

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-507241

(P2004-507241A)

(43) 公表日 平成16年3月11日(2004.3.11)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A 4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/15	A 6 1 K 31/15	4 B 0 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 C 2 0 6
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 61 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号 特願2002-522248 (P2002-522248)	(71) 出願人 399047002	
(86) (22) 出願日 平成12年8月21日 (2000. 8. 21)	ユニバーシティ オブ ユタ リサーチ	
(85) 翻訳文提出日 平成15年2月21日 (2003. 2. 21)	ファウンデーション	
(86) 国際出願番号 PCT/US2000/022920	アメリカ合衆国・ユタ州 84108・ソ	
(87) 国際公開番号 W02002/016575	ルト レイク シティ・スイート 110	
(87) 国際公開日 平成14年2月28日 (2002. 2. 28)	・アラビーン ドライブ 615	
(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), O A (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, C U, 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, S I, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW	(74) 代理人 100068755 弁理士 恩田 博宣	
	(74) 代理人 100105957 弁理士 恩田 誠	
		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト脂肪酸-C o Aリガーゼ4の阻害剤のスクリーニング方法

(57) 【要約】

本発明は、ヒトにおいて脂肪酸 - C o Aリガーゼ4 (F A C L 4) の活性を調節することにより作用する潜在的な癌化学療法剤および潜在的な化学予防剤のスクリーニング方法を提供する。本発明は、F A C L 4 遺伝子産物の活性を阻害することにより、遊離アラキドン酸の細胞レベルを引き上げて、アラキドン酸媒介性のアポトーシスを誘発させることにより、癌を治療するためのそのような薬剤の投与方法も提供する。本発明はさらに、大腸癌を含む癌の診断方法も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

潜在的な癌化学療法剤のスクリーニング方法であって、

(a) F A C L 4 遺伝子産物を発現または過剰発現している細胞を試験化合物に接触させる工程と、

(b) 該細胞における F A C L 4 遺伝子産物の機能の阻害を測定する工程であって、F A C L 4 遺伝子産物の機能を阻害する試験化合物が、潜在的な癌化学療法剤である工程と、を含む方法。

【請求項 2】

前記細胞は上皮細胞である請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記細胞は線維芽細胞である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記細胞は上皮腫瘍細胞である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記細胞は大腸癌細胞である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記細胞は、該細胞中での F A C L 4 遺伝子産物の発現が抑制された、遺伝子操作された細胞である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記細胞は、F A C L 4 を過剰発現する、遺伝子操作された細胞である請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 8】

潜在的な癌化学療法剤のスクリーニング方法であって、

(a) 動物に試験化合物を投与する工程と、

(b) 動物中での F A C L 4 遺伝子産物の機能の阻害を測定する工程であって、F A C L 4 遺伝子産物の機能を阻害する試験化合物が、潜在的な癌化学療法剤である工程と、を含む方法。

【請求項 9】

前記動物はマウスである請求項 8 に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記動物は、F A C L 4 対立遺伝子の一方または両方が変異したマウスである請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記動物は、1 または複数の組織において F A C L 4 遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスである請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

前記動物は、異種移植腫瘍を有するマウスである請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

ヒトにおいて F A C L 4 活性を阻害する方法であって、F A C L 4 を阻害する化合物をそのような治療を必要とするヒトに投与することを含む方法。

40

【請求項 14】

前記化合物はトリアクシン C である請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

ヒトにおいて F A C L 4 活性を阻害する方法であって、F A C L 4 を阻害する化合物をそのような治療を必要とするヒトに投与することを含み、前記化合物の活性はヒトに対して有意な毒性副作用をもたらさない方法。

【請求項 16】

ヒトにおいて F A C L 4 活性を阻害する方法であって、F A C L 4 を阻害する化合物をそのような治療を必要とするヒトに投与することを含み、前記化合物の F A C L 4 阻害能は

50

、
 (a) F A C L 4 遺伝子産物を発現または過剰発現している細胞を試験化合物に接触させる工程と、

(b) 該細胞における F A C L 4 遺伝子産物の機能の阻害を測定する工程とによって判定される方法。

【請求項 17】

大腸癌に罹患したヒトにおける大腸癌の治療方法であって、 F A C L 4 活性を阻害する化合物をそのような治療を必要とするヒトに投与する工程を含む方法。

【請求項 18】

大腸癌に罹患したヒトにおいて大腸癌を治療する方法であって、

10

(a) C O X - 2 を阻害する化合物を投与する工程と、

(b) F A C L 4 を阻害する化合物を投与する工程とを含む方法。

【請求項 19】

疑わしい組織の試料中の大腸癌細胞の有無を評価する方法であって、

(a) 疑わしい組織の試料を単離する工程と、

(b) 組織の細胞における F A C L 4 発現レベルを評価する工程と、

(c) 組織の細胞における F A C L 4 発現レベルを、対照細胞における F A C L 4 発現レベルと比較する工程とを含む方法。

【請求項 20】

前記組織の細胞における F A C L 4 発現レベルを評価する方法は、定量的 R T - P C R である請求項 19 に記載の方法。

20

【請求項 21】

前記組織の細胞における F A C L 4 発現レベルを評価する方法は、免疫染色または i n s i t u ハイブリダイゼーションである請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

前記組織の細胞における F A C L 4 発現レベルを評価する方法は、ウェスタンブロッティングである請求項 19 に記載の方法。

【請求項 23】

前記対照細胞は、非癌性腸細胞系列から選択される請求項 19 に記載の方法。

【請求項 24】

前記対照は、腸上皮系列 I n t 4 0 7 である請求項 19 に記載の方法。

30

【請求項 25】

大腸癌の診断方法であって、

(a) 癌性が疑われる組織の部位から試料を単離する工程と、

(b) 非癌性と考えられる同様の組織の部位から試料を単離する工程と、

(c) 各試料における F A C L 4 のレベルを評価する工程と、

(d) 前記疑われる組織における F A C L 4 のレベルを、疑いのない組織における F A C L 4 レベルと比較する工程とを含む方法。

【請求項 26】

前記組織の細胞における F A C L 4 発現のレベルを評価する方法は、定量的 R T - P C R である請求項 25 に記載の方法。

40

【請求項 27】

前記組織の細胞における F A C L 4 発現のレベルを評価する方法は、免疫染色である請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

前記組織の細胞における F A C L 4 発現のレベルを評価する方法は、免疫蛍光法である請求項 25 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

1. 発明の属する技術分野

50

本発明は癌の化学療法治療に関する。より詳細には、本発明はヒトにおいて脂肪酸C o - A リガーゼ4 (「F A C L 4」) 酵素の活性を調節する癌化学療法剤のスクリーニングアッセイ、そのようなアッセイを用いて発見された薬剤の投与を伴う大腸癌に対する新規な治療、および大腸癌のスクリーニング対象患者から得た組織試料中のF A C L 4 活性レベルを検出することにより大腸癌を診断する新しい方法に関する。

【0002】

2. 技術的背景

癌とは、正常な体細胞に変化がきたされることにより、正常な細胞抑制に関係なく増殖できるようになり、通常は別の細胞によって占められている体の領域に侵入してコロニーを形成するようになる疾病である。B. アルバーツ (Alberts) ら、M o l e c u l a r B i o l o g y o f t h e C e l l、1255 ~ 1294 頁 (第3版、1994年) を参照のこと。米国癌研究協会 (American Cancer Society) によれば、全アメリカ人男性の半数、および全アメリカ人女性の3分の1が生涯のどこかの時点で癌を発症するとされている。

【0003】

癌は広がって急激に増殖することができるため、癌性細胞の選択的な殺傷を試みることで癌患者の治療を行うのは困難である。この課題の難しさを、庭の雑草を完全に除去する難しさに喩えた者もいる。雑草と同様に、ほんの少しの癌細胞が処置されずに残されただけで、それらの癌細胞は再び体中に広がって疾病の再発を引き起こす。前掲の文献の1267頁を参照のこと。現行の癌治療としては、外科手術や、化学物質や照射を用いた治療法がある。しかしながら、元の腫瘍部位から広がった癌細胞は外科手術や照射によって見逃されたり、癌細胞を殺傷または不能にする薬剤治療は正常な細胞に対しても同様の損傷を引き起こす場合が多く、上記の治療の効果には限界があることも多い。前掲の文献参照。

【0004】

より優れた癌治療が望まれるなか、正常細胞を癌細胞に変化させる一連の事象である発癌についての理解を深めることに焦点が集まっている。そうした理解は、研究者や医師が癌細胞またはその前駆細胞だけを直接的に治療することにより、健康な体細胞への損傷を回避しながら、癌を阻止または治療する助けとなると期待される。

【0005】

研究者が発癌について理解しつつある一つの方法に、癌の予防または治療に有用であることが知られている化学物質が、どのようにして体内の癌を防止する作用を及ぼすかを評価する方法がある。そうした研究から、いくつかの癌予防 (化学予防) および癌治療 (化学治療) 剤が細胞内のアラキドン酸を代謝する細胞性酵素に作用するという結果が得られている。最近の研究では、アラキドン酸代謝が癌の発生において重要な役割を果たしていることが示されている。M. ツジイ (Tsujii) と R. N. デュボイス (Dubois)、C e l l、第83巻、493 ~ 501 頁 (1995年); H. シェング (Sheng) ら、J. C l i n . I n v e s t .、第99巻、2254 ~ 2259 頁 (1997年); および S. M. プレスコット (Prescott) と R. L. ホワイト (White)、C e l l、第87巻、783 ~ 786 頁 (1996年) を参照のこと。アラキドン酸 (「A A」; 20:4, n-6) は、細胞内で酸化されてプロスタグランジン類およびロイコトリエン類を含むエイコサノイド類を形成する必須多価不飽和脂肪酸である。

【0006】

A A を代謝する細胞性酵素の1つにC O X - 2 と呼ばれるものがある。C O X - 2 は A A からのプロスタグランジン類合成に関与する酵素である。この酵素は大腸での発癌に特異的に関与していることが示されている。他の酵素と同様に、C O X - 2 は化学的にうまく阻害することができる。実際のところ、最近の人口調査では、C O X - 2 を阻害する非ステロイド系抗炎症薬 (「N S A I D」) の常用により、大腸癌のリスクが低下することが示された。M. J. ターン (Thun) ら、N e w E n g l . J . M e d .、第325巻、1593 ~ 1596 頁 (1991年) を参照のこと。N S A I D の使用は、動物における発癌物質誘導性の癌の予防にも役立つ。F. M. ジャーディエロ (Giardiello)

10

20

30

40

50

10)ら、New England J. Med.、第328巻、1313～1316頁(1993年)；およびC. S. ウィリアムス(Williams)ら、Oncogene、第18巻、7908～7916頁(1999年)を参照のこと。さらに、AAを代謝する別の酵素である網状赤血球15型リポキシゲナーゼ(「LOX」)と同様に、COX-2は大腸癌においてアップレギュレートされることが示されている。癌細胞におけるいくつかのAA代謝酵素のアップレギュレーションは、発癌の最中に複数のAA代謝経路が活性化されることを示唆している。

【0007】

いくつかの証拠路線では、細胞中の遊離AAのレベルが、プログラム細胞死のための細胞機構であるアポトーシスを制御しうることが示されている。そのような証拠路線の一つは、腫瘍壊死因子(「TNF」)への暴露による細胞死に対して耐性をもつことが示された変異細胞系列において判明した。TNFは癌細胞を選択的に殺すことが示されているタンパク質である。この変異細胞系列では、サイトゾルホスホリパーゼA₂(「cPLA₂」)の活性が著しく低減されており、これによりAA合成のレベルも低減する。このことは、細胞内での内在性AA放出を阻止して、細胞内の遊離AAのレベルを低く保つことにより、細胞がTNF殺傷に対して耐性になることを示唆している。M. ハヤカワ(Hayakawa)ら、J. Biol. Chem.、第268巻、11290～11295頁(1993年)を参照のこと。

10

【0008】

さらなる証拠が、AA生合成に対する律速酵素である6-不飽和化酵素(デサチュラーゼ)が欠損していることが報告されている、別の系列のTNF殺傷耐性細胞により提供されている。T. リード(Reid)ら、J. Biol. Chem.、第266巻、16580～16586頁(1991年)を参照のこと。この欠損も同様に細胞内のAAレベルを低く維持してTNF殺傷を防止すると考えられる。

20

【0009】

いかなる特定の理論とも結びつけることなく、上述の結果は、細胞性AAプールの減少によって、TNFへの暴露に应答して蓄積しうる内在性AAのレベルが制限されるものと解釈することもできる。遊離の細胞性AAの量に対するそのような制限が細胞死に対する耐性を与えているように思われる。しかしながら、この解釈では、遊離AA自体の細胞レベルの効果と、エイコサノイドのような下流産物の細胞レベルの効果とが区別されていない。

30

【0010】

上記解釈は、リポキシゲナーゼに関する研究によりさらなる裏付けが得られると思われる。この研究は、アラキドン酸からロイコトリエンへの変換に関与するリポキシゲナーゼである12-LOXの阻害剤を投与することにより、ラット癌肉腫におけるアポトーシスが誘導されたことを報告した。D. G. タン(Tang)ら、Proc. Natl. Acad. Sci.、第93巻、5241～5246頁(1996年)を参照のこと。同様に、NSAIDの投与によっても、大腸癌細胞系列において同様の反応がもたらされることが示されている。実際のところ、アポトーシスは、単に外来性AAを細胞に添加するだけで誘導することができる。T. A. チャン(Chan)ら、Proc. Natl. Acad. Sci.、第95巻、681～686頁(1998年)を参照のこと。

40

【0011】

アラキドン酸塩-リン脂質のリモデリングをCoA非依存性トランスアシラーゼ(CoA-IT)の阻害剤によって阻止するとアポトーシスが誘導されることが実証されているものの、上記の阻害剤が細胞死を誘導する機構については完全には理解されていない。このことは、COX-2やLOXの阻害によって起こる細胞性遊離AAの蓄積に相当する。M. E. シュレット(Surette)ら、Biochemistry、第35巻、9187～9196頁(1996年)およびM. E. シュレット(Surette)ら、Carcinogenesis、第20巻、757～763頁(1999年)を参照のこと。AA代謝をうまく阻害できれば、細胞内AAの蓄積を容易にすることができ、アポトーシス

50

による腫瘍細胞死を容易に誘導できると考えられる。

【0012】

上記の研究は、AA代謝酵素を阻害する方法をさらに検討する基礎となった。COX-2 および他のAA代謝酵素に対する阻害剤が知られている。ヒトにおけるAA代謝酵素の他の研究は、ヒト脂肪酸CoAリガーゼ4(「FACL4」)酵素を中心に行われている。FACL4は、大腸腺癌細胞においてアップレギュレートされる。さらに、他のAA代謝性酵素の場合と同様に、FACL4の阻害によって大腸腺癌細胞におけるアポトーシスが誘導される。これらの特性から、FACL4の阻害は予見的癌治療の研究および応用の前途有望な手法と考えられ、癌患者に対して新たな希望を与えるものである。しかしながら、FACL4を阻害する薬剤についてはあまり知られておらず、現在までに、この経路を用いた癌の治療方法は全く知られていない。癌細胞におけるFACL4発現の上昇を診断方法として利用ものはまだない。

10

【0013】

前述のことから、癌細胞においてAA媒介性アポトーシスを制御するためのさらなる効果的方法を提供することは、当該技術分野での大きな前進となると考えられる。具体的には、癌細胞を含む細胞において、FACL4の活性を調節することにより作用する化学治療剤または化学予防剤をスクリーニングする方法を提供することは、当該技術分野での前進となると考えられる。さらに、そのようなアッセイを用いて発見された化学治療剤または化学予防剤の投与によりFACL4を阻害することを含む、大腸癌の新規な治療を提供することは当該技術分野でのさらなる前進となると考えられる。同様に、組織試料中のFACL4のレベルを検出することにより大腸癌を診断する新たな方法を提供することも、当該技術分野での前進となると考えられる。これらの方法について開示する。

20

【0014】

3. 発明の簡単な概要

本発明は、癌の化学予防的および化学療法的治療に関する。より詳細には、本発明は、化合物に対して癌の化学療法的活性をスクリーニングする方法に関する。前記スクリーニング方法は、脂肪酸Co-Aリガーゼ4酵素の活性を調節する物質を検出する。

【0015】

1つの実施形態において、方法は、FACL4遺伝子産物を発現または過剰発現している細胞を試験化合物と接触させる工程と、その後、該細胞におけるFACL4遺伝子産物の阻害レベルを測定する工程とを含む。遺伝子産物の阻害は、当該技術において知られている様々な方法によって測定され、その一例として、化合物で処理した細胞および非処理細胞においてFACL4によってエステル化された放射性標識AAの割合および量をモニターすること、あるいは、化合物で処理した細胞のアポトーシスの速度を非処理細胞のアポトーシスの速度と比較することなどが挙げられるが、これらに限定されることはない。D. B. ウィルソン(Wilson)ら、J. Biol. Chem.、第257巻、3510~3515頁(1982年)、およびY. チャオ(Cao)ら、Genomics、第49巻、327~330頁(1998年)を参照のこと。別の実施形態においては、方法は、FACL4の発現が抑制されている遺伝子操作細胞を試験化合物に接触させる工程と、該細胞におけるFACL4遺伝子産物の機能の阻害を測定する工程とを含んでいる。FACL4阻害剤に対する試験は、マウスモデル、たとえば、異種移植腫瘍を保持するマウス、FACL4を過剰発現するトランスジェニックマウスまたはこれに由来する細胞、あるいは、FACL4ノックアウトマウスを用いて実施することもできる。本発明の実施形態において、FACL4遺伝子産物の機能を阻害する試験化合物は、潜在的な癌化学療法剤である。

