

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 507028

(P2003 - 507028A)

(43)公表日 平成15年2月25日 (2003.2.25)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 48/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 7/06	4 B 0 2 4
48/00		35/02	4 B 0 6 3
A 6 1 P 7/06		C 0 7 K 16/18	4 B 0 6 4
35/02		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 97数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 517546(P2001 - 517546)

(86) (22)出願日 平成12年8月14日(2000.8.14)

(85)翻訳文提出日 平成14年2月13日(2002.2.13)

(86)国際出願番号 PCT/US00/22093

(87)国際公開番号 W001/012648

(87)国際公開日 平成13年2月22日(2001.2.22)

(31)優先権主張番号 60/148,940

(32)優先日 平成11年8月13日(1999.8.13)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ザ ジョージ ワシントン ユニヴァーシ
ティー
アメリカ合衆国 ワシントン ディーシー
20037 ノースウェスト アイ ストリー
ト 2300

(72)発明者 バーグ パトリシア イー
アメリカ合衆国 メリーランド州 20607
アッコキーク サンフォード レーン 1
104

(74)代理人 弁理士 中村 稔 (外 9 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規な転写因子 B P 1

(57)【要約】

グロビン遺伝子のリプレッサーであると考えられる、
転写因子BP1をコードしている配列番号1の分離した
DNAを提供する。該DNAを含むベクターで形質添加
した宿主細胞は、BP1を作製するために用いること
ができる。該BP1オープンリーディングフレームに作
用可能に結合した制御可能なプロモーターを有するベク
ターは、鎌状赤血球貧血症をもつ患者の グロビン産生
細胞を形質転換するために用いることができ、よって治
療される。BP1が白血病や乳がんで過剰発現すること
から、急性骨髄白血病、急性リンパ球性白血病、又は乳
がんは、これらの症状をもつことができる患者の細胞試
料においてBP1が過剰発現するかを求めることにより
スクリーニング及び診断し得る。BP1をコードしてい
るアンチセンスDNA又は該DNAに対するRNAは、
急性骨髄白血病、急性リンパ球性白血病、又は乳がんの
治療として用いることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 BP1をコードしている、配列番号1を有する分離したDNA。

【請求項2】 前記BP1がリプレッサー機能を示す、請求項1記載の分離したDNA。

【請求項3】 前記BP1が、 グロビン遺伝子上流の-530 bpでサイレンサーIに結合し、 グロビン遺伝子上流の-300 bpでサイレンサーIIに結合する、請求項1記載の分離したDNA。

【請求項4】 前記BP1が グロビン遺伝子上流の-530 bpでDNA配列に結合する、請求項1記載の分離したDNA。

【請求項5】 前記BP1が^G グロビン遺伝子上流の-1400 bpと-1100 bpで配列に結合し、^A グロビン遺伝子の-1100 bpで配列に結合する、請求項1記載の分離したDNA。

【請求項6】 前記DNAが1251 bpのcDNAである、請求項1記載の分離したDNA。

【請求項7】 前記DNAがオープンリーディングフレーム(ORF)を有する、請求項1記載の分離したDNA。

【請求項8】 請求項1記載の分離したDNAを含んでいるベクター。

【請求項9】 請求項8記載の該ベクターで形質転換した宿主細胞。

【請求項10】 前記宿主細胞が真核宿主細胞である、請求項9記載の宿主細胞。

【請求項11】 配列番号1を有するDNAに対して相補的なアンチセンスDNA又はアンチセンスRNA。

【請求項12】 鎌状赤血球貧血症を治療する方法であって、BP1の有効量を患者に投与する段階を含む、前記方法。

【請求項13】 患者の グロビン産生細胞を配列番号1のオープンリーディングフレームと制御可能な発現プロモーターを有するベクターで形質転換し、BP1が該患者の該 グロビン産生細胞中で制御可能に生産される、請求項12記載の方法。

【請求項14】 前記BP1が、 グロビン発現を減少させ、HbSの細胞内濃度

を低下させる、請求項12記載の方法。

【請求項15】 急性骨髄白血病又は急性リンパ球性白血病のスクリーニング又は診断方法であって、

(a) 患者から細胞試料を得る段階、及び

(b) BP1が正常細胞と比べて前記細胞試料によって過剰発現しているかを求め、BP1の過剰発現がある場合には、急性骨髄性白血病又は急性リンパ球性白血病の陽性診断を意味している段階

を含む、前記方法。

【請求項16】 該細胞試料が骨髄又は末梢血から得られる、請求項15記載の方法。

【請求項17】 BP1が過剰発現しているかを求める段階(b)が、配列番号1に由来するPCRプライマーを用いてRT-PCR(逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応)を行うことにより達成される、請求項15記載の方法。

【請求項18】 該PCRプライマーが配列番号8と配列番号9のオリゴヌクレオチドであり、BP1の発現が581塩基対(bp)のPCR産物によって示される、請求項17記載の方法。

【請求項19】 該PCRプライマーが配列番号10と配列番号11のオリゴヌクレオチドであり、BP1の発現が225塩基対(bp)のPCR産物によって示される、請求項17記載の方法。

【請求項20】 BP1に対する抗体を準備する段階を更に含み、BP1が正常細胞と比べて前記細胞試料によって過剰発現しているかを求める段階(b)がBP1に対する該抗体を用いたBP1の免疫組織化学的検出によって達成される、請求項15記載の方法。

【請求項21】 乳がんのスクリーニング/診断方法であって、

(a) 患者の乳房組織からの細胞試料を得る段階、及び

(b) BP1が正常細胞と比べて前記細胞試料によって過剰発現しているかを求め、BP1の過剰発現がある場合には、乳がんの陽性診断を意味している段階

を含む、前記方法。

【請求項22】 BP1が過剰発現をするかを求める段階(b)が、配列番号1に

由来するPCRプライマーを用いてRT-PCR(逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応)を行うことにより達成される、請求項21記載の方法。

【請求項23】 該PCRプライマーが配列番号8と配列番号9のオリゴヌクレオチドであり、BP1の発現が581塩基対(bp)のPCR産物によって示される、請求項22記載の方法。

【請求項24】 該RT-PCRプライマーが配列番号10と配列番号11のオリゴヌクレオチドであり、BP1の発現が225塩基対(bp)のPCR産物によって示される、請求項22記載の方法。

【請求項25】 BP1に対する抗体を準備する段階を更に含み、BP1が正常細胞と比べて前記細胞試料によって過剰発現しているかを求める段階(b)が、BP1に対する該抗体を用いたBP1の免疫組織化学的検出によって達成される、請求項21記載の方法。

【請求項26】 BP1タンパク質をコードしているmRNA断片。

【請求項27】 前記BP1がホメオボックス遺伝子と非遠位ファミリーの1種である、請求項1記載の分離したDNA。

【請求項28】 前記BP1が染色体17q21-22に位置している、請求項1記載の分離したDNA。

【請求項29】 BP1に対するポリクローナル抗体。

【請求項30】 BP1に対するモノクローナル抗体。

【請求項31】 BP1をコードしているmRNAのcDNAの基質からユニークなDNA分子を増幅させる一組のPCRプライマーを含む組成物。

【請求項32】 該一組のPCRプライマーが配列番号8と配列番号9のオリゴヌクレオチドを含んでいる、請求項31記載の組成物。

【請求項33】 該一組のPCRプライマーが配列番号10と配列番号11のオリゴヌクレオチドを含んでいる、請求項31記載の組成物。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本出願は、1999年8月13日出願の米国暫定出願第60/148,940号の出願日の恩典を主張する。その暫定出願の明細書の記載は本願明細書に含まれるものとする。

【0002】**合衆国補助金による研究についての供述**

本明細書に記載される研究は、NIH認可R01DK53533の援助を受けたものである。本発明の権利は合衆国政府が所有する。

【0003】**技術分野**

本発明は、転写因子BP1をコードしているDNA、該DNAを含むベクター及び該DNAを含む宿主細胞に関する。本発明は、また、BP1をコードしている該DNAに対するアンチセンスDNA又はRNA、BP1の有効量を投与することによる鎌状赤血球貧血症の治療方法、及び急性骨髄性白血病、急性リンパ球性白血病、又は乳がんをスクリーニングする方法に関する。

(暫定出願では、転写因子BP1は、しばしば『BP1/D1x9』又は『BP1/D1x9』と呼ばれた。本明細書では、明瞭にするために転写因子を簡単に『BP1』と呼ぶ。)

【0004】

グロビンクラスター内のグロビン遺伝子の発現は、赤血球形成細胞に限定され、5種類の異なる遺伝子が胚発生()、胎児発育(G 及びA)及び成人発育(及び)中に発現する。グロビン遺伝子の転写活性化は、転写アクチベータータンパク質を活性化される遺伝子のプロモーターに結合することにより生じるだけでなく、グロビンクラスターの6~18 kb上流に位置する調節要素、遺伝子座制御領域(LCR)によっても生じる(例えば、Berg, P.E. & A.N. Schecher, 1992. ヘモグロビン疾患の分子遺伝学. T. Friedmam(ed), Molecular Genetic Medicine, Academic Press, サンディエゴ; Forrester, W. C., C. Thompson, J. T. Elder, & Groudine, M. 1986. ヒト グロビン遺伝子クラスターにおける発生的に安定なクロマチン構造. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 1359-1363; Tuan, D.

, W. Soloman, Q. Li, & I. M. ロンドン, 1985. ヒト赤芽球細胞における『グロビン様』遺伝子ドメイン. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6384-6388を参照されたい)。個体発生での グロビンクラスター遺伝子の連続活性化は、一定の発生段階で不活性なグロビン遺伝子の抑制によって妨げられるにちがいない。抑制は、リプレッサータンパク質をプロモーター/上流DNAに結合することにより引き起こされ、成人 グロビン遺伝子の場合には、おそらくLCRによる活性化がないことによると思われる(例えば、Crossley, M. & S. H. Orkin, 1993. グロビン座の調節. Curr. Opinion Gen. Dev. 3: 232-237を参照されたい)。グロビン遺伝子近傍のDNA配列に結合する転写アクチベーターについては非常に知られているが、転写を抑制するタンパク質についてはほとんど知られていない。

【0005】

上記のように、BP1は グロビン遺伝子上流の2つのDNA配列に結合することが知られているので、BP1タンパク質が グロビン遺伝子のリプレッサーであることを示す強力な証拠である。本発明は、BP1をコードしているDNA配列、及び乳がん、急性骨髄白血病、又は急性リンパ球白血病のような症状をスクリーニングするためにDNA配列の知識に由来する情報を用いる方法を提供する。DNA配列は、Quinn, L. M., B. V. Johnson, J. Nicholl, G. R. Sutherland, & B. Kalionis, 1997. 非遠位(distal-less)ファミリーの新規な1種、DLX4を含むヒト胎盤からのホメオボックス遺伝子の分離と同定. Gene 187: 55-61; Nakamura S, Stock D W, Wydner KL, Bollekens JA, Takeshita K, Nagai BM, Chiba, Kitamura T, Freeland TM, Zhao Z, Minowada J. Lawrence JB, Weiss KB, & Ruddle FH. 新規な哺乳動物非遠位遺伝子: Dlx-7のゲノム分析. Genomics 1996; 38: 314-324に記載されている他の2つのヒト遺伝子、DLX4とDLX7に密接に関係していることがわかった。

【0006】

多くの種類のがんの生存率は、早期発見と治療に関係する。更に、有効性を調べるために継続しているがん治療を監視することは有益なことである。従って、信頼できるがん細胞スクリーニング方法が依然として求められている。スクリーニング方法は、正常細胞と比べて特定の種類のがん細胞が過剰発現又は不足発現

する遺伝子の発現を検出及びモニターする方法である。検出技術と具体的なマーカーが、例えば、次の米国特許：Smithらの米国特許第5,776,683号；Pardeeらの同第5,965,409号；Coleらの同第6,037,129号；Holtらの同第5,677,125号；Watsonらの同第6,004,756号；Mulshineらの同第5,994,062号；Zonらの同5,700,927号；Rioらの同第5,981,218号に開示されており、これらの明細書の記載は本願明細書に含まれるものとする。

マーカー又はスクリーニング方法は完全に信頼できるものではないことから、追加の遺伝標識が当該技術において依然として求められている。特に、乳がん、急性骨髄白血病又は急性リンパ球性白血病を同定する遺伝標識が依然として求められている。本発明は、DNA BP1組成物及び乳がん、急性骨髄白血病又は急性リンパ球性白血病をスクリーニングする方法を提供することにより当該技術におけるこの問題を克服するものである。

グロビン遺伝子の抑制に関する情報がない当該技術においても問題がある。後述されるように、鎌状赤血球貧血症のような医学的症状が グロビンの発現を抑制することにより治療することができ、本発明は、BP1、推定 グロビンリプレッサーの生産を提供する。

【0007】

発明の開示

本発明の目的は、BP1をコードしているDNA配列を提供することである。

本発明の目的は、更に、マーカー及び急性骨髄白血病又は急性リンパ球性白血病を検出する方法を提供することである。

本発明は、更に、マーカー及び乳がんを検出する方法を提供することである。

本発明は、更に、 グロビン遺伝子の発現を抑制することにより改善し得る症状の治療を提供することである。

本発明の目的は、更に、鎌状赤血球貧血症の治療を提供することである。

本発明の目的は、更に、BP1の発現を遮断することにより改善し得る症状の治療を提供することである。

これらの及び他の目的は、本発明においては、BP1をコードしている、配列番号1を有する分離したDNAを得ることにより達成される。BP1は、リプレッサー機

能を示し、グロビン遺伝子上流のサイレンサーIとIIに結合し、グロビン遺伝子上流の-530 bpの配列にも結合する。

本発明は、また、BP1をコードしているDNAを含むベクター及び該ベクターで形質転換した宿主細胞を含んでいる。

【0008】

代替的实施態様においては、本発明は、BP1をコードしている、アンチセンスDNA又は配列番号1を有するDNAのアンチセンスRNAに関する。

本発明は、更に、鎌状赤血球貧血症の治療方法であって、BP1の有効量を投与する段階を含む、前記方法を提供する。

本発明は、急性骨髄白血病又は急性リンパ性白血病のスクリーニング及び/又は診断方法であって、(a) 患者から細胞試料を得る段階、及び(b) BP1が正常細胞と比べて前記細胞試料によって過剰発現しているかを求める段階を含む、前記方法を提供する。

本発明は、また、乳がんのスクリーニング及び/又は診断方法であって、(a) 患者から細胞試料を得る段階、及び(b) BP1が正常細胞と比べて前記細胞試料によって過剰発現しているかを求める段階を含む、前記方法を提供する。

本発明は、更に、BP1に対するポリクローナル抗体を提供する。

本発明は、更に、配列番号1のDNAを増幅する一組のPCRプライマーを提供する。

。

本発明の上記及び他の目的は、下記の詳細な説明と、単に本発明を行う最良の方法を具体的に説明することによって本発明の好適実施態様のみを図示及び説明している図面から当業者に容易に明かになるであろう。容易に認識されるように、本発明は、本発明の真意と範囲から逸脱することなく当該技術の技能の範囲内で変更し得る。

【0009】

図面の簡単な説明

図1は、グロビンの上流の-100 ~ -600 bpの概略図であり、BP1がキャップ部位(+1)に相対する-530 bpのサイレンサーIと-300 bpのサイレンサーII内で結合し、BP2、他のDNA結合タンパク質が-270 bpのサイレンサーII内で結合している。

ことを示している。

図2は、BP1の予想された結合特異性、即ち、グロビン遺伝子上流のサイレンサーIとII及びグロビン遺伝子上流の-530 bpの配列に結合する能力をもったタンパク質をcDNAがコードしたことを証明するEMSA競合分析の結果を示すオートラジオグラムである。ガラクトシダーゼに融合した推定BP1タンパク質を、溶原菌から発現させた。この融合タンパク質を部分的に精製し、ライブラリーをスクリーニングするために用いられるサイレンサーIIプローブとインキュベートし、矢印で示された1本のシフトしたバンド、レーン1が生じた。

図3Aは、プローブとして630 bp BP1 cDNA(本明細書に記載されるように得られる)の一部を用いたK562 RNAのノーザンブロットの結果を示すオートラジオグラムである。

図3Bは、図3Aと同じプローブを用いた胎児組織のノーザンブロットの結果を示すオートラジオグラムである。

【0010】

図4は、BP1の配列である。この配列は、配列番号1として挙げた結合した配列で示されている。その配列のオープンリーディングフレーム、及び配列番号2と配列番号12として挙げた配列で示されている予想したタンパク質配列が示されている。

図5A及び図5Bは、pRSV/BP1-ORF(ここに記載されるようにサブクローン化した)の増加量又はエンptyベクターに関する一時トランスフェクション分析におけるK562細胞の相対CAT活性を示すグラフである。図5Aにおいては、pCAT/SIが標的DNAであり、図5Bにおいては、pCAT/SIIが標的DNAである。K562細胞を、標的プラスミドと共にエンptyベクターか又はpRSV/BP1-ORFの増加量で一過性にコトランスフェクトした。

図6は、RT-PCRで求めた、赤芽球と骨髄の系統細胞系におけるBP1の発現を示すオートラジオグラムである。

図7A及び図7Bは、RT-PCRで求めた、T細胞ALL細胞系及び赤血球骨髄細胞系におけるBP1、DLX7及びDLX4を示すオートラジオグラムである。

図8は、正常骨髄、B細胞及びT細胞におけるBP1、DLX7及びDLX4の発現を示すオ

オートラジオグラムである。

図9は、急性骨髄白血病におけるBP1、DLX7及びDLX4の発現を示すオートラジオグラムである。6人の患者からの試料が示されている。(-)は、正常な対照と同じか少ない発現を意味し、(+)は、対照より多い発現を意味し、(++)は、(+)の発現比率より少なくとも3倍の発現比率を意味する。

【0011】

図10は、AML及びT細胞ALLにおけるBP1、DLX7及びDLX4の発現を比較しているグラフである。黒色の棒は成人AMLであり、白色の棒は小児T細胞ALLである。

図11は、CD34⁺細胞とCD34⁻細胞におけるBP1発現を示すオートラジオグラムである。

図12は、エンptyベクターを導入した対照細胞(9A及び9B)と比較したBP1アンチセンス産生プラスミド(10B及び10D)で形質転換した細胞系の4日間の経過について生存率%を示すグラフである。

図13は、エンptyベクターを導入した細胞系9A-9B(ライン1-2)及びBP1アンチセンス産生プラスミド10B-10Dで形質転換した細胞系(ライン3-4)のBP1発現を示すオートラジオグラムである。

図14は、乳がん系MCF7、ADR、MDA468及びT47Dを含む数種の乳がん細胞系によるBP1の発現を示し、新規な乳房組織には発現がないことを示すオートラジオグラムである。

図15は、正常乳房組織及び悪性乳房組織におけるBP1の発現を示すオートラジオグラムである。

【0012】

発明実施の最良の形態

本発明は、配列番号1を有するか又は実質的に配列番号1からなり、転写因子BP1をコードしている分離したDNAに関する。転写因子BP1は、グロビンリプレッサー機能を示し、グロビン遺伝子上流のサイレンサーI及びII、グロビン遺伝子上流の-530 bpの配列及びインディアンハプロタイプD配列に結合する。BP1は、典型的には、胎盤や腎で発現する。配列番号1の分離したDNAのオープンリーディングフレームから推論したBP1の予想配列は、配列番号2及び配列番号12

