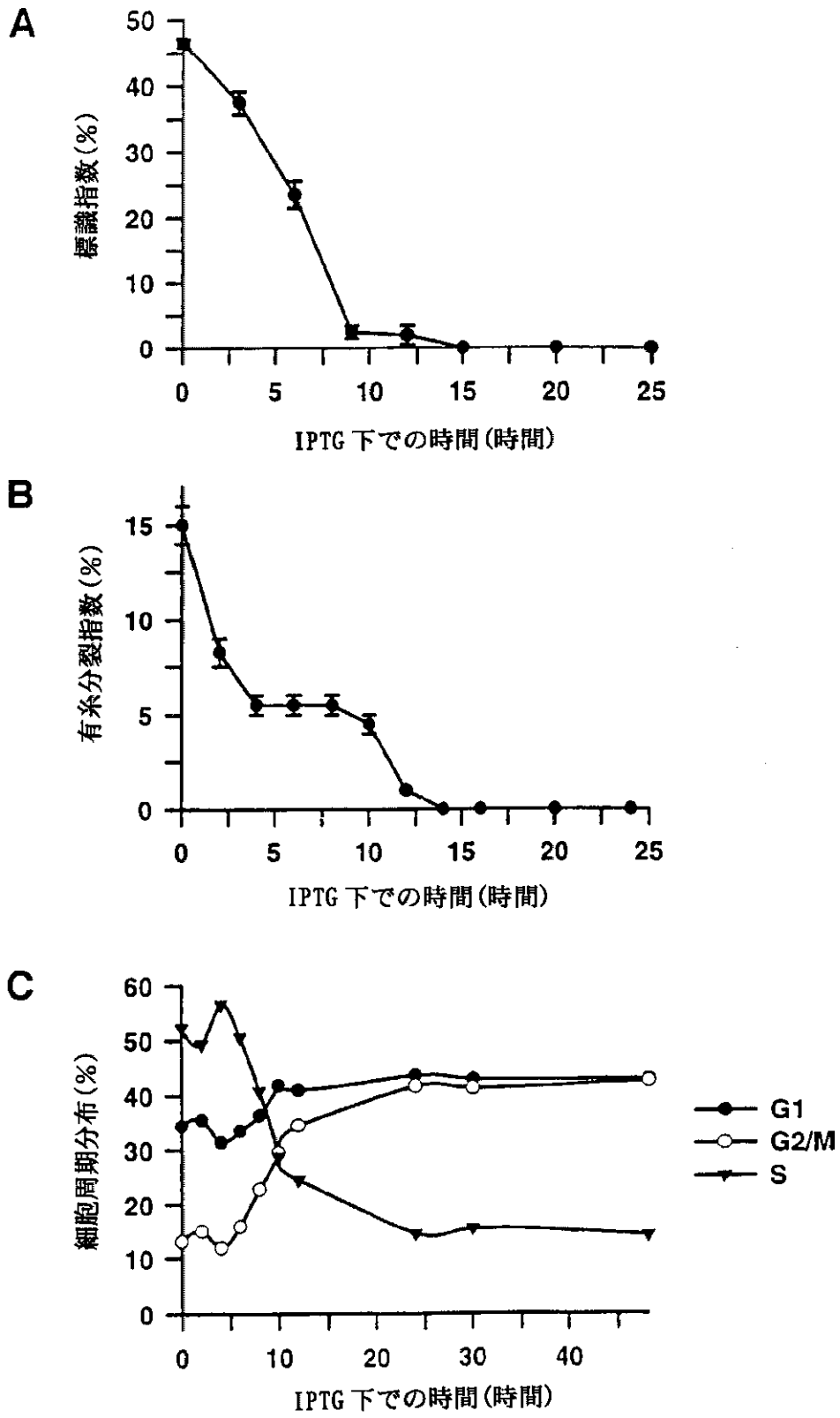


Fig. 3

【図4】