30

40

【0016】

本発明は、大腸癌に対する新規の治療であって、上で開示したアッセイ方法を用いて発見された化学療法剤または化学予防剤を、そのような治療に必要なヒトに投与することによる治療を提供することにも関する。したがって、大腸癌に対する新規の治療は、FACL4阻害剤を投与することによりヒトにおけるFACL4を阻害することを含む。特定の実

50

施形態において、上記治療はトリアクシンCをヒトに投与することを含む。本明細書中、「有効な量」とは、無毒でありながら、任意の治療に付随する正当な利益/リスク比で、所望の局所的または全身的な効果および性能を与えるのに十分な量を意味する。他の実施形態において、上記治療は、ヒトにFACL4阻害性化合物を投与することを含み、化合物の活性はヒトに対して有意な毒性効果をもたらさない。さらに別の実施形態において、上記治療は、FACL4を阻害する化合物をそのような治療を必要とするヒトに投与することを含み、化合物がFACL4を阻害する能力は、該化合物を、FACL4遺伝子産物を発現または過剰発現するように遺伝子操作された細胞と接触させ、該化合物がFACL4遺伝子産物を阻害しているかどうかを測定することによって判定される。

【0017】

さらに、本発明は、組織試料中のFACL4活性レベルを検出することにより大腸癌を診断する新たな方法に関する。いくつかの実施形態では、該方法は、癌性が疑われる組織の試料を単離する工程と、組織の細胞におけるFACL4発現レベルを評価する工程と、このFACL4発現レベルを対照細胞のものと比較する工程とを含んでいる。FACL4の発現レベルの評価は、定量的RT-PCR、免疫染色、in situハイブリダイゼーション、免疫蛍光法、ウェスタンブロットティング、または当該技術分野において広く知られている方法によって実施することができる。さらに、上記方法において用いる対照細胞は、当該技術分野において知られる非癌性大腸細胞系列から選択してもよいし、あるいは、単に同一の個体から取り出した正常と考えられる組織試料から得た細胞であってもよい。

本発明の上記および他の特徴および利点は、以下の詳細な説明によってさらに明らかになるであろう。

【0018】

4. 図面の簡単な説明

図1：大腸腺癌および大腸癌細胞系列においてFACL4およびCOX-2の発現が高められている。(A)大腸腺癌における発現。24対の大腸腺癌および隣接する正常組織から単離したRNAに対して定量的RT-PCRを行った。2人の患者から得た代表的なRT-PCRの定量結果が示されている。上側のパネルは、FACL4アンプリコンで増殖させたもの、下側のパネルはCOX-2アンプリコンで増殖させたものである。FACL4は、32および36サイクルで増殖させ、COX-2は34および38サイクルで増殖させた。符号Tは大腸腺癌組織を示し、符号Nは同一患者からの正常な大腸組織を示す。(B)大腸癌細胞系列における発現。ゲルの上部の説明はRNAの抽出元となった細胞系列を示している。

【0019】

図2：トリアクシンCはアラキドン酸誘導性アポトーシスを感作し(A)、アポトーシスを誘導する際にNSAIDと相乗作用する(B)。HT29細胞を96ウェルにプレートイングした。トリアクシンCおよびAAを添加するか(図A)、あるいは、トリアクシンCをインドメタシン(Ind)またはスリダク(Sul)のいずれかとともに示された濃度で添加した(図B)。インドメタシンとスリダクはどちらもシクロオキシゲナーゼ(COX)阻害剤である。アポトーシスは、細胞死ELISAにより、それぞれ44時間後(A)および72時間後(B)に測定した。対照細胞(以後「Ctl」と呼ぶ)は、NSAID治療を受けなかった細胞とみなす。示した値は3回の測定の平均である。

【0020】

図3：アラキドン酸はカスパーゼ3の活性化を介したアポトーシスを誘導する。(A)細胞生存性の測定。AAを示された濃度で293細胞に添加し、細胞の生存画分を44時間後に判定した。示した値は、AAに暴露しなかった細胞の生存率と比較した値である。(B)AAに暴露した細胞におけるアポトーシスの増加。(A)と同じ条件下で細胞をAA(300μM)またはパルミチン酸(PA)(300μM)で処理し、ELISAによってアポトーシスを検出した。3回測定の平均値が示されている。複数回の実験において、細胞の実質的画分においてアポトーシスを誘導するAAの濃度は200μM~300μM

10

20

30

40

50

のあいだで変動した。(C)アポトーシスの *in situ* 検出。293細胞をAA(300 μ M; +AA)または伝播体のみ(-AA)で44時間処理した。核をDAPIで染色し、個々の細胞におけるDNA鎖の分断を蛍光TUNELアッセイによって検出した。上側のパネルは、UV(左側パネル)およびFITCフィルタ(右側パネル)の下で撮影した細胞(-AA)の同一視野である。下側のパネルは、アポトーシス細胞(+AA)を示している。倍率は80倍である。(D)抗活性カスパーゼ3抗体による免疫染色。上側のパネルは対照細胞(-AA)であり、下側のパネルは300 μ MのAAに暴露した細胞である。左側のパネルはDAPI染色であり、右側のパネルは活性カスパーゼ3に選択的な抗体による免疫染色である。倍率は100倍である。(E)カスパーゼ3の阻害によるAA誘導性アポトーシスの阻害。293細胞をカスパーゼ阻害剤(DMQD、カスパーゼ3阻害剤、およびカスパーゼ1および4阻害剤であるYVAD(ペプチド研究所)を含む)とともに、指示された濃度で1時間前培養し、AA(300 μ M)を添加し、44時間後にアポトーシスを測定した。値は3回測定の平均値である。

10

【0021】

図4: COX-2またはFACL4の過剰発現がアポトーシスを阻害する。(A)安定にトランスフェクトされた系列におけるFACL4およびCOX-2の条件付き発現レベル。細胞をボナステロン(1 μ g/mL)の共存下(+)または非共存下(-)で48時間処理し、それぞれ抗FACL4および抗COX-2抗体を用いてウェスタンブロッティングを実施した。ローディングは抗アクチン抗体(ICNバイオメディカルズ)を標準として行った。(B)COX-2、FACL4およびその両方の過剰発現によるAA誘導性アポトーシスの減少。空の対照ベクター(Ct1)、FACL4のcDNA、COX-2のcDNA、およびFACL4とCOX-2の両方のcDNAで安定にトランスフェクトした293細胞について、(A)と同様に、過剰発現の誘導を行わないか(-Pon)、に誘導を行う(+Pon)実験を行った。誘導から24時間後にAA(300 μ M)を添加し、44時間後にアポトーシスを調べた。AAによって誘導されたアポトーシスの増加は、処理を行わなかった細胞におけるシグナルと比較して6倍~20倍の間で変動した。プロットは、安定系列のあいだでの相対アポトーシスレベルの比較であり、3回の独立実験の代表的なものを示している。数値は3回測定の平均で示されている。(C)COX-2媒介性のアポトーシス阻害のための触媒活性に対する要件。細胞に対して上述の過剰発現を誘導を行わないか(-Pon)、誘導を行う(+Pon)実験を行った。イムノブロッティングで調べたところ、変異COX-2は野生型と同等のレベルで発現されていたが、合成されたプロスタグランジン量に関してはバックグラウンド以上の上昇が見られなかった。示したようにCOX阻害剤を6時間後に投与した。AA(300 μ M)を2時間後に添加し、44時間後にアポトーシスを調べた。プロットは(B)と同様に行い、それぞれに3回測定を行う3回の独立した実験の代表的結果である。「Wt」は野生型、「Mut」は変異型、「Met」は50 μ Mの6-メトキシ-2-ナフチル酢酸、「Ind」は10 μ Mインドメタシンを表す。(D)FACL4とCOX-2の共発現によるプロスタグランジン合成の減少。COX-2、FACL4/COX-2安定細胞、および空のベクターを保持する対照細胞に対して48時間誘導を行い、洗浄後、20 μ MのAAとともに37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。合成されたPGE₂の量はELISAによって決定した。さらに4つのFACL4/COX-2二重安定細胞のクローンについて調べたところ、そのどれもがCOX-2単独安定系列に比べて低いレベル(16%~56%の範囲)でしかPGE₂を分泌しなかった。(E)安定系列における遊離AAのレベル。上清に放出された[³H]を測定したが、示されている数値は複数回の実験(n=4, P<0.05)の平均値である。

20

30

40

【0022】

図5: 遊離アラキドン酸に対する酵素的「シンク」は、TNF およびカルシウムイオノフォア媒介性細胞殺傷を防止する。(A)細胞生存性の判定。細胞を24時間誘導するか(+Pon)若しくは誘導せずに(-Pon)、TNF(1 ng/mL)またはカルシウムイオノフォアA23187(5 μ M)を添加し、細胞をさらに72時間インキュベ-

50

トした。生存画分を判定し、TNF または A 2 3 1 8 7 処理を行わなかった同系列のものと比較するようにプロットした。「C t l」は、空のベクターを保持した対照細胞を表し、F A C L 4 / C O X - 2 は二重安定系列を表す。(B) 遊離 A A の測定。F A C L 4 / C O X - 2 細胞を [³ H] で予め標識し、誘導を行い、A 2 3 1 8 7 (5 μ M) で刺激し、[³ H] A A の放出を示した時間間隔で測定した。数値は 4 回の独立した測定を代表する 1 回の実験のものである。

【 0 0 2 3 】

図 6 : A A に暴露した細胞では脂質過酸化が増加する。アポトーシスは抗酸化剤および B c l - 2 によって阻害される。(A) 脂質酸化生成物のレベル。2 9 3 細胞を指示した濃度で 4 8 時間処理した。示したデータは、2 回の独立した実験の代表的な 1 回の実験のものである。(B) 抗酸化剤による A A 誘導性アポトーシスの減衰。指示濃度の抗酸化剤を 2 9 3 細胞に 1 時間与え、次に A A (2 0 0 μ M) を添加した。アポトーシスは 4 4 時間後に測定し、対照細胞におけるレベルと比較して示されている。(C) B c l - 2 による A A 誘導性アポトーシスの阻害。細胞を空のベクター (C t l) または B c l - 2 をコードする c D N A でトランスフェクトした後、A A (3 0 0 μ M) に暴露した。アポトーシスのレベルは 4 4 時間後に決定した。示した数値は対照細胞と比較したアポトーシスレベルであり、3 回測定の平均 (P < 0 . 0 5) を表す。B c l - 2 の発現は、ウェスタンブロッティングによって判定した。(D) 安定な細胞における B c l - 2 発現のレベル。安定にトランスフェクトされた細胞をボナステロンで 2 4 時間または 4 8 時間、誘導するか、若しくは誘導を行わなかった。細胞溶解液を B c l - 2 に対する抗体に対してプロットした。標準化は抗 アクチン抗体によって行った。

10

20

【 0 0 2 4 】

これらの図面は本発明の典型的な実施形態に関する情報を与えているにすぎず、本発明の範囲を限定するものとみなすべきではない。

5 . 発明の詳細な説明

本発明は、脂肪酸 C o - A リガーゼ 4 酵素の活性を調節する癌化学療法剤のスクリーニング方法を提供する。本発明は、そのようなアッセイを用いて発見された化学療法剤または化学予防剤の投与による F A C L 4 の阻害を伴う、大腸癌の新規な治療を提供する。さらに本発明は、組織試料中の F A C L 4 活性レベルを検出することにより大腸癌を診断する新たな方法を提供する。

30

本願において引用する全ての文献、特許および特許出願は、参照により本願に組み込まれる。

【 0 0 2 5 】

(定義)

「ベクター」は、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、人工染色体、ウィルス、ピリオンなどの任意の遺伝子要素であって、適切な制御要素が伴う場合に複製が可能であり、細胞間で遺伝子配列を移動させることのできる遺伝子要素を意味する。したがって、この用語にはウィルスベクターだけでなくクローニングや発現の伝播体も含まれる。

【 0 0 2 6 】

「トランスフェクション」という用語は、細胞による外来 D N A の取り込みを言及するために用いられる。外来性 D N A が細胞膜内部に導入されている場合、その細胞は「トランスフェクトされている」ことになる。多くのトランスフェクション技術が当該技術分野において広く知られている。たとえば、グラハム (G r a h a m) ら、V i r o l o g y 、第 5 2 巻、4 5 6 頁 (1 9 7 3 年) ; サンプルック (S a m b r o o k) ら、M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , コールドスプリングハーバー研究所、ニューヨーク (1 9 8 9 年) ; デービス (D a v i s) ら、B a s i c M e t h o d s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , E l s e v i e r 社 (1 9 8 6 年) ; チュー (C h u) ら、G e n e , 第 1 3 巻、1 9 7 頁 (1 9 8 1 年) ; および J . D . ワトソン (W a t s o n) ら、R e c o m b i n a n t D N A , 2 1

40

50

3 ~ 234 頁 (1996 年) を参照のこと。このような技術は、ヌクレオチド組み込み型ベクターや他の核酸分子などの 1 または複数の外来性 DNA 部分を適切な宿主細胞に導入するために用いることができる。この用語は、化学的、電氣的ならびにウィルスを媒介したトランスフェクション手法を捕らえるものであり、その例としては、リン酸カルシウム共沈 (グラハム (Graham) ら、*Virology*、第 52 巻、456 ~ 467 頁 (1973 年))、培養細胞への直接マイクロインジェクション (M. R. カペッチ (Capucci)、*Cell*、第 22 巻、479 ~ 488 頁 (1980 年))、エレクトロポレーション (シゲカワ (Shigekawa) ら、*BioTechniques*、第 6 巻、742 ~ 751 頁 (1988 年))、リポソーム媒介性遺伝子導入 (マンニーノ (Mannino) ら、*BioTechniques*、第 6 巻、682 ~ 690 頁 (1988 年))、脂質媒介性トランスフェクション (フェルグナー (Felgner) ら、*Proc. Natl. Acad. Sci.*、第 84 巻、7413 ~ 7417 頁 (1987 年))、および高速マイクロプロジェクトイルを用いた核酸導入 (クライン (Klein) ら、*Nature*、第 327 巻、70 ~ 73 頁 (1987 年)) が挙げられる。

【0027】

本明細書中で用いる、「細胞系列」という用語は、*in vitro* において連続的または長期に亘って増殖し分化できる細胞集団のことをいう。細胞系列は単一の前駆細胞に由来するクローン集団であることが多い。このようなクローン集団を保存または輸送している間に、天然のまたは誘導による核型の変化が起こりうることは当該技術分野において認識されている。したがって、引用された細胞系列に由来する細胞は、祖先の細胞または培養物と正確に一致しているとは限らず、引用された細胞系列はこのような変種も含んでいる。

【0028】

「RT-PCR」という用語は、当該技術分野において使用され知られている逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応を表す。当該技術分野において知られているように、RT-PCR は、ポリメラーゼと、所望の標的 DNA 部位の側方に位置する DNA 配列に相補的なヌクレオチド配列を有するプライマーとを用いた、目的 DNA 分子の基本的な増幅方法の変法である。最初のサイクルで生成された鎖は以後のサイクルにおいて産生のための鋳型として使用できるので、連続的な処理プロセスを用いて DNA の存在量を増加させることができる。RT-PCR はこの基本的な方法を cDNA を形成するための mRNA の逆転写と組み合わせたものであり、cDNA は上述の手法によって増幅させることができる。R. C. キング (King)、*A Dictionary of Genetics*、オックスフォード大学出版局、ニューヨーク、268 頁 (1997 年) を参照のこと。

【0029】

「アンプリコン」という用語は、断片中に見られる遺伝子の機能を阻害する化合物に暴露されると、多数の線状複製物を生成する、遺伝材料の断片を意味するために用いられる。

【0030】

本明細書中で用いる「過剰発現」という用語は、操作されていない比較細胞または比較細胞組に比べて、高い比率で遺伝子産物を発現するように操作された細胞または細胞組において、所与の遺伝子産物が発現されていることを表す。前記細胞における過剰発現の比率は元のレベルからみて、2 倍、5 倍、10 倍と様々であるが、10 倍が好ましい。

【0031】

(一般的方法)

本発明は、COX-2 や LOX などの脂肪酸 CoA リガーゼ 4 (FACL4) が大腸腺癌においてアップレギュレートされるという知見に基づいている。Y. チャオ (Chao) ら、*Genomics*、第 49 巻、327 ~ 330 頁 (1998 年) を参照のこと。上記酵素のアップレギュレーションは、大腸癌が遊離 AA のレベルを累積的に低下させる AA 代謝経路に変化をもたらすことにより、アポトーシスを阻害することを示唆するものである。この仮説を、FACL4 および / または COX-2 を安定かつ誘導可能に発現するヒト上皮系列を構築することによって調べた。これらの細胞系列を用いて、AA がアポトーシ

スに対するシグナルであることを確認した。またこれらの検定から、NSAIDおよび他のAA代謝阻害剤によるアポトーシスの誘導は、AA代謝物質の阻害によってAAが蓄積された結果として起こることも示された。これらの検定からは、大腸癌やおそらくは他の癌においても起こっていると考えられる、COX-2およびFACL4の過剰発現が、AAに対する「シンク」を形成することにより、アポトーシス促進シグナルを除去して発癌を促進することも示された。したがって、遊離AAの細胞レベルを薬理的に操作してアポトーシスを誘導することは、変質細胞を殺傷する一般的なアプローチとなると考えられる。このことは、COX-2やFACL4などの、AAを代謝する酵素を阻害することによって達成されると考えられる。