として示される。DNA配列とタンパク質配列双方が、図4において共に示されている。本明細書に用いられる『分離したDNA』という用語は、未変性条件にないDNAを意味する。

本発明の好適実施態様においては、BP1をコードしている分離したDNAは1251 bpのcDNAである。分離したDNAは、オープンリーディングフレーム(ORF)を含んでいる。

本発明は、更に、DNAを含むベクター及びDNAを含む該ベクターで形質添加した宿主細胞に関する。好適実施態様においては、形質転換した宿主細胞は真核宿主細胞である。

【0013】

本発明は、更に、配列番号1を有するDNAのアンチセンスDNA又はアンチセンスRNAを含んでいる。

本発明は、更に、鎌状赤血球貧血症の治療方法であって、BP1の有効量をそれを必要としている患者に投与する段階を含む、前記方法を含んでいる。本発明の方法においては、BP1は、患者における グロビン発現を減少させ、HbSの細胞内濃度を低下させる。

本発明は、更に、急性骨髄白血病又は急性リンパ球性白血病のスクリーニング又は診断方法であって、

- (a) 患者から細胞試料を得る段階、及び
- (b) BP1が正常細胞と比べて前記細胞試料によって過剰発現しているかを求める段階

を含む、前記方法を含んでいる。

本発明は、また、乳がんのスクリーニング又は診断方法であって、

- (a) 患者から細胞試料を得る段階、及び
- (b) BP1が正常細胞と比べて前記細胞試料によって過剰発現しているかを求める段階

を含む、前記方法を含んでいる。

【0014】

白血病や乳がんの発見方法においては、BP1をコードしているmRNAを逆転写酵

素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)で検出することにより又はBP1自体を免疫組織化学的検出により検出することによりBP1の過剰発現を求めることができる。

本発明は、更に、BP1をコードしているmRNAのcDNAの基質からユニークなDNA分子を増幅するPCRプライマーを含んでいる。そのPCRプライマーは、配列番号1のDNA配列から容易に誘導し得る。本明細書に用いられる『ユニークなDNA分子』という用語は、増幅される基質が配列番号1の配列に由来していることを求めるために十分な特異性を有することを意味する。

本発明は、更に、BP1に対するポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を含んでいる。下記のように、ポリクローナル抗体を含む血清の生産を誘導するために、哺乳動物をBP1又はその抗原断片で免疫することによりポリクローナル抗体を得ることができる。BP1に対するモノクローナル抗体は、典型的には、免疫した哺乳動物から脾細胞を分離し、次にBP1に結合する抗体を分泌する融合細胞を同定する段階を含む、ハイブリドーマ技術によって得ることができる。

本発明は、更に、グロビン遺伝子を抑制する方法であって、BP1の有効量を投与する段階を含む、前記方法を含んでいる。

【0015】

本発明のこれらの態様は、更に、次のように確認される。まず、BP1 cDNAのクローニングと一過性コトランスフェクション分析における過剰発現により、グロビン遺伝子のサイレンサーI又はサイレンサーII DNAに結合しているリポーター遺伝子の抑制が引き起こされることがわかる。これにより、BP1がグロビン遺伝子のリプレッサーであることが証明される。配列決定により、BP1をコードしているDNAがホメオボックスを含み、相互に調節しかつ関係ない遺伝子も調節する保存遺伝子のファミリーにDNAが配置されていることがわかる(例えば、Jaynes, J. B. P. H. & O' Farrell, 1988. 共通部位を結合しているホメオドメイン含有タンパク質による転写の活性化と抑制. *Nature* 336: 744-749及びその中の参考文献; Levine, M. & T. Hoey, 1988. 配列特異的転写因子としてのホメオボックスタンパク質. *Cell* 55: 537-540を参照されたい)。配列の比較により、BP1をコードしているDNAがホメオボックス遺伝子の非遠位ファミリーに属し、初期発生中に発現していることが示される(例えば、Cohen, S. M. & G. Jurgens,

1989. ショウジョウバエにおける近位-遠位パターン形成: 肢発生における非遠位遺伝子活性に要求される細胞自律性. *EMBO J.* 8: 2045-2055;

【0016】

Cohen, S. M., G. Bronner, F. Kuttner, G. Jurgens, H. Jackle, 1989. 非遠位はショウジョウバエにおける肢発生に必要とされるホメオドメインタンパク質をコードしている. *Nater* 338: 432-434; Dolle, P., M. プライス & D. Duboule, 1992. 顔面、眼、及び肢発生でのマウスD1x-1ホメオボックス遺伝子の発現. *Differentiation* 49: 93-99; Robinson, G. W. & K. Mahon, 1994. D1x-2及びD1x-3の微分発現ドメインと重複発現ドメインは頭蓋顔面発生において非遠位ホメオボックス遺伝子の異なる役割を示している. *Mech. Dev.* 48: 199-215; Simeone, A., D. Acampora, M. Pannese, M. D'Esposito, A. Stornaiuolo, M. Gulisano, A. Mallamaci, K. Kastury, T. Druck, & K. Huebner, 1994. 脊椎動物D1x遺伝子ファミリーの2種のクローニングと確認. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2250-54; Stock, D. W., D. L. Ellies, Z. Zhao, M. Ekker, F. H. Ruddle, & K. M. Weiss, 1996. 脊椎動物D1xファミリーの進化. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10858-10863を参照されたい)。BP1をコードしているDNAの発現は、非常に限定され、発生的に重要な遺伝子の特徴を示している。

【0017】

BP1のクローニングと確認

材料と方法:

BP1のクローニング: gt11 K562細胞cDNA発現ライブラリー(クロンテック社(Clonotech, Inc.))を、グロビン遺伝子上流の-336~278 bpの配列を含む、サイレンサーII DNAに位置するBP1結合部位を含むオリゴヌクレオチドプローブでスクリーニングした。スクリーニングは、若干変更して記載されている通りにした(例えば、Vinson, C. R., K. L. LaMarco, P. F. Johnson, W. H. Landschulz, & S. L. McKnight, 1988. 組換えバクテリオファージによって指定された配列特異的DNA結合活性の原位置検出. *Genes & Devel.* 2: 801-806を参照されたい)。ろ過物を5%カーネーションインスタント粉乳を含有する結合緩衝液(例えば、Berg, P. E., D. M. Williams, R.-L. Qian, R. B. Cohen, S. X. Cao, M. Mittel

man, & A. N. Schechter, 1989. 共通タンパク質は5' ヒト グロビン遺伝子の2つのサイレンサーに結合する. Nucl. Acids Res. 17: 8833-8852を参照されたい)中で4 で30分間予めハイブリッド形成し、次に同じ緩衝液中で4 で2~12時間振盪しながらハイブリッド形成した。正のプラークを精製し、更に3ラウンドのスクリーニングに供した。

【0018】

電気泳動移動度変位分析(EMSA): 結合反応液には、結合緩衝液(10 mMトリス, pH7.5, 50 mM NaCl, 5%グリセロール, 1 mM DTT, 1 μ lの1 mg/ml BSA, 1 μ gのポリ(dI-dC))に添加した500 pgの融合タンパク質又は250 ngの核抽出物及び5,000-10,000 cpmの³²P-dCTP標識プローブが含まれた。インキュベーションは、室温で30分間とした。核抽出物をDigmanら(Dignam, J. D., R. M. Lebovitz, & R. G. Roeder. 1983. 分離した哺乳動物核からの可溶性抽出物におけるRNAポリメラーゼIIによる正確な転写開始. Nucl. Acids Res. 11: 1475-1489をコードしている参照されたい)に従って調製した。溶原菌からのタンパク質抽出物を記載されているように(例えば、Cowell, I. G. & H. C. Hurst. 199. cDNA発現ライブラリーからのクローニング転写因子, p.120-122. D. S. Latchman(ed.), 転写因子: 実用的方法. IRL P. ニューヨークを参照されたい)調製した。プローブを添加する前に競合物を核抽出物と20分間プレインキュベートした。プローブのオリゴヌクレオチド配列とEMSA分析の競合物を次に示す。

名称	配列
-530 参照	TGTATATATACACATATATATATATATTTTTTTTT CTTTTCTTACCAGAAGGTTT (配列番号3)
-530 インディアン	TGTACATATACACATATATATATATATATA TTTTTTCTTTTCTTACCAGAAGGTTT (配列番号4)
-300	TTCTTATTTGTGTAATAAGAAAATTGGGAAAACG ATCTTCAATATGCTTACCAAGCTG (配列番号5)
-530	TTCTTTTAA TGGATATTTATTTCAATATAAT AAAAAATTAGAGTTTTTA (配列番号6)
非特異	TGCATATATATGTATATGTATGTGTGTATA (配列番号7)

【0019】

プラスミド構築: BP1 cDNAオープンリーディングフレームを発現するプラスミドを構築するために、K562細胞mRNAからRT-PCRによってBP1 cDNAを増幅した。得られた1000 bp産物をpGEM7ベクター(プロメガ社(Promega, Inc.))の中へクローン化し、その同一性を配列決定により確認した。このプラスミドをHind IIIとXba Iで切断してBP1 ORFを遊離し、これをpRc/RSV(インビトロジェン社(Invitrogen, Inc.))の中へ方向性をもってクローン化した。

トランスフェクション及びCAT分析: DMR1E-C試薬(ギブコ-BRL社(Gibco-BRL, Inc.))を用いてK562細胞において一過性トランスフェクション分析を行った。細胞を 5×10^5 細胞/mlの密度まで増殖し、 2×10^6 細胞全部をトランスフェクション反応によって用いた。OPTI-MEM無血清培地(ギブコ-BRL社)を用いて6ウェルプレートにおいてトランスフェクションを行った。8 μ gのプラスミドDNAとサーモン精子DNAの全部を添加して1mlのOPTI-MEM I還元血清培養液(ギブコ-BRL社)中の16 μ lのDMR1E-C試薬と室温で15~45分間複合体を形成した。0.2ml無血清培養液中の 2×10^6 細胞を各ウェルに添加し、プレートを37°Cで4~5時間インキュベートした。2 mlの増殖培地を添加し、48時間後に細胞を収集した。記載されているようにCAT分析を行った(例えば、Berg, P. E., D. M. Williams, R.-L. Qian, R. B. Cohen, S. X. Cao, M. Mittelman, & A. N. Schechter. 1989. 共通タンパク質は5' ヒト グロビン遺伝子の2つのサイレンサーに結合する. Nucl. Acids Res. 17: 8833-8852を参照されたい)。

【0020】

ノーザンブロット分析: RNeasyキットとOligotexキット(キアジェン社(Qiagen, Inc.))を用いてRNAを分離した。2 μ gのmRNAをレーンによって電気泳動し、次に毛管作用でハイボンド(Hybond) N膜(アマースタム(Amerstam))に転写した。RNAをストラトリンカー(Stratolinker)(ストラタジーン(Stratagene))を用いて膜に架橋し、バックグラウンドを排除している標準法か又はサンドイッチ法を用いてる過物をハイブリッド形成した(例えば、Wu, S., Q. Lu, & A. L. Kriz. 1995. ノーザンブロット又はサザンブロットの多重サンドイッチ一段ハイブリダイゼーション. BioTechniques 18: 585-586を参照されたい)。RNAドットブロットは

購入した(クロンテック社(Clontech, Inc.))。プロットに充填されるRNA量は、試料を基準化する必要を取り除く8種類の異なるハウスキーピング遺伝子に対して製造業者によって基準化されている。プローブは、pBluescriptの中へクローニングしたBP1 cDNAをPCR増幅し、引き続きEco RI消化してホメオボックス配列を欠く部分的3' BP1 cDNAを遊離するにより得られた630 bp DNA断片とした。任意開始により標識し、65 °Cで一晩ハイブリッド形成した。プロットを洗浄し、X線フィルムに曝露した。

【0021】

RT-PCR: TRIzol試薬(ギブコBRL)を用いて製造業者の説明書に従って全RNAを分離した。1 µgのRNAをSuperScript II RT(ギブコBRL)を20 µlの全反応容量で用いて逆転写した。16.8 µlの蒸留水、2.5 µlの10×PCR緩衝液(200 mMトリス-HCl [pH 8.4]、500 mM KCl)、1.5 µl 25 mM MgCl₂、0.5 µl 10 mM dNTPミックス(dATP、dCTP、dGTP、dTTP各10 mM)、0.2 µl(1単位)Ampli-Taq DNAポリメラーゼ(パーキンエルマー(Perkin Elmer)及び各1 µlのそれぞれ10 µM アクチン又はBP1の前向き又は逆向きプライマーからなる25 µlの全反応容量の1 µlの逆転写産物でPCRを行った。直線性分析結果に基づき、次のBP1のPCR条件を用いた。各PCRサイクルは、変性段階(94 °C、1分間)、アニーリング段階(58 °C、1分間)及び延長段階(72 °C、1.5分間)が27サイクル、続いて追加のエクステンション(72 °C、5分間)からなつた。581 bpの産物を増幅するように設計されたプライマーは、前向き: 5' -CACC TCCTGTCTTACCCCTACACC-3' 配列番号8; 逆向き: 5' -GCCCTTCCCCAGATTACATCATC-3' 配列番号9とした。PCR産物を2%アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウムで可視化した。産物を制限酵素により切断及び内部プローブによるハイブリダイゼーションで証明した。

また、225 bpの産物は、次のプライマー: 前向き5' GTATGGCCACCTCCTGTCTT-3' (配列番号10)及び逆向き: 5' -GAGTAGATGGTCCTCGGCTT-3' (配列番号11)で次の条件下: 94 °Cで2分間; 次に94 °Cで1分間、62 °Cで1分間及び72 °Cで1.5分間、30サイクル; 72 °Cで10分間で得ることができる。

【0022】

BP1 cDNAのクローニング

ヒトK562細胞から作成した gt11 cDNA発現ライブラリーを-300 bp BP1結合部位を含む多量体化オリゴヌクレオチドを用いてプローブした。200万のプラークをスクリーニングし、-300 bp BP1結合部位を認識するが負の制御配列を認識しないタンパク質を発現した1つの正のプラークを分離した。

cDNAが予想したBP1の結合特異性、即ち、 グロビン遺伝子上流のサイレンサーI及びIIと グロビン遺伝子上流の-530 bpの配列に結合する能力(例えば、Berg, P.E., S. Abhyankar, & M. Chase. 1994. 高速移動群タンパク質HMG-1(Y)はヒト グロビン遺伝子上流のサイレンサーDNA配列に結合する. Blood 84 Suppl 1: 262aを参照されたい)をもつタンパク質をコードしていることを証明するために、EMSA競合分析を行った。 ガラクトシダーゼに融合された推定BP1タンパク質を、上記のように 溶原菌から発現した。

【0023】

この融合タンパク質を部分的に精製し、ライブラリーをスクリーニングするために用いられるサイレンサーIIプローブとインキュベートし、矢印で示される(図2、レーン1)1本のシフトしたバンドを得た。上方のバンドはウェルの位置の印であり、下方のバンドはシフトしていないプローブを有する。冷競合物を100×と200×のモル過剰量で添加して特異性を求めた。シフトしたバンドは、自己DNA(非標識-300結合部位、レーン2-3)、参照配列(野生型)か又はインディアンハプロタイプ配列を含むサイレンサーIにおける-530 bpのBP1結合部位(レーン6-9)、及び グロビンインキュベートの上流に見られる(レーン10-11)が非特異DNA(レーン4-5)に見られないBP1結合部位によって競合した。インディアン配列は、参照配列より良好な競合物であり、以前にK562核抽出物を用いて見られたように、BP1のインディアン配列への結合が強固であることに留意されたい(例えば、Elion, J., P. E. Berg, C. Lapoumeroulie, G. Trabuchet, M. Mittelman, H. Krishnan, A. N. Schechter, & D. Labie. 1992. 5' グロビン遺伝子の負の制御領域のDNA配列の変化は 突然変異の表現型発現と相関する. Blood 79: 787-792を参照されたい)。負の対照、純粋な ガラクトシダーゼタンパク質は、プローブに対して結合活性を示さなかった(データは示していない)。従って、EMSA分析から、融合タンパク質の結合特性がBP1に予想されたものにあてはまるこ

とが証明された。

【0024】

得られたBP1 cDNAは長さが630 bpであった。この配列の一部をK562 RNAを含むノーザンブロットにおいてプローブとして用いた場合、2.1 kbのRNAバンドが確認された(図3A)。この結果から、不完全なcDNAがクローン化されたことが示された。cDNA配列を伸長するために、cDNA端の急速増幅(RACE)を用いた。5' と3'の双方の向きに配列を追加し、1366 bpのcDNAを得た。続いて、微調整により、配列番号1の1251 bp配列が得られた(図4)。更に、予想されたオープンリーディングフレーム(ORF)も得られた。

BLSTを用いたコンピュータ分析から、BP1がホメオボックス(HB)を含み、発生に重要であることが知られる遺伝子のファミリーに配置されていることが示された。数種のホメオボックス遺伝子のサブファミリーが特定されている。これらの遺伝子のホメオボックスに対する配列相同に基づき、BP1は非遠位(Dlx)ファミリーの1種である。図4においては、ホメオボックスは下線が引かれ、ホメオドメインに見られる3つの予想ヘリックスを含むアミノ酸(例えば、Pabo, C. O. & R. T. Sauer. 1992. 転写因子: 構造ファミリーとDNA確認の原理. Annu. Rev. Biochem. 61: 1053-1095を参照されたい)が示されている。第2ヘリックスと第3ヘリックスは、ホメオドメインの特徴を示すヘリックス-ターン-ヘリックス(HTH)モチーフを含んでいる。推定翻訳開始部位は、コザック(Kozak)共通配列との相同により求めた(例えば、Kozak, M. 1987. 699脊椎動物メッセンジャーRNAからの5'非コード配列. Nucl. Acids Res. 15: 8125-8148を参照されたい)。オープンリーディングフレーム(ORF)とその予想アミノ酸配列を示す。

【0025】

一過性トランスフェクション分析:

クローン化BP1 ORFの機能を調べるために、一過性トランスフェクション分析を行った。上記のオープンリーディングフレーム(ORF)をサブクローン化してpRSV/BP1-ORFをつくった。K562細胞を、標的プローブと共にエンブティベクター又はpRSV/BP1-ORFの増加量で一過性にコトランスフェクトした(図5A及び図5B)。標的DNAは、CATリポーター遺伝子に融合した グロビンプロモーターを含む発現

ベクターの中へクローン化したサイレンサーI(p CAT/SI)又はサイレンサーII(p CAT/SII)からなった。このプラスミドは、始めはサイレンサーIやIIを特定する実験に用いたものである(例えば、Berg, P. E., D. M. Williams, R.-L. Qian, R. B. Cohen, S. X. Cao, M. Mittelman, & A. N. Schechter. 1989. 共通タンパク質は5' ヒト グロビン遺伝子の2つのサイレンサーに結合する. Nucl. Acids Res. 17: 8833-8852を参照されたい)。CAT活性をコトランスフェクトした内部標準、pCMV/ galに対して基準化した。CAT比活性を、pRSV/BP1-ORFを導入した細胞のCAT活性とエンブティベクターのみを導入した細胞のCAT活性に対する比率として計算した。pRSV/BP1-ORF DNAの増加量をp CAT/SIに添加した場合(図5A)、CAT活性は用量依存方式で抑制され、プラークは3 µgのpRSV/BP1-ORFから開始した。同様に、pRSV/BP1-ORF DNAをp CAT/SIIに増量添加すると、CATリポーター遺伝子の抑制が増加した(図5B)が、添加最少量、1 µgはCAT発現の急激な減少が生じた。対照のサイレンサーDNAを欠く CATプラスミドは、pRSV/BP1-ORFの添加に対して応答しなかった(データは示していない)。従って、BP1は、グロビン遺伝子の両サイレンサーに対して抑制活性を示すことがわかった。