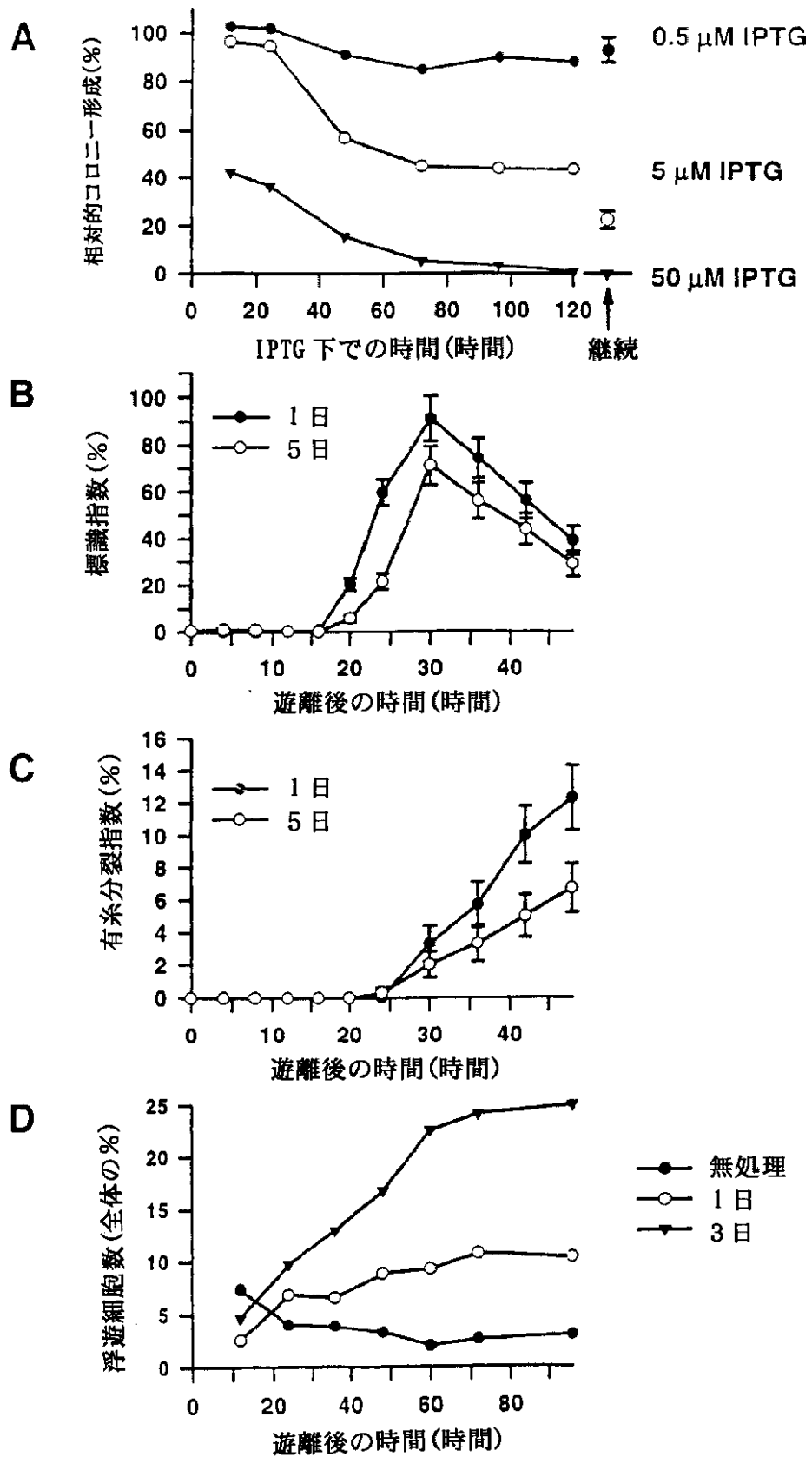
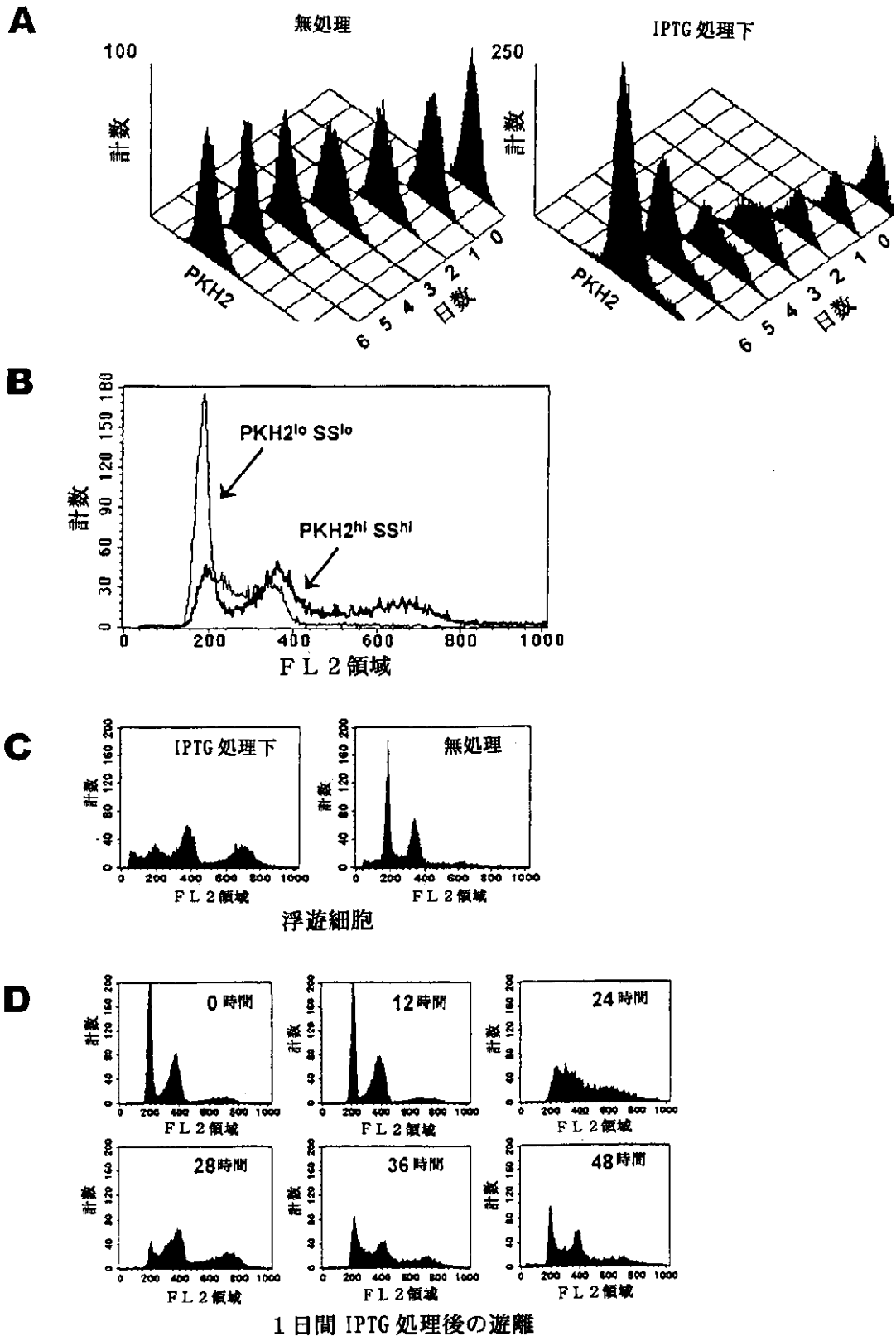