【0032】

FACL4によるAAの代謝を阻止する化合物を発見するために、FACL4、COX-2、およびFACL4とCOX-2の両者を安定的に誘導可能に発現するヒト上皮細胞系列を構築した。これらの細胞系列は、FACL4を阻害する化合物のスクリーニング方法において使用した。この方法は、FACL4遺伝子産物を発現または過剰発現している細胞に試験化合物を接触させる工程と、該化合物によるFACL4遺伝子産物の阻害を、非接触細胞による阻害と比較して測定する工程とを含む。試験化合物によるFACL4遺伝子産物の阻害を測定するために多くの方法を用いることができるが、そうした方法には、FACL4で処理した細胞と非FACL4処理細胞における放射性標識したAAの代謝を追跡することが含まれる。同様に、実施例5において用いるようなパルス追跡法でも、細胞組において起こるAA代謝の量を対照に対する相対量として求めることができる。さらに、AAプールのアポトーシス誘導効果に基づく方法、たとえば、FACL4処理細胞におけるアポトーシスの速度を、非FACL4処理細胞のアポトーシス速度と比較することや、外来性AAに暴露後のFACL4処理細胞と非処理細胞のアポトーシス速度を比較することなどが挙げられる。

【0033】

さらに、上述のアッセイを用いて発見された化合物は、ヒトにおける大腸癌治療のために用いることができる。例えば実施例2に見られるように、トリアクシンCなどの既知のFACL4阻害剤を用いて、細胞をAA誘導性アポトーシスに感受性にすることができる。実際のところ、図2bに見られるように、FACL4とCOX-2の両方が阻害された場合には、癌細胞を破壊する相乗作用が認められる。

【0034】

また、実施例1に見られるように、大腸腺癌は正常な細胞よりもはるかに高いレベルでFACL4を発現している。このことは、疑いのある組織の試料中のFACL4発現のレベルを評価し、これを正常組織、正常細胞系列または他の対照の試料中で認められるレベルと比較することが、大腸癌の診断方法として役立つことを示唆するものである。

【0035】

本明細書に記載の*in vitro*実験においてアポトーシスを誘導したAAの濃度は、正常な生物流体において測定されている定常状態レベルよりも高いものの、細胞中の濃度は分かっておらず、*in vivo*の一定の状況下で一時的にそのようなレベルに達するのかもしれない。たとえば、トロンピンで刺激すると1分以内に 10^9 個の血小板から約5~20nmolのAAが放出される。E. J. ノイフェルド (Neufeld) と P. W. マジェラス (Majerus)、*J. Biol. Chem.*、第258巻、2461~2467頁 (1983年)。

【0036】

アポトーシスの誘導は、オレイン酸やパルミチン酸などの他の脂肪酸が同様の反応を示さないことから、洗浄性の作用ではない。さらに、AAによって開始されるアポトーシスは、COX-2とFACL4を過剰発現させた実験で実証したように、AAを代謝的に除去することによって阻害することができる。

【0037】

COX-2特異的阻害剤であるSC-58125およびNS398は、抗アポトーシスタ

10

20

30

40

50

ンパク質 Bcl-2 をダウンレギュレートすることにより、大腸および前立腺癌細胞におけるアポトーシスの誘導を増強することが報告されており (H. シェング (Sheng) ら、Cancer Res.、第 58 巻、362 ~ 366 頁 (1998 年)、および、X. I. リウ (Liu) ら、Cancer Res. 第 58 巻、4245 ~ 4249 頁 (1998 年) を参照のこと)、一方で、15-LOX は Bcl-2 をアップレギュレートすることにより、アポトーシスを阻害することが分かっている。E. ニシオ (Nishio) と Y. ワタナベ (Watanabe)、Br. J. Pharmacol.、第 122 巻、1516 ~ 1522 頁 (1997 年) を参照のこと。我々は COX-2 および / または FACL4 を過剰発現させると、アポトーシスが阻害されるとともに、Bcl-2 の発現が上昇することを発見した。さらに、Bcl-2 の過剰発現により、AA によって誘導されるアポトーシスが抑制された。これらの結果は、Bcl-2 の発現が遊離 AA のレベルによって制御されていること、および、Bcl-2 依存性経路が AA によって指令されるアポトーシスにおける重大な役割を果たしていることを示唆する。

10

【0038】

AA 代謝の増加が腫瘍成長の開始剤であるのか腫瘍成長の結果であるのかについては、議論がなされてきた。COX-2 とその阻害剤を用いた研究から、COX-2 の誘導が発癌および腫瘍の進行における重要な段階であることが強く支持されている。COX-2 および他の AA 代謝経路を活性化する前新生物形成効果は多く存在するが、1 つの重要な機構はアポトーシスの阻害である。大腸の生理的状态からすると、アポトーシスは、腸上皮細胞のライフサイクルを終結させる正常な事象である。大腸癌においては誘導酵素による AA の転流が遊離 AA のレベルの低下をもたらし、結果としてアポトーシスを減衰させることにより腫瘍の成長が促進される。プロスタグランジン類やロイコトリエン類などの AA 代謝の特定のエイコサノイド産物もまた、細胞付着および増殖を増強することにより変質に寄与すると考えられる。それでもなお、AA 代謝「シンク」の協調的活性化によるアポトーシスの阻害は、腫瘍成長を促進するのに極めて重要な機構であり、我々の知見は、AA 代謝経路を標的とした特異的かつ無毒の阻害剤を開発することが治療的インターベンションに対する新規なアプローチとなることを含意するものである。

20

【0039】

6. 実施例

以下の実施例は、本発明によって実施した様々な実施形態を説明するためのものである。以下の実施例は、本発明に従って製造されうる多様な実施形態を包括または網羅するものではない。

30

【0040】

(材料と方法)

腫瘍組織および逆転写 PCR

全 RNA は、同一の患者から外科的に除去した大腸腺癌および隣接する正常組織から、トリゾール試薬 (ライフテクノロジー社) によって調製した。大腸癌細胞系列は ATCC より得た。RT-PCR は、ヒト FACL4 または COX-2 のコード配列に対応するプライマーと、アクチンプライマー / コンペチマー (competimer) 混合物 (Ambion 社) を用いて行った。FACL4 および COX-2 に対して増幅される断片の大きさは、それぞれ 441 bp および 480 bp であり、アクチンプライマーは 294 bp の断片を増幅する。

40

【0041】

細胞死検出 ELISA

細胞を 96 ウェルプレート上に 1 ウェルあたりの細胞数が 1×10^4 個となるようにプレATINGした。AA を与え、44 時間後に細胞死検出 ELISA (ベーリンガー・マンハイム社) によってアポトーシス死を判定した。

【0042】

安定細胞系列

安定エクジソン誘導系 (インビトロゲン社) を用いて、ヒト FACL4、COX-2、C

50

OX-2変異体、およびFACL4とCOX-2の両者を過剰発現する安定な系列を構築した。COX-2変異体cDNAは、アミノ酸残基が1つだけ変化した触媒的に不活性なCOX-2(L547K)を発現する。これらのcDNAをpIND(SP1)(ネオマイシン)中にクローン化した。これらのcDNA構築物または空のベクターpIND(SP1)をEcR293細胞にトランスフェクトし、400 μ g/mLゲネチシンおよび400 μ g/mLゼオシン中で選択した。多数のシングルコロニーについて、抗FACL4(Y.チャオ(Cao)ら、FEBSLett.第467巻、263~267頁(2000年))および抗COX-2抗体(Dr. Jacques Macloufより寄贈)に対するイムノブロットングにより、また、FACL4に対してはCoAリガーゼ活性(D. B. ウィルソン(Wilson)ら、J. Biol. Chem.、第257巻、3510~3515頁(1992年))、COX-2野生型に対してはPFE₂分泌(ELISAアッセイ、アッセイデザイン社)を測定することにより、FACL4、COX-2野生型、およびCOX-2変異体の過剰発現に対するスクリーニングを実施した。FACL4cDNAをpIND(SP1)(ヒグロマイシン)ベクター中にクローン化した別のpIND(SP1)-FACL4cDNA構築物で、COX-2安定細胞を安定にトランスフェクトすることにより、二重安定系列を作製した。細胞は、400 μ g/mLゲネチシン、400 μ g/mLゼオシン、および50 μ g/mLヒグロマイシンB中で選択した。ポジティブコロニーについて、上述のようにしてスクリーニングを実施した。

10

【0043】

細胞生存性

20

細胞生存率はクリスタルバイオレット染色(M.ハヤカワ(Hayakawa)ら、J Biol. Chem.、第268巻、11290~11295頁(1993年))を参照)によって判別した。

【0044】

in situ細胞死検出

細胞をポリL-リシンで予めコートした8ウェルのガラスチャンバスライドにプレATINGした。AA(300 μ M)を添加し、44時間後に、in situ細胞死検出キット(ベリンガー・マンハイム社)を用いて蛍光TUNELアッセイを行った。

【0045】

アラキドン酸の放出

30

細胞をポリL-リシンで予めコートした6ウェルのプレート上に、1ウェルあたり 8×10^5 個になるようにプレATINGした。次にこれらを[³H]AA(0.4 μ Ci/mL培地)(91.8Ci/mmol, 100 μ Ci/mL, NEN)で24時間予備標識した。洗浄後、1%BSA(脂肪酸非含有)を加えた血清を含まないDMEMを添加した。少量の培地を時間毎に抜き取り、遊離の脂肪酸をイソプロピルアルコール/ヘプタン/2MH₂SO₄(40:10:1)カクテルで抽出した(V.ドール(Dole)とH.(マイナーツ)Meinertz、J. Biol. Chem.、第235巻、2595~2599頁(1960年))を参照のこと)。上側のヘプタン相を回収し、[³H]標識されたAAをシンチレーションカウンタによって測定した。培地は28時間後に抽出し、AAの放出を再度測定した。AA放出の百分率(+P/-P)は、まず同一皿中で4時間後に放出されたAA(バックグラウンド)を32時間後に放出されたAAから差し引き、次に同一の安定系列においてポナステロン処理後(+P)の放出レベルを対照(-P)の放出レベルで割ることにより求めた。A23187刺激によるAAの放出は、非刺激細胞から放出されたAAを、A23187によって刺激された対応物から放出されたAAから差し引くことによって求めた。

40

【0046】

脂質過酸化アッセイ

細胞をプレATINGし、AAで48時間処理した。次にこれらの処理細胞を300 μ LのH₂O中に懸濁し、凍結解凍を繰り返すことにより細胞溶解液を調製した。細胞性マロンジアルデヒド(MDA)および4-ヒドロキシノネナル(4-HNE)のレベルを、

50

脂質過酸化アッセイキット (Calbiochem) を用いて測定した。

【0047】

Bcl-2 cDNA 構築物によるトランスフェクション
細胞を、LipofectAMINE (ライフテクノロジーズ社) を用いて、ヒト Bcl-2 cDNA 構築物でトランスフェクトした。2 μg の Bcl-2 cDNA および 1 μg のルシフェラーゼ cDNA 構築物を 4×10^5 個までの細胞にトランスフェクトした。48 時間後に細胞を回収し、96 ウェルプレート上に 1 ウェルあたりの細胞数が 1×10^4 個となるように再度プレATINGした。トランスフェクタントを 300 μM の AA に暴露し、44 時間後にアポトーシスを調べた。トランスフェクタントの一部を溶解し、ルシフェラーゼ活性を測定してトランスフェクション効率をモニタした。Bcl-2 の発現レベルは、イムノプロッティング (ペーリンガー・マンハイム社より入手した抗体) によって調べた。

10

【0048】

間接的蛍光免疫染色

細胞をポリ-L-リシンで予めコートした 8 チャンバスライド中で培養し、3.7% パラホルムアルデヒドで固定した。スライドをブロックし、抗活性カスパーゼ 3 抗体 (1:200 希釈、ファージン社) を与えた後、FITC 複合化ヤギ抗ウサギ二次抗体 (1:250 希釈、ジャクソン・イムノリサーチ社) とともにインキュベートした。

【0049】

実施例 1: 大腸腺癌において FACL4 の発現が増大している。

20

我々は以前に、AA に対して高い選択性を有し、AA をアラキドノイル補酵素 A エステルに変換する酵素をコードする脂肪酸 CoA-リガーゼのヒトアイソフォーム 4 のクローニングを行った (Y. チャオ (Cao) ら、Genomics、第 49 巻、327~330 頁 (1998 年))。FACL4 と COX-2 のどちらも AA を基質として用いること、ならびに COX-2 が大腸癌において誘導されることが明らかにされていることから (C. E. イーバート (Eberhart) ら、Gastroenterology、第 107 巻、1183~1188 頁 (1994 年) を参照)、FACL4 もまた大腸腺癌においてアップレギュレートされるのではないかと考えた。COX-2 および FACL4 に対して特異的なプライマーを用いて定量的 RT-PCR を行ったところ、大腸腺癌においては、COX-2 だけでなく FACL4 の発現も、同一患者から得た隣接する正常組織と比較して有意に増大されていることが判明した。24 個の大腸腺癌試料のうちの 23 個で FACL4 の発現が 2~14 倍に増加しており、2 人の患者から得た代表的な結果を図 1A に示した。また、多くの大腸癌細胞系列が、腸上皮系列 Int407 におけるよりも有意に高いレベルの FACL4 を発現していることが判明した (図 1B)。

30

【0050】

実施例 2: FACL 阻害剤は、細胞を AA 誘導性アポトーシスに対して感受性にするとともに、アポトーシスの誘導において NSAID と相乗作用を示す。

以前の報告から、形質転換細胞において NSAID で COX-2 を阻害すると、アポトーシスが起こることが明らかにされている。我々は、FACL の阻害剤であるトリアクシン C が同様の効果を有するかどうかを調べた。その結果、トリアクシン C が HT29 細胞において濃度依存的にアポトーシスを誘導することが分かった。トリアクシン C は 10 μM で対照細胞に比べて 9 倍の増加を示した (図 2A)。さらに、外来性 AA は 100~300 μM の濃度でアポトーシスを誘導し、トリアクシン C は細胞を AA 誘導性アポトーシスに感受性にした (図 2A)。このことは、トリアクシン C によるアポトーシスの誘導が、FACL4 経路の不活性化と、その後起こる細胞内での遊離 AA の蓄積とによって媒介されることを示唆する。さらに、これらの 2 つの代謝経路を同時に阻害すると、アポトーシスに対する相乗作用がもたらされるかどうかを調べた。この結果、COX 阻害剤であるインドメタシンを添加すると、HT29 細胞においては細胞死を引き起こさなかった濃度 (2 μM) のトリアクシン C がアポトーシスを誘導することが分かった。トリアクシン C のアポトーシス誘導効果は、別の COX 阻害剤であるスリダクスの存在下で 4~8 倍に増

40

50

大した(図2B)。同様の相乗作用は、ヒト腎臓上皮293細胞においても検出された(図示せず)。したがって、アポトーシスに対するシグナルは、AAのレベルの増加であり、トリアクシンCおよびNSAIDは、遊離AAの代謝的除去を阻害することによりアポトーシスを促進していると考えられる。

【0051】

実施例3：アラキドン酸は上皮細胞におけるアポトーシスを誘導し、カスパーゼ3の活性化に關与する。

腫瘍組織においてAAを利用する酵素のアップレギュレーションに關与する機構を調べるために、細胞の遊離AAレベルを操作できるようにした細胞モデルを構築した。まず最初に、外来性AAに暴露した293細胞の運命について調べたところ、脂肪酸の濃度を増加させると生存性が対照の23%にまで落ち込むことが分かった(図3A)。アポトーシスに起因すると考えられる細胞死の部分を、モノおよびオリゴヌクレオソームの形成を検出するアッセイにおいて評価した。細胞を300 μ MのAAに暴露した場合には高いレベル(対照の18倍)が検出されたが、パルミチン酸(PA)に暴露した場合には増加は見られなかった(図3B)。対照細胞は無傷の核を有していたが、AAで処理した細胞では、核凝縮およびクロマチン断片化および高レベルのDNA鎖破壊が見られた(図3C)。このように、AAは濃度依存的にアポトーシスを誘導する。我々は、カスパーゼ1(ICE)ではなくカスパーゼ3によって媒介される経路が、内在性AA放出が刺激されているTNF処理細胞に含まれていることから、カスパーゼ3の活性化がAA誘導性アポトーシスに關与するのではないかと仮定した。S. Bourteilleら、J. Biol. Chem.、第273巻、31245~31251頁(1998年)を参照のこと。対照細胞と比較してAA処理細胞において、カスパーゼ3様の活性の時間および濃度依存的に増加が認められ、増加は4.5倍まで17時間目にピークを示した(図示せず)。個々の細胞におけるカスパーゼ3の活性化は、活性化されたカスパーゼ3に特異的な抗体を用いて検出した。染色パターンから、活性化されたカスパーゼ3のレベルはクロマチン断片化の程度と相関することが判明した(図3D)。次に、細胞を外来性AAに暴露する前に、カスパーゼ1/4(z-YVAD-fmk)またはカスパーゼ3(z-DMQD-fmk)の何れかの阻害剤を細胞に添加した。カスパーゼ3阻害剤はアポトーシスを顕著に阻害したが(いずれの濃度においても $P < 0.001$)、カスパーゼ1/4阻害剤ではこのような阻害が見られなかった(図3E)。このことは、カスパーゼ3の活性化がAAによって誘導されるアポトーシスにおいて不可欠な下流の出来事であることを示している。

【0052】

実施例4：AAを利用する経路の活性化は、細胞の遊離AAのレベルを低減することによりAA誘導性アポトーシスを阻害する。

次に我々は、誘導によってヒトFACL4、ヒトCOX-2、またはその両方を発現する安定に形質転換された系列を構築した。誘導によるFACL4、COX-2、またはその両方の発現のレベルは、安定系列においてウェスタンブロッティングによって検出した(図4A)。さらに、触媒活性を欠失した変異COX-2(L547K)を誘導可能に発現する系列を単離した(図示せず)。そして、FACL4および/またはCOX-2の過剰発現によってAA誘導性アポトーシスが阻害されるかどうかを調べた。アポトーシスのレベルは、対照細胞に比べてFACL4またはCOX-2を過剰発現している細胞において減少していた(図4B)。アポトーシスの減少は、酵素の発現を誘導するために用いた物質であるポナステロンの副作用ではない。とういのも空のベクターを保持した対照細胞が誘導の有無にかかわらず同様のシグナルレベルを示したためである。アポトーシスの減衰は、細胞がFACL4とCOX-2の両方を過剰発現した場合に、さらに顕著であった(図4B)。FACL4またはCOX-2の過剰発現によってAA誘導性アポトーシスが部分的に阻害され、両酵素を同時に過剰発現させると付加的効果が得られるという結論に至った。