【0026】

BP1の発現分析:

ヒト組織や細胞系におけるBP1発現パターンを求めるためにノーザン分析を行った。胎盤においては、BP1プローブによって、2.1 kb、2.6 kb及び3.2 kbの3本のバンドが確認された(図3A)。胎児組織のノーザンプロットもプローブし、結果を図3Bに示した。胎児腎と肺(レーン1と3)双方に2.1 kbと6.3 kbのバンドで発現があり、胎児肝又は脳(レーン2と4)には発現が検出されなかった。BP1がクローン化されたK562細胞では唯一のバンドであるので、2.1 kbバンドはBP1に対応すると思われる。その他のバンドは、更に、ホメオボックス遺伝子と共通して関連があるイソ型であり得る(例えば、Cohen, S. M. & G. Jurgens. 1989. ショウジョウバエにおける近位-遠位パターン形成: 肢発生における非遠位遺伝子活性に要求される細胞自律性. EMBO J. 8: 2045-2055; Lowney, P., J. Corral, M. M. LeBesn, L. Deaven, H. J. Lawrence, & C. Largman. 1991. ヒトHoxIホメオボックス遺伝子は造血細胞において代替的転写物の骨髓特異的発現を示す. Nu

cl. Acids Res. 19: 3443-3449. O' Connor, M. B., R. Binari, L. A. Perkins, & W. Bender. 1988. ビトラックス複合体のウルトラビトラックスドメインからの代替RNA産物. EMBO J 7: 435-445を参照されたい)。

組織の広範囲スペクトルの発現を分析するために、50種の組織から正常ヒトRNAを含むドットプロットをプローブした(下記の表1)。胎盤と腎には強い発現が見られ、大脳皮質、脾、乳腺、小腸、肺、胎児肺及び胎児腎には弱い発現が見られた(後の2つは図3BのノーザンプロットとRNAドットプロットの両方にあった)。41種の追加組織からのRNAには発現が示されなかった。

【0027】

表1 BP1の組織特異的発現

強い	弱い	なし	なし
胎盤 腎	大脳皮質 脾 乳腺 小腸 肺 胎児肺 胎児腎	全脳 扁桃腺 尾状核 小脳 海馬 前頭葉 延髄 後頭葉 被殻 黒質 側頭葉 視床腹側部 核 胸腺 心臓 大動脈 骨格筋 結腸 膀胱 子宮 前立腺 胃 精巣 卵巣 膵臓 副腎	甲状腺 唾液腺 下垂体 気管腺 末梢 白血球 リンパ節 骨髄 垂 視床 肝 脊髄 胎児脾 胎児胸腺 胎児脳 胎児心臓 胎児肝

【0028】

これまでは、正常な造血発生や白血病細胞系で、しばしば系統特異方式で発現するHOXファミリーに属する25種のヒトホメオボックス遺伝子が記載されている（例えば、Lawrence, H. J. & C. Largman. 1992. 正常造血や白血病におけるホメオボックス遺伝子. Blood 80: 2445-2453を参照されたい）。従って、赤芽球系統細胞系と骨髄系統細胞系におけるBP1の発現をRT-PCRで調べた（図6）。赤芽球K562とHEL細胞と単球THP-1とU937細胞に最も強い発現が見られ、巨核球MEG-01細胞と単球/顆粒球HL60細胞の発現は弱かった。この実験に用いられる細胞系に

ついて造血系統における遺伝子の発現がしばしば調べられているが、白血病に由来していることは留意すべきである。

【0029】

上記のように、BP1はリプレッサー機能を示すものである。ORFを含むプラスミドの増加量を用いると、サイレンサーI又はII DNAを含む標的 CATリポーター遺伝子の抑制が増してくる。リポーター遺伝子の発現は、完全には消えず、これはおそらく低存在量のリプレッサータンパク質の結合が更に要求されるためであると思われる。そのようなタンパク質はBP2であってもよく、これもサイレンサーI DNAに結合し、リプレッサー機能をもつと思われる(例えば、Berg, P. E., D. M. Williams, R.-L. Qian, R. B. Cohen, S. X. Cao, M. Mittelman, & A. N. Schechter. 1989. 共通タンパク質は5' ヒト グロビン遺伝子の2つのサイレンサーに結合する. *Nucl. Acids Res.* 17: 8833-8852 & Ebb, D., D. C. Tang, L. Drew, K. Chin, P. E. Berg, & G. P. Rodgers. 1998. 成人 グロビン様遺伝子を抑制する調節要素の同定. *Blood Cells, Mol., Dis.* 24: 356-369)。データ及び無傷BP1結合部位がサイレンサーII機能に必要とされる実体(例えば、Ebb, D., D. C. Tang, L. Drew, K. Chin, P. E. Berg, & G. P. Rodgers. 1998. 成人 グロビン様遺伝子を抑制する調節要素の同定. *Blood Cells, Mol., Dis.* 24: 356-369を参照されたい)は、BP1がたぶん グロビン遺伝子のリプレッサーであることを示している。それだけで、クローン化すべき最初の グロビンリプレッサーである。

【0030】

BP1は、ホメオボックス遺伝子や非遠位ファミリーの1種である(例えば、Cohen, S. M., G. Bronner, F. Kuttner, G. Jurgens, & H. Jackle. 1989. 非遠位はショウジョウバエにおける肢発生に必要とされるホメオドメインタンパク質をコードしている. *Nature* 338: 432-434を参照されたい)。ホメオボックス遺伝子は、突然変異時に莫大な形態異常が生じることからマスター調節遺伝子として知られる。非遠位遺伝子は、マウス、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュ又はヒトのような異種の生物体に見られる(例えば、Stock, D. W., D. L. Ellies, Z. Zhao, M. Ekker, F. H. Ruddle, & K. M. Weiss. 1996. 脊椎動物D1xファ

ミリーの進化. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10858-10863を参照されたい)。シヨウジョウバエにおいては、非遠位(D11と呼ばれる)は、頭部と胸郭の幼虫感覚器官の正常な発生に必要である。幼虫と成体のハエにおいては、D11は、肢の末端領域の発生に重要な役割を果たしている(例えば、Cohen, S. M. & G. Jurgens. 1989. シヨウジョウバエにおける近位-遠位パターン形成: 肢発生における非遠位遺伝子活性に要求される細胞自律性. EMBO J. 8: 2045-2055; Cohen, S. M., G. Bronner, F. Kuttner, G. Jurgens, & H. Jackle. 1989. 非遠位はシヨウジョウバエにおける肢発生に必要とされるホメオドメインタンパク質をコードしている. Nature 338: 432-434を参照されたい)。

【0031】

シヨウジョウバエには単一D11遺伝子があるが、他の生物体には多重非遠位遺伝子がある。哺乳動物には、7種の非遠位(哺乳動物ではD1xと呼ばれる)遺伝子が同定されている。マウスの発生中、D1x遺伝子は、さいきゅう(鰓弓)、前脳、肢、目、歯、骨又は顔面間充織で発現する(例えば、Dolle, P., M. Price & D. Duboule. 1992. 顔面、眼、又は肢発生でのマウスD1x-1ホメオボックス遺伝子の発現. Differentiation 49: 93-99, Robinson, G. W. & K. Mahon. 1994. D1x-2及びD1x-3の微分発現ドメインと重複発現ドメインは頭蓋顔面発生において非遠位ホメオボックス遺伝子の異なる役割を示している. Mech. Dev. 48: 199-215; Si meone, A., D. Acampora, M. Pannese, M. D' Esposito, A. Stornaiuolo, M. Gulisano, A. Mallamaci, K. Kastury, T. Druck, & K. Huebner, 1994. 脊椎動物D1x遺伝子ファミリーの2種のクローニングと確認. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2250-54を参照されたい)。

【0032】

BP1と2つの最近発見されたヒト遺伝子、DLX7(例えば、Nakamura S, D. W. Stock, K. L. Wydner, J.A. Bollekens, K. Takeshita, B. M. Nagai, S. Chiba, T. Kitamura, T. M. Freeland, Z. Zhao, J. Minowada. J. B. Lawrence, K. B. Weiss, & F. H. Ruddle. 1996 新規な哺乳動物非遠位遺伝子: D1x-7のゲノム分析. Genomics 38: 314-324を参照されたい)とDLX4(以前にはD1x8と呼ばれた; 例えば、Quinn, L. M., B. V. Johnson, J. Nicholl, G. R. Sutherland, & B.

Kalionis, 1997. 非遠位ファミリーの新規な1種、DLX4を含むヒト胎盤からのホメオボックス遺伝子の分離と同定. *Gene* 187: 55-61を参照されたい) は、ホメオボックスが同じであるのでイソ型であると思われ、広範囲の相同領域を示すものである。インサイチュハイブリダイゼーションにおいて蛍光を用いて、BP1の位置が染色体17q21-23、またDLX7とDLX4の遺伝子座に決定された。更に、BP1とDLX7 (例えば、Nakamura S, D. W. Stock, K. L. Wydner, J.A. Bollekens, K. Takeshita, B. M. Nagai, S. Chiba, T. Kitamura, T. M. Freeland, Z. Zhao, J. Minowada. J. B. Lawrence, K. B. Weiss, & F. H. Ruddle. 1996. 新規な哺乳動物非遠位遺伝子: Dlx-7のゲノム分析. *Genomics* 38: 314-324; Price. J. A., D. W. Bowden, J. T. Wright, M. J. Pettenati, & T. C. Hart. 1998. 毛歯-骨(TD0)症候群と関連があるD1x3における突然変異の同定. *Hum. Mol. Gen.* 7: 563-569を参照されたい) は、BP1のヌクレオチド565~1250の完全配列同一性を共有するが、ヌクレオチド565の上流は相同性がない。BP1とDLX4間の配列相同性は、BP1のヌクレオチド565から始まり、ホメオボックスを含んでいる。DLX7とDLX4の機能は、不明である。しかしながら、K562細胞におけるDLX7発現の抑止は、アポトーシスを引き起こす (例えば、Shimamoto, T., S. Nakamura, J. Bollekens, F. H. Ruddle & K. Takeshita. 1997. Dlx-7ホメオボックス遺伝子の阻害はGATA-1遺伝子とc-myc遺伝子の発現減少とアポトーシスを引き起こす. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3245-3249を参照されたい)。予備的データから、BP1の欠除はK562細胞におけるアポトーシスを引き起こすことが示される。

【0033】

BP1の驚くべき特徴は、その限定された発現である。BP1 mRNAは、胎盤と腎において最も強く発現する (表1及び図3)。ホメオボックス配列はプローブ内に有しないが、DLX7に対する部分的配列相同性があった。従って、胎盤や骨髄におけるRT-PCRによるBP1の発現は、BP1特異的プライマーを用いて評価し、正しいサイズのバンドが見られた。弱いハイブリダイゼーションを示す7種の組織は、BP1及び/又はDLX7を発現させることができる。

【0034】

41種の組織は、BP1発現がなかった。BP1が成人グロビン遺伝子発現を抑制する

場合には、BP1 mRNAが胎児肝と胎児脾に存在しないことは驚くべきことであった。しかしながら、これらの組織の双方が胎生24週の胎児から得られ、そのときまでにグロビン発現が既に始まっていた(例えば、Ley, T. J., K. A. Maloney, J. I. Gordon & A. L. Schwartz. 1989. 赤芽球ヒト胎児肝細胞におけるグロビン遺伝子発現. *J. Clin. Invest.* 83: 1032-1038, Mavilio, F., A. Giampaolo, A. Care, G. Migliaccio, M. Calandrini, G. Russo, G. L. Pagliardi, G. Mastroberardino, M. Marinucci, & C. Peschle. 1983. ヒトヘモグロビンスイッチングの分子機構: 胚、胎児、及び成人赤芽球における選択的低メチル化と発現. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 80: 6907-6911; Papayannopoulou, T., T.H. Shepard, & G. Stamatoyannopoulos. 1983. 抗- α -グロビン鎖と抗- β -グロビン鎖蛍光抗体を用いた初期ヒト胎児の赤芽球細胞におけるヘモグロビン発現の研究, p.421-430. G. Stamatoyannopoulos & A.W. Nienhuis(ed.), *グロビン遺伝子発現と造血分化*. Alan R. Liss, ニューヨークを参照されたい)。この点を更に調べるために、RT-PCRを4つの胎生10週肝試料について行った。10週まででさえ、

グロビン転写が始まっており(例えば、Ley, T. J., K. A. Maloney, J. I. Gordon & A. L. Schwartz. 1989. 赤芽球ヒト胎児肝細胞におけるグロビン遺伝子発現. *J. Clin. Invest.* 83: 1032-1038を参照されたい)、30サイクルの増幅試料を用いたBP1発現は検出されなかった。35サイクルに4つの試料の各々に正しいサイズの検出可能なバンドが見られた。従って、胎児肝のBP1の量は非常に少量であり、卵黄嚢組織は、発現のパターンを良好に追跡するのに利用できる。

【0035】

少なくとも25のHOX遺伝子、ヒトホメオボックス遺伝子の最大ファミリーは、造血発生で、しばしば系統特異的方式で発現する(Lawrence, H. J. & C. Largman. 1992. 正常造血と白血病におけるホメオボックス遺伝子. *Blood* 80: 2445-2453に総説されている)。しかしながら、これらの遺伝子の機能は不明である。BP1をグロビン遺伝子の調節因子として同定すると、これが造血において既知の機能をもつ最初のヒトホメオボックス遺伝子になる。

上記のサイレンサーIとサイレンサーIIの結合部位の他に、BP1によって調節することができる潜在的遺伝子標的を更に同定した。既知のBP1結合部位に対して

少なくとも75%の相同性をもつDNA配列を同定するために配列分析を行った。グロビン遺伝子上流に3つの部位が同定された。これらの3つの部位は、G⁻グロビン遺伝子上流の-1427 bpと-1091 bp及びA⁻グロビン遺伝子上流の-1091 bpに位置している。これらの部位は、電気泳動移動度変位分析を用いてBP1タンパク質の結合部位であることがわかった。

【0036】

ポリクローナル抗体の作成、免疫沈降及びウェスタンブロッティング

ポリクローナル抗体を、ウサギにおいてユニークなN末端BP1ペプチドSYPTYEPANPGDSYLSCQQ(配列番号13)(リサーチジェネティクス(Research Genetics))に対して高めた。新たに調製したK562細胞タンパク質溶解物をプロテインAセファロースビーズ(バイオラド)を用いて免疫沈降させた。同量のK562タンパク質溶解物、免疫沈降した溶解物及び試験管内転写/翻訳タンパク質産物を12.5%SDS-PAGEゲルによる分析に用いた。タンパク質を電気泳動でニトロセルロース膜に転写した。BP1抗体をPBS(1:2500)に希釈し、室温で2時間添加し、次に抗ウサギ二次抗体を添加した。推奨されたプロトコール(アマシャムファルマシアバイオテック)に従ってECLキットを用いてシグナルの検出を行った。

【0037】

アンチセンスBP1 DNAを含むプラスミドの作成

239 bp(ヌクレオチド219~558)のBP1 DNA断片を、次のように、ベクターpMTの中へアンチセンスの向きでメタロチオネインプロモーターの制御下にクローン化した。BP1 cDNAのヌクレオチド219とヌクレオチド1231間のDNAを増幅するプライマーを用いてRT-PCRを行った。この断片を blunt end にし、pGEM7の中へクローン化した。pGEM7のポリリンカーの5' BamHI部位とヌクレオチド558のXho I部位(BP1の内部)を用いてベクターからBP1 DNAを遊離した。239 bpのこのBP1断片をpMTの中へアンチセンスの向きで方向性をもってクローン化した。(例えば、Canelles, M., Delgado, M.D., Hyland, K.M. Lerga, A., Richard, C., Dang, C.V. & Leon, J. (1997) cMyc最大阻害変異体はヒト骨髄細胞において赤芽球分化とアポトーシスに対する抵抗を含んでいる. Oncogene 14, 1315-1327を参照されたい)。

【0038】

鎌状赤血球貧血症の治療

グロビン遺伝子の6番目のコドンの突然変異が鎌状赤血球貧血症を引き起こす。鎌状赤血球貧血症の現在の治療は、胎児ヘモグロビン遺伝子の回復に集中している。その治療には、遺伝子治療が含まれてもよく、グロビン遺伝子を置き換えるか又は胎児グロビンタンパク質を過剰抑制するように操作した胎児グロビン遺伝子を添加するために用いられる。しかしながら、これらの治療は、欠損のある鎌状赤血球タンパク質の存在によって妨害され、正常ヘモグロビンの形成を妨害する。

【0039】

上記のように、グロビン遺伝子上流に2つのサイレンサーとそれらに結合する2つのタンパク質、BP1とBP2がある(例えば、Berg, P. E., D. M. Williams, R.-L. Qian, R. B. Cohen, S. X. Cao, M. Mittelman, & A. N. Schechter. 1989. 共通タンパク質は5' ヒト グロビン遺伝子の2つのサイレンサーに結合する. Nucl. Acids Res. 17: 8833-8852を参照されたい)。図1に示されるように、BP1は、キャップ部位(+1)に相対する-530 bpのサイレンサーI及び-300 bpのサイレンサーII内で結合し、BP2は-270 bpのサイレンサーII内で結合する。興味深いことに、高速移動群タンパク質I(HMG-I(Y))、構築タンパク質はサイレンサーIのBP1結合部位で又はその近傍でDNAに結合し、DNAを湾曲することがわかった(例えば、Chase, M. B., S. Haga, W. D. Hankins, D. M. Williams, Z. Bi, J. W. Strovel, C. Obriecht, & P. E. Berg. 1999. HMG-I(Y)の結合はヒト グロビン遺伝子のサイレンサーの構造変化を誘起する. Am. J. Hem. 60: 27-35を参照されたい)。HMG-I(Y)は、BP1とおそらくこの領域の他のリプレッサータンパク質の結合を促進させることができる。サイレンサーII内のBP1部位の変異は、抑制を部分的に除去し(例えば、Ebb, D., D. C. Tang, L. Drew, K. Chin, P. E. Berg, & G. P. Rodgers. 1998. 成人 グロビン様遺伝子を抑制する調節要素の同定. Blood Cells, Mol., Dis. 24: 356-369を参照されたい)、BP1がグロビン遺伝子のリプレッサーとして働くことができることを示している。更に、BP1は、その他の成人グロビン遺伝子、の上流の負の調節領域に結合する(例

例えば、Berg, P.E., S. Abhyankar, & M. Chase. 1994. 高速移動群タンパク質HM G-1(Y)は、ヒト グロビン遺伝子上流のサイレンサーDNA配列に結合する。Blood 84 Suppl 1: 262aを参照されたい)。発明者は、BP1が成人グロビン遺伝子発現を協調的に調節すると考える。

【0040】

BP1タンパク質は、胎児 グロビン遺伝子の近傍、及び成人 グロビン遺伝子と グロビン遺伝子の近傍でDNAに結合するので、発生での胎児ヘモグロビンから成人ヘモグロビンへのスイッチに直接関係することができる。実験から、BP1結合活性が胎児グロビン遺伝子の薬理的回復時に高められることが証明された。