Fig. 4

【図 5】

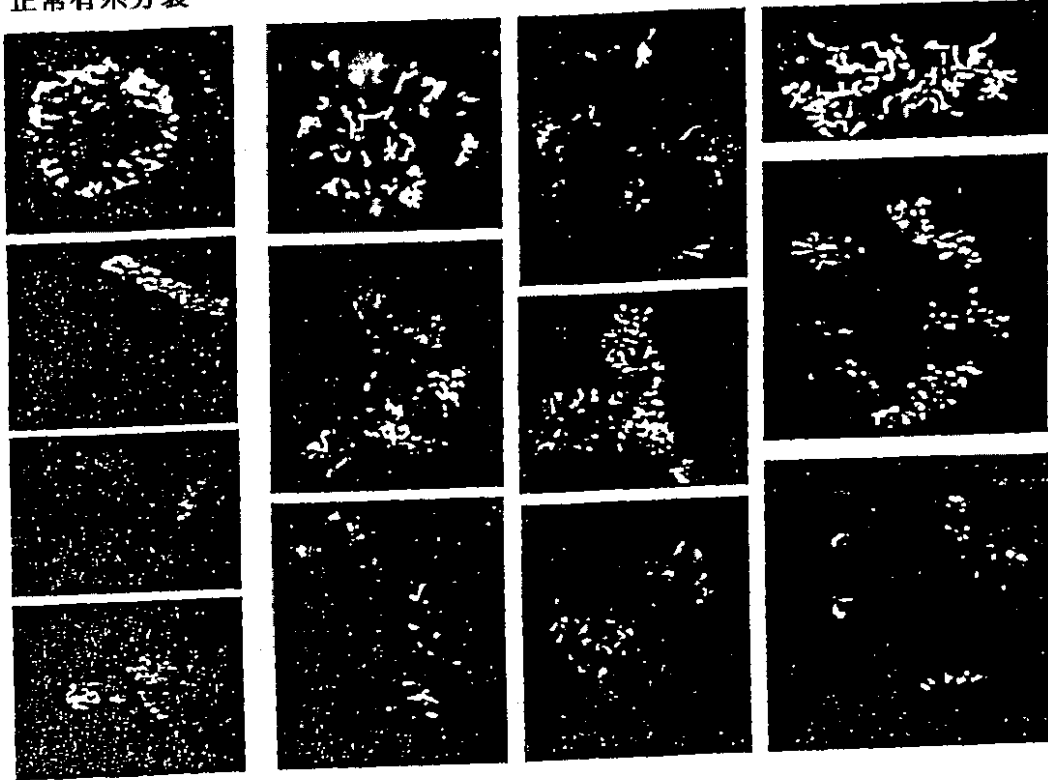


*Fig. 5*

【图6】

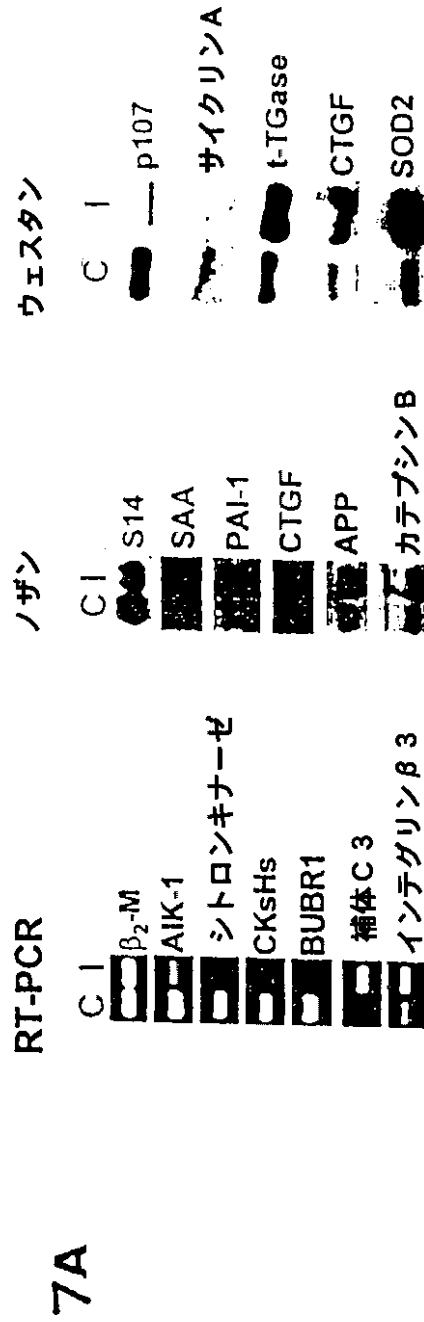
正常有糸分裂

異常有糸分裂