【0053】

10

20

30

40

50

次に、他の多価不飽和脂肪酸がアポトーシスを誘導するかどうかを調べるために、エイコサペンタエン酸 (EPA) およびドコサヘキサエン酸 (DHA) が有効かどうかを調べた。DHA は AA または EPA ほどに良好ではないものの、上記脂肪酸のいずれも COX-2 に対する基質である。W. L. スミス (Smith) ら、*J. Biol. Chem.*、第 271 巻、33157 ~ 33160 頁 (1996 年) を参照のこと。200 μ M の AA、200 μ M の EPA、100 μ M の DHA および 200 μ M の PA で処理した後のアポトーシスの増加倍率は、それぞれ、8.5 倍、9.1 倍、15.1 倍、および 4.2 倍であった。COX-2 の過剰発現を誘導することにより、AA に応答したアポトーシスは 36.7% ($n=3$, $P<0.001$) 減少し、EPA に応答したアポトーシスは 34.0% ($n=3$, $P<0.01$)、DHA に応答したアポトーシスは 18.5% ($n=3$, $P>0.05$)、PA に応答したアポトーシスは 8.1% ($n=3$, $P>0.05$) だけ減少した。したがって、COX-2 の過剰発現によるアポトーシスの阻害は、脂肪酸の基質としての適性に相関していた。異なる脂肪酸を用いた結果によって示唆されるように、COX-2 の防止効果とその触媒活性を必要とするかを調べるために、野生型 COX-2 を有した細胞におけるアポトーシスレベルを、不活性変異細胞 COX-2 (L547K) を有する細胞におけるレベルと比較した (図 4C)。野生型 COX-2 の場合とは対照的に、変異 COX-2 の発現はアポトーシスを阻害しなかった (図 4C)。次に、この応答に対する NSAID の影響を調べたところ、COX-2 の選択的阻害剤である 6-メトキシ-2-ナフチル酢酸 (50 μ M) が、COX-2 によるアポトーシスの阻害を無効にすることが分かった。これとは対照的に、インドメタシンは (COX-1 を阻害するが COX-2 は阻害しない濃度である 10 μ M) (E. A. ミード (Meade) ら、*J. Biol. Chem.*、第 268 巻、6610 ~ 6614 頁 (1993 年) を参照) アポトーシス応答を変えることはなかった (図 4C)。このように、COX-2 の阻害はアポトーシス促進効果を有していた。

【0054】

アポトーシスからの保護は、遊離 AA の徹底的な除去あるいは代謝産物の産生に起因するものであった可能性がある。これらの 2 つの機構を区別するために、いくつかの実験を行った。まずはじめに、COX-2 経路の主要な産物である PGE₂ の分泌を、COX-2 単独安定細胞および FACL4 / COX-2 二重安定細胞において比較した。二重安定細胞は、COX-2 単独安定細胞と比べて、28% 以下の量の PGE₂ しか分泌しなかった (図 4D)。これは、おそらく COX-2 媒介経路と FACL4 媒介経路との間での、遊離 AA のプールに対する競争が原因と考えられる。二重安定細胞が遙かに低レベルのプロスタグランジンしか産生しないにもかかわらず、COX-2 単独安定細胞よりも効果的にアポトーシスを阻害したことから、上記結果は、産物の生成ではなく、AA の枯渇が阻害の要因であるという解釈の方を強く支持するものである。さらに、PGE₂ (50 μ M) および PGJ₂ (5 μ M) を細胞に直接添加したところ、これらが外来性 AA の存在下において細胞の生存率を高めないことが分かった (図示せず)。二重安定細胞において遊離 AA の利用性が減少したことから、阻害が LOX 経路を介する HETE 合成の変化によるものであるという別の可能性もあった。293 細胞における 15-LOX を調べたところ、LOX 阻害剤である NDGA が、以前に報告されているようにアポトーシスを誘導すること (D. G. タン (Tang) ら、*Proc. Natl. Acad. Sci.*、第 93 巻、5241 ~ 5246 頁 (1996 年) 参照)、さらに 15-HETE を加えても 293 細胞における細胞の生存性に影響がないことが分かった (図示せず)。上記の結果をまとめると、高レベルの遊離 AA がアポトーシスの引き金となる一方で、その枯渇がアポトーシスを阻害するという仮説が支持される。直接的な証拠を得るために、次に様々な細胞系列における遊離 AA の相対量を培地中への放出量を測定することにより調べた。S. ジャヤデブ (Jayadev) ら、*J. Biol. Chem.*、第 269 巻、5757 ~ 5763 頁 (1994 年) を参照。「シンク」の誘導後、AA は、FACL4、COX-2 および二重安定細胞において、誘導を行わなかった対応物と比較してそれぞれ 67%、61% および 26% まで減少していた (図 4E)。

【0055】

実施例5：アラキドン酸代謝「シンク」もまたTNF 媒介性殺傷を防止する。
次に、AAに対する「シンク」が、例えばTNF 媒介性殺傷などの他の状況において細胞死を防止するかどうかを調べた。TNF は特定の腫瘍細胞に対して細胞毒性および細胞静止作用を及ぼし、cPLA₂によるAAの放出は明らかにこのプロセスに含まれてる。M. ハヤカワ (Hayakawa) 等、J. Biol. Chem. 第268巻、11290~11295頁 (1993年)、および、S. ジャヤデブ (Jayadev) 等、J. Biol. Chem. 第272巻、17196~17203頁 (1997年)を参照のこと。FACL4またはCOX-2を過剰発現した細胞において、TNF 処理後の細胞の生存性は適度に増大し(図示せず)、FACL4/COX-2安定細胞においては顕著に上昇し、生存画分は43.5%から70.5%へと増大した(n=3, P<0.001)(図5A)。二重安定細胞における細胞の生存性は、誘導を行わない場合ですら対照細胞よりも良好であることが分かった。おそらくこれは、cDNA構築物のプロモータ制御におけるわずかな漏れに起因すると考えられる。さらに我々は、cPLA₂によりAA放出を刺激する、他のアゴニストであるCa²⁺イオノフォアA23187(L. Lin)等、Proc. Natl. Acad. Sci. 第89巻、6147~6151頁 (1992年)を参照)に应答した細胞生存性について調べたところ、生存性は、誘導されたFACL4またはCOX-2安定細胞において、それらの非誘導対応物に比べて高かった(図示せず)。この向上は、細胞生存性が37.8%から67.8%に上昇した(t試験、n=3、P<0.01)二重安定細胞においてさらに顕著であった(図5A)。我々はFACL4とCOX-2の両者の過剰発現による相乗作用について繰り返し調べた。その結果、COX-2特異的阻害剤(6-メトキシ-2-ナフチル酢酸)が二重安定細胞における細胞生存性の向上を部分的に無効にすることが判明した(図示せず)。細胞生存性の向上が遊離AAのレベルの減少の結果であるのかどうかをさらに調べるために、パルス追跡実験を行い、A23187処理後に培地中に放出されたAAの量を測定した。対照細胞は、A23187に应答して大量のAAを放出したが、その放出はFACL4およびCOX-2の過剰発現によって完全に無効にされた(図5B)。このことから、代謝経路(シンク)内へのAAの転流が、AA放出に対する強い刺激条件の下ですら低い細胞濃度をもたらすことが実証された。これらの結果は、AAのレベルの上昇がTNF 誘導性およびA23187誘導性殺傷における重要なステップであること、および遊離AAが様々な刺激によって開始される細胞死シグナリングを媒介することを支持するものである。

【0056】

実施例6：AA誘導性アポトーシスは抗酸化剤およびBcl-2によって抑制される。脂質過酸化はアポトーシスの構成要素であることが多いが(D. M. Hockenbery)等、Cell、第75巻、241~251頁(1993年)を参照)、我々は、AAに暴露した細胞においてマロンジアルデヒドおよび4-ヒドロキシ-2(E)-ノネナールの形成が高められることを観察した(図6A)。さらに、細胞をデフェロキサミン、アスコルビン酸、トロロックス、トコフェロール等の抗酸化剤で前処理した場合、アポトーシスは顕著に低下した(図6B)。また、膜透過性抗酸化剤であるアポトランスフェリンについても調べたところ、この物質がAA誘導性アポトーシスに変化をもたらさないことが分かった(図示せず)。このように、抗酸化剤は細胞内酸化プロセスを阻止することにより、アポトーシスを部分的に防止している。上記の結果は、おそらくは非酵素的機構を介するAAの過酸化を含むかもしれないAA誘導性アポトーシスに、反応性酸素種が関与していることを示唆している。カスパーゼ3阻害剤は過酸化脂質の形成を阻止しなかったことから、過酸化脂質の蓄積はカスパーゼ3活性化の上流に位置づけられる(図示せず)。

【0057】

Bcl-2は抗アポトーシスタンパク質であり、その1つの作用として、脂質過酸化の抑制がある。D. M. Hockenbery)等、Cell、第75巻、

241～251頁(1993年)を参照。細胞をBcl-2のcDNAでトランスフェクトしたところ、このトランスフェクト細胞がAA誘導性アポトーシスを減少させること、およびこの減少がBcl-2の発現レベルと相関していることが分かった(図6C)。このことは、AAシンクを有する細胞において観察されたアポトーシスからの保護が、これらの細胞におけるBcl-2の発現の増加に起因しているという可能性が持ち上がる。実際のところ、FACL4および/またはCOX-2が過剰発現されたときに、Bcl-2の発現レベルが適度に上昇することが判明した(図6D)。したがって、AAによって開始されるアポトーシス経路は脂質の過酸化を伴い、Bcl-2によって抑制可能であるが、AA代謝酵素の発現によって与えられる防止効果、すなわち、利用可能な遊離のAAの量を調節することによる防止効果はこれらの段階の上流にある。