BP1は成人遺伝子を抑制しつつ胎児遺伝子を活性化すると思われるので、正常遺伝子又は 遺伝子を添加する段階を含む治療に代わるものとして鎌状赤血球貧血症を治療するために潜在的に使用し得る。

BP1の結合親和性と鎌状赤血球貧血症(SCA)の重篤度間に逆の関係が見られた(例えば、Elion, J., P. E. Berg, C. Lapoumeroulie, G. Trabuchet, M. Mittelman, R. Krishnamoorthy, A. N. Schechter, & D. Labie. 1992. 5' グロビン遺伝子の負の制御領域のDNA配列の変化は 5' 突然変異の表現型発現と相関する。Blood 79: 787-792を参照されたい)。

【0041】

鎌状赤血球貧血症においては、突然変異した グロビン遺伝子(5')は、5つの制限ハプロタイプと厳密には系統非平衡にある(例えば、Kulozik, A. E., J. S. Wainscoat, G. R. Serjeant, B. D. Kar, B. Al-Awamy, G. J. F. Essan, A. G. Falusi, S. K. Haque, A. M. Hilali, S. Kate, W. A. E. P. Ranasinghe, & D. J. Weatherall. 1986. 5-グロビン遺伝子ハプロタイプの地理学的調査: 鎌状赤血球突然変異のアジア独立由来の証明。Am. J. Hum. Genet. 39: 239-244; Lapoumeroulie, C., O. Dunda, G. Trabuchet, M. Mony-Lobe, D. Labie, J. Elion, & R. Krishnamoorthy. 1989. アフリカにおける他の由来の新規な鎌状遺伝子: カメルーン型。Blood 74: 225a; Pagnier, J., J. G. Mears, O. Dunda-Belkhodja, K. E. Schaefer-Rego, C. Beldjored, R. L. Nagel, & D. Labie. 1984. アフリカにおけるヘモグロビンS遺伝子の多中心由来の証明。Proc. Natl. Aca

d. Sci. USA 81: 1771-1773を参照されたい)。

【0042】

ハプロタイプの中でも鎌状赤血球貧血症の臨床重篤度に差があり、インディアン-アラボ(以後インディアンハプロタイプと呼ぶ)が最も弱く、バンツーが最も激しく影響する(例えば、Ali, S. A. 1970. 異常に高いレベルの胎児ヘモグロビンと関連があるクエートのアラブ人の鎌状赤血球疾患の弱い変異型. Br. J. Haematol. 19: 613-619; Perrine, R. P., M. E. Pembrey, S. Perrine, & F. Shoup. 1978. サウジアラビアにおける自然履歴. 270人の被検者の実験. Ann. Internal Med. 88: 1-6を参照されたい)。BP1の-530 bp結合部位内の配列多型性はこれらの5つのSCAハプロタイプと系統非平衡にある(例えば、Chebloune, Y., J. Pagnier, G. Trabuchet, C. Faure, G. Verdier, D. Labie, & V.M. Nigon. 1988. アフリカ鎌状赤血球貧血症患者における グロビン遺伝子の5' フランキング領域の構造分析: アフリカにおける鎌状赤血球突然変異の3つの由来の証明. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4431-4435を参照されたい)。

【0043】

電気泳動移動度変位競合分析を用いて、BP1が正常又は参照配列よりインディアンハプロタイプ配列に5~6倍強固に結合することがわかった(例えば、Berg, P. E., M. Mittelman, J. Elion, D. Labie, & A. N. Schechter. 1991. ヒトグロビン遺伝子の-530突然変異へのタンパク質結合増加と グロビン合成減少との関連. Am. J. Hematol. 36: 42-47; Elion, J., P. E. Berg, C. Lapoumeroulie, G. Trabuchet, M. Mittelman, R. Krishnamoorthy, A. N. Schechter, & D. Labie. 1992. 5' グロビン遺伝子の負の制御領域のDNA配列の変化は⁵突然変異の表現型発現と相関する. Blood 79: 787-792; Zeng, F.-y., G. P. Rodgers, S.-z. Huang, A. N. Schechter, M. Salamah, s. Perrine, & P. E. Berg. 1994. アラビアンハプロタイプをもつ鎌状赤血球貧血症患者の グロビン遺伝子の-530領域の配列. Human Mutation 3: 163-165を参照されたい)。一方、BP1は、参照配列よりバンツーハプロタイプ配列に1/2~1/3弱く結合し(例えば、Elion, J., P. E. Berg, C. Lapoumeroulie, G. Trabuchet, M. Mittelman, R. Krishnamoorthy, A. N. Schechter, & D. Labie. 1992. 5' グロビン遺伝子の

負の制御領域のDNA配列の変化は⁵ 突然変異の表現型発現と相関する。Blood 79: 787-792を参照されたい)、⁵の転写を可能にすることができ、高濃度のヘモグロビンSがもたらされる。このことは、バンツーに見られる鎌状赤血球疾患の重篤度と相関する。

【0044】

上記のように、BP1は、鎌状赤血球貧血症(SCA)の治療に用いられる強力な候補である。⁵ グロビン発現の減少は、HbSの細胞内濃度の低下が予想され、SCAの臨床作用の主因であると考えられる細胞内HbS濃度とポリマー形成が低下する(例えば、Schechter, A. N., C. T. Noguchi & G. P. Rodgers. 1987. 鎌状赤血球疾患, p. 179-218. G. Stamatoyannopoulos, A. W. Nienhuis, P. Leder, Majerus, P. W.(ed.), 血液疾患の分子基準. ソーングズ、フィラデルフィア)。更に、BP1のようなリプレッサーによる治療は、胎児グロビン遺伝子を間接的に回復させることができる。この概念は、生体内及び試験管内双方で胎児グロビン遺伝子と成人グロビン遺伝子の相互調節を証明している十分に確立された所見に基づいている。Dover及びBoyer(例えば、Dover, G. J. & S. H. Boyer. 1987. 胎児ヘモグロビン含有細胞は胎児ヘモグロビンを含まない細胞と同じ平均顆粒ヘモグロビンを有する: 正常被検者と胎児ヘモグロビン生産の高い被検者におけるグロビン遺伝子発現と グロビン遺伝子発現の相互関係. Blood 69: 1109-1113を参照されたい)は、高レベルのHbFとSCAのため低レベルのHbA、胎児ヘモグロビンの遺伝性異種細胞持続(HPFH)、又は サラセミアを発現する個体に存在することを証明した。

【0045】

Perrineら(例えば、Perrine, S. P., B. A. Miller, M. F. Greene, R. A. Cohen, N. Cook, C. Shackleton, & D. V. Faller. 1987. 酪酸類縁体は新生児赤芽球前駆細胞における グロビン遺伝子発現を増強する. Biochem. Biophys. Res. Comm. 148: 694-700を参照されたい)は、糖尿病の母親に生まれた幼児の血漿中に高レベルで存在する2つの因子、 α -アミノ-n-酪酸とインスリンが グロビン発現の減少によって達成された グロビン発現を増強することを示した。更に、 サラセミアとSCA患者から培養した赤芽球前駆細胞を酪酸ナトリウム、4-フ

エニルブチレート又はフェニルアセテートで処理した場合、グロビン発現の増強とグロビン発現の相互減少が示された(例えば、Fibach, E., P. Prasanna, G.P. Rodgers, & D. Samid. 1993. 正常提供者や鎌状赤血球貧血症やサラセミアをもつ患者由来の赤芽球前駆細胞におけるフェニルアセテート又は4-フェニルブチレートによる高胎児ヘモグロビン生産. *Blood* 82: 2203-2209; Perrine, S.P., B. A. Miller, D. V. Faller, R. A. Cohen, E. P. Vichinsky, D. Hurst, B. H. Lubin, & T. Papayannopoulou. 1989. 酪酸ナトリウムはHbSSやサラセミアをもつ患者の赤芽球前駆細胞の胎児グロビン遺伝子発現を増強する. *Blood* 74: 454-459を参照されたい)。SCAの現在の治療は胎児グロビン遺伝子の化学的回復に集中しているので、HbSの抑制はその化学薬品の要求を減少又は排除することができる。

鎌状赤血球貧血症の治療として、好ましい方法は、遺伝子治療によって患者に投与し得る、好ましくはグロビン遺伝子を発現する組織の標的になるベクターにBP1をコードしているDNAを組み込む方法である。BP1の過剰発現による潜在的問題を避けるために、DNAは制御可能なプロモーターに結合することができる。

【0046】

白血病のスクリーニング

急性骨髄白血病(AML)は、2番目に多い小児白血病と最多の成人白血病である(例えば、Pui C-H. 小児白血病. *New Eng J Med* 1995; 332: 1618-1630; Karp JE. 急性白血病: 治療の標的としての細胞生存のメカニズム. *Int J Oncol* 1997; 11: 657-674を参照されたい)。生存はAMLで悪く、子供の生存が30~40%で成人の生存が10~35%だけである。一方、急性リンパ性白血病(ALL)は、子供が最多の白血病であり、成人はまれである。数種の分子マーカーがAMLやALLと関連があるが(例えば、Look AT. ヒト急性白血病におけるがん転写因子. *Science* 1997; 278: 1059-1064; Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang D-E. 転写因子、正常骨髄発生、白血病. *Blood* 1997; 90: 489-491; Lawrence HJ, Sauvageau G, Humphries RK, Largman C. 正常造血と白血病造血におけるHOXホメオボックス遺伝子の役割. *Stem Cells* 1996; 14: 281-291を参照されたい)、更に、診断することや適切な治療を決定することを助け得るマーカー、及び/又は治療標的として潜

在的に役に立つマーカーを同定することが求められていることは明かである。

【0047】

ホメオボックス遺伝子(HB)を含む転写因子の修飾発現は、急性白血病に関係があり、ホメオボックス遺伝子の異常発現は、白血病細胞系や原発性白血病芽球では記載されている。ホメオボックス遺伝子は、DNA結合ドメインをコードしている180 bp DNA保存配列を特徴とする(例えば、Levine M. Hoey T. 配列特異的転写因子としてのホメオボックスタンパク質. Cell 1988; 55: 537-540を参照されたい)。それらは、広範囲の生物体の物理的発生に非常に重要である『マスター調節遺伝子』である。最近の研究から、HB遺伝子が造血で発現することが証明された(例えば、Lawrence HJ, Sauvageau G, Hunphries RK, Largman C. 正常造血と白血病造血におけるHOXホメオボックスの役割. Stem Cells 1996; 14: 281-291を参照されたい)。ホメオボックスの中で特別な配列保存によって特定されたHB遺伝子のファミリーがいくつかある。ヒトにおいて39種からなる最大ファミリーは、HOXと呼ばれる。

【0048】

一部の白血病は、融合タンパク質としてホメオボックス遺伝子を異常に発現する(Look AT. ヒト急性白血病におけるがん転写因子. Science 1997; 278: 1059-1064)。これらの場合、1つの遺伝子からの活性化ドメインをコードしているDNAは、もう1つのDNA結合領域をコードしているDNAに融合し、新しいタンパク質産物に異なる機能がもたらされる。AML又はALLと関連がある融合遺伝子の下流標的は、まだ、求められていない。前B細胞リンパ芽球白血病では、例えば、HB遺伝子Pbx1がE2Aに融合し(例えば、Lu Q, Wright DD, Kamps MP. E2Aと融合すると、Pbx1ホメオドメインタンパク質がt(1;19)相互転座を有するヒト白血病において構成的転写アクチベーターに変換される. Mol Cell Biol 1994; 14: 3938-3948を参照されたい)、急性骨髄白血病(AML)では、HOXA9がNUP98-HOXA9に融合する(例えば、Borrow J, Shearman A.M., Stanton Jr. V.P., Becher R, Collins T, Williams AJ, Dube I, Katz F, Kwong YL, Morris C, Ohyashiki K, Toyama K, Rowley J, Housman DE. 急性骨髄白血病におけるt(7;11)(p15;p15)転座はヌクレオポリンNUP98やクラスIホメオプロテインHOXA9の遺伝子を融合する. Nature

Genetics 1996; 12: 159-167; Nakamura T, Yamazaki Y, Hatano Y, Miura I. NUP98は染色体転座t(1;11)(q23;p15)を有するヒト急性骨髄性白血病においてPMX1ホメオボックス遺伝子に融合する. Blood 1999; 94: 741-747を参照されたい)。明かな細胞遺伝学的変化を含まない白血病の他の場合には、本来サイレントである遺伝子は、初期造血前駆細胞においては活性化されるか又はおそらくダウンレギュレートしない。これは、T-ALL又はB-ALLでは発現するが、正常T又はBリンパ球では発現しない9つのHOXB遺伝子のうち4つに見られた（例えば、Petrini m, Quaranta MT, Testa U, Samoggia P, Tritarelli E, Care A, Cianetti L, Valtieri M, Barletta C, Peschle C. B/T急性リンパ系白血病やインターロイキン-2/インターロイキン-1 刺激ナチュラルキラーリンパ球. Blood 1992; 80: 185-193を参照されたい）。

【0049】

赤血球骨髄白血病細胞系又はリンパ系白血病細胞系、又は成人又は小児急性骨髄白血病(AML)、小児急性T細胞リンパ球性白血病(ALL)又は小児前B細胞ALLにおいてBP1発現を調べた。DLX7及びD1x4と呼ばれるBP1の明かなイソ型が2つあることから、同じ試料中の発現を測定した。赤芽球細胞系又は単球細胞系、又はリンパ系細胞系の少なくとも半分において3つ全部が同時発現する。それらは、正常骨髄、PHA刺激T細胞又はB細胞において少しは検出可能であってもほとんどない。81%の小児の例と47%の成人の例を含む63%のAMLの例に見られたが、前B ALLの例のいずれにも発現しなかった。同様の結果がDLX7とD1x4において得られ、3つ全部が著しい数の白血病で同時発現した。データは、BP1発現が初期前駆細胞に生じることを示している。従って、白血病芽球中のBP1 RNAの存在は、原始細胞の分子マーカーであってもよく及び/又はBP1ががん遺伝子経路における重要な上流因子であることを意味してもよい。

BP1が白血病誘発性である仮説は、細胞系K562におけるクローン産生性の増加を引き起こすことを示し、かつこれらの細胞が赤芽球分化を行う能力の減少を引き起こす本実験によって支持されている。赤白血病細胞系K562におけるBP1の過剰発現は軟寒天中で発育増加を生じ、これは白血病誘発性の可能性の指標である。

BP1発現は、K562細胞において増殖と生存の増加及び分化の低下を引き起こすと思われる。同様の結果は、2つの周知のがん遺伝子のいずれも、c-mycとc-mybが過剰発現したときのK562細胞において見られた。従って、データから、BP1はAML症状及びT細胞ALL症状においてがん遺伝子として機能することが示される。

BP1発現を求めるために行われる実験を次に詳述する。

【0050】

材料と方法:

白血病細胞系の培養: T-ALL細胞系とB-ALL細胞系を、2 mMグルタミン、100 U/mlペニシリン、100 µg/mlストレプトマイシン、0.1 mM非必須アミノ酸、1 mMピルビン酸ナトリウム及び10%ウシ胎児血清で補足したRPMI 1640(ギブコ-BRL)中で増殖した。赤血球骨髄細胞系を、2 mMグルタミン、100 U/mlペニシリン及び100 µg/mlストレプトマイシン、10 mM HEPES及び10%ウシ胎児血清で補足したRPMI 1640中で培養した。

臨床試料: 正常骨髄(BM)をメリーランド大学の発育障害の脳組織バンクから入手した。成人AML骨髄試料をメリーランド大学グリーンバウムがんセンターとジョンホプキンスがんセンター細胞遺伝学中核研究所から入手した。T-ALLとB-ALL小児患者からの骨髄試料を小児腫瘍学グループ(POG)から入手した。インフォームド・コンセントを地方施設で各患者又は親から得た。白血病試料は少なくとも85%の芽球を含有した。正常提供者の末梢血からTリンパ球とBリンパ球を向流水ひ、続いて磁気ビーズ(ミルテニイバイオテック(Miltenyi Biotec)、オーバーン、カリフォルニア州)を用いた系統特異的分離により得た。

【0051】

RT-PCR: RNA分析用単核細胞をフィコール・パックにより分離した。全RNAをTRIzol試薬(ギブコ-BRL、ゲイザースバーグ、メリーランド州)を用いて全試料から抽出した。逆転写(RT)反応のために、1 µgのDNase I処理RNAを2.5 µMオリゴ-d(T)プライマー(PEバイオシステムズ)、10 U RNaseインヒビター(ギブコ-BRL)、0.5 mM dNTP、及び100 U MMLV逆転写酵素(プロメガ)に添加した。RT反応を、サーマルサイクラー中25 °Cで10分間、4分間傾斜、42 °Cで50分間、及び99 °Cで5分間行った。1~2 µlのこの反応液をPCR反応に用いた。BP1、DLX4及びDLX7に特異的なプ

プライマーを設計し、PCR産物を制限酵素分析によって証明した。各プライマーセットの直線性分析を行い、サイクリング条件を結果的に調整した（データは示していない）。プライマー配列とPCRサイクリング条件を次の表2に示す。

【0052】

表2: PCRプライマー

プライマー	配列	PCR条件	産物	参考文献
BP1	上:5' CACCTCCTGTCTTACCCCTACACC3' (配列番号8)下:5' GCCCTTCCCCAGATTCACATCATC3' (配列番号9)	94°C/1min; 62°C/min;72°C/1.5min30サイクル	581 bp	
DLX7	上:5' CCTACACCGTGTGTGTGCTGC3' (配列番号14)下:5' CTGTTGCCATAGCCACTG3' (配列番号15)	94°C/1min; 60°C/min;72°C/1.5min30サイクル	406 bp	
DLX4	上:5' CACGGTGTGGCGGGGAGACAT3' (配列番号16)下:5' CTGCGGTGGGAGGTCGGAGTTC3' (配列番号17)	94°C/1min; 60°C/min;72°C/1.5min30サイクル	350 bp	
β アクトチン	上:5' GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC3' (配列番号18)下:5' CCTCGCCTTTGCCGATCC3' (配列番号19)	94°C/1min; 60°C/min;72°C/1.5min20サイクル	626 bp	Raffら, 1996
c-myb	上:5' ATTAGGTAATGAATTGTAGCAG3' (配列番号20)下:5' ACTTAGAGTAATGCTTTTACTGA3' (配列番号21)	94°C/30sec; 55°C/min;72°C/1min28サイクル	228 bp	Majelloら, 1986Shimamotoら, 1997
GATA-1	上:5' CCATTGCTCAACTGTATGGAGGG3' (配列番号22)下:5' ACTATTGGGGACAGGGAGTGATG3' (配列番号23)	94°C/30sec; 58°C/min;72°C/1.5min28サイクル	249 bp	Tsaiら, 1989Shimamotoら, 1997
SCL	上:5' CAATCGAGTGAAGAGGAGACTCC3' (配列番号24)下:5' TTGCGGAGCTCGGCAAAGGC3' (配列番号25)	94°C/45sec; 55°C/45sec;72°C/1.5min30サイクル	144 bp	Chenら, 1990