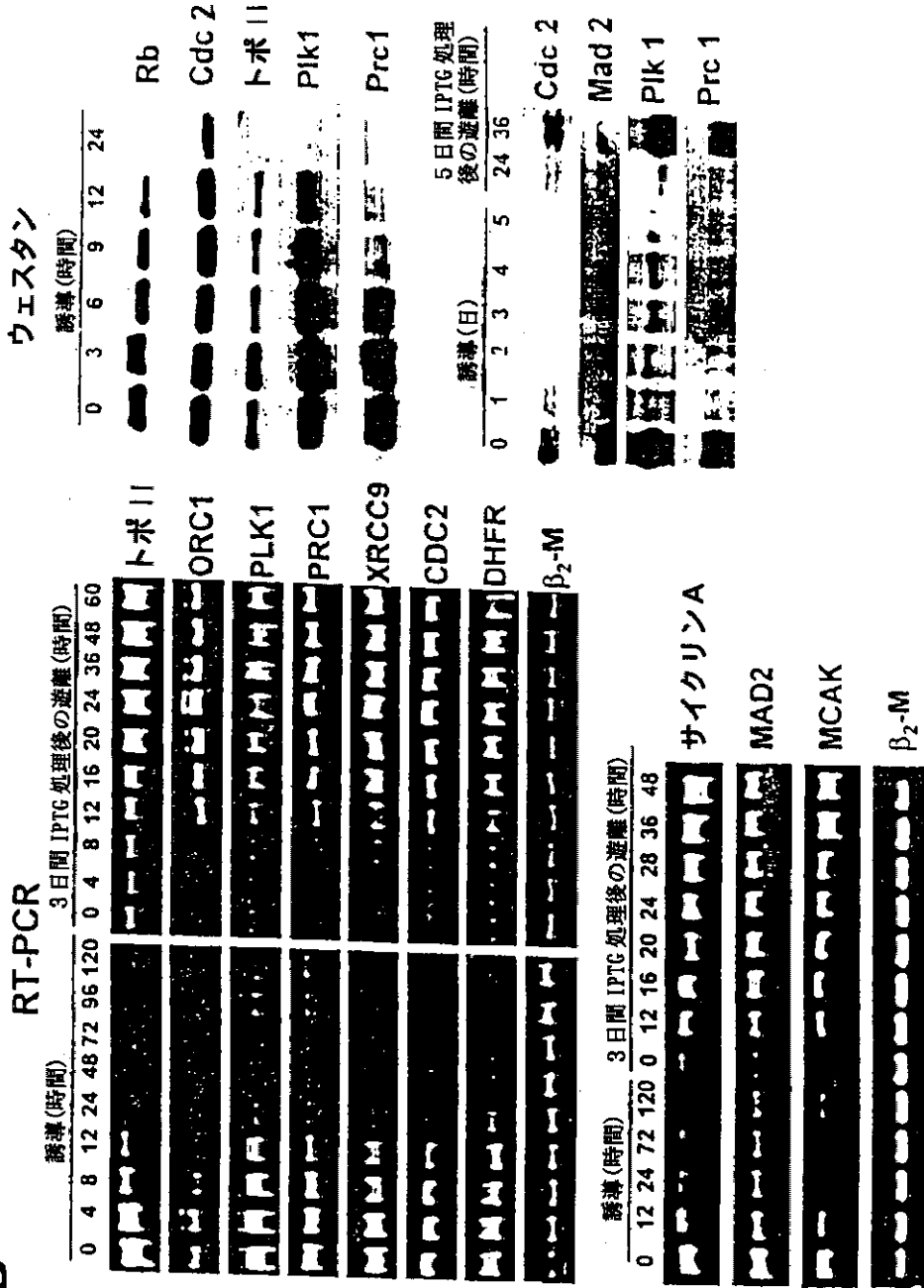
*Fig. 6*

【図7A】



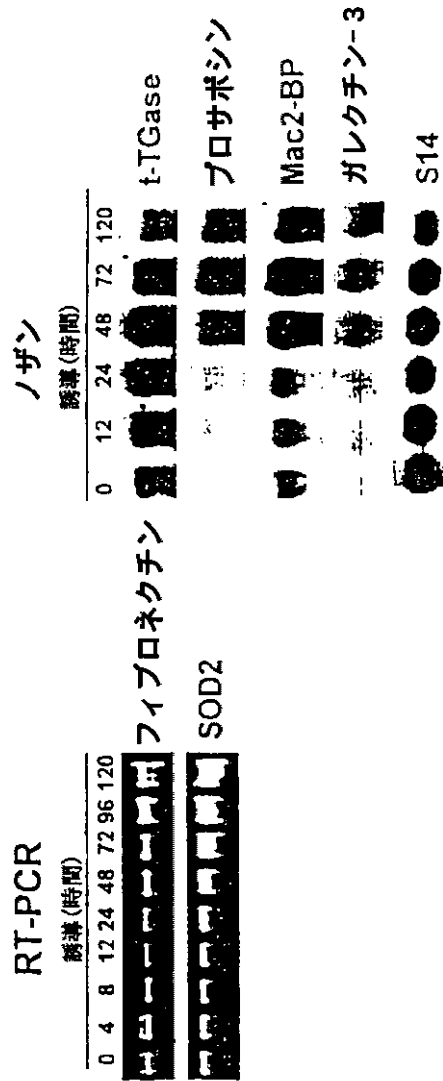
7B

【図7B】

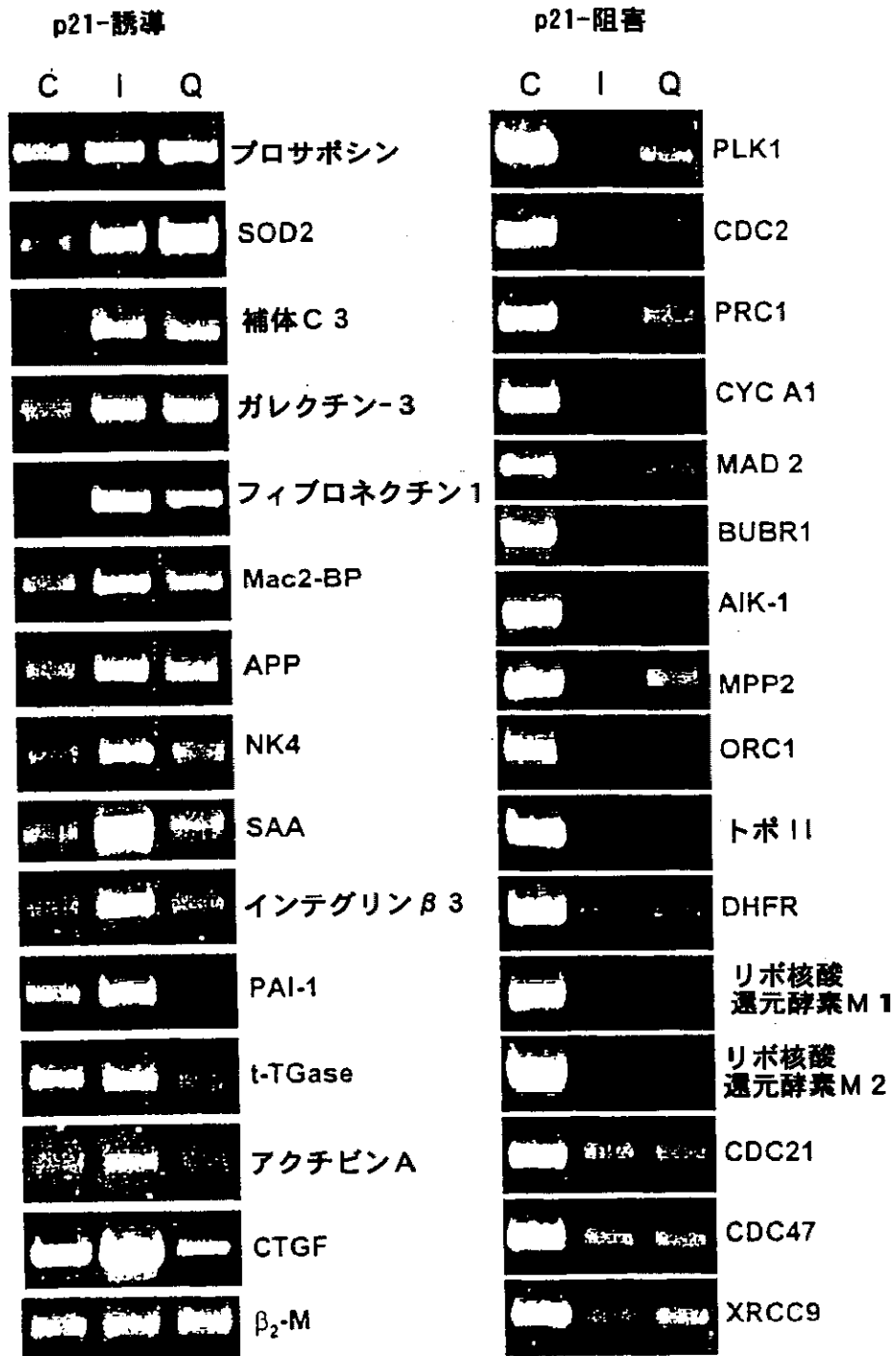


【図7C】