10

【図面の簡単な説明】

【図1A】大腸腺癌における定量的RT-PCRの結果を示す図。

【図1B】大腸癌細胞系列における定量的RT-PCRの結果を示す図。

【図2A】トリアクシンCによるアラキドン酸誘導性アポトーシスの感作を示すグラフ。

【図2B】アポトーシスを誘導する際のトリアクシンCのNSAIDとの相乗作用を示すグラフ。

【図3A】アポトーシス誘導の際の細胞生存性の測定を示すグラフ。

【図3B】アラキドン酸に暴露した細胞におけるアポトーシスの増加を示すグラフ。

【図3C】アポトーシスの蛍光TUNELアッセイによる*in situ*検出。

【図3D】抗活性カスパーゼ3抗体による免疫染色。

20

【図3E】カスパーゼ3の阻害によるAA誘導性アポトーシスの阻害。

【図4A】安定にトランスフェクトされた系列におけるFACL4およびCOX-2の条件付き発現レベルを示す図。

【図4B】COX-2、FACL4およびその両方の過剰発現によるAA誘導性アポトーシスの減少を示すグラフ。

【図4C】COX-2媒介性のアポトーシス阻害のための触媒活性に対する要件を示すグラフ。

【図4D】FACL4とCOX-2の共発現によるプロスタグランジン合成の減少を示すグラフ。

【図4E】安定系列における遊離AAのレベルを示すグラフ。

30

【図5A】遊離アラキドン酸に対する酵素的「シンク」による、TNFおよびカルシウムイオノフォア媒介性細胞殺傷の防止を示す、細胞生存性の判定のグラフ。

【図5B】遊離アラキドン酸に対する酵素的「シンク」による、TNFおよびカルシウムイオノフォア媒介性細胞殺傷の防止を示す、遊離AAの測定のグラフ。

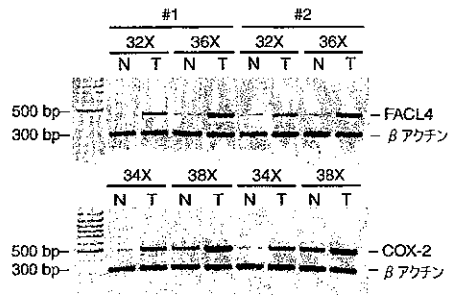
【図6A】AAに暴露した細胞での脂質酸化生成物のレベルを示すグラフ。

【図6B】抗酸化剤によるAA誘導性アポトーシスの減衰を示すグラフ。

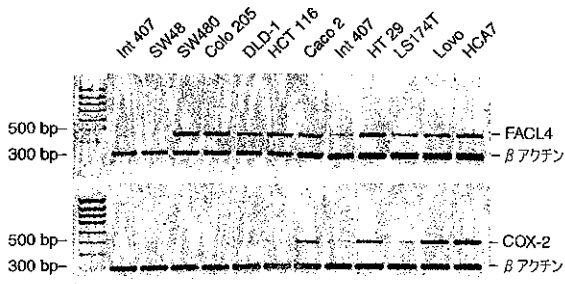
【図6C】Bcl-2によるAA誘導性アポトーシスの阻害を示すグラフ。

【図6D】安定な細胞におけるBcl-2発現のレベルを示すグラフ。

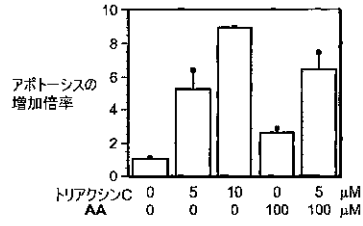
【 図 1 A 】



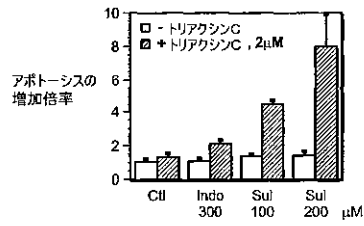
【 図 1 B 】



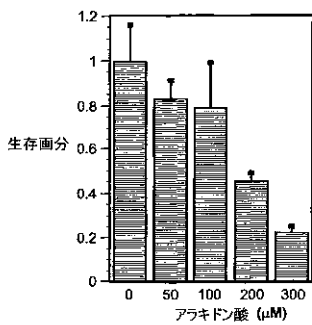
【 図 2 A 】



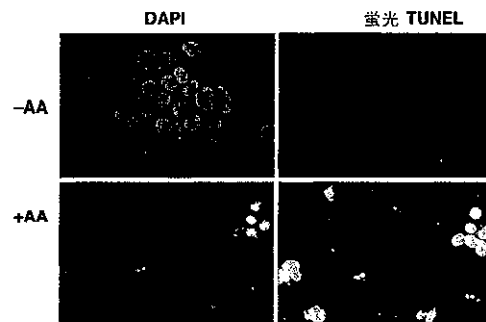
【 図 2 B 】



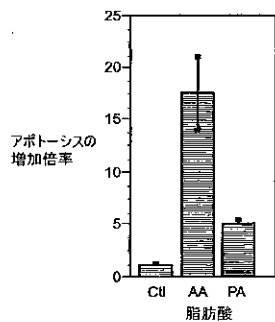
【 図 3 A 】



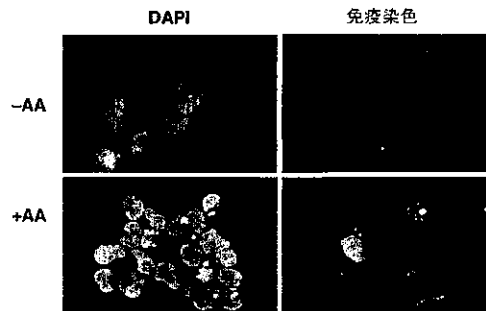
【 図 3 C 】



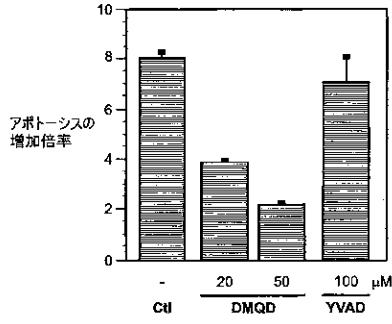
【 図 3 B 】



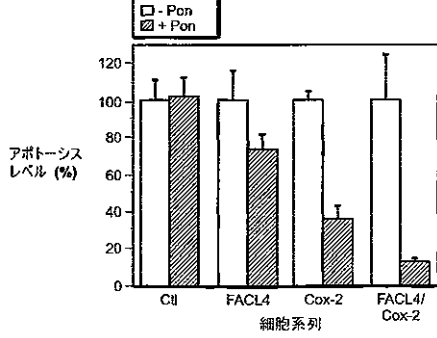
【 図 3 D 】



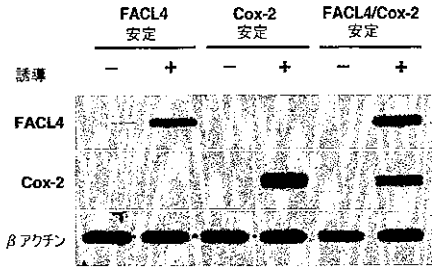
【 図 3 E 】



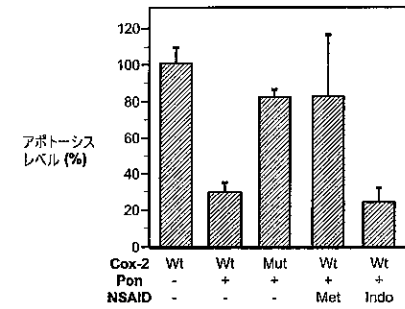
【 図 4 B 】



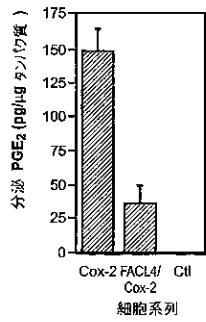
【 図 4 A 】



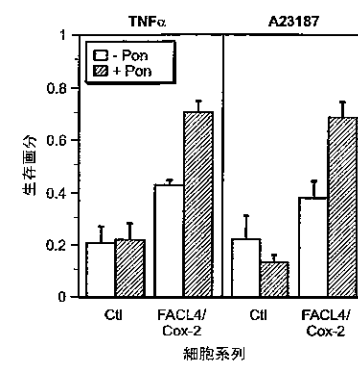
【 図 4 C 】



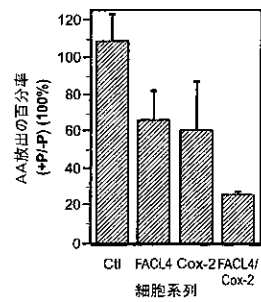
【 図 4 D 】



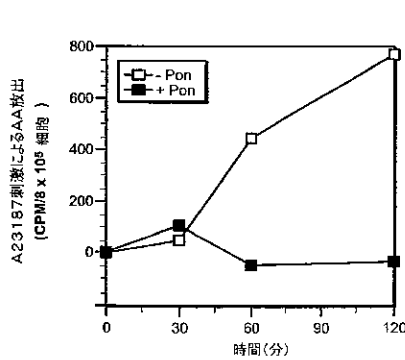
【 図 5 A 】



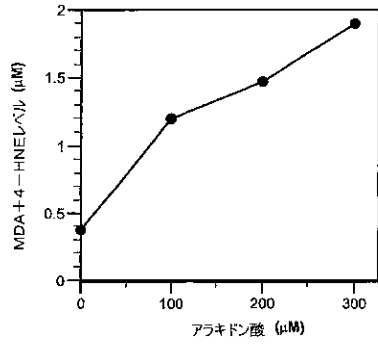
【 図 4 E 】



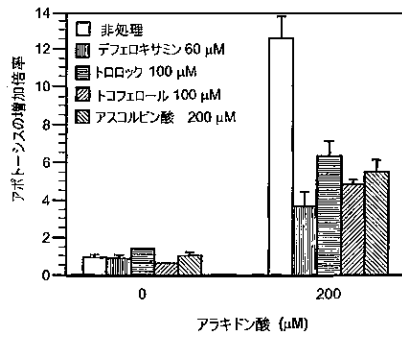
【 図 5 B 】



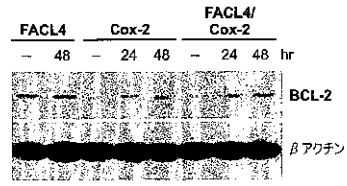
【 図 6 A 】



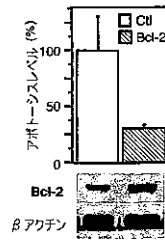
【 図 6 B 】



【 図 6 C 】



【 図 6 D 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(18) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
28 February 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/16575 A1(51) International Patent Classification: C12N 15/00,
15/63, 15/09, 5/00, A61K 31/70, A01N 43/04

(21) International Application Number: PCT/US00/23920

(22) International Filing Date: 21 August 2000 (21.08.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(71) Applicant (for all designated States except US): UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION (US/US);
615 Arapahoe Drive, Salt Lake City, UT 84108 (US).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): PRESCOTT,
Stephen (USA/S), Huntsman Cancer Institute, 2000 Circle of Hope, Room 5360, Salt Lake City, UT 84112 (US);
CAO, Yang (CN/C), Huntsman Cancer Institute, 2000 Circle of Hope, Room 5360, Salt Lake City, UT 84112 (US).

(74) Agent: GIDDINGS, Barton, W.; Mabson & Metcalf, 15 West South Temple, Suite 900, Salt Lake City, UT 84101 (US).

(81) Designated States (national): AB, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, HK, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KH, KR, KP, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, 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.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM), Eurasian patent (AM, AZ, BY, EG, KZ, MD, RU, TJ, TN), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IL, IT, MC, NL, PL, SE), GAPI patent (BI, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/16575 A1

(54) Title: METHOD OF SCREENING FOR INHIBITORS OF HUMAN FATTY ACID-CoA LIGASE 4

(57) Abstract: The present invention provides a method of screening for potential cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents which act by modulating the activity of the Fatty Acid-CoA Ligase 4 (FACL4) gene product in humans. This invention also provides methods of administering such agents to treat cancer by inhibiting the activity of the FACL4 gene product, thus raising the cellular level of free arachidonic acid and triggering arachidonic acid mediated apoptosis. The present invention further provides a method for diagnosing cancers, including colon cancer.

WO 02/16575

PCT/US00/22920

**METHOD OF SCREENING FOR INHIBITORS OF
HUMAN FATTY ACID-CoA LIGASE 4**

1. FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention relates to chemotherapeutic treatments for cancer. More specifically, the invention relates to screening assays for cancer chemotherapeutic agents which modulate the activity of the enzyme Fatty Acid Co-A Ligase 4 ("FACL4") in humans, to novel treatments for colon cancer which involve the administration of agents discovered using said assays, and to new methods for diagnosing colon cancer by
10 detecting the levels of FACL4 activity in tissue samples taken from a patient being screened for colon cancer.

2. TECHNICAL BACKGROUND

Cancer is a disease in which normal body cells are changed, becoming able to multiply without regard to normal cellular restraints and to invade and colonize areas of the body
15 normally occupied by other cells. See B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell* 1255-1294 (3d ed. 1994). According to the American Cancer Society, one-half of all American men and one-third of all American women will at some point in their lives develop cancer.

Due to the ability of cancer cells to spread and rapidly proliferate, it is difficult to treat
20 cancer patients by attempting to selectively kill cancerous cells. Some have compared the difficulty of this task to the difficulty of completely ridding a garden of weeds. As with weeds, if only a few cancer cells are left untouched by treatment, they may again spread throughout the body, causing a recurrence of the disease. See *id.* at 1267. Current treatments for cancer include surgery and therapies using chemicals and radiation. The effectiveness of
25 these treatments is often limited, however, since cancer cells that have spread from the original tumor site may be missed by surgery and radiation, and since chemical treatments which kill or disable cancer cells are often capable of causing similar damage to normal cells. See *id.*

Hope for better treatments for cancer focuses on obtaining a better understanding of
30 carcinogenesis—the series of events which transforms a normal cell into a cancer cell. It is hoped that such an understanding will help researchers and physicians direct treatments solely toward cancer cells or their precursors, thus preventing or treating cancer and avoiding damage to healthy body tissues.

WO 02/16575

PCT/US00/22920

One way researchers are learning about carcinogenesis is by evaluating how chemical agents which are known to be useful in preventing or treating cancer act to prevent cancer in the body. One result of such research is the discovery that some cancer-preventing ("chemopreventive") and cancer therapeutic ("chemotherapeutic") agents act on cellular enzymes which metabolize arachidonic acid in cells. Recent studies have shown that arachidonic acid metabolism plays an important role in the development of cancer. See M. Tsujii & R.N. DuBois, *Cell*, 83:493-501 (1995); H. Sheng et al., 99 *J. Clin. Invest.* 2254-2259 (1997); and S.M. Prescott & R.L. White, 87 *Cell* 783-786 (1996). Arachidonic acid ("AA"; 20:4, n-6) is an essential polyunsaturated fatty acid which is oxidized in cells to form eicosanoids including prostaglandins and leukotrienes.

One cellular enzyme which metabolizes AA is named COX-2. COX-2 is an enzyme involved in the synthesis of prostaglandins from AA. It has been shown to be specifically involved in colon carcinogenesis. Like other enzymes, COX-2 can be successfully chemically inhibited. Indeed, it has been shown in recent population studies that regular use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs ("NSAIDs"), which inhibit COX-2, lowers colon cancer risk. See M.J. Thun et al., 325 *New Engl. J. Med.* 1593-1596 (1991). Use of such NSAIDs also helps to prevent carcinogen-induced cancer in animals. See F.M. Giardiello et al., 328 *New England J. Med.* 1313-1316 (1993); and C.S. Williams et al., 18 *Oncogene* 7908-7916 (1999). Moreover, COX-2 has been shown to be upregulated in colon cancer, as has the reticulocyte type 15-lipoxygenase ("LOX"), another enzyme which metabolizes AA. This upregulation of several AA-metabolizing enzymes in cancer cells suggests that multiple pathways of AA metabolism are activated during carcinogenesis.

Several lines of evidence indicate that the level of free AA in cells can regulate apoptosis, the cellular mechanism for programmed cell death. One such line of evidence is found in a mutant cell line shown to be resistant to cell death from exposure to tumor necrosis factor alpha ("TNF α "). TNF α is a protein shown to preferentially kill cancer cells. In this mutant cell line, the activity of cytosolic phospholipase A₂ ("cPLA₂") was significantly reduced, thereby also reducing levels of AA synthesis. This suggests that blocking endogenous AA release in cells, and thus keeping the levels of free AA in cells low, renders cells resistant to TNF α killing. See M. Hayakawa et al., 263 *J. Biol. Chem.* 11290-11295 (1993).

WO 02/16575

PCT/US00/22920

Additional evidence is provided by another line of TNF α killing-resistant cells in which a defect in the rate-limiting enzyme for AA biosynthesis, $\Delta 6$ -desaturase, has been reported. See T. Reid et al., 266 *J. Biol. Chem.* 16580-16586 (1991). This defect would similarly keep AA levels in cells low, thus preventing TNF α killing.

5 Without being bound to any particular theory, one interpretation of the above results is that a reduced cellular AA pool sets a limitation on the level of endogenous AA that can accumulate in response to exposure to TNF α . This limitation on the amount of free cellular AA appears to confer resistance to cell death. This interpretation does not distinguish between an effect of the cellular levels of free AA itself or that of a downstream product like an
10 eicosanoid, however.

This interpretation seems to be further supported by a study involving lipoxygenases. This study reported that the administration of inhibitors of 12-LOX, a lipoxygenase involved in converting arachidonic acid into a leukotriene, induced apoptosis in rat carcinosarcoma cells. See D.G. Tang et al., 93 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 5241-5246 (1996). Likewise, the
15 administration of NSAIDs has been shown to yield a similar response in colon cancer cell lines. Indeed, apoptosis may be induced by simply adding exogenous AA to the cells. See T.A. Chan et al., 95 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 681-686 (1998).

The mechanism by which these inhibitors induce cell death is not completely understood, although research has shown that blocking arachidonate-phospholipid remodeling
20 by inhibitors of CoA-independent transacylase (CoA-IT) induced apoptosis. This corresponded to an accumulation of cellular free AA like that which resulted from the inhibition of COX-2 and LOX. See M.E. Surette et al., 35 *Biochemistry* 9187-9196 (1996); and M.E. Surette et al., 20 *Carcinogenesis* 757-763 (1999). Successful inhibition of AA metabolism appears to facilitate the accumulation of AA in cells, thus facilitating the
25 induction of tumor cell death by apoptosis.

This research has spawned much investigation into methods of inhibiting enzymes which metabolize AA. Inhibitors are known for COX-2 and other enzymes which metabolize AA. Other studies of enzymes which metabolize AA in humans have centered on the enzyme human Fatty Acid CoA Ligase 4 ("FACL4"). FACL4 is upregulated in colon adenocarcinoma
30 cells. Moreover, as with other AA-metabolizing enzymes, inhibiting FACL4 induces apoptosis in colon adenocarcinoma cells. These properties make FACL4 inhibition a promising avenue of research for and application of prospective cancer treatments and give

WO 02/16575

PCT/US00/22920

new hope to cancer sufferers. However, little is known about agents which inhibit FACL4, and there are no known treatments for cancer to date which utilize this pathway. No use has been made of the elevation of FACL4 expression in cancer cells as a diagnostic method.

From the foregoing, it will be appreciated that it would be a significant advancement in the art to provide additional effective methods for regulating AA-mediated apoptosis in cancer cells. Specifically, it would be an advancement in the art to provide methods for screening for chemotherapeutic or chemopreventive agents which act by modulating the activity of FACL4 in cells, including cancer cells. It would be a further advancement in the art to provide novel treatments for colon cancer involving the inhibition of FACL4 by the administration of chemotherapeutic or chemopreventive agents discovered using such assays. Similarly, it would be an advancement in the art to provide new methods for diagnosing colon cancer by detecting the levels of FACL4 activity in tissue samples. Such methods are disclosed herein.

3. BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to chemopreventive and chemotherapeutic treatments for cancer. More specifically, the present invention relates to methods of screening compounds for cancer chemotherapeutic activity. Said methods of screening detect agents which modulate the activity of the enzyme Fatty Acid Co-A Ligase 4.

In certain embodiments, said methods comprise contacting cells which express or overexpress the FACL4 gene product with the compound to be tested, and then measuring the level of inhibition of the FACL4 gene product in the cells. The inhibition of the gene product is measured in any of the numerous ways known in the art, including, but not limited to monitoring the rate and amount of radiolabeled AA esterified by FACL4 in compound-treated and untreated cells or comparing rates of apoptosis among compound-treated cells with those of untreated cells. See D.B. Wilson et al., 257 *J. Biol. Chem.* 3510-3515 (1982); and Y. Cao et al., 49 *Genomics* 327-330 (1998). In certain other embodiments, said methods comprise contacting a genetically engineered cell in which the expression of FACL4 is suppressed with a test compound and measuring inhibition of the function of the FACL4 gene product in the cell. One could also test for FACL4 inhibitors using mouse models, for example in mice bearing xenografted tumors, in transgenic mice or cells derived therefrom that overexpress FACL4, or in FACL4 knock-out mice. In embodiments of the present invention, test

WO 02/16575

PCT/US00/22920

compounds which inhibit the function of the FACL4 gene product are potential cancer chemotherapeutic agents.

The invention also relates to providing novel treatments for colon cancer by administering chemotherapeutic or chemopreventive agents discovered using the assay methods disclosed above to a human in need of such treatment. Thus, said novel treatments for colon cancer comprise inhibiting FACL4 in a human by administering a FACL4 inhibitor. In specific embodiments, these treatments comprise administering triacsin C to a human. As used herein, "effective amount" means an amount of a drug or pharmacologically active agent that is nontoxic but sufficient to provide the desired local or systemic effect and performance at a reasonable benefit/risk ratio attending any medical treatment. In other embodiments, said treatments comprise administering a FACL4-inhibiting compound to a human, wherein the activity of the compound does not result in significant toxic effects to the human. In yet another embodiment, said treatments comprise administering a compound which inhibits FACL4 to a human in need of such treatment, wherein the ability of the compound to inhibit FACL4 is determined by contacting it with a cell genetically engineered to express or overexpress a FACL4 gene product and determining whether the compound inhibits the FACL4 gene product.

Further, the invention relates to new methods for diagnosing colon cancer by detecting the levels of FACL4 activity in tissue samples. In some embodiments, said methods comprise isolating a sample of tissue suspected to be cancerous, evaluating levels of FACL4 expression in the cells of the tissue, and comparing the levels of FACL4 expression with those of a control cell. Evaluation of the levels of expression of FACL4 may be conducted through quantitative RT-PCR, immunostaining, *in situ* hybridization, immunofluorescence, Western blotting, or other methods commonly known in the art. Further, the control cell used in these methods may be selected from non-cancerous colon cell lines known in the art, or may simply be a cell from a tissue sample thought to be normal taken from the same individual.

These and other features and advantages of the present invention will become more fully apparent from the following detailed description.

4. BRIEF SUMMARY OF THE DRAWINGS

Figure 1: The expression of FACL4 and COX-2 is increased in colon adenocarcinomas and cell lines. (A) Expression in adenocarcinomas. Quantitative RT-PCR was performed on RNAs isolated from 24 pairs of colon adenocarcinomas and adjacent

WO 02/16575

PCT/US00/22920

normal tissues. A representative RT-PCR quantitation from two patients is shown. The top panel illustrates amplification with the *FACL4* amplicons and the bottom with the *COX-2* amplicons. *FACL4* was amplified for 32 and 36 cycles, and *COX-2* was amplified for 34 and 38 cycles. T denotes colon adenocarcinoma tissue, while N denotes normal colon tissue from the same patient. (B) Expression in colon cancer cell lines. The legends on top of the gel indicate the cell line from which RNA was extracted.

Figure 2: Triacsin C sensitizes arachidonic acid-induced apoptosis (A) and synergizes with NSAIDs in inducing apoptosis (B). HT 29 Cells were plated in 96 wells. Triacsin C and AA were added (in A), or triacsin C with either indomethacin (Indo) or sulindac (Sul) (in B) were added at the indicated concentrations. Indomethacin and sulindac are both cyclooxygenase (COX) inhibitors. Apoptosis was determined by Cell Death ELISA 44 hr later (A), and 72 hr later (B), respectively. Control cells, (hereinafter "Ctl") are considered to be cells which did not receive NSAIDs treatment. The values shown are the means of triplicate determinations.

Figure 3: Arachidonic acid induces apoptosis via activation of caspase 3. (A) Determination of cell survival. AA was added to 293 cells at the indicated concentrations and the surviving fraction of cells was determined after 44 hr. The values shown are relative to the viability of cells that were not exposed to AA. (B) Increased apoptosis in cells exposed to AA. Cells were treated with AA (300 μ M) or palmitic acid (300 μ M) under the same conditions as in A, and then apoptosis was detected with an ELISA. The mean values from triplicate determinations are shown. In multiple experiments the concentration of AA that induced apoptosis in a substantial fraction of the cells varied between 200 and 300 μ M (C) In situ detection of apoptosis. The 293 cells were treated with AA (300 μ M; +AA) or vehicle alone (-AA) for 44 hr. The nuclei were stained with DAPI, and DNA strand breaks in individual cells were detected with a fluorescent TUNEL assay. The upper panels are the same field of cells (-AA) photographed under UV (left panels) and FITC filters (right panels). The lower panels illustrate apoptotic cells (+AA). The magnification is 80x. (D) Immunostaining with an anti-active caspase 3 antibody. Upper panels, control cells (-AA); lower panels, cells exposed to 300 μ M AA. Left panels, DAPI staining; right panels, immunostaining with an antibody selective for active caspase 3. The magnification is 100x. (E) Blocking AA-induced apoptosis by inhibition of caspase 3. The 293 cells were preincubated with caspase inhibitors (including DMQD, a caspase 3 inhibitor, and YVAD,

WO 02/16575

PCT/US00/22920

a caspase 1 and 4 inhibitor (Peptide Institute)) for 1 hr at the indicated concentrations, AA (300 μ M) was added, and apoptosis was determined 44 hr later. The values represent the means from triplicate determinations.