【0053】

半定量的RT-PCR: 各産物に特異的なオリゴヌクレオチドを $-^{32}\text{P}$ -dATPで末端標

識し、10%のPCR産物(2.5 μ l)に添加した。ハイブリダイゼーションをサーマルサイクラー内でした(94 で15秒間; 42 で1分間)。ハイブリッド形成した産物を5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ゲルを乾燥し、膜に曝露した。オートラジオグラフをゲルと整列させ、バンドを切り取り、シンチレーションカウンティングで定量した。

発現を、 β -アクトチンに対して基準化することにより負(-)、正(+)又はどちらでもない(+/-)として評価した。BP1、DLX7又はDLX4を示すバンドのcpmを同じ試料からの β -アクトチンバンドのcpmで割ることにより比率を計算した。各AML実験に正常BMと減退BMを含めた。BP1、DLX7及びDLX4の比率を平均し(それぞれ6回繰り返す)、試料が-(0.0-0.10)、+/(0.11-0.15)、+(>0.15)又は++(>0.45)として評価される指針とした。2つのフィトヘマグルチニン(PHA)刺激正常T細胞培養物はT細胞ALLの対照とした。平均比率(10回繰り返す)は0.05であった。同じ基準を上記BP1、DLX7及びDLX4を評価するのに用いた。c-myb及びGATA-1は正常BM中で発現する(我々の所見及びGewirtz AM, Calabretta B. c-mybアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドは試験管内で正常ヒト造血を阻害する. Science 1988; 242: 1303-1306. Guerrasio A, Saglio G, Rosso C, Alfarano A, Camasella C, Lo Coco F, Biondi A, Ranbaldi A, Nicolis S, Ottolenghi S. ヒト骨髄白血病細胞におけるGATA-1 mRNAの発現. Leukemia 1994; 6: 1034-1038にも述べられている)。c-mybとGATA-1に対するBMでの平均比率は、それぞれ0.57と2.1であった。比率が0.1~1.14(c-myb)又は0.1~4.2(GATA-1)間の試料を(+)として、即ち、正常BMの範囲内で評価し、1.14(c-myb)又は4.2(GATA-1)より大きい比率を(++)として評価した。RT-PCRとハイブリダイゼーションをそれぞれ独立して2回行った。

【0054】

CD34細胞の分離: 骨髄細胞を、NIHの施設内倫理委員会により承認されたガイドラインに従って同意している健康な成人提供者の後腸骨稜から吸引した。まず、細胞をヒストパック-1077密度勾配遠心分離により調製した。次に、単核細胞をCD34(QBEnd10)結合磁気マイクロビーズ(アンセルコーポ(AmCellCorp)、サニーベール、カリフォルニア州)とインキュベートし、MACA磁気分離カラム(ミルテニイ

バイオテック、ベルギッシュグラドバハ、ドイツ)によって処理して精製したCD34+ 細胞を得た。高い純度のCD34+ 細胞については、第2カラムランを用いた。分離したCD34+ 細胞の純度は、一般的には90%より高く、ヨウ化プロピジウム排除により評価した細胞生存率は常に95%より高かった。残りのCD34- 細胞の純度は95%より高かった。

BP1を過剰発現する細胞系の構築：完全オープンリーディングフレームを含む1013 bpのBP1 cDNA断片を、最初のcDNAから設計されたプライマーを用いてK562細胞RNAからRT-PCRにより増幅した。この断片をpGEM7の中へクローン化し、配列決定してからHind IIIとXba Iを用いてpRC/RSV(インビトロジェン(Invitrogen))の中へサブクローン化した。

統計的分析：BP1、DLX4、及びDLX7間の相関の意味をフィッシャの正確確率検定で評価した。報告されたp値はすべてすり合った。

【0055】

詳細な結果：

正常細胞におけるBP1の発現：BP1のRNAレベルを、4つの正常骨髄試料と1つの減退しているAML患者からの骨髄、及び5つのPHA刺激T細胞と5つの正常骨髄からのB細胞標品で求めた。6つの代表的試料の半定量的RT-PCR分析後に得られた結果を図8に示す。対照試料のいずれにもBP1 RNAはほとんど見えず、結果はDLX4とDLX7に似ていた。オートラジオグラフを長時間曝露した後、6試料全部にいくつかのイソ型のわずかなバンドが見られた(データは示していない)。

細胞系におけるBP1の発現：多くの白血病細胞系においてRT-PCRによりBP1の発現を調べた。リンパ球由来の14の細胞系についてBP1発現を分析した。BP1 RNAは、8つのT細胞ALL細胞系の内の4つと4つのリンパ腫細胞系に存在した(表3)。

【0056】

表3 造血細胞系におけるBP1の発現

リンパ系	BP1発現	骨髄	BP1発現
B細胞系統		赤芽球	
正常	+/-	K562	+
ALL		HEL	+
REH	+	単球	
RS4;11	+	THP-1	+
バーキットリンパ腫		U937	+
Raji	-	巨核球	
Daudi	+	MEG-01	+/-
		単球/顆粒球	
T細胞系統		HL60	+/-
正常	+/-		
ALL			
Jurkat	+		
MOLT-3	+		
MOLT-4	+		
MOLT-13	+		
CCRF-CEM	-		
HSB2	-		
MOLT-16	-		
RPMI8402	-		
リンパ腫			
HUT78	+		
Sup-T1	+		

【0057】

DLX7 RNAレベルとDLX4 RNAレベルをT細胞ALL細胞系において求め(図7A)、同じ細胞系において3つのイソ型が同時発現した。6つの赤血球骨髄細胞系のうち4つ(K562、HEL、THP-1及びU937)においてBP1 mRNAが容易に検出可能であり、MEG-

01とHL60細胞では発現しなかった。¹ これらの細胞系におけるDLX7とDLX4の分析から、BP1、DLX7及びDLX4がしばしば同時発現しK562細胞とU937細胞において3つ全部の発現が最大であった(図7B)。異種の骨髄白血病細胞系及びリンパ系白血病細胞系に見られる発現と比べて、正常骨髄(上記)のイソ型のいずれにもほとんど又は全く発現がないという所見により、我々は急性白血病患者の骨髄におけるBP1、DLX7及びDLX4の相対発現を半定量的RT-PCRを用いて調べることになった。

。

【0058】

急性骨髄白血病におけるBP1の発現: 小児と成人のAML患者双方においてBP1の発現を調べた。39人のAML患者全員を実験し、18人は18歳未満(小児; 例8~27)であり、21人は18歳以上(成人; 例29~49)であった。下記表4は、AML細胞遺伝学、表面マーカーの発現及び処理の初期応答を含む、試料の分析及び各患者に利用できる臨床データを纏めたものである。成果データは、すべての患者について入手できなかったため、排除した。データは、仏国-米国-英国(FAB)基準に従って分類した(例えば、Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA G, Gralnick HR, Sultan C. 仏国-米国-英国共同グループの分類のための修正基準案. *Ann Intern Med* 1985; 103: 620-625を参照されたい)。発現レベルの帰属は、材料と方法に記載されるように行った。この分析については、臨床試料を比較する負のベースラインとして正常骨髄を用いた。+/-として分類された試料は、統計的分析から除外した。81%(13/16)の小児骨髄試料及び47%(9/19)の成人例において明瞭な方法でBP1が過剰発現した。DLX7は59%(10/17)の小児例及び38%(6/16)の成人例で過剰発現し、DLX4は79%(11/14)の小児例及び79%(15/19)の成人例で過剰発現した。選択した試料において発現を示しているRT-PCR分析の例は図9に見られる。ここで、患者15は、BP1とDLX7の最高レベルを示したが、DLX4は発現しなかった。BP1とDLX7($p=0.0002$)、BP1とDLX4($p=0.0016$)、及びDLX7とDLX4($p=0.023$)間の相関は、フィッシャの正確確率検定により統計的に有意であった。

【0059】

表4 BP1、DLX7及びDLX4の発現、及びAMLをもつ患者における臨床生物学的特徴

FAB	患者	BP1	DLX7	DLX4	c-myb	GATA-1	CD34	CD33	CD13
正常 B. M.		-	-	-	+	+			
M0	12*	++	+	+/-	++	+	-	+	+
	37	+/-	-	+	++	+	+	+	+
	47	-	-	-	ND	ND	+	+	+
M1	15*	++	++	+	++	+	+	+	+
	17*	+/-	-	+/-	++	+	+	+	+
	19*	-	-	-	++	+	+	+	+
	22*	++	++	++	+++	+	+	+	+
	26*	+	+	+/-	+	+	+	+	+
	27*	-	-	+	+	+	+	+	+
	29	-	-	+	++	+	+	+	+
	40	++	++	++	++	+/-	-	+	+
	46	+	+	+	ND	ND	-	+	+
M2	18*	-	-	-	+/-	+	+	+	+
	20*	+	-	+	+	-	-	+	+
	44	-	ND	+/-	ND	ND	+	+	+
	45	-	-	-	ND	ND	+	+	-
	48	+	+/-	ND	ND	ND	+	+	+
M3	41	+	+	++	+	+	-	+	+

M4	23*	+/-	-	-	+	-	+	+	+
	31	-	-	-	+	+	-	+	+
	32	-	-	-	+	+	-	+	+
	35	+	+/-	+	+	+	-	+	+
	49	-	-	+	ND	ND	+	+	+
M5	8*	+	+	+	++	-	-	+	-
	9*	+	+/-	+/-	+	-	-	+	-
	11*	+	+	+	++	-	-	+	+
	13*	+	+	+	++	+	-	+	-
	14*	+	+	+	+	+	-	+	+
	16*	+	-	+	+	+	-	+	+
	30	-	+/-	+	+	-	-	+	+
	33	-	-	+	+	+	+	+	+
	34	+	+	+	+	+	+	+	-
	36	+	-	+	+	+	+	+	-
	38	+/-	-	+	+	+	+	+	+
	39	-	+/-	++	+	+	-	+	+
	42	+	+	+	+	-	13%	+	62%
	43	+	+	+	ND	ND	-	+	+
M7	21*	+	++	++	+++	+++	+	+	-
	24*	+	+	+	++	+	+	+	+

【0060】

表4(つづき)

FAB	患者	核型	反応**
正常 B. M.			
M0	12*	ND	PR
	37	46, XY, t(1;15), トリソミー-1q	NR
	47	47, XY, +13	NR
M1	15*	46, XY, t(11;9) (q23;p13.1)	CR
	17*	46, Y, t(X;7) (q13;p15), dup(12) (p11p13)	CR
	19*	46, XX	CR
	22*	4, XX, +21	ND
	26*	46, XX	CR
	27*	46, XY	CR
	29	46, XY, del(5) (q31q34)	NR
	40	46, XY, t(1;12)	CTC
	46	46, XY, del(1) (q32), del(13) (q12-22)	CR
M2	18*	47, XX, +8	CR
	20*	46, XY	CR
	44	46, XY	CR
	45	45, X, -Y	CR(<6mo.)
	48	47, XY, +8	NR
M3	41	46, XX, t(15;17) (q21;q12-21)	CR

M4	23*	46, XX, inv (16) (q13q22)	CR
	31	45, XY, -7	NR
	32	45, XX, -16	NR
	35	46, XX	NR
	49	46, XY, inv (16) (p13q22)	CR
M5	8*	46, XX, t (11;17) (q23;q25)	CR
	9*	ND	CR
	11*	46, XY	NR
	13*	46, XY, der (1) t (1;6) (q32;p21.1), add (11) (q23), der (22) t (t;22) (q23;q11.2)	CR
	14*	46, XX	CR
	16*	46, XX	NA
	30	47, XY, +3	NA
	33	46, XY	NR
	34	48, XX, add (4) (p15.1), del (5) (q21q23), t (7;12) (p10;q10), add (11) (q23), +i (12) (p10), add (16) (q11.2), -17, +18, -20, +der (21) t (17;21) (q10;q10), +mar	NR
	36	46, XY, del (7) (q22), +(8) (q24.3)	NR
	38	46, XX	CR
	39	48, XY, t (1;16), +7, +19	CTC
	42	47, XY, t (6;9) (q23;q34), +8	RD
	43	46, XY, t (3;5) (q25;q34)	NR
M7	21*	46, XY	CR
	24*	45, XY, t (3;3) (q21;q26), -7	NR

* 18歳未満

** 完全応答(CR)、応答なし(NR)、部分応答(PR)、完全腫瘍クリアランス(CTC)、疾患残存(RD)、測定せず(ND)、データが入手不能(NA)

【0061】

BP1を発現する細胞の分化状態を示すためにAML試料についてGATA-1とc-myb、初期マーカーの分析を行った。GATA-1は、骨髄発生の正の調節に関係すると思われる、初期前駆細胞において発現し、次に骨髄(赤芽球ではない)分化においてダウンレギュレーションし、骨髄経路での発現を未熟の正負にすると考えられる(例えば、Crotta S, Nicolis S, Ronchi A, Ottolenghi S, Ruzzi L, Shimada Y, Migliaccio AR. GM-及びG-CSF依存性骨髄細胞系における赤芽球転写因子の発現の漸進的不活性化. Nucl Acids Res 1990; 18: 6863-6869を参照されたい)。初期前駆細胞の増殖を特徴とする急性白血病に検出される(例えば、Guerrasio A, Saggio G, Rosso C, Alfarano A, Camaschella C, Lo Coco F, Biondi A, Ranbaldi A, Nicolis S, Ottolenghi S. ヒト骨髄白血病細胞におけるGATA-1 mRNAの発現. Leukemia 1994; 6: 1034-1038を参照されたい)。c-mybは、未熟造血細胞において発現し、その発現は、細胞が分化するにつれて減少する(例えば、Gewirtz AM, Calabretta B. c-mybアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドは試験管内で正常ヒト造血を阻害する. Science 1988; 242: 1303-1306; Gonda T, Metcalf D. マウス骨髄白血病の分化でのmyb、myc及びfosプロトオンコジーンの発現. Nature 1984; 310: 249-251; Luscher B, Eisenman RN. Myc及びMybに関する新しい観点. パートII. Myb. Genes & Devel 1990; 4: 2235-2241を参照されたい)。

【0062】

c-myb及びGATA-1は正常骨髄において発現するので(データは示していない)(例えば、Gewirtz AM, Calabretta B. c-mybアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドは試験管内で正常ヒト造血を阻害する. Science 1988; 242: 1303-1306; Guerrasio A, Saggio G, Rosso C, Alfarano A, Camaschella C, Lo Coco F, Biondi A, Ranbaldi A, Nicolis S, Ottolenghi S. ヒト骨髄白血病細胞におけるGATA-1 mRNAの発現. Leukemia 1994; 6: 1034-1038を参照されたい)、正常細胞のレベルでc-mybを発現する試料に対して正の分類が示された(詳細については上記を参照されたい)。すべてのAML試料が正常骨髄と少なくとも同じc-myb発現を示し、42%(13/31)が強い発現を示したことがわかった。成人の21%に比べて子供

が59%の、成人の場合より大きい割合の小児が高レベルのc-mybを示した。GATA-1はAML症例の77%(24/31)に存在し、72%が子供での発現で85%が成人での発現であった。

【0063】

DLX7及びDLX4とBP1の同時発現は著しく、BP1+試料の84%がDLX7+であり、100%がDLX4+であった。GATA-1は試料の74%で同時発現し、すべてc-myb+であり、45%が高レベルのc-mybを示した。この実験において他のパラメーターは、表面マーカーの分析であった。興味深いことに、BP1+試料の64%がCD34-であり、73%がCD13+であり、100%がCD33+であった。

【0064】

39人のAML患者のうち、2人が異常染色体17qアーム、BP1座を有した(例えば、Fu S, Strovel JW, Haga SB, Stamberg J, Berg PE. 新規なホメオボックス、BP1のイソ型DLX7近傍の地図作成と グロビン遺伝子の抑制の役割の確認. *Am. J. Hum. Gen.* 1998; 63: A181を参照されたい)。急性前骨髄性白血病をもつ患者41は、おそらく染色体17にレチノイン酸受容体を含むt(15;17)転座を示した(例えば、Look AT. ヒト急性白血病におけるがん転写因子. *Science* 1997; 278: 1059-1064を参照されたい)。患者8は、t(11;17)(q23;q25)転座を示した。この転座は、染色体11q23上のMLL遺伝子を、共に17q25上に位置し1つの塩基が異なっているAF17q25遺伝子か又はMSFに融合しているものとして同定した(例えば、Baer M R, Stewart CC, Lawrence D, Arthur DC, Mrozek K, Strout MP, Davey FR, Schiffer CA, Blomfield CD. 11q23転座をもつ急性骨髄白血病: マルチパラメータフローサイトメトリーによる骨髄性単球免疫表現型. *Leukemia* 1998; 12:317-325; Taki T, Ohnishi H, Shinohara K, Sako M, Bessho F, Yanagisawa M, Hayashi Y. AF17q25、推定セプチンファミリー遺伝子は急性骨髄白血病のMLL遺伝子をt(11;17)(q23;q25)と融合している. *Cancer Res* 1999; 59: 4261-4265; Osaka M, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ. t(11;17)(q23;q25)をもつ治療関連急性骨髄白血病におけるMSF(MLLセプチン様融合)、MLLの融合パートナー遺伝子. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 6428-6433を参照されたい)。MLL遺伝子はいくつかのHOXを活性化することが既知であるので(例えば、Yu BD, Hess JL, Horning SE, B

rown GAJ, Korsmeyer S. M11変異マウスにおける修飾Hox発現と部分的同一性. Nature 1995; 378: 505-508を参照されたい)、この例においては融合タンパク質がBP1を活性化することができるかと推測することは人の心をそそるものである。

急性リンパ系白血病におけるBP1の発現：骨髄系白血病と比較するために、小児T細胞ALLの19例を調べた(表5)。

【0065】

表5 T細胞ALLをもつ子供におけるBP1、DLX7又はDLX4の発現

患者	BP1	DLX7	DLX4
1	-	-	-
2	-	+	-
3	-	+	-
4	+	-	-
5	+	+	+
6	-	-	-
7	-	+	+
8	-	-	-
9	-	-	-
10	+	+	+
11	-	nd	-
12	+	-	-
13	-	-	+
14	+	+	+
15	-	nd	nd
16	+	+	+
17	-	nd	nd
18	-	nd	nd
19	-	nd	nd

【0066】

ここで、32%(6/19)が正のBP1であった。成果データはこれらの患者について入手できなかった。DLX7とDLX4の分析から、それらの例の40%(6/15)が正のDLX7であり、40%(6/15)が正のDLX4であった。AMLとT細胞ALLにおける3つのイソ型の発現の比較は図10に見られる。

次に、前B-ALLをもつ19人の小児患者を分析した。これらの例のいずれにも検出可能なBP1が見られなかったが、アクチン対照は正常に発現した(データは示していない)。

CD34+細胞とCD34-細胞におけるBP1発現: 正常骨髄におけるBP1発現が非常に少ない理由を正確に調べるために、また、BP1が初期前駆細胞において発現するかを求めるために、CD34+細胞とCD34-細胞におけるBP1発現を測定した。CD34-細胞の2つの独立した分離物中に明かな発現があった(図11、レーン2及び3)。対照的に、CD34+骨髄の3つの独立した試料にはかろうじて検出可能なBP1 mRNAがあった(レーン4、5及び6)。K562細胞での発現は、レーン1での比較を示し、アクチンは、負荷対照として測定した。