7C



【図7D】



C, 対照の無処理細胞 ; I, IPTG 処理,  
 Q, 血清枯渇(休止)細胞

【図8】

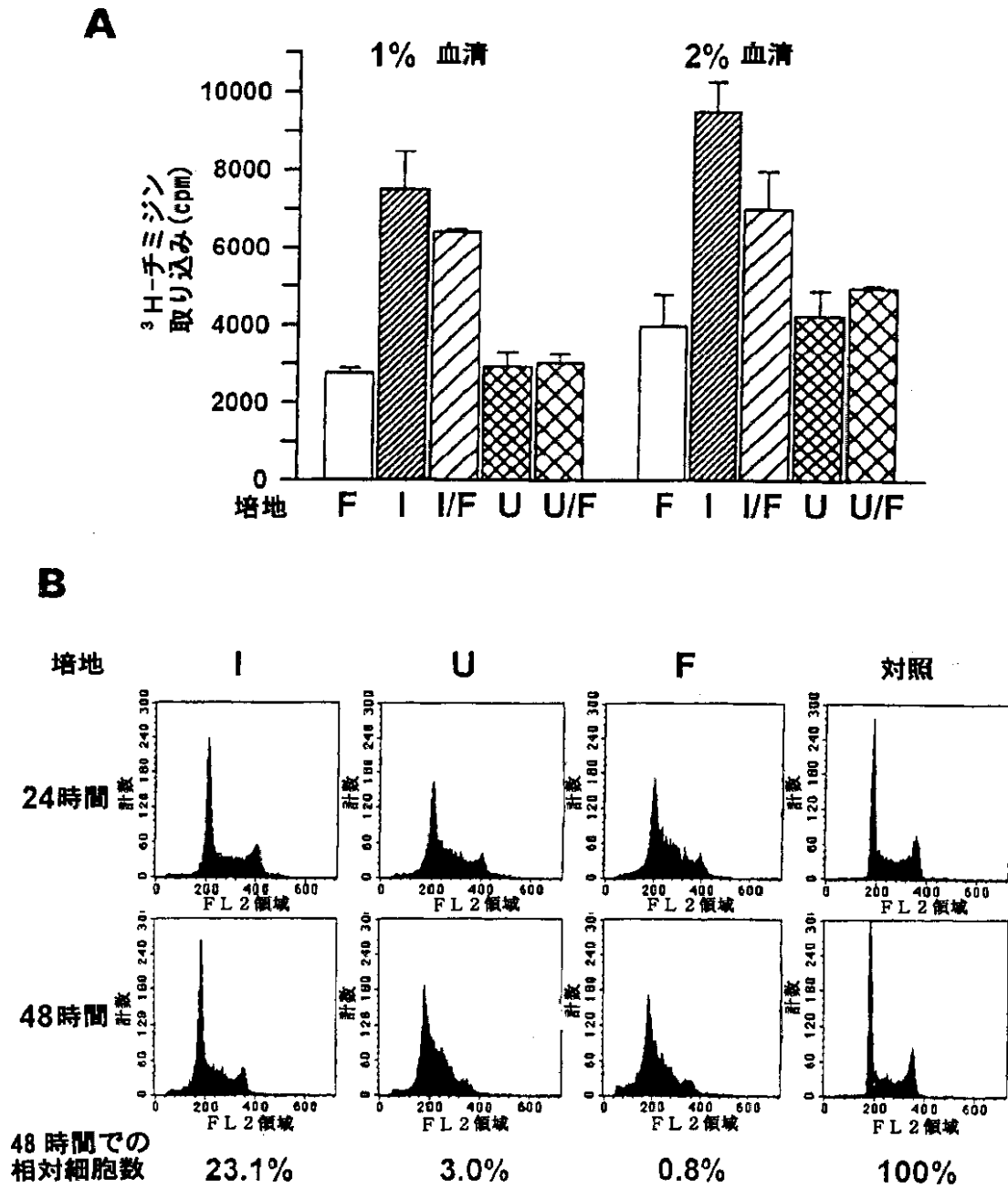
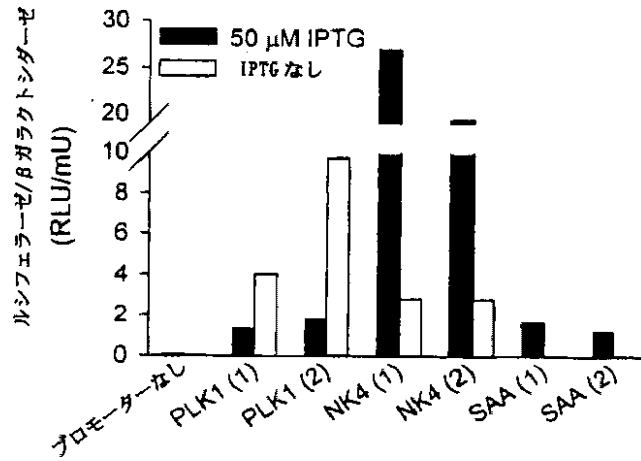