Figure 4: Over-expression of COX-2 or FACLA inhibits apoptosis. (A) Conditional expression level of FACLA and COX-2 in stably transfected lines. Cells were treated with (+) or without (-) ponasterone (1 μ g/ml) for 48 hr, and Western blotting was carried out with anti-FACLA and anti-COX-2 antibodies, respectively. The loading was normalized with an anti- β -actin antibody (ICN Biomedicals). (B) Reduction of AA-induced apoptosis by over-expression of COX-2, FACLA, and both together. The 293 cells stably transfected with an empty control vector (Cl), FACLA cDNA, COX-2 cDNA, and both FACLA and COX-2 cDNAs were uninduced (- Pon) or induced for over-expression (+ Pon) as in A. AA (300 μ M) was added after 24 hr of induction and apoptosis was determined 44 hr later. The increase in apoptosis induced by AA varied between 6- and 20-fold relative to the signal in cells without treatment. The plot is a comparison of the relative apoptosis levels among the stable lines and is representative of three independent experiments. The values shown are the averages of triplicate determinations. (C) Requirement for the catalytic activity for the COX-2 mediated prevention of apoptosis. Cells were uninduced (- Pon) or induced for over-expression as above. The mutant COX-2 was expressed at a similar level to the wild-type, as assessed by immunoblotting, but there was no increase above background in the amount of prostaglandin synthesized. COX inhibitors were administered 6 hr later as indicated. AA (300 μ M) was then added after 2 hr and apoptosis was determined 44 hr later. The plot is prepared as in B, and is a representative result from three independent experiments, in which triplicates were performed. Wt = wild-type, Mut = mutant, Met = 50 μ M 6-methoxy-2-naphthyl acetic acid, Indo = 10 μ M indomethacin. (D) Reduction of prostaglandin synthesis by co-expression of FACLA with COX-2. The COX-2, FACLA/COX-2 stable and control cells carrying an empty vector were induced for 48 hr, washed and incubated with 20 μ M AA at 37°C for 30 min. The amount of PGE₂ synthesized was determined by ELISA. Four additional clones of the FACLA/COX-2 double stable cells were examined, and all secreted a lower level of PGE₂—ranging from 16% to 56%—than the COX-2 single stable lines. (E) The levels of free AA in the stable lines. The [³H] AA released to the supernatant was determined and the values shown are averages from multiple experiments (n \geq 4, P<0.05).

WO 02/16575

PCT/US00/22920

Figure 5: Enzymatic "sinks" for free arachidonic acid protect against TNF α - and calcium ionophore-mediated cell killing. (A) Determination of cell survival. The cells were induced (+ Pon) or not (- Pon) for 24 hr, and TNF α (1 ng/ml) or the calcium ionophore A23187 (5 μ M) was added, and the cells were incubated for another 72 hr. The surviving fraction was determined and is plotted relative to that of the same line without TNF α or A23187 treatment. Ctl denotes control cells harboring an empty vector, while FACL4/COX-2 denotes the double stable line. (B) Measurement of the free AA. The FACL4/COX-2 cells were pre-labeled with [³H] AA, induced, and stimulated with A23187 (5 μ M), and [³H] AA release was measured at the indicated time intervals. The values are from one experiment that is representative of four independent determinations.

Figure 6: Cells exposed to AA show increased lipid peroxidation; apoptosis is blocked by antioxidants and Bcl-2. (A) The level of lipid oxidation products. The 293 cells were treated with AA at the indicated concentrations for 48 hr. The data presented are from one experiment that is representative of two independent experiments. (B) Attenuation of AA-induced apoptosis by antioxidants. Antioxidants were applied to 293 cells at the indicated concentration for 1 hr, and then AA (200 μ M) was added. Apoptosis was determined after 44 hr and is shown relative to the level in control cells. (C) Inhibition of AA-induced apoptosis by Bcl-2. Cells were transfected with the empty vector (Ctl) or with a cDNA encoding Bcl-2 and then were exposed to AA (300 μ M). The level of apoptosis was determined after 44 hr. The values shown indicate the apoptosis level relative to control cells, and represent the means of triplicate determinations (P<0.05). The expression of Bcl-2 was detected by Western blotting. (D) The level of Bcl-2 expression in the stable cells. The stably transfected cells were induced, or not, with ponasterone for 24 or 48 hr. Cell lysates were blotted with an antibody to Bcl-2. Normalization was performed with an anti- β -actin antibody.

These drawings only provide information concerning typical embodiments of the invention and are not therefore to be considered limiting of its scope.

5. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides screening assays for cancer chemotherapeutic agents which modulate the activity of the enzyme Fatty Acid Co-A Ligase 4. The invention also provides novel treatments for colon cancer which involve the inhibition of FACL4 by the administration of chemotherapeutic or chemopreventive agents discovered using such assays.

WO 02/16575

PCT/US00/22920

Further, the invention provides new methods for diagnosing colon cancer by detecting the levels of FACLA activity in tissue samples.

All publications, patents, and patent applications cited herein are hereby incorporated by reference.

5

DEFINITIONS

By "vector" is meant any genetic element, such as a plasmid, phage, transposon, cosmid, chromosome, artificial chromosome, virus, virion, etc., which is capable of replication when associated with the proper control elements and which can transfer gene sequences between cells. Thus, the term includes cloning and expression vehicles, as well as viral vectors.

The term "transfection" is used to refer to the uptake of foreign DNA by a cell. A cell has been "transfected" when exogenous DNA has been introduced inside the cell membrane. A number of transfection techniques are generally known in the art. See, e.g., Graham et al., 52 *Virology* 456 (1973); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York (1989); Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, (1986); Chu et al., 13 *Gene* 197 (1981); and J.D. Watson et al., *Recombinant DNA*, 213-234 (1996). Such techniques can be used to introduce one or more exogenous DNA moieties, such as a nucleotide integration vector and other nucleic acid molecules into suitable host cells. The term captures chemical, electrical, and viral-mediated transfection procedures, including, as examples, calcium phosphate co-precipitation (Graham et al., 52 *Virology* 456-467 (1973)), direct micro-injection into cultured cells (M.R. Capecchi, 22 *Cell* 479-488 (1980)), electroporation (Shigekawa et al., 6 *BioTechniques* 742-751 (1988)), liposome-mediated gene transfer (Mannino et al., 6 *BioTechniques* 682-690 (1988)), lipid-mediated transfection (Felgner et al., 84 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 7413-7417 (1987)), and nucleic acid delivery using high-velocity microprojectiles (Klein et al., 327 *Nature* 70-73 (1987)).

As used herein, the term "cell line" refers to a population of cells capable of continuous or prolonged growth and division in vitro. Often, cell lines are clonal populations derived from a single progenitor cell. It is further known in the art that spontaneous or induced changes can occur in karyotype during storage or transfer of such clonal populations. Therefore, cells derived from the cell line referred to may not be precisely identical to the ancestral cells or cultures, and the cell line referred to includes such variants.

WO 02/16575

PCT/US00/22920

The term "RT-PCR" denotes the reverse transcriptase polymerase chain reaction used and known in the art. As is known in the art, RT-PCR is a variation on a basic method of amplifying a target DNA molecule by using a polymerase and primers which have nucleotide sequences complementary to the sequence of the DNA flanking the desired target region of the DNA. Successive cycles of the process can be used to increase the amount of DNA present since the strands produced in a first cycle can be used as templates for production in later cycles. RT-PCR combines this basic method with the reverse transcription of mRNA to form cDNA, which may then be amplified by the procedure just described. See R.C. King, *A Dictionary of Genetics*, New York, Oxford University Press 268 (1997).

The term "amplicon" is used to mean a segment of genetic material which forms many linear copies upon exposure to a compound which inhibits the function of a gene found in the segment.

The term "over-expression" as used herein denotes that a given gene product is being expressed in a cell or set of cells that have been engineered to express the gene product at a rate higher than in a comparable cell or set of cells that have not been so engineered. The rates of overexpression in said cells vary from the original levels by 2-fold, 5-fold, and 10-fold, with 10-fold being preferred.

GENERAL METHODS

The invention stems from the discovery that fatty acid CoA ligase 4 (FACL4), like COX-2 and LOX, is upregulated in colon adenocarcinoma. See Y. Cao et al., *49 Genomics* 327-330 (1998). This upregulation of these enzymes suggests that colon cancer causes alterations to existing AA metabolic pathways which cumulatively lower the level of free AA in a cell, thereby preventing apoptosis. This hypothesis was tested by establishing human epithelial lines with stable, inducible expression of FACL4 and/or COX-2. Using these cell lines, it was determined that AA is a signal for apoptosis. These assays further showed that the induction of apoptosis by NSAIDs and other inhibitors of AA metabolism is a consequence of the accumulation of AA due to the inhibition of AA-metabolizing agents. These assays further showed that over-expression of COX-2 and FACL4, like that which occurs in colon and perhaps other cancers creates a "sink" for AA, thereby removing a pro-apoptotic signal and promoting carcinogenesis. Pharmacological manipulation of the cellular level of free AA to induce apoptosis could thus be a general approach to killing transformed

WO 02/16575

PCT/US00/22920

cells. This could be achieved through the inhibition of enzymes which metabolize AA, such as COX-2 and FACLA.

In order to discover compounds which block the metabolism of AA by FACLA, human epithelial cell lines were developed with stable, inducible expression of FACLA, COX-2, and both FACLA and COX-2. These cell lines were used in methods of screening for compounds which inhibit FACLA. Such methods comprise contacting a test composition with a cell expressing or overexpressing the FACLA gene product and measuring the inhibition of the FACLA gene product by the compound relative to that of a non-contacted cell. Many methods may be used to measure the inhibition of the FACLA gene product by the test compound, including tracking the metabolism of radiolabeled AA in FACLA-treated and non-FACLA-treated cells. Similarly, pulse-chase methods such as that used in Example 5 can show relative amounts of AA metabolism occurring in a set of cells versus that of a control. Further, methods stemming from the apoptosis-inducing effects of AA pooling such as comparing rates of apoptosis in FACLA-treated cells with those of non-FACLA-treated cells and comparing apoptosis rates of FACLA-treated and non-treated cells after exposure to exogenous AA.

Further, the compounds discovered using the above assays may be used to treat colon cancer in a human. As seen, for example, in Example 2, known inhibitors of FACLA such as triacsin C may be used to sensitize cells to AA-induced apoptosis. Indeed, there is a synergistic effect in destroying cancer cells when both FACLA and COX-2 are inhibited, as seen in Figure 2b.

Also, as seen in Example 1, colon adenocarcinomas express FACLA at much higher levels than normal cells. This suggests that evaluating the levels of FACLA expression in a sample of suspect tissue and comparing it to the levels found in a sample of normal tissue, a normal cell line, or other control would serve as a method of diagnosing colon cancer.

The concentrations of AA that induced apoptosis in the *in vitro* experiments described herein are higher than the steady state levels that have been measured in normal biological fluids, but the concentration in cells is unknown and might approach such levels transiently under certain circumstances *in vivo*. For example, approximately 5 to 20 nmol of AA are released from 10^9 platelets in 1 min upon stimulation by thrombin. See E.J. Neufeld & P.W. Majerus, 258 *J. Biol. Chem.* 2461-2467 (1983).

WO 02/16575

PCT/US00/22920

The induction of apoptosis is not a detergent effect since other fatty acids, such as oleic and palmitic acids, did not cause the same response. Moreover, the AA-initiated apoptosis can be inhibited by removal of AA metabolically as shown in our experiments in which COX-2 and FACL4 were over-expressed.

5 COX-2-specific inhibitors SC-58125 and NS398 have been reported to enhance the induction of apoptosis in colon and prostate cancer cells by down-regulating the anti-apoptotic protein Bcl-2 (See H. Sheng et al., 58 *Cancer Res.* 362-366 (1998); and X.H. Liu, et al., 58 *Cancer Res.* 4245-4249 (1998)), whereas 15-LOX was found to block apoptosis by upregulating Bcl-2. See E. Nishio & Y. Watanabe, 122 *Br. J. Pharmacol.* 1516-1522 (1997).
10 We have discovered that overexpressing COX-2 and/or FACL4 blocked apoptosis, and was paralleled by an increased expression of Bcl-2. In addition, over-expression of Bcl-2 suppressed the AA-induced apoptosis. These suggest that the expression of Bcl-2 is regulated by the level of free AA, and that the Bcl-2 dependent pathways play a crucial role in AA signaled apoptosis.

15 It has been debated whether the augmented AA metabolism is an initiator or a consequence of tumor growth. The studies with COX-2 and its inhibitors strongly support that the induction of COX-2 is a critical step in carcinogenesis and tumor progression. The pro-neoplastic effects of activating COX-2 and other AA metabolic pathways are multiple, but one important mechanism is the inhibition of apoptosis. In the case of colon physiology,
20 apoptosis is a normal event to conclude the life cycle of intestinal epithelial cells. The diversion of AA by the induced enzymes in colon cancer lowers the level of free AA, and thereby promotes tumor growth by attenuating apoptosis. The specific eicosanoid products of AA metabolism, like prostaglandins and leucotrienes may also contribute to the transformation through enhancing cell adhesion and proliferation. Nonetheless, the inhibition
25 of apoptosis by coordinated activation of AA metabolic "sinks" is a vital mechanism to promote tumor growth, and our findings implicate that development of specific and non-toxic inhibitors targeted to the AA-metabolizing pathways may provide novel approaches for therapeutic intervention.

6. EXAMPLES

30 The following examples are given to illustrate various embodiments which have been made with the present invention. It is to be understood that the following examples are not

WO 02/16575

PCT/US00/22920

comprehensive or exhaustive of the many types of embodiments which can be prepared in accordance with the present invention.

Materials and Methods

Tumor tissues and Reverse Transcription PCR. Total RNA was prepared from
5 surgically removed colon adenocarcinoma and the adjacent normal tissues from the same
patient by Trizol Reagent (Life Technologies, Inc.). Colon cancer cell lines were from ATCC.
RT-PCR was carried out using primers corresponding to the coding sequence of human
FACL4 or COX-2, and β -actin primer-competimer mix (Ambion). The sizes of the amplified
fragments for FACL4 and COX-2 are 441 bp and 480 bp, and the β -actin primers amplify a
10 fragment of 294 bp.

Cell Death Detection ELISA. Cells were plated on 96 well-plates at 1×10^4 cells per
well. AA was applied and apoptotic death was determined after 44 hr with the Cell Death
Detection ELISA (Boehringer Mannheim).

Stable cell lines. The codysonne inducible system (Invitrogen) was used to construct
15 stable lines over-expressing human FACL4, COX-2, COX-2 mutant, and both FACL4 and
COX-2. COX-2 mutant cDNA expresses a catalytically inactive COX-2 with change of a
single amino acid residue (L547K). The cDNAs were cloned into pIND(SP1) (Neomycin).
The cDNA constructs, or the empty vector pIND(SP1) were transfected into E6R293 cells,
which were then selected in 400 μ g/ml geneticin and 400 μ g/ml zeocin. A number of single
20 colonics were screened for over-expression of FACL4, COX-2 wild type, and COX-2 mutant
by immunoblotting against anti-FACL4 (See Y. Cao et al., 467 *FEBS Lett.* 263-267 (2000)),
and anti-COX-2 antibodies (a gift from Dr. Jacques Maclouf), and by measurement of the
CoA ligase activity for FACL4 (See D.B. Wilson et al., 257 *J. Biol. Chem.* 3510-3515
(1992)), or the PGE₂ secretion for COX-2 wild type (ELISA assay, Assay Design, Inc.). The
25 double stable line was generated by stably transfecting the COX-2 stable cells with another
pIND(SP1)-FACL4 cDNA construct, in which the FACL4 cDNA was cloned into a
pIND(SP1) (hygromycin) vector. The cells were selected in 400 μ g/ml geneticin, 400 μ g/ml
zeocin, and 50 μ g/ml hygromycin B. The positive colonies were screened as described above.

Cell survival. Cell viability was determined with the crystal violet staining (See M.
30 Hayakawa et al., 268 *J. Biol. Chem.* 11290-11295 (1993)).

WO 02/16575

PCT/US00/22920

In situ cell death detection. Cells were plated on 8 well-glass chamber slides precoated with poly-L-lysine. AA (300 μ M) was added, and the fluorescent TUNEL assay was performed 44 hr later using the in situ cell death detection kit (Boehringer Mannheim).

Arachidonic acid release. Cells were plated on 6 well-plates precoated with poly-L-lysine at 8×10^5 cells per well. They were then prelabeled with [3 H] AA (0.4 μ Ci/ml medium) (91.8 Ci/mmol, 100 μ Ci/ml, NEN) for 24 hr. After a wash, serum-free DMEM supplemented with 1% BSA (fatty acid free) was added. A small portion of the medium was withdrawn at time intervals, and free fatty acids were extracted with the isopropyl alcohol/heptane/2M H₂SO₄ (40:10:1) cocktail (See V. Dole & H. Meinertz, 235 *J. Biol. Chem.* 2595-2599 (1960)).
10 The upper heptane phase was collected and the [3 H] labeled AA was determined by a scintillation counter. The medium was extracted 28 hr later and AA release was determined again. The percentage of AA release (+P/-P) was calculated by first subtracting released AA after 4 hr (background) from that at 32 hr in the same dish, secondly dividing the release level after ponasterone treatment (+P) with that of control (-P) in the same stable line. The AA
15 release stimulated by A23187 was calculated by subtracting the released AA by unstimulated cells, from that by A23187-stimulated counterparts.