【0067】

BP1を過剰発現するK562細胞のクローン産生性: K562細胞におけるBP1の発現強化により分化の低下及びクローン産生性の増加が生じることがわかった。ヒト赤白血病細胞系K562を用いて赤芽球分化に対する異所性BP1発現の作用を調べた。BP1を過剰発現する4つの独立したK562クローンを分離し、エンブティベクターを含む2つのクローンと比較した。過剰発現する細胞系のすべてが赤芽球分化を行う能力の低下を示すことがわかった(データは示していない)。

発がん性の基準であると考えられるクローン産生性は、0.5%軟寒天中で増殖する白血病細胞の能力によって測定し得る。BP1を過剰発現する細胞系の3つは、対照と比べて播種した15,000細胞に対して軟寒天中で増殖し得るコロニー数が顕著に増加した(下記表6)。これらの結果は、BP1過剰発現がK562細胞における発がん性の増加と関連があり得ること及び増殖能又は細胞生存を高めることができることを意味する。30コロニーをプールしてコロニーに対する細胞の平均数を得ることによりコロニーに対する細胞の平均数(増殖の指標)を求めた。この数は、

過剰発現細胞系では増加せず、増殖曲線は過剰発現細胞系と対照が同じであり（データは示していない）、過剰発現因子は増殖過剰よりむしろ7aと7bに相対して生存増加を示すようにした。纏めると、これらのデータは、BP1発現が、K562細胞を一部のオンコジーンによって示される特性の分化を犠牲にして生存に向けることができることを意味している。

【0068】

表6 BP1を過剰発現するK562細胞のクローン産生性

播種した細胞系	相対BP1発現	コロニー/15,000	平均細胞数/コロニー
7a (対照)	1	23±15	4400
7b (対照)	1	21±7	1300
8a	21	517±108	2900
8c	12	924±199	5300
8d	5	223±34	5800
8e	7	57±18	2300

【0069】

K562細胞は負のBCL-2、負のp53であり、BCR-ABL転座を有する。K562細胞においてBP1を過剰発現する作用は、この形質転換バックグラウンドに対して生じる。この理由から、不死化しているが形質転換していない(マウスに注射した場合に悪性を引き起こさない)NIH 3T3細胞を用いた。その細胞におけるBP1の発現強化により、軟寒天中での増殖増加が生じたが、約4倍の低レベルであった。BP1を過剰発現するNIH 3T3細胞もフォーカス形成において約4倍増加した。K562細胞とNIH 3T3細胞に対する高BP1発現の作用の差は、K562細胞に見られるクローン産生性の約10倍以上の増加に遺伝子変化が更に必要であることを意味している。

【0070】

考察:

総括すると、成人患者の47%に比べて小児AML患者の81%の骨髄にBP1の著しいRNA発現が検出された。対照的に、正常骨髄には再現性をもってBP1発現が見られ

なかった。最大%の正のBP1はFAB分類M5(単球)に生じ、AML例の77%が正のBP1であった。このカテゴリーでは子供の100%からの骨髄細胞が正のBP1であった。2つのスプライス変異体、DLX7とDLX4は、それぞれAML患者の48%と79%に同時発現した。BP1、DLX7及びDLX4レベルを小児T細胞ALLの19例で評価した。発現頻度はAMLと比べて少なかったが、BP1が32%、DLX7が50%及びDLX4が40%のT細胞ALLで過剰発現し、正常PHA刺激Tリンパ球での発現は弱いか又は全くなかった。はっきりと対照的には、前B ALLではBP1発現が検出されなかった。T細胞ALLでのBP1発現が前B細胞ALLではない理由は明らかではないが、この差は有効な診断の相違を与えることができる。

【0071】

c-mybは、すべてのAML試料において正常骨髄に匹敵するレベルでか又は高いレベルで発現した。c-mybの発現は未熟と関連がある(例えば、Gewirtz AM, Calabretta B. c-mybアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドは試験管内で正常ヒト造血を阻害する. *Science* 1988; 242: 1303-1306; Gonda T, Metcalf D. マウス骨髄白血病の分化でのmyb、myc及びfosプロトオンコジーンの発現. *Nature* 1984; 310: 249-251; Luscher B, Eisenman RN. MycとMybに関する新しい観点. パートII. Myb. *Genes & Devel* 1990; 4: 2235-2241を参照されたい)ので、正常範囲内の例は初期前駆細胞段階で抑制することができる。マウスにおいてc-mybの活性化により白血病が引き起こされるので、高いc-myb発現は白血病誘発過程の一部であることができる(例えば、Wolff L, Koller R, Bies J, Nazarov V, Hoffman B, Amanullah A, Krall M, Mock B. マウス前単球白血病におけるレトロウイルス挿入突然変異誘発: c-myb及びMmI1. *Curr Topics Micro Immuno* 1996; 211: 191-199を参照されたい)。これに関して、c-mybを高度に発現しかつBP1発現を評価し得る11試料のうち9つが正のBP1であった。悪性造血細胞系におけるHOX遺伝子の発現に関して実質的なデータ本体がある。

【0072】

HOX遺伝子は4つの染色体上にクラスター形成され、同じ染色体上に対で位置している(例えば、Lawrence HJ, Sauvageau G, Humphries RK, Largman C. 正常造血及び白血病造血におけるHOXホメオボックス遺伝子の役割. *Stem Cells* 1996;

14: 281-291; van Oostveen JW, Biji JJ, Raaphorst FM, Walbooners JJM, Meijer CJLM. 正常造血におけるホメオボックス遺伝子の役割と血液学的悪性度. *Leukemia* 1999; 13: 1675-1690; Nakamura S, Stock DW, Wydner KL, Bollekens J A, Takeshita K, Nagai BM, Chiba, Kitamura T, Freeland TM, Zhao Z, Minowada J, Lawrence JB, Weiss KB, & Ruddle FH. 新規な哺乳動物非遠位遺伝子: Dix-7のゲノム分析. *Genomics* 1996; 38: 314-324; Simeone A, Acampora D, Pannese M, D'Esposito M, Stornaiuolo A, Gulisano M, Mallamaci A, Kastury K, Druck T, Huebner K. 脊椎動物Dix遺伝子ファミリーの2種のクローニングと確認. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2250-2254を参照されたい)。BP1は染色体17上のHOXBクラスターの3' 端に位置している(例えば、Fu S, Strovel JW, Haga SB, Stamberg J, Berg PE. 新規なホメオボックス遺伝子、BP1のイソ型DLX7近傍での地図作成及び グロビン遺伝子の抑制における役割の確認. *Am. J. Hum. Gen.* 1998; 63: A181を参照されたい)。

【0073】

HOXB遺伝子は、K562細胞系やHEL細胞系を含む赤芽球細胞において優先的に発現する(例えば、Lawrence HJ, Sauvageau G, Humphries RK, Largman C. 正常造血及び白血病造血におけるHOXホメオボックス遺伝子. *Stem Cells* 1996; 14: 281-291; Shen W-F, Largman C, Lowney P, Corral JC, Detmer K, Hauser CA, Simonitch TA, Hack FM, Lawrence HJ. ヒト造血細胞系におけるホメオボックス含有遺伝子の系統拘束発現. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 8536-8540; Magli CM, Barba, P, Celetti A, De Vita G, Cillo, C, Boncinelli E. ヒト造血細胞におけるHOX遺伝子の同調調節. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6348-6352; Mathews CHE, Detmer K, Boncinelli E, Lawrence HJ, Lartman C. ヒトHOX2座のホメオボックス遺伝子の赤芽球拘束発現. *Blood* 1991; 78: 2248-2252を参照されたい)。HOXクラスター内の遺伝子が脊髄細胞内のブロックでスイッチをオン又はオフにするとと思われる(例えば、38、40を参照されたい)。

【0074】

本明細書に示されたデータは、赤血球骨髄細胞系における発現パターンが隣接したHOXB遺伝子と似ているのでBP1が同調調節の一部であってもよいことを意味し

ている。HOX遺伝子の転写物は、AML、T-ALL及び前B-ALLに見られるが、BP1と異なり正常骨髄でも容易に検出可能である（例えば、Petrini M, Quaranta MT, Testa U, Samoggia P, Tritarelli E, Care A, Cianetti L, Valtieri M, Barlett a C, Peschle C. B/T急性リンパ系白血病とインターロイキン-2/インターロイキン-1 刺激ナチュラルキラーリンパ球における選択ヒトHOX遺伝子の発現. *Blood* 1992; 80: 185-193; Lawrence HJ. Sauvageau G, Ahmadi N, Lopez AR, LeBeau MM, Link M, Humphries K, Largman C. 正常造血細胞と白血病造血細胞におけるHOXA10ホメオボックスインキュベートの段階特異的発現と系統特異的発現. *Exp Hem* 1995; 23: 1160-1166; Biji JJ, van Oostveen JW, Walboomers JMM, Brink ATP, Vos W, Ossenkoppele GJ, Meijer CJLM. 脊髄白血病と正常脊髄細胞におけるHOXC4、HOXC5及びHOXC6の分化と細胞型拘束発現. *Leukemia* 1998; 12: 1724-1732; Kawagoe H, Humphries RK, Blair A, Sutherland HJ, Hogge DE. 白血病細胞と正常ヒト造血細胞の表現型及び機能的に特定された亜集団におけるHOX遺伝子、HOX補因子、及びMLLの発現. *Leukemia* 1999; 13: 687-698; Salvati PD, Ranford PR, Ford J, Kees UR. 小児急性リンパ芽球白血病におけるHOX11発現はT細胞表現型と関連がある. *Oncogene* 1995; 11:1333-1338を参照されたい)。

【0075】

特に、HOX遺伝子の発現は正常造血分化ではダウンレギュレーションされるがAMLではされない（例えば、Kawagoe H, Humphries RK, Blair A, Sutherland HJ, Hogge DE. 白血病細胞と正常ヒト造血細胞の表現型及び機能的に特定された亜集団におけるHOX遺伝子、HOX補因子、及びMLLの発現. *Leukemia* 1999; 13: 687-698を参照されたい）。急性白血病におけるBP1 RNA発現は、白血病芽細胞の分化段階のマーカ-を表すことができ及び/又は白血病誘発に直接関係することができる。本明細書に示されたデータから、AMLにおけるBP1発現が初期前駆細胞内で起こる可能性が示される。(i) 正のBP1細胞のすべてが、初期前駆細胞の2つの指標の、正のc-mybであり、74%が正のGATA-1である（例えば、20、22~24）。(ii) 正常骨髄に見られるBP1のかろうじて検出可能な発現は、正常骨髄の非常に小さな亜集団を含んでいる初期細胞における発現と適合する。(iii) 骨髄性白血病とリンパ系白血病におけるBP1の過剰発現によって、白血病誘発が幹細胞又は

多分化能造血前駆細胞に起こることができることが論じられる。

【0076】

(iv) 正のBP1芽球の59%がFABクラスにおいて初期であると考えられ幹細胞白血病、即ち、M0(最少の分化)、M5(単球)又はM7(巨核球)と関連があると見られる所見がこの概念を更に支持している(例えば、Cuneo A, Mecucci C, Kerim S, Van den berghe E, Dal Cin P, Van Orshoven A, Rodhain J, Bosly A, Michaux JL, Martiat P., Boogaerts M, Carli MG, Castoldi G, Van Den Berghe H. 巨核芽球白血病における多分化能幹細胞の関与: 15人の患者における細胞学的及び細胞遺伝学的証明. *Blood* 1989; 74: 1781-1790; Bonnet D, Dick JE. ヒト急性白血病は初期造血細胞に由来する階層として組織される. *Nature Medicine* 1997; 3: 730-737; Venditti A, Del Poeta G, Buccisano F, Tamburini A, Cox MC, Stasi R, Bruno A, Aronica G, Maffei L, Suppo G, Simone MD, Forte L, Cordero V, Pistorino M, Tufilli V, Isacchi G, Masi M, Papa G, Amadori S. 最少に分化した急性脊髄白血病(AML-M0): 25例と他の仏国-米国-英国サブタイプとの比較. *Blood* 1997; 89: 621-629を参照されたい)。

【0077】

(v) 正のBP1例の64%は負のCD34である。CD34+幹細胞はいくつかのHOX遺伝子を発現し、この発現はCD34- 細胞においてダウンレギュレーションする(例えば、van Oostveen JW, Biji JJ, Raaphorst FM, Walbooners JJM, Meijer CJLM. 正常造血におけるホメオボックス遺伝子の役割と血液学的悪性度. *Leukemia* 1999; 13: 1675-1690; Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge ED, Dragowska WH, Reid DS, Largman C, Lawrence J, Humphries RK. ヒト骨髄細胞の機能的に異なるCD34+ 亜集団におけるホメオボックスの微分発現. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12223-12227を参照されたい)。対照的に、BP1はCD34- 細胞において発現し、CD34+ 細胞においてダウンレギュレーションする。これらの結果は、AML試料におけるデータと一致し(点v)、BP1は主としてCD34- 細胞に見られた。CD34+ 細胞における非常に弱い発現は、若干のCD34+ 細胞での発現か又はCD34- 細胞によるCD34+ 細胞の混入であり得る。最近の文献には、マウスとヒト双方において再増殖能をもつ初期CD34- lin- 幹細胞の亜集団の存在が支持される

。マウスにおいては、CD34⁻ lin⁻ 幹細胞は活性化時にCD34⁺ 幹細胞に変換し得る。これはヒトにおいては調べなかった (Goode II MA. CD34⁺ 又はCD34⁻: 実際問題になりますか? Blood 1999; 94: 2545-2547; Sato T, Laver JH, Ogawa M. マウス造血幹細胞によるCD34の可逆的発現. Blood 1999; 94: 2548-2554を参照されたい)。我々のCD34⁻ 細胞はlin⁺ とlin⁻ の亜集団双方を含んでいるので、BP1が幹細胞中で発現するかは不明である。しかしながら、BP1が造血において初期に活性化されることは明かである。

【0078】

従って、BP1発現が分化中に抑制されることが仮定される。この概念は、BP1が細胞系MB-02の赤芽球分化の間ダウンレギュレートするという所見によって強化される。BP1に対する可能なオンコジーンの役割を支持して、BP1を発現する安定な細胞系がクローン産生性の45倍まで増加したことが見られた。更に、AMLにおける高頻度の発現は、BP1がオンコジーン経路の上流因子であることを意味することができる。更に、正常造血におけるBP1の役割を表すために、悪性転換の役割を果たすかを直接求めるために、及び急性白血病における発現の臨床的意義を調べるために実験が求められている。

【0079】

白血病におけるBP1発現の増強の上記知見の観点から、急性骨髄白血病又は急性骨髄白血病又は急性リンパ球性白血病のスクリーニング方法には、細胞試料を患者から得る段階及び正常細胞に比べてBP1が該細胞試料中の差によって過剰発現するかを求める段階が含まれる。典型的には、白血病を試験するために、骨髄又は末梢血のような適切な原料から細胞試料が用いられる。BP1が過剰発現するかを求めることは、好ましくは、細胞試料中のBP1 RNAレベル又はBP1タンパク質レベルを測定することにより行われる。RNAレベルは、ノーザンブロット分析、スロットアンドドットブロット分析、RT-PCR又はインサイチュハイブリダイゼーションのような当該技術において既知のRNA分析によって求め得る。例えば、細胞がBP1 RNAを産生しているかを求めるために、上記の典型的な例でのような逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)の手法が使用し得る。特に、RNAを試料細胞から分離し、転写されて逆転写産物(cDNA)を得る。次に、配列番号1に由来する

前向き及び逆向きPCRプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応が行われる。

【0080】

BP1に適切なPCRプライマー対は、例えば、581 bpの産物を増幅する配列番号8と配列番号9、及び225 bpの産物を増幅する配列番号10と配列番号11を含んでいる。ポリメラーゼ連鎖反応は、BP1産物を増幅するのに適切な反応条件下で行われる。例えば、配列番号8と配列番号9のプライマーについては、典型的な反応条件は、変性段階(94 °Cで1分間)、アニーリング段階(58°Cで1分間)及び延長段階(72 °Cで1.5分間)を27サイクル、続いて更にエクステンション(72 °Cで5分間)を含んでいる。配列番号10と配列番号11のプライマーについては、典型的な反応条件は、試料を94 °Cで2分間保持し、次に30サイクルの94 °Cで1分間、62 °Cで1分間及び72 °Cで1.5分間、30サイクルを行い、次に試料を72 °Cで10分間保持する条件を含んでいる。次に、PCR産物を試料から分離し、電気泳動のような典型的な方法で可視化又は定量化する。BP1タンパク質レベルは、免疫組織化学分析のような当該技術において既知のタンパク質分析によって直接測定することができる。免疫分析用ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を得るためには、当該技術において既知の手法により、哺乳動物に接種するために用いるのに十分な量の実質的に精製したBP1を作製してBP1に特異的に結合するポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を産生するために本明細書に開示されたBP1 DNAが使用し得る。

【0081】

白血病の治療

K562白血病細胞においてBP1発現が減少すると、アポトーシスが引き起こされる。これを証明するために、アンチセンスBP1発現を調節する誘導メタロチオネインプロモーターを含むベクターを作製し、K562細胞に安定に導入した。2つの対照がエンブティベクターを有し(9Aと9B)、2つがアンチセンスプラスミドを有する(10Bと10D)、4つの細胞系を実験した。メタロチオネインプロモーターの誘導物質、CdSO₄を50 µMで4日間まで添加してアンチセンスBP1発現を誘導した。アンチセンスBP1の誘導により、トリパンブルーによって測定した生存率の低下が生じた(図12)。対照の生存率の低下が一部あったが、10Bと10Dの細胞死が著しかった。これは、このときのBP1 mRNAの著しい減少と関連した。図13は、50 µM

CdSO₄の存在下に10Bと10D（アンチセンス、それぞれレーン3とレーン4）と比較した対照、9Aと9B（それぞれレーン1とレーン2）のRT-PCRにより評価したBP1 mRNAの発現を示す写真である。BP1 RNA発現は、10Bと10Dでほとんど消えている。生存率の低下がアポトーシスの増加によるものであるかを求めるために、アネキシンVを用いて細胞を評価し、正のアネキシンV、負のヨウ化プロピジウム細胞を評価した。アンチセンス含有細胞のアポトーシスは、著しく増加した（データは示していない）。これらの実験から、BP1発現の減少はアポトーシスと関連があることが示され、BP1を過剰発現する細胞が生存の増加を示すと思われる事実と共に、BP1発現のモジュレーションがK562細胞における細胞生存の有力な結果となることが確認される。

【0082】

表7 BP1アンチセンスRNAの誘導後のK562細胞のアポトーシス%

細胞系	1日目	2日目	3日目
9A	9±1	7±3	13±3
9B	5±3	9±1	13±1
10B	6±1	15±2	53±4
10D	9±1	20±1	68±1

【0083】

これらの結果は、白血病に可能な治療はBP1をコードしているDNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを患者に導入し、よってアンチセンスオリゴヌクレオチドが白血病細胞においてBP1の発現を遮断し、よってこれらの細胞のアポトーシスを引き起こすことができることを意味している。

また、BP1の発現強化がAML患者を治療するために用いられる薬剤のシトシンアラビノシド(Ara C)に対する白血病細胞の感受性増加を引き起こすことがわかった。BP1を過剰発現するK562細胞系に種々の濃度のara Cを攻撃した。50 μmのara Cを4日間攻撃した後、対照細胞の生存率は82～86%であり、BP1を過剰発現する