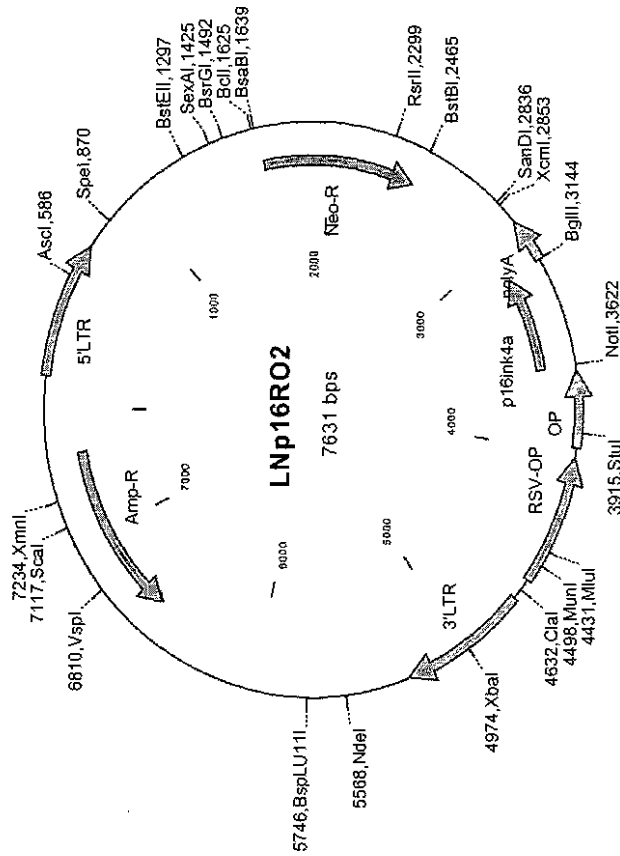
Fig. 8

【図9】



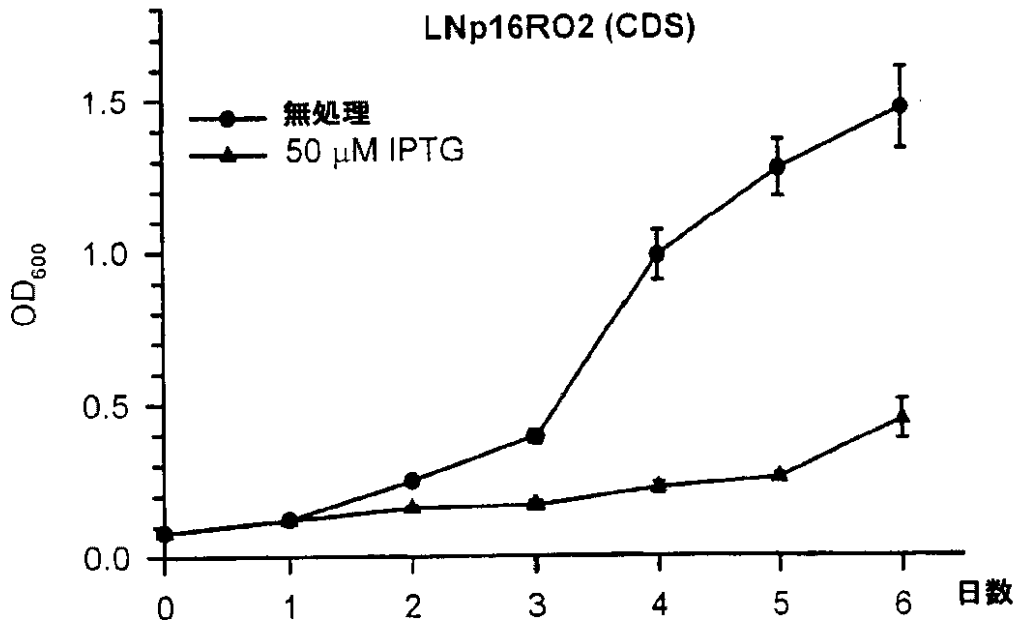
【図10】

Figure 10



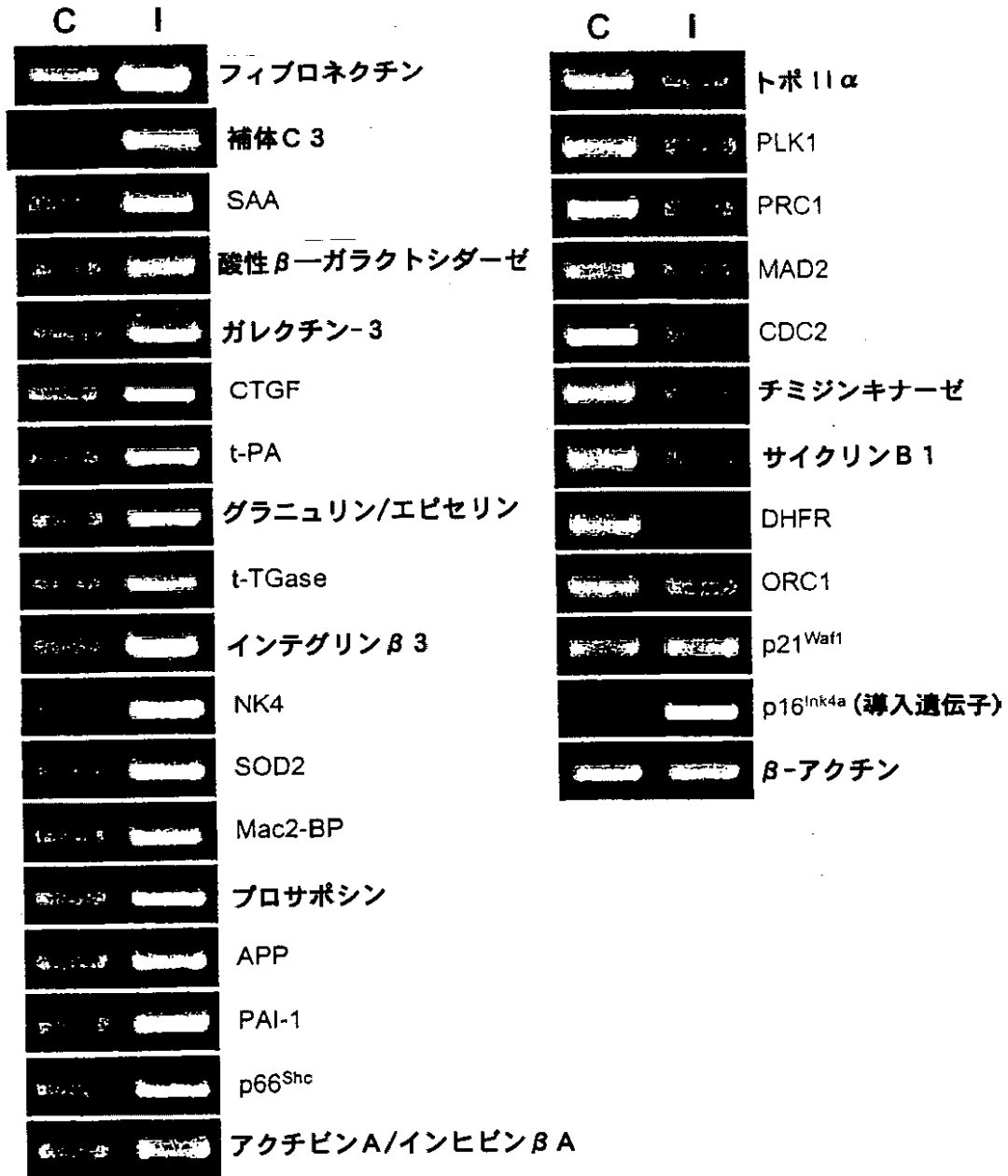
【図11】

LNp16R02 で形質導入した HT10803' SS6 細胞の増殖に対する IPTG の効果



【図12】

LNp16R02 で形質導入した HT10803' SS6 細胞の増殖における p21 制御遺伝子の発現に対する IPTG の効果の RT-PCR 分析



## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/US 00/28082
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, WPI Data, EMBASE, MEDLINE, CAB Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	B.-D. CHANG ET AL.: "Transient overexpression of p21 WAF1/CIP1 induces cell death and features of senescence in a human fibrosarcoma line." PROCEEDING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 40, March 1999 (1999-03), pages 94-95, XP000914903  the whole document  --/--	1-14, 16, 18-20, 22, 24-39, 41, 42, 44-94, 96-109, 111-155, 170, 171, 200-224
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		'*T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention '*X' document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone '*Y' document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. '*Z' document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 28 May 2001		Date of mailing of the international search report 08. 06. 2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Hix, R

2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. Patent Application No  
 PCT/US 00/28082

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	H. XIAO ET AL.: "Sodium butyrate induces NIH3T3 cells to senescence-like state and enhances promoter activity of p21 waf/CIP1 in p53-independent manner." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 237, 1997, pages 457-460, XP000914900	175,211, 214
Y	the whole document	1-14,16, 18-20, 22, 24-39, 41,42, 44-94, 96-105
X	M. HSIAO ET AL.: "Functional expression of human p21 WAF1/CIP1 gene in rat glioma cells suppresses tumor growth in vivo and induces radiosensitivity." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 233, 1997, pages 329-335, XP000914899	175
Y	the whole document	1-14,16, 18-20, 22, 24-39, 41,42, 44-94, 96-109, 111-155, 183-198, 200-210, 214-224
Y	M. VOGT ET AL.: "Independent induction of senescence by p16INK4a and p21CIP1 in spontaneously immortalized human fibroblasts." CELL GROWTH AND DIFFERENTIATION, vol. 9, no. 2, February 1998 (1998-02), pages 139-146, XP000923096	1-14,16, 18-20, 22, 24-39, 41,42, 44-94, 96-109, 111-155, 183-198, 200-210, 214-224
	the whole document	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/US 00/28082

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZENG Y.-X. ET AL: "Regulation of p21(WAF1/CIPI) expression by p53-independent pathways." ONCOGENE, (1996) 12/7 (1557-1564)., XP000922595  the whole document	12-14, 16, 18-20, 22, 24-26, 38,39, 41,42, 44-51, 92-94, 96-105, 179-181
Y	AFSHARI C.A. ET AL: "A role for a p21-E2F interaction during senescence arrest of normal human fibroblasts." CELL GROWTH AND DIFFERENTIATION, (1996) 7/8 (979-988)., XP000922599 the whole document	52-91, 107-109, 111-123, 186-198, 200-210
Y	M. JOHNSON ET AL.: "Evidence for a p53-independent pathway for upregulation of SDI1/CIPI/WAF1/p21 RNA in human cells." MOLECULAR CARCINOGENESIS, vol. 11, no. 2, October 1994 (1994-10), pages 59-64, XP000922631 the whole document	179-181
P,X	CHANG B.-D. ET AL: "Role of p53 and p21(waf1/cip1) in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs." ONCOGENE, (26 AUG 1999) 18/34, page 4808-4818 XP000922555  the whole document	1-14,16, 18-20, 22, 24-39, 41,42, 44-94, 96-109, 111-155, 170,171, 200-224
A	M. NAKANISHI ET AL.: "The C-terminal region of p21 SDI1/WAF1/CIPI is involved in proliferating cell nuclear antigen binding but does not appear to be required for growth inhibition." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 29, 21 July 1995 (1995-07-21), pages 17060-17063, XP000914898 the whole document	