Lipid peroxidation assay. Cells were plated and treated with AA for 48 hr. They were then suspended in 300 μ l H₂O and the cell lysates were prepared by repeatedly freezing and thawing. The cellular malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) levels
20 were determined with the lipid peroxidation assay kit (Calbiochem).

Transfection with Bcl-2 cDNA construct. The cells were transfected with human Bcl-2 cDNA construct using LipofectAMINE (Life Technologies, Inc.). Two μ g of Bcl-2 cDNA and 1 μ g of luciferase cDNA constructs were transfected into $\sim 4 \times 10^5$ cells. The cells were harvested 48 hr later and replated at 1×10^4 cells per well on 96-well plates. The
25 transfectants were exposed to 300 μ M AA, and apoptosis was examined 44 hr later. A portion of the transfectants was lysed, and the luciferase activity was determined to monitor the transfection efficiency. The expression level of Bcl-2 was examined by immunoblotting (antibody from Boehringer Mannheim).

Indirect fluorescent immunostaining. Cells were cultured in poly-L-lysine precoated 8-chamber slides, and were fixed with 3.7% paraformaldehyde. The slides were then blocked
30 and the anti-active caspase 3 antibody (1:200 dilution, Phammingen) was applied, followed by

WO 02/16575

PCT/US00/22920

incubation with FITC-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (1:250 dilution, Jackson ImmunoResearch).

Example 1: The expression of FAFL4 is increased in colon adenocarcinomas.

We previously cloned the human isoform 4 of fatty acid CoA-ligase that encodes an enzyme that highly prefers AA and that converts it into arachidonoyl coenzyme A ester. (See Y. Cao et al., 49 *Genomics* 327-330 (1998)). Since FAFL4 and COX-2 both use AA as substrate, and since COX-2 was shown to be induced in colon cancer (See C.B. Eberhart et al., 107 *Gastroenterology* 1183-1188 (1994)), we asked if FAFL4 is also upregulated in colon adenocarcinomas. By quantitative RT-PCR using primers specific for COX-2 and FAFL4, we found that in addition to COX-2, the expression of FAFL4 was significantly increased in the colon adenocarcinoma compared to the adjacent normal tissue from the same patient. We observed a 2- to 14-fold increase in the expression of FAFL4 in 23 of 24 colon adenocarcinoma samples, and a representative result from two patients is shown in Fig. 1A. We also found that many colon carcinoma cell lines express a significantly higher level of FAFL4 than in the intestinal epithelial line Int 407 (Fig. 1B).

Example 2: A FAFL inhibitor sensitizes a cell to AA-induced apoptosis and synergizes with NSAIDs in inducing apoptosis.

Previous reports indicated that inhibition of COX-2 by NSAIDs in transformed cells results in apoptosis. We evaluated whether triacsin C, an inhibitor of FAFL, has a similar effect. We found that triacsin C induced apoptosis in a concentration-dependent manner in HT 29 cells; at 10 μ M it caused a 9-fold increase compared to control cells (Fig. 2A). Furthermore, exogenous AA induced apoptosis at concentrations from 100 to 300 μ M, and triacsin C sensitized cells to AA-induced apoptosis (Fig. 2A). This suggests that the induction of apoptosis by triacsin C is mediated through inactivation of the FAFL pathway and subsequently, an accumulation of free AA in cells. We further tested whether blocking these two metabolic pathways simultaneously exerts a synergistic effect on apoptosis. We found that triacsin C at a concentration (2 μ M) that otherwise did not cause cell death in HT 29 cells, induced apoptosis when indomethacin, a COX inhibitor, was added. The apoptosis-inducing effect of triacsin C was increased by 4-8 fold in the

WO 02/16575

PCT/US00/22920

presence of sulindac, another COX inhibitor (Fig. 2B). A similar synergy was detected in human kidney epithelial 293 cells (not shown). Thus, it is likely that the signal for apoptosis is an elevated level of AA, and triacsin C and NSAIDs promote apoptosis by blocking the metabolic removal of free AAs.

5

Example 3: Arachidonic acid induces apoptosis in epithelial cells and involves activation of caspase-3.

To evaluate the mechanism implicated in the upregulation of AA-utilizing
10 enzymes in tumor tissues, we engineered a cellular model that allowed us to manipulate the cellular free AA level. Initially, we examined the fate of 293 cells exposed to exogenous AA and found that survival fell to 23% of the control as the fatty acid concentration was increased (Fig. 3A). The portion of cell death attributable to apoptosis was estimated in an assay that detects the formation of mono- and oligo-nucleosomes. A
15 high level (18-fold over the control) was detected when the cells were exposed to 300 μ M AA, but no increase was observed when they were exposed to palmitic acid (PA) (Fig. 3B). The control cells had intact nuclei, while the cells treated with AA showed nuclear condensation, chromatin fragmentation, and a high level of DNA strand breaks (Fig. 3C). Thus, AA induces apoptosis in a concentration-dependent manner. We postulated that
20 activation of caspase 3 might be involved in the AA-induced apoptosis, since a caspase 3, but not caspase 1 (ICE), mediated pathway is involved in TNF α -treated cells, in which endogenous AA release is stimulated. See S. Bourteele et al., 273 *J. Biol. Chem.* 31245-31251 (1998). We detected increased caspase 3-like activity in AA-treated cells in a time- and concentration-dependent manner compared to control cells--the maximal
25 increase was ~ 4.5 fold and the peak was at 17 hours (not shown). Activation of caspase 3 in individual cells was detected with an antibody specific for activated caspase 3. The

WO 02/16575

PCT/US00/22920

staining pattern revealed that the level of activated caspase 3 correlated with the extent of chromatin fragmentation (Fig. 3D). We next added inhibitors of either caspase 1/4 (z-YVAD-fmk) or caspase 3 (z-DMQD-fmk) to the cells before exposing them to exogenous AA. We found that the caspase 3 inhibitor, but not the caspase 1/4 inhibitor, significantly
5 blocked apoptosis ($P < 0.001$ at both concentrations) (Fig. 3E). This indicates that activation of caspase 3 is an essential downstream event in AA-induced apoptosis.

**Example 4: Activation of AA-utilizing pathways prevents AA-induced apoptosis by
reducing the level of cellular free AA.**

We next constructed stably transfected lines that express human *FAC14*, human
10 *COX-2*, or both upon induction. The expression level of *FAC14*, *COX-2*, or both upon induction was detected in the stable lines by Western blotting (Fig. 4A). In addition, we isolated lines with inducible expression of a mutant *COX-2* (L547K) that lacks catalytic activity (not shown). We then tested if over-expression of *FAC14* and/or *COX-2*
15 over-expressed *FAC14* or *COX-2* compared to control cells (Fig. 4B). The reduction in apoptosis was not a side effect of ponasterone, the agent used to induce expression of the enzymes, because the control cells harboring the empty vector generated similar levels of signals with or without induction. The attenuation of apoptosis was much more pronounced when cells over-expressed both *FAC14* and *COX-2* (Fig. 4B). We conclude
20 that over-expression of *FAC14* or *COX-2* partially prevents AA-induced apoptosis, and simultaneous over-expression of both enzymes has an additive effect.

We next asked if other polyunsaturated fatty acids induced apoptosis and observed that eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) were effective. Both of these fatty acids are substrates for *COX-2* although DHA is not as good as either AA or
25 EPA. See W.L. Smith et al., 271 *J. Biol. Chem.* 33157-33160 (1996). The fold-increase in apoptosis was 8.5-, 9.1-, 15.1- and 4.2-fold after treatment with 200 μ M AA, 200 μ M

WO 02/16575

PCT/US00/22920

EPA, 100 μ M DHA and 200 μ M PA, respectively. By inducing COX-2 over-expression, apoptosis in response to AA was reduced by 36.7% (n=3, P<0.001), to EPA by 34.0% (n=3, P<0.01), to DHA by 18.5% (n=3, P>0.05), and to PA by only 8.1% (n=3, P>0.05). Thus, prevention of apoptosis by over-expression of COX-2 correlated with the suitability of the fatty acid as substrate. To test whether the protective effect of COX-2 required its catalytic activity, as suggested by the results with different fatty acids, we compared the level of apoptosis in cells with wild type COX-2 to that in cells with an inactive mutant COX-2 (L547K). In contrast to wild type COX-2, over-expression of the mutant COX-2 did not inhibit apoptosis (Fig. 4C). We next tested the effect of NSAIDs on this response and found that 6-methoxy-2-naphthylacetic acid (50 μ M), a selective inhibitor of COX-2, abolished the prevention of apoptosis by COX-2. In contrast, indomethacin (10 μ M, a concentration that inhibits Cox-1 but does not inhibit COX-2) (See E. A. Meade et al., 268 *J. Biol. Chem.* 6610-6614 (1993)) did not alter the apoptosis response (Fig. 4C). Thus, inhibition of COX-2 had a pro-apoptotic effect.

15 The protection from apoptosis could have resulted from the extensive removal of free AA, or alternatively, the production of metabolites. To distinguish between these two mechanisms, we performed several experiments: first, we compared the secretion of PGE₂, the major product of the COX-2 pathway, in the COX-2 single and the FA₁CL4/COX-2 double stable lines. The double stable cells secreted ~28% of the amount of PGE₂ secreted by the COX-2 single stable cells (Fig. 4D). This most likely resulted from competition between COX-2 and FA₁CL4-mediated pathways for the pool of free AA. This result strongly favors the interpretation that depletion of AA, and not the generation of products, was responsible for the prevention, since the double stable cells prevented apoptosis more effectively than the COX-2 single stable cells even though they produced a much lower level of prostaglandins. Furthermore, we directly added PGE₂ (50 μ M) and PGJ₂ (5 μ M) to the cells and found that they did not improve cell viability in the presence of exogenous AA (not shown). Another possibility was that the prevention resulted from an alteration in

WO 02/16575

PCT/US00/22920

HETE synthesis via the LOX pathways because of the decreased availability of free AA in the double stable cells. We detected 15-LOX in 293 cells and found that the LOX inhibitor NDGA induced apoptosis, as reported previously (See D.G. Tang et al., 93 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 5241–5246 (1996)), moreover, addition of 15-HETE did not affect cell survival in 293 cells (not shown). Taken together, these results support the hypothesis that a high level of free AA triggers apoptosis, while its depletion blocks apoptosis. To obtain direct evidence, we next estimated the relative amounts of free AA in the different cell lines by measuring the amount released into the medium. See S. Jayadev et al., 269 *J. Biol. Chem.* 5757–5763 (1994). After induction of the “sink”, AA was reduced to 67%, 61% and 26% in the FACLA, COX-2 and the double stable cells, respectively, compared to the counterparts without induction (Fig. 4E).

Example 5: The arachidonic acid metabolic “sink” also prevents TNF α -mediated killing.

We next tested if the “sink” for AA could apply to prevent cell death in other circumstances, for example, TNF α -mediated killing. TNF α exerts cytotoxic and cytostatic effects against certain tumor cells, and release of AA by cPLA₂ clearly has been implicated in this process. See M. Hayakawa et al., 268 *J. Biol. Chem.* 11290–11295 (1993); and S. Jayadev et al., 272 *J. Biol. Chem.* 17196–17203 (1997). In the cells that overexpressed FACLA or COX-2, the cell survival after TNF α treatment was increased moderately (not shown), and it was significantly improved in the FACLA/COX-2 stable cells: the surviving fraction increased from 43.5% to 70.5% (n=3, P< 0.001) (Fig. 5A). We observed that cell survival in the double stable cells was better than that in control cells even without induction. This probably resulted from a slight leak in promoter regulation of the cDNA constructs. We also examined cell survival in response to another agonist, Ca²⁺ ionophore A23187, which stimulates AA release by cPLA₂ (See L.-L. Lin et al., 89 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 6147–6151 (1992)): survival was higher in induced FACLA or COX-2

WO 02/16575

PCT/US00/22920

stable cells than in their uninduced counterparts (not shown). The improvement was even more pronounced in the double stable cells: cell survival rose from 37.8% to 67.8% (t test, n=3, P<0.01) (Fig. 5A). We repeatedly observed synergistic actions by over-expression of both *FACL4* and *COX-2*. We also found that the *COX-2* specific inhibitor (6-methoxy-2-naphthylacetic acid) partially abolished the improvement in cell survival in the double stable cells (not shown). To further test whether the improvement of cell survival was a consequence of reduction of the level of free AA, we performed a pulse-chase experiment and measured the AA released to the medium after A23187 treatment. Control cells released a large amount of AA in response to A23187, but its release was completely abolished by over-expression of *FACL4* and *COX-2* (Fig. 5B). This demonstrated that diversion of AA into metabolic pathways (a sink) resulted in a low cellular concentration even under conditions of a strong stimulus for AA release. These results support that a rise in the level of AA is a key step in TNF α - and A23187-mediated killing and that free AA mediates cell death signaling initiated by a variety of stimuli.

15 **Example 6: The AA-induced apoptosis is suppressed by antioxidants and Bcl-2.**

Lipid peroxidation often is a component of apoptosis (See D.M. Hockenbery et al., 75 *Cell* 241-251 (1993)), and we observed enhanced formation of malondialdehyde and 4-hydroxy-2(E)-nonenal in cells exposed to AA (Fig. 6A). Moreover, apoptosis decreased significantly when the cells were pretreated with antioxidants including deferoxamine, ascorbic acid, trolox and tocopherol (Fig. 6B). We also tested apo-transferrin, a membrane-impermeable antioxidant, and found that it did not alter AA-induced apoptosis (not shown). Thus, antioxidants partially protect against apoptosis by blocking an intracellular oxidative process. Our results suggest that reactive oxygen species are involved in AA-induced apoptosis, which might include peroxidation of the AA, perhaps via non-enzymatic mechanisms. The caspase 3 inhibitor did not block the generation of

WO 02/16575

PCT/US00/22920

peroxidized lipids, which places the accumulation of peroxidized lipids upstream of caspase 3 activation (not shown).

Bcl-2 is an anti-apoptotic protein and one of its effects is to suppress lipid peroxidation. See D.M. Hockenbery et al., 75 *Cell* 241-251 (1993). We transfected cells
5 with a Bcl-2 cDNA and found that it reduced the AA-induced apoptosis and that the reduction correlated with the expression level of Bcl-2 (Fig. 6C). This raised the possibility that the protection from apoptosis observed in the cells with an AA-sink might have resulted from increased expression of Bcl-2 in those cells. Indeed, we found that the expression levels of Bcl-2 increased moderately when FA4 and/or COX-2 are over-
10 expressed (Fig. 6D). Thus, the apoptosis pathway initiated by AA involves lipid peroxidation and can be suppressed by Bcl-2, but the protective effect provided by expression of AA-metabolizing enzymes lies upstream of those steps—by regulating the amount of free AA available.

WO 02/16575

PCT/US00/22920

We claim:

1. A method of screening for potential cancer chemotherapeutic agents comprising the steps of:
 - a. contacting a cell with a test compound, wherein the cell expresses or
5 overexpresses a FACL4 gene product; and
 - b. measuring inhibition of the function of the FACL4 gene product in the cell, wherein a test compound which inhibits the function of the FACL4 gene product is a potential cancer chemotherapeutic agent.
2. The method of Claim 1, wherein the cell is an epithelial cell.
- 10 3. The method of Claim 1, wherein the cell is a fibroblast.
4. The method of Claim 1, wherein the cell is an epithelial tumor cell.
5. The method of Claim 1, wherein the cell is a colorectal cancer cell.
6. The method of Claim 1, wherein the cell is a genetically engineered cell in which the expression of the FACL4 gene product is suppressed.
- 15 7. The method of Claim 1, wherein the cell is a genetically-engineered cell which overexpresses FACL4.
8. A method of screening for potential cancer chemotherapeutic agents comprising the steps of:
 - a. administering a test compound to an animal; and
 - 20 b. measuring inhibition of the function of the FACL4 gene product in the animal, wherein a test compound which inhibits the function of the FACL4 gene product is a potential cancer chemotherapeutic agent.
9. The method of claim 8, wherein the animal is a mouse.

WO 02/16575

PCT/US00/22920

10. The method of claim 8, wherein the animal is a mouse in which one or both
FACL4 alleles have been mutated.
11. The method of claim 8, wherein the animal is a transgenic mouse that
overexpresses the FACL4 gene product in one or more tissues.
- 5 12. The method of claim 8, wherein the animal is a mouse bearing a xenografted
tumor.
13. A method for inhibiting FACL4 activity in a human, comprising administering a
compound which inhibits FACL4 to a human in need of such treatment.
14. The method of Claim 13 wherein the compound is firaecin C.
- 10 15. A method for inhibiting FACL4 activity in a human, comprising administering a
compound which inhibits FACL4 to a human in need of such treatment, wherein
the activity of the compound does not result in significant toxic side effects to the
human.
16. A method for inhibiting FACL4 activity in a human, comprising administering a
15 compound that inhibits FACL4 to a human in need of such treatment, wherein the
ability of the compound to inhibit FACL4 is determined by:
 - a. contacting a cell with a test compound, wherein the cell expresses or
overexpresses a FACL4 gene product; and
 - b. measuring inhibition of the function of the FACL4 gene product in the cell.
- 20 17. A method for treating colon cancer in a human suffering therefrom, comprising
administering a compound that inhibits FACL4 activity to a human in need of such
treatment.
18. A method for treating colon cancer in a human suffering therefrom, comprising:
 - a. administering a compound which inhibits COX-2; and
 - 25 b. administering a compound which inhibits FACL4.