細胞の生存率は27-29%～66%の範囲にあった。即ち、生存率が1/3まで低下した（データは示していない）。100 μ m Ara Cにデータの差はほとんどなかった。30分と60分のアネキシンV分析では、最低生存率をもつ細胞に最高頻度のアポトーシス細胞が見られた。従って、BP1発現が強化された細胞系がアポトーシスの増加によって証明されるAra Cに対する感受性が増加することは明かである。

上記の知見は、患者のBP1発現レベルに従って患者に投与されるAra Cの用量を最適化するために治療的に使用し得る。

【0084】

乳がんのスクリーニングと治療

BP1が乳がん細胞系で過剰発現するかを求めるために、本発明者は、正常乳房組織と比べてBP1の過剰発現を検出する実験を行った。図14は、乳がん系MCF7、ADR、MDA468及びT47Dを含む数種の乳がん細胞系によるBP1発現を示している写真である。実験においては、更に、乳がん細胞系におけるBP1発現をRT-PCRにより調べた（表8）。

【0085】

表8 乳がん細胞系におけるBP1発現

細胞系	ER	PR	悪性度	腫瘍発生+	BP1
Hs578T	-	-	腺管がん	無	+/-
MCF7	+	+	腺管がん	**	+
MCF7ADR	*		ADR耐性	有	+++
MDA-MB-231	-	-	腺管がん	有	++
MDA-MB-435s	-	-	腺管がん	無	+
MDA-MB-468	-	-	腺管がん	有	++
T47D	+	+	腺管がん	NA	+++
MCF10A	+	+	正常	無	+/-

* エストラジオールに対して無応答

+ アメリカン・タイプ・カルチャア・コレクションからのデータ。NA、データが入

手不能。

** エストラジオールの添加しないときに腫瘍発生はなかった。

【0086】

最も著しい相関は、BP1発現とマウスにおいて乳房腫瘍を引き起こす細胞系の能力間であった。興味深いことに、高BP1発現は、アドリアマイシン(ADR)耐性MCF7細胞系、MCF7ADRに見られた。BP1発現とADR耐性間に関係があるかは不明である。正常な乳房上皮に由来する細胞系MCF10Aは、かろうじて検出可能なBP1 mRNAを示した。

BP1が乳がんで発現することを更に証明するために、凍結乳房腫瘍組織と周囲の正常組織におけるBP1発現を調べた。合計15の腫瘍組織を分析した(表9)。BP1は、12の負のER例全部に発現したが3つの正のER例のうち1つだけに発現した。これらのデータから、高いグレードのER-、PR- 腫瘍組織においてBP1発現の傾向が示される。

【0087】

表9 乳がんにおけるBP1発現とER及びPR状態との比較

	BP1+	BP1-
ER+PR+	1	2
ER-PR-	12	0

【0088】

正常乳房組織と悪性乳房組織からの代表的な試料のRT-PCR分析を図15に示す。正常組織はNで示され、腫瘍はTで示されている。腫瘍組織のすべてがER- PR- である。レーン1~4において、腫瘍と対応する正常組織を示す。正常組織に発現が見られず、腫瘍のすべてにBP1が発現した。合計6つの正常乳房組織を分析した。6つのうち5つが負のBP1であり、1つが低BP1発現を示した(データは示していない)。レーン5~7に更に3つの腫瘍組織を示す。アクチン発現は、RNAの多能性を証明し、各試料の負荷対照としての働きをする。

上記の観点から、BP1の過剰発現の検出は乳がんのスクリーニングツールであ

る。スクリーニング方法は、本方法においては細胞試料が乳房組織から採取されること以外は白血病のスクリーニングと同じ方法で行われる。

【0089】

引用文献

Ali, S.A. 1970. Milder variant of sickle cell disease in Arabs in Kuwait associated with unusually high level of foetal haemoglobin. *Br. J. Haematol.* 19:613-619.

Breg, P.E., S. Fu, 及び S. Haga. 1998. Unpublished data.

Berg, P.E., S. Abhyankar, 及び M. Chase. 1994. The high mobility group protein HMG-I(Y) binds to a silencer DNA sequence upstream of the human γ -globin gene. *Blood* 84 Suppl 1:262a.

Berg, P.E. 及び A.N. Schechter. 1992. Molecular genetics of disorders of hemoglobin. In T. Friedmann (ed), *Molecular Genetic Medicine*. Academic Press, San Diego.

Berg, P.E., M. Mittelman, J. Elion, D. Labie, 及び A.N. Schechter. 1991. Increased protein binding to a 530 mutation of the human γ -globin gene associated with decreased γ -globin synthesis. *Am. J. Hematol.* 36:42-47.

Berg, P.E., D.M. Williams, R.-L. Qian, R.B. Cohen, S.X. Cao, M. Mittelman, 及び A.N. Schechter. 1989. A common protein binds to two silencers 5' to the human γ -globin gene. *Nucl. Acids Res.* 17:8833-8852.

Chase, M.B., S. Haga, W.D. Hankins, D.M. Williams, Z. Bi, J.W. Strovel, C. Obriecht, 及び P.E. Breg. 1999. Binding of HMG-I(Y) elicits structural changes in a silencer of the human γ -globin gene. *Am. J. Hem.* 60:27-35.

Chebloune, Y., J. Pagnier, G. Trabuchet, C. Faure, G. Verdier, D. Labie, 及び V.M. Nigon. 1988. Structural analysis of the 5' flanking region of the γ -globin gene in African sickle cell anemia patients: further evidence for three origins of the sickle cell mutation in Africa. *Proc. Natl*

. Acad. Sci. USA 85:4431-4435.

【 0 0 9 0 】

Cho, K.E.Y., J. Geotz, C.V.E. Wright, A. Fritz, A Hardwicke, 及び E.M.D. Roberts. 1988. Differential utilization of the same reading frame in a *Xenopus* homeobox gene encodes two related proteins sharing the same DNA-binding specificity. *EMBO J.* 7:2139-2149.

Cohen, S.M. 及び G. Jurgens. 1989. Proximal-distal pattern formation in *Drosophila*: cell autonomous requirement for *Distal-less* gene activity in limb development. *EMBO J* 8:2045-2055.

Cohen, S.M., G. Bronner, F. Kuttner, G. Jurgens, 及び H. Jackle. 1989. *Distal-less* encodes a homeodomain protein required for limb development in *Drosophila*. *Nature* 338:432-434.

Cowell, I.G. 及び H.C. Hurst. 199. Cloning transcription factors from a cDNA expression library, p.120-122. In D.S. Latchman (ed.), *Transcription factors: a practical approach*. IRL Press, New York.

Crossley, M. 及び S.H. Orkin. 1993. Regulation of the γ -globin locus. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 3:232-237.

Dignam, J.D., R.M. Lebovitz, 及び R.G. Roeder. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl. Acids Res.* 11:1475-1489.

Dolle, P., M. Price 及び D. Duboule. 1992. Expression of the murine *D1x-1* homeobox gene during facial, ocular, and limb development. *Differentiation* 49:93-99.

【 0 0 9 1 】

Dover, G.J. 及び S.H. Boyer. 1987. Fetal hemoglobin-containing cells have the same mean corpuscular hemoglobin as cells without fetal hemoglobin: a reciprocal relationship between gamma- and beta-globin gene expression in normal subjects and in those with high fetal hemoglobin production. *Blood* 69:1109-1113.

- Ebb, D., D.C. Tang, L. Drew, K. Chin, P.E. Berg, 及び G.P. Rodgers. 1988. Identification of regulatory elements that repress adult beta-like globin genes. *Blood Cells, Mol., Dis.* 24:356-369.
- Elion, J., P.E. Berg, C. Lapoumeroulie, G. Trabuchet, M. Mittelman, R. Krishnamoorthy, A.N. Schechter, 及び D. Labie. 1992. DNA sequence variation in a negative control region 5' to the β -globin gene correlates with the phenotypic expression of the β^s mutation. *Blood* 79:787-792.
- Fibach, E., P. Prasanna, G.P. Rodgers, 及び D. Samid. 1993. Enhanced fetal hemoglobin production by phenylacetate and 4-phenylbutyrate in erythroid precursors derived from normal donors and patients with sickle cell anemia and β -thalassemia. *Blood* 82:2203-2209.
- Forrester, W.C., C. Thompson, J.T. Elder, 及び Groudine, M. 1986. A developmentally stable chromatin structure in the human β -globin gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:1359-1363.
- Jaynes, J.B.P.H. 及び O'Farrell. 1988. Activation and repression of transcription by homeodomain-containing proteins that bind a common site. *Nature* 336:744-749.
- Kozak, M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucl. Acids Res.* 15:8125-8148.

【 0 0 9 2 】

- Kulozik, A.E., J.S. Wainscoat, G.R. Serjeant, B.D. Kar, B. Al-Awamy, G.J. .F. Essan, A.G. Falusi, S.K. Haque, A.M. Hilali, S. Kate, W.A.E.P. Ranasinghe, 及び D.J. Weatherall. 1986. Geographical survey of β^s -globin gene haplotypes: Evidence for an independent Asian origin of the sickle-cell mutation. *Am J. Hum. Genet.* 39:239-244.
- Lapoumeroulie, C., O. Dunda, G. Trabuchet, M. Mony-Lobe, D. Labie, J. Elion, 及び R. Krishnamoorthy. 1989. A novel sickle gene of yet another origin in Africa: The Cameroon type. *Blood* 74:225a.
- Lawrence, H.J. 及び, C. Largman. 1992. Homeobox genes in normal hematopo

ies and leukemia. *Blood* 80:2445-2453.

Levine, M. 及び T. Hoey. 1988. Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. *Cell* 55:537-540.

Ley, T.J., K.A. Maloney, J.I. Gordon 及び A.L. Schwartz. 1989. Globin gene expression in erythroid human fetal liver cells. *J. Clin. Invest.* 83:1032-1038.

Lowney, P., J. Corral, M.M. LeBean, L. Deaven, H.J. Lawrence, 及び C. Largman. 1991. A human Hox1 homeobox gene exhibits myeloid-specific expression of alternative transcripts in human hematopoietic cells. *Nucl. Acids Res.* 19:3443-3449.

Mavilio, F., A. Giampaolo, A. Care, G. Migliaccio, M. Calandrini, G. Russo, G.L. Pagliardi, G. Mastroberardino, M. Marinucci, 及び C. Peschle. 1983. Molecular mechanisms of human hemoglobin switching: selective undermethylation and expression of globin genes in embryonic, fetal, and adult erythroblasts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 80:6907-6911.

【 0 0 9 3 】

Nakamura, S., D.W. Stock, K.L. Wydner, J.A. Bollekens, K. Takeshita, B.M. Nagai, S. Chiba, T. Kitamura, T.M. Freeland, Z. Zhao, J. Minowada, J.B. Lawrence, K.B. Weiss, 及び F.H. Ruddle. 1996. Genomic analysis of a new mammalian Distal-less gene: D1x-7. *Genomics* 38:314-324.

O'Connor, M.B., R. Binari, L.A. Perkins, 及び W. Bender. 1988. Alternative RNA products from the Ultrabithorax domain of the bithorax complex. *EMBO J* 7:435-445.

Pabo, C.O. 及び R.T. Sauer. 1992. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 61:1053-1095.

Pagnier, J., J.G. Mears, O. Dunda-Belkhodja, K.E. Schaefer-Rego, C. Beldjord, R.L. Nagel, 及び D. Labie. 1984. Evidence of the multicentric origin of the hemoglobin S gene in Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:177

1-1773.

Papayannopoulou, T., T.H. Shepard, 及び G. Stamatoyannopoulos. 1983. Studies of hemoglobin expression in erythroid cells of early human fetuses using anti- α - and anti- β -globin chain fluorescent antibodies, p.421-430. In G. Stamatoyannopoulos 及び A.W. Nienhuis (ed.), *Globin Gene Expression and Hematopoietic Differentiation*. Alan R. Liss, New York.

Perrine, S.P., B.A. Miller, D.V. Faller, R.A. Cohen, E.P. Vichinsky, D. Hurst, B.H. Lubin, 及び T. Papayannopoulou. 1989. Sodium butyrate enhances fetal globin gene expression in erythroid progenitors of patients with HbSS and β -thalassemia. *Blood* 74:454-459.

【 0 0 9 4 】

Perrine, S.P., B.A. Miller, M.F. Greene, R.A. Cohen, N. Cook, C. Shackleton, 及び D.V. Faller. 1987. Butyric acid analogues augment globin gene expression in neonatal erythroid progenitors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 148:694-700.

Perrine, R.P., M.E. Pembrey, S. Perrine, 及び F. Shoup. 1978. Natural history of sickle cell anemia in Saudi Arabs. A study of 270 subjects. *Ann. Internal. Med.* 88:1-6.

Price, J.A., D.W. Bowden, J.T. Wright, M.J. Pettenati, 及び T.C. Hart. 1998. Identification of a mutation in D1x3 associated with tricho-dento-osseous (TDO) syndrome. *Hum. Mol. Gen.* 7:563-569.

Quinn, L.M., B.V. Johnson, J. Nicholl, G.R. Sutherland, 及び B. Kalionis. 1997. Isolation and identification of homeobox genes from human placenta including a novel member of the Distal-less family, D1x4. *Gene* 187:55-61.

Robinson, G.W. 及び K. Mahon. 1994. Differential and overlapping expression domains of D1x-2 and D1x-3 suggest distinct roles for Distal-less homeobox genes in craniofacial development. *Mech. Dev.* 48:199-215.

Schechter, A.N. C.T. Noguchi 及び G.P. Rodgers. 1987. Sickle cell disease

e, p.179-218. In G. Stamatoyannopoulos, A.W. Nienhuis, P. Leder, Majerus, P.W. (ed.), *The Molecular Basis of Blood Disease*. Saunders, Philadelphia.

Shimamoto, T., S. Nakamura, J. Bollekens, F.H. Ruddle 及び K. Takeshita. 1997. Inhibition of D1x-7 homeobox gene causes decreased expression of GATA-1 and c-myc genes and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3245-3249.

【 0 0 9 5 】

Simeone, A., D. Acampora, M. Pannese, M. D'Esposito, A. Stornaiuolo, M. Gulisano, A. Mallamaci, K. Kastury, T. Druck, 及び K. Huebner. 1994. Cloning and characterization of two members of the vertebrate D1x gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2250-54.

Stock, D.W., D.L. Ellies, Z. Zhao, M. Ekker, F.H. Ruddle, 及び K.M. Weiss. 1996. The evolution of the vertebrate D1x family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10858-10863.

Tuan, D., W. Soloman, Q. Li, 及び I.M. London. 1985. The " -like-globin " gene domain in human erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6384-6388.

Vinson, C.R., K.L. LaMarco, P.F. Johnson, W.H. Landschulz, 及び S.L. McKnight. 1988. In situ detection of sequence-specific DNA binding activity specified by a recombinant bacteriophage. *Genes & Devel.* 2:801-806.

Wu, S., Q. Lu, 及び A.L. Kriz. 1995. Multiple-sandwich, one-step hybridization of Northern and Southern blots. *BioTechniques* 18:585-586.

Zeng, F.-y., G.P. Rodgers, S.-z. Huang, A.N. Schechter, M. Salamah, S. Perrine, 及び P.E. Berg. 1994. Sequence of the 530 region of the beta globin gene of sickle cell anemia patients with the Arabian haplotype. *Human Mutation* 3:163-165. Chase MB, Haga S, Fu S, Davenport G, Morgan D, Mah A, Berg PE. Repression of the human -globin gene by BP1, a new homeodomain protein. Submitted.

【0096】

Levine M, Hoey T. Homeobox proteins as sequence specific transcription factors. *Cell* 1988; 55:537-540.

van Oostveen JW, Biji JJ, Raaphorst FM, Walbooners JJM, Meijer CJLM. The role of homeobox genes in normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Leukemia* 1999; 13:1675-1690.

Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 1997; 278:1059-1064.

Lu Q, Wright DD, Kamps MP. Fusion with E2A converts the Pbx1 homeodomain protein into a constitutive transcriptional activator in human leukemias carrying the t(1;19) translocation. *Mol Cell Biol* 1994; 14:3938-3948.

Nakamura T, Yamazaki Y, Hatano Y, Miura I. NUP98 is fused to PMX1 homeobox gene in human acute myelogenous leukemia with chromosome translocation t(1;11)(q23;p15). *Blood* 1999; 94:741-747.

Petrini M, Quaranta MT, Testa U, Samoggia P, Tritarelli E, Care A, Cianetti L, Valtieri M, Barletta C, Peschle C. Expression of selected human HOX genes in B/T acute lymphoid leukemia and interleukin-2/interleukin-1-stimulated natural killer lymphocytes. *Blood* 1992; 80:185-193.

Hawley RG, Fong AZC, Reis MD, Zhang N, Lu M, Hawley TS. Transforming function of the HOX11/TCL3 homeobox gene. *Cancer Res* 1997; 57:337-345.

Fu S, Strovel JW, Haga SB, Stamberg J, Berg PE. Mapping of a new homeobox gene, BP1, near its isoform DLX7 and characterization of their roles in repression of the beta globin gene. *Am J. Hum. Gen.* 1998; 63:A181.

【0097】

Pui C-H. Childhood leukemias. *New Eng J Med* 1995; 332:1618-1630.

Karp JE. Acute leukemia: mechanisms of cell survival as targets for therapy. *Int J Oncol* 1997; 11:657-674.

Copelan EA, McGuire EA. The biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood* 1995; 85:1151-1168.

Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang D-E. Transcription factors, normal myeloid development and leukemia. *Blood* 1997; 90:489-491.

Gewirtz AM, Calabretta B. A c-myb antisense oligodeoxynucleotide inhibits normal human hematopoiesis in vitro. *Science* 1988; 242:1303-1306.

Guerrasio A, Saglio G, Rosso C, Alfarano A, Camaschella C, Lo Coco F, Biondi A, Ranbaldi A, Nicolis S, Ottolenghi S. Expression of GATA-1 mRNA in human myeloid leukemic cells. *Leukemia* 1994; 6:1034-1038.

Crotta S, Nicolis S, Ronchi A, Ottolenghi S, Ruzzi L, Shimada Y, Migliaccio AR. Progressive inactivation of the expression of an erythroid transcriptional factor in GM- and G-CSF-dependent myeloid cell lines. *Nucl Acids Res* 1990; 18:6863-6869.

Gonda T, Metcalf D. Expression of myb, myc and fos proto-oncogenes during the differentiation of a murine myeloid leukemia. *Nature* 1984; 310:249-251.

【 0 0 9 8 】

Luscher B, Eisenman RN. New light on Myc and Myb. Part II. Myb. *Genes & Devel* 1990; 4:2235-2241.

Raff T, van der Giet M, Endemann D, Wiederholt T, Paul M. Design and testing of β -actin primers for RT-PCR that do not co-amplify processed pseudogenes. *BioTechniques* 1997; 23:456-460.

Majello B, Kenyon LC, Dalla-Favera R. Human c-myb protooncogene: nucleotide sequence of cDNA and organization of the genomic locus. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83:9636-9640.

Tsai SF, Martin DIK, Zon LI, D'Andrea AD, Wong GG, Orkin SH. Cloning of the cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature* 1989; 339:446-451.

Chen Q, Cheng J-T, Tsai L-H, Schneider N, Buchanan G, Carroll A, Crist W, Ozanne B, Siciliano MJ, Baer R. The tal gene undergoes chromosome tran

slocation in T cell leukemia and potentially encodes a helix-loop-helix protein. *EMBO J* 1990; 9:415-424.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985; 103:620-625.