2

Form PCT/SA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/US 00/28082

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	M. NAKANISHI ET AL.: "Identification of the active region of the DNA synthesis inhibitory gene p21 Sd11/CIP1/WAF1" THE EMBO JOURNAL, vol. 14, no. 3, 1995, pages 555-563, XP002039812 the whole document	
P,X	B.-D. CHANG ET AL.: "Effects of p21 Waf1/Cip1/Sd11 on cellular gene expression: Implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 97, no. 8, 11 April 2000 (2000-04-11), pages 4291-4296, XP000921392  the whole document	1-14,16, 18-20, 22, 24-39, 41,42, 44-94, 96-109, 111-155, 170,171, 173-177, 179-198, 200-224
P,X	B.-D. CHANG ET AL.: "p21 Waf1/Cip1/Sd11 - induced growth arrest is associated with depletion of mitosis-control proteins and leads to abnormal mitosis and endoreduplication in recovering cells." ONCOGENE, vol. 19, no. 17, 20 April 2000 (2000-04-20), pages 2165-2170, XP000922527  the whole document	1-14,16, 18-20, 22, 24-39, 41,42, 44-94, 96-109, 111-155, 170,171, 173-177, 179-198, 200-224
E	WO 00 61751 A (CHANG BEY DIH ;UNIV ILLINOIS (US); RONINSON IGOR B (US)) 19 October 2000 (2000-10-19)  the whole document	1-14,16, 18-20, 22, 24-39, 41,42, 44-94, 96-109, 111-155, 170,171, 173-177, 179-198, 200-224

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/US 00/28082

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	REZNIKOFF C.A. ET AL: "Elevated p16 at senescence and loss of p16 at immortalization i human papillomavirus 16 E6, but not E7, transformed human uroepithelial cells." CANCER RESEARCH (1996) 56/13 (2886-2890). XP000993535	175,176, 178
Y	the whole document	12,13, 15,17, 21, 23-38, 40,41, 43-93, 95-108, 110-155, 170, 172-174, 179-197, 199-236
X	TANIGUCHI K. ET AL: "Induction of the p16(INK4a) senescence gene as a new therapeuti strategy for the treatment of rheumatoid arthritis." NATURE MEDICINE, (1999) 5/7 (760-767). , XP000993540	175,176, 178
Y	the whole document	12,13, 15,17, 21, 23-38, 40,41, 43-93, 95-108, 110-155, 170, 172-174, 179-197, 199-236

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. .ional Application No  
 PCT/US 00/28082

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	D.A. ALCORTA ET AL.: "Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts" PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 93, November 1996 (1996-11), pages 13742-13747, XP001003075	175,176, 178
Y	the whole document	12,13, 15,17, 21, 23-38, 40,41, 43-93, 95-108, 110-155, 170, 172-174, 179-197, 199-236
X	L. UHRBOM ET AL.: "Induction of senescence in human malignant glioma cells by p16INK4a" ONCOGENE, vol. 15, no. 5, 31 July 1997 (1997-07-31), pages 505-514, XP000994730	175,176, 178
Y	the whole document	12,13, 15,17, 21, 23-38, 40,41, 43-93, 95-108, 110-155, 170, 172-174, 179-197, 199-236

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/US 00/28082

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	A.J. BRENNER ET AL.: "Increased p16 expression with first senescence arrest in human mammary epithelial cells and extended growth capacity with p16 inactivation." ONCOGENE, vol. 17, no. 2, 16 July 1998 (1998-07-16), pages 199-205, XP000994736	175,176, 178
Y	the whole document	12,13, 15,17, 21, 23-38, 40,41, 43-93, 95-108, 110-155, 170, 172-174, 179-197, 199-236
X	D.F. JARRARD ET AL.: "p16/pRb pathway alterations are required for bypassing senescence in human prostate epithelial cells." CANCER RESEARCH, vol. 59, 15 June 1999 (1999-06-15), pages 2957-2964, XP000993538	175,176, 178
Y	the whole document	12,13, 15,17, 21, 23-38, 40,41, 43-93, 95-108, 110-155, 170, 172-174, 179-197, 199-236
Y	S.J. KUERBITZ ET AL.: "Deletion of p16INK4A/CDKN2 and p15INK4B in human somatic cell hybrids and hybrid-derived tumors." CELL GROWTH & DIFFERENTIATION, vol. 10, January 1999 (1999-01), pages 27-33, XP001004759	225-236
	the whole document	
	-/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/US 00/28082

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	M.S. STEINER ET AL.: "Adenoviral vector containing wild-type p16 suppresses prostate cancer growth and prolongs survival by inducing cell senescence." CANCER GENE THERAPY, vol. 7, no. 3, March 2000 (2000-03), pages 360-372, XP000994781	175,176, 178
P,Y	the whole document	12,13, 15,17, 21, 23-38, 40,41, 43-93, 95-108, 110-155, 170, 172-174, 179-197, 199-236
P,X	ALLAY J A ET AL: "Adenovirus p16 gene therapy for prostate cancer." WORLD JOURNAL OF UROLOGY, (2000 APR) 18 (2) 111-20., XP000994791	175,176, 178
P,Y	the whole document	12,13, 15,17, 21, 23-38, 40,41, 43-93, 95-108, 110-155, 170, 172-174, 179-197, 199-236

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. Application No  
 PCT/US 00/28082

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	STEINER M.S. ET AL.: "p16/MTS1/INK4A suppresses prostate cancer by both pRb dependent and independent pathways." ONCOGENE, (2 MAR 2000) 19/10 (1297-1306).  XP001001577	175,176, 178
P,Y	the whole document	12,13, 15,17, 21, 23-38, 40,41, 43-93, 95-108, 110-155, 170, 172-174, 179-197, 199-236
A	--- G.P. NIELSON ET AL.: "Immunohistochemical survey of p16INK4A expression in normal human adult and infant tissues." LABORATORY INVESTIGATION, vol. 79, no. 9, September 1999 (1999-09), pages 1137-1143, XP000994720 the whole document	
A	--- R.S. ROBETORYE ET AL.: "Regulation of p21 Sdi1/Cip1/Waf1/mda-6 and expression of other cyclin-dependent kinase inhibitors in senescent human cells." MOLECULAR AND CELLULAR DIFFERENTIATION., vol. 4, no. 1, 1996, pages 113-126, XP000922642 the whole document -----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 00/28082**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 76 to 91 and 144 to 155 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.: 156-169  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 12, 13, 24-38, 32, 44-93, 96-108, 111-155, 170, 173-176, 179-197, 200-224, partially and claims 1-11, 14, 16, 18-20, 22, 39, 41, 42, 94, 109, 171, 177, 198 completely.