WO 02/16575

PCT/US00/22920

19. A method for evaluating the presence or absence of colon cancer cells in a sample of a suspect tissue comprising the steps of:
- a. isolating the sample of the suspect tissue;
 - b. evaluating the level of FACL4 expression in the cells of the tissue; and
 - 5 c. comparing the level of FACL4 expression in the cells of the tissue with those of a control cell.
20. The method of Claim 19, wherein the method of evaluating levels of FACL4 expression in the cells of the tissue is quantitative RT-PCR.
21. The method of Claim 19, wherein the method of evaluating levels of FACL4
10 expression in the cells of the tissue is immunostaining or in situ hybridization.
22. The method of Claim 19, wherein the method of evaluating levels of FACL4 expression in the cells of the tissue is Western blotting.
23. The method of Claim 19, wherein the control cell is from a non-cancerous
intestinal cell line.
- 15 24. The method of Claim 19, wherein the control is the intestinal epithelial line Int 407.
25. A method for diagnosing colon cancer comprising the steps of:
- a. isolating a sample from a region of suspected cancerous tissue;
 - b. isolating a sample from a region of similar tissue thought to be non-
20 cancerous;
 - c. evaluating levels of FACL4 in each of the samples; and
 - d. comparing the levels of FACL4 in the suspected tissue with those in the non-suspect tissue.

WO 02/16575

PCT/US00/22920

26. The method of Claim 25, wherein the method of evaluating levels of FACL4 expression in the cells of the tissue is quantitative RT-PCR.
27. The method of Claim 25, wherein the method of evaluating levels of FACL4 expression in the cells of the tissue is immunostaining.
- 5 28. The method of Claim 25, wherein the method of evaluating levels of FACL4 expression in the cells of the tissue is immunofluorescence.

WO 02/16575

PC/T/US00/22920

1/10

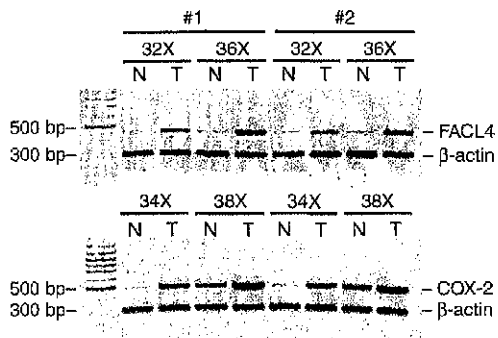


Figure 1A

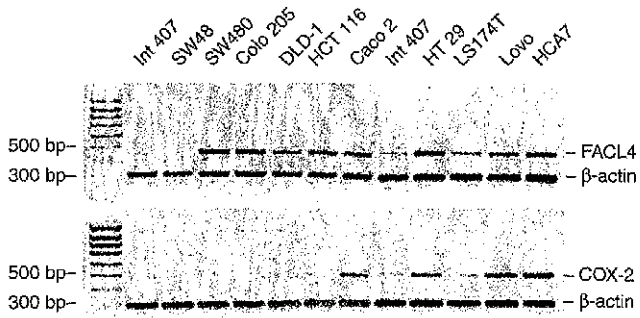


Figure 1B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

2/10

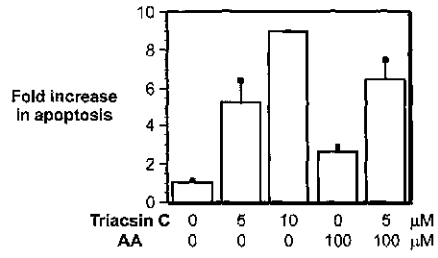


Figure 2A

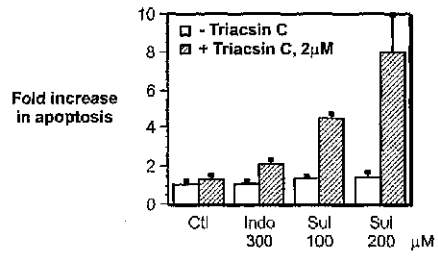


Figure 2B

3/10

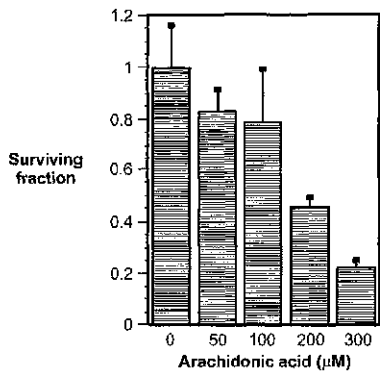


Figure 3A

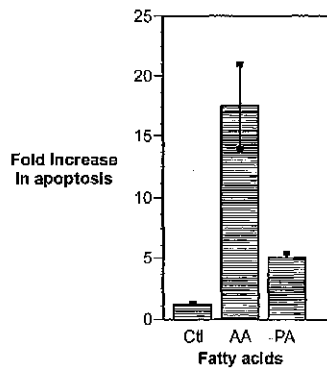


Figure 3B

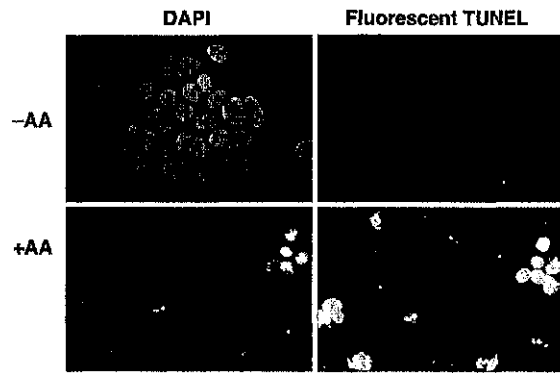


Figure 3C

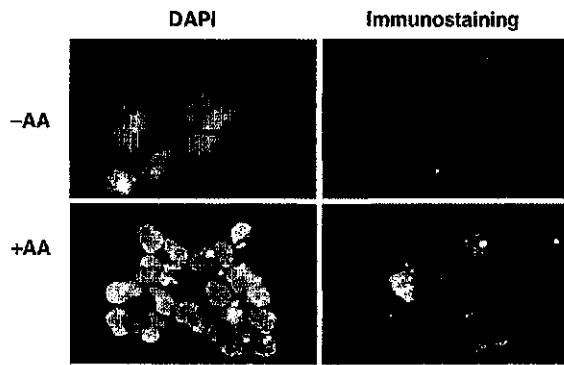


Figure 3D

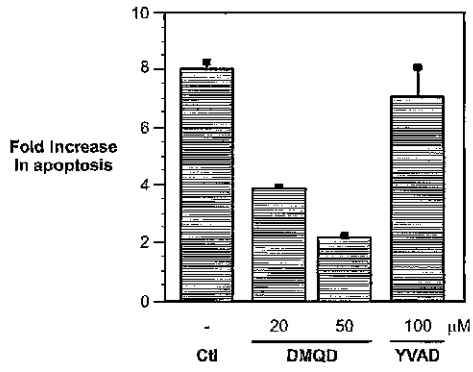


Figure 3E

6/10

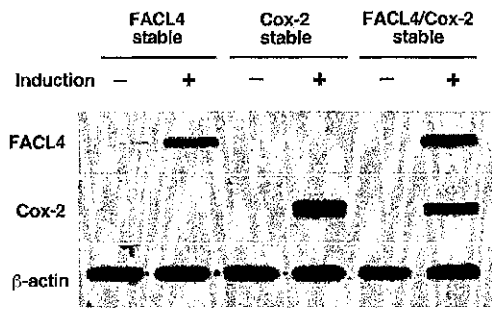


Figure 4A

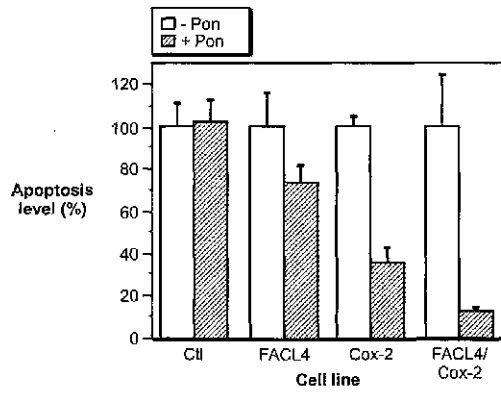


Figure 4B

WO 02/16575

PC/T/US00/22920

7/10

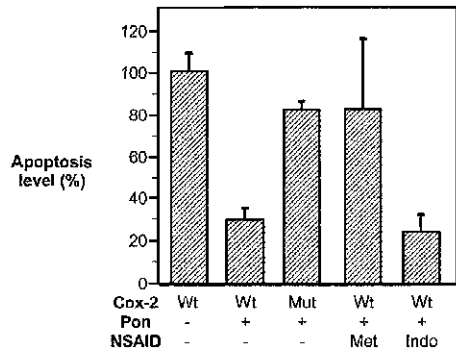


Figure 4C

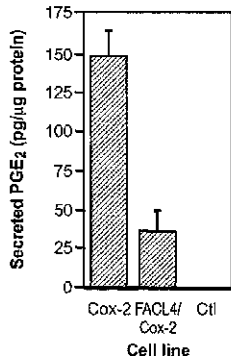


Figure 4D

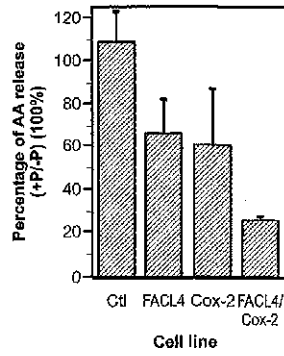


Figure 4E

8/10

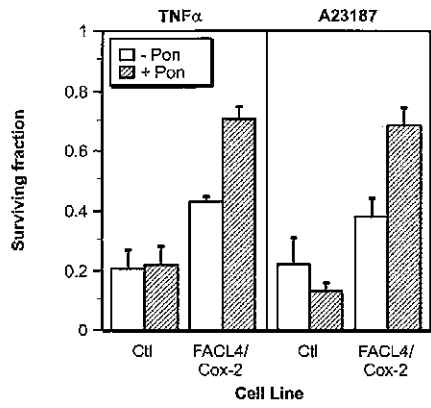


Figure 5A

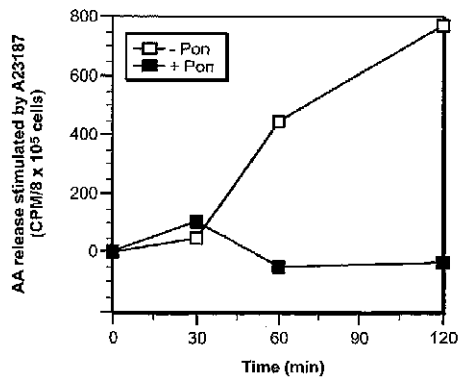


Figure 5B

WO 02/16575

PCT/US00/22920

9/10

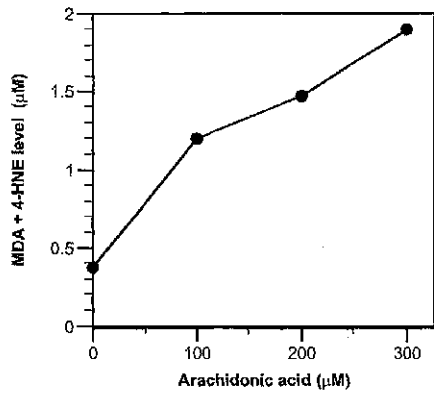


Figure 6A

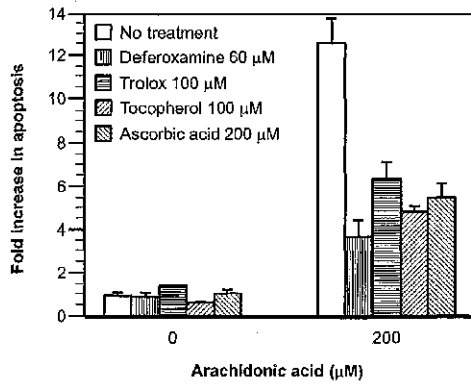


Figure 6B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

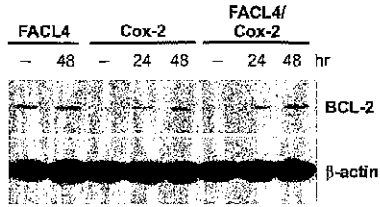


Figure 6C

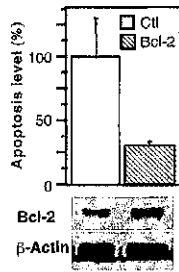


Figure 6D

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/22920
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(T) : C12N 15/00, 15/03, 15/09, 5/00; A61K 31/70; A01N 43/04 US CL : Please See Extra Sheet. 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) U.S. : 51444; 435G, 455, 463, 69.1, 325, 320.1; 8009. 10, 15, 18, 21, 22, 25 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, GENBANK, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE, WEST, NPL search terms: FACLA, fatty acid-CoA ligase, synthetase, COX-2, transgenic, cancer, gene therapy, mouse, animal model		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CAO et al. Cloning, Expression, and Chromosomal Localization of Human Long-Chain Fatty Acid-CoA Ligase 4 (FACLA). <i>Genomics</i> , 1998, Vol. 49, pages 327-330, see entire document.	1-28
Y	NUNN et al. Transport of Long-chain Fatty Acids in Escherichia coli. <i>The Journal of Biological Chemistry</i> , 05 January 1986, Vol. 261, No. 1, pages 167-171, see entire document.	1-28
Y	WILSON et al. Discovery of an Arachidonoyl Coenzyme A Synthetase in Human Platelets. <i>The Journal of Biological Chemistry</i> , 10 April 1982, Vol. 257, No. 7, pages 3510-3515, see entire document.	1-28
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *1* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *2* earlier document published on or after the international filing date *3* document which may have priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (to be specified) *4* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *5* document published prior to its international filing date but later than its priority date claimed *7* 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 *8* document of particular relevance to the claimed invention cannot be considered to be of particular relevance to the invention when the document is taken alone *9* 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 *A* document cited of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 OCTOBER 2000		Date of mailing of the international search report 03 NOV 2000
Name and mailing address of the ISA/CIS Comptroller of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer JILL D. MARTIN Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/22920

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indications, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CAO et al. Expression of fatty acid-CoA ligase 4 during development and in brain. FEBS Letters. 2000, Vol. 467, pages 263-267, see entire document.	1-28
Y	VITELLI et al. Identification and characterization of mouse orthologs of the AMMECRI and FAFL4 genes deleted in AMME syndrome: orthology of Xq22.3 and MmuXF1-F3. Cytogenetics and Cell Genetics. 2000, Vol. 88, pages 259-263, see entire document.	1-28
Y	WATKINS et al. "Human very long-chain acyl-CoA synthetase and two human homologs: initial characterization and relationship to fatty acid transport protein. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids." 1999, Vol. 60, Nos. 5 and 6, pages 323-328, see entire document.	1-28
Y	BERGER et al. "cDNA cloning and mRNA distribution of a mouse very long-chain acyl-CoA synthetase," FEBS Letters. 1998, Vol. 425, pages 305-309, see entire document.	1-28
Y	STEINBERG et al. "Human Liver-Specific Very-Long-Chain Acyl-Coenzyme A Synthetase: cDNA Cloning and Characterization of a Second Enzymatically Active Protein," Molecular Genetics and Metabolism. 1999, Vol. 68, pages 32-42, see entire document.	1-28
Y	STEINBERG et al. "The Human Liver-specific Homolog of Very Long-Chain Acyl-CoA Synthetase Is Cholate: CoA Ligase," The Journal of Biological Chemistry. 26 May 2000, Vol. 275, No. 21, pages 15606-15608, see entire document.	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US06/22920

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
US CL :

514/44, 435/6, 455, 463, 69.1, 325, 320.1; 800/3, 10, 13, 18, 21, 22, 25

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/566	

(72)発明者 プレスコット、スティーブン

アメリカ合衆国 8 4 1 1 2 ユタ州 ソルト レイク シティ サークル オブ ホープ 2 0
0 0 ハンツマン キャンサー インスティテュート ルーム 5 3 6 0

(72)発明者 カオ、ヤン

アメリカ合衆国 8 4 1 1 2 ユタ州 ソルト レイク シティ サークル オブ ホープ 2 0
0 0 ハンツマン キャンサー インスティテュート ルーム 5 3 6 0

Fターム(参考) 4B024 AA12 BA07 CA04 DA02 EA04 GA11 HA12
4B063 QA18 QA19 QQ08 QR32 QR55 QS34
4C084 AA17 NA14 ZB261
4C206 AA01 AA02 HA08 MA01 MA04 NA14 ZB26

专利名称(译)	筛选人脂肪酸-CoA连接酶抑制剂的方法4		
公开(公告)号	JP2004507241A	公开(公告)日	2004-03-11
申请号	JP2002522248	申请日	2000-08-21
[标]申请(专利权)人(译)	犹他大学研究基金会		
申请(专利权)人(译)	犹他州研究基金会大学		
[标]发明人	プレスコットスティーブン カオヤン		
发明人	プレスコット、スティーブン カオ、ヤン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/15 A61K31/435 A61K38/00 A61K45/00 A61P35/00 A61P43/00 C12N9/00 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6886 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C12N9/93 A01K2217/075 A61K31/435 A61K38/00 C12Q1/25 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/136 G01N33/5088 G01N33/57419 G01N2500/00		
FI分类号	C12N15/00.A A61K31/15 A61K45/00 A61P35/00 A61P43/00.111 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/BA07 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS34 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C206/AA01 4C206/AA02 4C206/HA08 4C206/MA01 4C206/MA04 4C206/NA14 4C206/ZB26		
代理人(译)	昂达诚		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供筛选潜在癌症化学治疗剂和潜在化学预防剂的方法，所述化学预防剂通过调节人体中脂肪酸-CoA连接酶4 (FACL4) 的活性起作用。本发明中，通过抑制FACL4基因产物的活性，提高游离的花生四烯酸的细胞水平上，通过诱导花生四烯酸介导的凋亡，对于癌症的治疗中施用这种试剂的方法同样。本发明进一步提供了用于诊断癌症（包括结肠癌）的方法。

【図1B】