A recombinant mammalian fibrosarcoma cell comprising a recombinant expression construct encoding a mammalian p21 gene, method for identifying a compound that inhibits p21-mediated modulation of cellular gene expression, mammalian cell comprising a recombinant expression construct encoding a mammalian p21 inhibitor gene, or a construct encoding a reporter gene under transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is induced or repressed by p21, method for identifying a compound that inhibits or potentiates p21 mediated modulation of cellular gene expression, or inhibits senescence in a mammalian cell by assaying for repression or induction of genes repressed or induced by p21, method for identifying a compound that potentiates senescence using a cell comprising a promoter for a mammalian gene whose expression is modulated by p21, method for identifying a compound that promotes induction of senescence in a mammalian cell by assaying the mammalian cell for repression or induction of genes that are repressed or induced by p21 gene expression, compound that inhibits or potentiates p21 modulation of cellular gene expression, compound that inhibits senescence in a mammalian cell where the mammalian cell is assayed for repression or induction of genes that are repressed or induced by p21 gene expression, method for producing an anti-apoptotic or mitogenic factor from a mammalian cell by producing p21 gene expression in a mammalian cell and culturing the cell to produce an anti-apoptotic or mitogenic factor, mammalian cell culture medium conditioned by growth of a mammalian cell that expresses p21, method for obtaining a plurality of nucleic acid species enriched for a gene involved in cell cycle progression or genes that encode secreted proteins with paracrine function involving inducing expression of p21 in a mammalian cell, method for identifying a plurality of cellular genes that are markers of cellular senescence involving inducing expression of p21, recombinant expression construct encoding a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is inhibited or induced by p21.

2. Claims: 12, 13, 24-38, 32, 41, 44-93, 96-108, 111-155, 170, 173-176, 179-197, 200-224, partially and claims 15, 17, 21, 23, 40, 43, 95, 110, 172, 178, 199, 225-236 completely

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A recombinant mammalian fibrosarcoma cell comprising a recombinant expression construct encoding a mammalian p16 gene, method for identifying a compound that inhibits p16-mediated modulation of cellular gene expression, mammalian cell comprising a recombinant expression construct encoding a mammalian p16 inhibitor gene, or a construct encoding a reporter gene under transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is induced or repressed by p16, method for identifying a compound that inhibits or potentiates p16 mediated modulation of cellular gene expression, or inhibits senescence in a mammalian cell by assaying for repression or induction of genes repressed or induced by p16, method for identifying a compound that potentiates senescence using a cell comprising a promoter for a mammalian gene whose expression is modulated by p16, method for identifying a compound that promotes induction of senescence in a mammalian cell by assaying the mammalian cell for repression or induction of genes that are repressed or induced by p16 gene expression, compound that inhibits or potentiates p16 modulation of cellular gene expression, compound that inhibits senescence in a mammalian cell where the mammalian cell is assayed for repression or induction of genes that are repressed or induced by p16 gene expression, method for producing an anti-apoptotic or mitogenic factor from a mammalian cell by producing p16 gene expression in a mammalian cell and culturing the cell to produce an anti-apoptotic or mitogenic factor, mammalian cell culture medium conditioned by growth of a mammalian cell that expresses p16, method for obtaining a plurality of nucleic acid species enriched for a gene involved in cell cycle progression or genes that encode secreted proteins with paracrine function involving inducing expression of p16 in a mammalian cell, method for identifying a plurality of cellular genes that are markers of cellular senescence involving inducing expression of p16, recombinant expression construct encoding a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is inhibited or induced by p16.

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Continuation of Box 1.2

Claims Nos.: 156-169

Present claims 156 to 169 relate to products defined by reference to a desirable characteristic or property, namely that the product acts as an inhibitor of p21-mediated modulation of cellular gene expression or as an inhibitor or potentiator of senescence and as products of processes whereby the products are identified only by their desirable characteristics.

The claims cover all products having this characteristic or property. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No  
PCT/US 00/28082

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0061751 A	19-10-2000	AU 4079000 A	14-11-2000

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーム(参考)	
C 1 2 P	21/00	C 1 2 Q	1/68	A 4 C 0 8 4
C 1 2 Q	1/02	G 0 1 N	33/15	Z
	1/68		33/50	Z
G 0 1 N	33/15		33/53	M
	33/50		33/566	Z
	33/53			
	33/566	C 1 2 R	1:91	
/(C 1 2 N	5/10	C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 R	1:91)		5/00	B

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

(72)発明者 ロニンソン、 イゴール ビー。  
 アメリカ合衆国 イリノイ州 60091 イ  
 リノイ州 ウィルメット リンカーン レ  
 ーン 2731

Fターム(参考) 2G045 AA35 BB20 CB01 DA13 FA16  
 FB02 FB03 FB08 FB12  
 4B024 AA11 CA04 CA09 CA12 FA02  
 HA03 HA14  
 4B063 QA18 QA19 QQ08 QR55 QR62  
 QR77 QS25 QS34  
 4B064 AG23 CA10 CA19 CC24 DA13  
 4B065 AA93 AB01 BA01 CA24 CA46  
 4C084 AA06 AA17 NA14 ZB211  
 ZB261 ZC781

专利名称(译)	用于鉴定和调节由CDK抑制剂调节的基因表达的试剂和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003525032A</a>	公开(公告)日	2003-08-26
申请号	JP2001539874	申请日	2000-10-11
申请(专利权)人(译)	伊利诺伊州的盐湖研究所董事会		
[标]发明人	チャンバイデー ロニンソンイゴールビー		
发明人	チャン、バイ-デー ロニンソン、イゴールビー.		
IPC分类号	G01N33/50 A61K45/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47 C12N5/06 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/00 C12Q1/02 C12Q1/68 C12R1/91 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C07K14/4738		
FI分类号	A61K45/00 A61P35/00 A61P43/00.105 C12P21/00.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/53.Z G01N33/566 C12R1/91 C12N15/00.A C12N5/00.B		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/FA16 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/FB12 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/FA02 4B024/HA03 4B024/HA14 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG23 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA93 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA46 4C084/AA06 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB211 4C084/ZB261 4C084/ZC781		
优先权	09/449589 1999-11-29 US PCT/US2000/009286 2000-04-07 WO		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了鉴定与细胞进程，生长促进，凋亡调节，细胞衰老和衰老有关的基因的方法和试剂，以及鉴定抑制或增强细胞衰老的化合物的方法。。

表IIIb PCR条件

プロモーター	変性	アニーリング	伸長	サイクル	産物サイズ
PLK1	94°, 1分	68°, 1分	72°, 1分 40秒	32	990 bp
NK4	94°, 1分	65°, 1分	72°, 1分 40秒	32	877 bp
SAA	94°, 1分	68°, 1分	72°, 1分 40秒	32	1000 bp