Baer MR, Stewart CC, Lawrence D, Arthur DC, Mrozek K, Strout MP, Davey FR, Schiffer CA, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia with 11q23 translocations: myelomonocytic immunophenotype by multiparameter flow cytometry. *Leukemia* 1998; 12:317-325.

【 0 0 9 9 】

Taki T, Ohnishi H, Shinohara K, Sako M, Bessho F, Yanagisawa M, Hayashi Y. AF17q25, a putative septin family gene, fuses the MLL gene in acute myeloid leukemia with t(11;17)(q23;q25). *Cancer Res* 1999; 59:4261-4265.

Osaka M, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ. MSF (MLL septin-like fusion), a fusion partner gene of MLL, in a therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;17)(q23;q25). *Proc. Natl Acad Sci USA* 1999; 96:6428-6433.

Yu BD, Hess JL, Horning SE, Brown GAJ, Korsmeyer S. Altered Hox expression and segmental identity in MLL-mutant mice. *Nature* 1995; 378:505-508.

Wolff L, Koller R, Bies J, Nazarov V, Hoffman B, Amanullah A, Krall M, Mock B. Retroviral insertional mutagenesis in murine promonocytic leukemias: c-myb and Mml1. *Curr Topics Micro Immuno* 1996; 211:191-199.

Shen W-F, Largman C, Lowney P, Corral JC, Detmer K, Hauser CA, Simonitch TA, Hack FM, Lawrence HJ. Lineage-restricted expression of homeobox-containing genes in human hematopoietic cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:8536-8540.

Magli CM, Barba P, Celetti A, De Vita G, Cillo C, Boncinelli E. Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:6348-6352.

Mathews CHE, Detmer K, Boncinelli E, Lawrence HJ, Largman C. Erythroid-r

restricted expression of homeobox genes of the human HOX2 locus. *Blood* 1991; 78:2248-2252.

【 0 1 0 0 】

Celetti A, Barba P, Cillo C, Rotoli B, Boncinelli E, Magli MC. Characteristic patterns of HOX gene expression in different types of human leukemia. *Int J Cancer* 1993; 53:237-244.

Lawrence HJ, Sauvageau G, Ahmadi N, Lopez AR, LeBeau MM, Link M, Humphries K, Largman C. Stage- and lineage-specific expression of the HOXA10 homeobox gene in normal and leukemic hematopoietic cells. *Exp Hem* 1995; 23: 1160-1166.

Biji JJ, van Oostveen JW, Walboomers JMM, Brink ATP, Vos W, Ossenkoppele GJ, Meijer CJLM. Differentiation and cell-type restricted expression of HOXC4, HOXC5 and HOXC6 in myeloid leukemias and normal myeloid cells. *Leukemia* 1998; 12:1724-1732.

Kawagoe H, Humphries RK, Blair A, Sutherland HJ, Hogge DE. Expression HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells. *Leukemia* 1999; 13:687-698.

Salvati PD, Ranford PR, Ford J, Kees UR. HOX11 expression in pediatric acute lymphoblastic leukemia is associated with T-cell phenotype. *Oncogene* 1995; 11:1333-1338.

Cuneo A, Mecucci C, Kerim S, Vandenberghe E, Dal Cin P, Van Orshoven A, Rodhain J, Bosly A, Michaux JL, Martiat P., Boogaerts M, Carli MG, Castoldi G, Van Den Berghe H. Multipotent stem cell involvement in megakaryoblastic leukemia: cytologic and cytogenetic evidence in 15 patients. *Blood* 1989; 74:1781-1790.

【 0 1 0 1 】

Bonnet D, Dick JE. Human acute leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine* 1997; 3

:730-737.

Venditti A, Del Poeta G, Buccisano F, Tamburini A, Cox MC, Stasi R, Bruno A, Aronica G, Maffei L, Suppo G, Simone MD, Forte L, Cordero V, Postorino M, Tufilli V, Isacchi G, Masi M, Papa G, Amadori S. Minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0); Comparison of 25 cases with other French-American-British subtypes. *Blood* 1997; 89:621-629.

Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, Reid DS, Largman C, Lawrence J, Humphries RK. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:12223-12227.

Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nature Med* 1998; 4:1038-1045.

Goodell MA. CD34+ or CD34-: does it really matter? *Blood* 1999; 94:2545-2547.

Sato T, Laver JH, Ogawa M. Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. *Blood* 1999; 94:2548-2554.

Schiffer CA. Acute myeloid leukemia in adults, in Holland JF, Frei E., Bast RC, Kufe DW, Morton DL, Weichselbaum RR (eds): *Cancer Medicine*. Philadelphia, PA. Lea & Febiger, 1997.

【 0 1 0 2 】

Scott MP, Tamkun JW, Hartzel III GW. The structure and function of the homeodomain. *Biochem Biophys Acta* 989:25, 1989.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103:103, 1985.

Luscher B, Eisenman RN. New light on Myc and Myb. Part II. Myb. *Genes & Devel* 4:2235, 1990.

Crotta S, Nicolis S, Ronchi A, Ottolenghi S, Ruzzi L, Shimada Y, Migliac

cio AR. Progressive inactivation of the expression of an erythroid transcriptional factor in GM- and G-CSF dependent myeloid cell lines. *Nucl Acids Res* 18:6863, 1990.

Romeo P-H, Prandini M-H, Joulin V, Mignotte V, Prenant M, Vainchenker W, Marguerie G, Uzan G. Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. *Nature* 344:447, 1990.

Martin DIK, Orkin SH: Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GM1/NF-E1/ERYF1. *Genes Dev* 4:1886, 1990.

Perkins A, Kongsuwan K, Visvader J, Adams JM, Cory S: Homeobox gene expression plus autocrine growth factor production elicits myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8398, 1990.

Lawrence HJ, Sauvageau G, Ahmadi N, Lopez AR, LeBeau MM, Link M, Humphries K, Largman C: Stage- and Lineage-specific expression of the HOXA10 homeobox gene in normal and leukemic hematopoietic cells. *Exp Hem* 23:1160, 1995.

【 0 1 0 3 】

Lawrence H.J., Sauvageau G, Humphries R.K., Largman C: The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis. *Stem Cells* 14:281, 1996.

Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Humphries RK: HOX homeobox genes as regulators of normal and leukemic hematopoiesis. *Aplastic Anemia and Stem Cell Biol* 11:1221, 1997.

Borrow J, Shearman A.M., Stanton Jr. V.P., Becher R, Collins T, Williams A.J., Dube I, Katz F, Kwong YL, Morris C, Ohyashiki K, Toyama K, Rowley J, Housman DE: The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9. *Nature Genetics* 12:159, 1996.

Nakamura T, Largaespada DA, Lee MP, Johnson LA, Ohyashiki K, Tokyama K, Chen SJ, Willman CL, Chen I-M, Feinberg AP, Jenkins NA, Copeland NG, Sha

ughnessy Jr JD: Fusion of the nucleoporin gene NUP98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in human myeloid leukaemia. *Nature Genetics* 12:154, 1996.

Shimamoto T, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Kawakubo K, Fujimura T, Iwama H, Nakazawa S, Toyama K: The expression pattern of erythrocyte/megakaryocyte-related transcription factors GATA-1 and the stem cell leukemia gene correlates with hematopoietic differentiation and is associated with outcome of acute myeloid leukemia. *Blood* 86:3173, 1995.

Komatsu N, Kirito K, Izuma T, Eguchi M, Miura Y: GATA-1 and erythropoietin receptor genes are highly expressed in erythroleukemia. *Exp Hem* 26:1148, 1998.

【 0 1 0 4 】

Thompson MA, Ramsay RG: Myb: an old oncoprotein with new roles. *Bioessays* 17:341, 1995.

Bash, R.O., Hall, S., Timmons, C.F., Crist, W.M., Amylone, M., 及び Smith, 及び Baer, R. (1995) Does activation of TAL1 gene occur in a majority of patients with T cell acute lymphoblastic leukemia? A Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 86:666-676.

Brown, L., Cheng, J-T., Chen, Q., Siciliano, M.J., Crist, W., Buchanan, G. 及び Baer, R. (1990) Site-specific recombination of the tar-1 gene is a common occurrence in human T cell leukemia. *EMBO J* 9:3343-3351.

Bernard, O., Lecointe, N., Jonveaux, p., Souyr, M., Mauchauffe, M., Berger, R., Larsen, C.J. 及び Mathieu-Mahul, D. (1991) Two site-specific deletion and t(1;14) translocation restricted to human T-cell acute leukemia as disrupt the 5' part of the tar-1 gene. *Oncogene* 6:1477-1488.

Aplan, P.D., Lombardi, D.P., Reaman, G., Sather, H., Hammond, G. 及び Kirsch, I.R. (1992), Involvement of the putative hemopoietic transcription factor SCL in T cell acute Lymphoblastic leukemia. *Blood* 79:1327-1333

Begley, C.G., Aplan, P.D., Denning, S.M., Haynes, B.F., Waldmann, T.A., 及び Kirsch, I.R. (1989) The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. Proc. Natl. Acad. Sci. 86:10128-10132.

Visvader, J., Begley, C.G., 及び Adams, J.M. (1990) Differential expression of the LYL, SCL and E2A helix-loop-helix genes within the hemopoietic system. Oncogene 6:187-194.

Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH: Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. J Immunol 133:157, 1984.

Elwood, N.J., Cook, W.D., Metcalf, D. 及び Begley, C.G. (1993) SCL, the gene implicated in human T-cell leukemia, is oncogenic in a murine T-lymphocyte cell line. Oncogene 8:3093-3101.

【0105】

上記説明と実施例の目的は、限定を意味することなく本発明の実施態様を具体的に説明することである。本発明の真意又は範囲から逸脱することなく本発明の組成物及び方法に修正や変更を行うことができることは当業者に明かである。本明細書に引用されたすべての特許と文献の記載は、全体で本願明細書に含まれるものとする。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Berg, Patricia
 <120> Novel Transcription Factor, BP1
 <130> 179.37405X00
 <160> 25
 <170> PatentIn version 3.0
 <210> 1
 <211> 1251
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (633)..(812)
 <223> homeobox
 <220>
 <221> CDS
 <222> (285)..(1004)
 <400> 1
 ccgccccgggc aggtgggaac cgaacccgat ggagaggagg gggcccccat ggatttaggg 60
 ggggagggga aagtcattggg ggggcacccc cccggaaccc ctttcccagg cgcgcgttct 120
 ccgctgaaag aggctcagag agacaacttc tccgggatct taagtgtggg ggctgctggc 180
 tggggggccc gtcggcccca acgcccggagg cttggaaaag agagtttagca gcgggagcgg 240
 actacgtgcc gggccatggc cctttctgcc gggccctggc caca atg acc tct ttg 296
 Met Thr Ser Leu
 1
 ccc tgc ccc ctc ccc ggc cgg gac gcc tcc aaa gct gtc ttc cca gac 344
 Pro Cys Pro Leu Pro Gly Arg Asp Ala Ser Lys Ala Val Phe Pro Asp
 5 10 15 20
 ctc gcc cct gtc ccg tcg gta gcg gct gcc tac ccg ctt ggc ttg tcc 392
 Leu Ala Pro Val Pro Ser Val Ala Ala Ala Tyr Pro Leu Gly Leu Ser
 25 30 35
 cct aca acc gca gcc tcc ccc aat ttg tcc tac tcc agg ccg tat ggc 440
 Pro Thr Thr Ala Ala Ser Pro Asn Leu Ser Tyr Ser Arg Pro Tyr Gly
 40 45 50
 cac ctc ctg tct tac ccc tac acc gag cca gcg aac ccc gga gac tcc 488
 His Leu Leu Ser Tyr Pro Tyr Thr Glu Pro Ala Asn Pro Gly Asp Ser
 55 60 65
 tac ctg tcc tgc cag caa ccc gcg gcg ctc tct cag ccc ctc tgc gga 536
 Tyr Leu Ser Cys Gln Gln Pro Ala Ala Leu Ser Gln Pro Leu Cys Gly
 70 75 80
 cct gca gag cac cct cag gaa ctc gag gca gac tcg gag aag ccg cgg 584
 Pro Ala Glu His Pro Gln Glu Leu Glu Ala Asp Ser Glu Lys Pro Arg
 85 90 95 100
 ctg tcc ccg gaa ccc tcc gag cgg cgc cct cag gcc ccc gcc aaa aag 632
 Leu Ser Pro Glu Pro Ser Glu Arg Arg Pro Gln Ala Pro Ala Lys Lys
 105 110 115

ctc cgc aag ccg agg acc atc tac tcc agc ctg cag ctg cag cac cta 680
 Leu Arg Lys Pro Arg Thr Ile Tyr Ser Ser Leu Gln Leu Gln His Leu
 120 125 130

aac cag cgt ttc cag cac acg cag tac ctg gcg ctg ccc gag agg gcc 728
 Asn Gln Arg Phe Gln His Thr Gln Tyr Leu Ala Leu Pro Glu Arg Ala
 135 140 145

cag ctg gca gcg cag ctc ggc ctc acc cag acc cag gta aag atc tgg 776
 Gln Leu Ala Ala Gln Leu Gly Leu Thr Gln Thr Gln Val Lys Ile Trp
 150 155 160

ttt cag aac aaa cgc tcc aag tat aag aag ctc ctg aag cag aat tct 824
 Phe Gln Asn Lys Arg Ser Lys Tyr Lys Lys Leu Leu Lys Gln Asn Ser
 165 170 175 180

ggg ggg cag gaa ggg gac ttc cct ggg agg acc ttc tct gtg tct ccc 872
 Gly Gly Gln Glu Gly Asp Phe Pro Gly Arg Thr Phe Ser Val Ser Pro
 185 190 195

tgc tcc cca ccc ctc ccc tcc ctc tgg gat cta ccc aag gca ggg acc 920
 Cys Ser Pro Pro Leu Pro Ser Leu Trp Asp Leu Pro Lys Ala Gly Thr
 200 205 210

ctg ccc acc agt ggc tat ggc aac agc ttt gga gcc tgg tat cag cat 968
 Leu Pro Thr Ser Gly Tyr Gly Asn Ser Phe Gly Ala Trp Tyr Gln His
 215 220 225

cac tcc tca gat gtc ctg gct tgg cct cag atg atg tgaatctggg 1014
 His Ser Ser Asp Val Leu Ala Ser Pro Gln Met Met
 230 235 240

gaagggcggg tcaggccac agccttctg caaagcccag gaccaggca gtccacctgc 1074

accccttctg ggcctggagg aaaccagctc cagatgggtt ttctctggag gacaaacagt 1134

tagaggagaa aaaggaatgg agcagagcct gtaccctaa ccctaacagc taaatcaagg 1194

acctcagcct tatataatca ttgtcccac cactaccatg gactgaacac cttcacc 1251

<210> 2
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (633)..(812)
 <223> homeobox

<400> 2

Met Thr Ser Leu Pro Cys Pro Leu Pro Gly Arg Asp Ala Ser Lys Ala
 1 5 10 15

Val Phe Pro Asp Leu Ala Pro Val Pro Ser Val Ala Ala Ala Tyr Pro
 20 25 30

Leu Gly Leu Ser Pro Thr Thr Ala Ala Ser Pro Asn Leu Ser Tyr Ser
 35 40 45

Arg Pro Tyr Gly His Leu Leu Ser Tyr Pro Tyr Thr Glu Pro Ala Asn


```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(56)
<223> synthesized oligonucleotide

<400> 4
tgtacatata cacatatata tatatatata ttttttcttt tcttaccaga aggttt      56

<210> 5
<211> 58
<212> DNA
<213> Artificial/Unknown

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(58)
<223> synthesized oligonucleotide

<400> 5
ttcttatttg tgtaataaga aaattgggaa aacgatcttc aatatgctta ccaagctg      58

<210> 6
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial/Unknown

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(48)
<223> synthesized oligonucleotide

<400> 6
ttcttttaat ggatatttat ttcaatataa taaaaaatta gagtttta      48

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial/Unknown

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(30)
<223> synthesized oligonucleotide

<400> 7
tgcatatata tgtatatgta tgtgtgtata      30

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial/Unknown

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(24)
<223> synthesized oligonucleotide

<400> 8

```

cacctcctgt cttaccoccta cacc

24

<210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(24)
 <223> synthesized oligonucleotide

<400> 9
 gcccttcccc agattcacat catc

24

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> synthesized oligonucleotide

<400> 10
 gtatggccac ctctgtctt

20

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> synthesized oligonucleotide

<400> 11
 gagtagatgg tcctcggctt

20

<210> 12
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> HELIX1
 <222> (127)..(136)

<220>
 <221> HELIX2
 <222> (144)..(154)

<220>
 <221> HELIX3
 <222> (158)..(173)

<400> 12

Met Thr Ser Leu Pro Cys Pro Leu Pro Gly Arg Asp Ala Ser Lys Ala
 1 5 10 15
 Val Phe Pro Asp Leu Ala Pro Val Pro Ser Val Ala Ala Ala Tyr Pro
 20 25 30
 Leu Gly Leu Ser Pro Thr Thr Ala Ala Ser Pro Asn Leu Ser Tyr Ser
 35 40 45
 Arg Pro Tyr Gly His Leu Leu Ser Tyr Pro Tyr Thr Glu Pro Ala Asn
 50 55 60
 Pro Gly Asp Ser Tyr Leu Ser Cys Gln Gln Pro Ala Ala Leu Ser Gln
 65 70 75 80
 Pro Leu Cys Gly Pro Ala Glu His Pro Gln Glu Leu Glu Ala Asp Ser
 85 90 95
 Glu Lys Pro Arg Leu Ser Pro Glu Pro Ser Glu Arg Arg Pro Gln Ala
 100 105 110
 Pro Ala Lys Lys Leu Arg Lys Pro Arg Thr Ile Tyr Ser Ser Leu Gln
 115 120 125
 Leu Gln His Leu Asn Gln Arg Phe Gln His Thr Gln Tyr Leu Ala Leu
 130 135 140
 Pro Glu Arg Ala Gln Leu Ala Ala Gln Leu Gly Leu Thr Gln Thr Gln
 145 150 155 160
 Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Lys Arg Ser Lys Tyr Lys Lys Leu Leu
 165 170 175
 Lys Gln Asn Ser Gly Gly Gln Glu Gly Asp Phe Pro Gly Arg Thr Phe
 180 185 190
 Ser Val Ser Pro Cys Ser Pro Pro Leu Pro Ser Leu Trp Asp Leu Pro
 195 200 205
 Lys Ala Gly Thr Leu Pro Thr Ser Gly Tyr Gly Asn Ser Phe Gly Ala
 210 215 220
 Trp Tyr Gln His His Ser Ser Asp Val Leu Ala Ser Pro Gln Met Met
 225 230 235 240

<210> 13
 <211> 19
 <212> FRT
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> synthesized polypeptide antigen

<400> 13

Ser Tyr Pro Tyr Thr Glu Pro Ala Asn Pro Gly Asp Ser Tyr Leu Ser
 1 5 10 15
 Cys Gln Gln

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA

```

<213> Artificial/Unknown

<220>
<221> misc feature
<222> (1)..(20)
<223> synthesized oligonucleotide

<400> 14
cctacaccgt gttgtgctgc                20

<210> 15
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial/Unknown

<220>
<221> misc feature
<222> (1)..(18)
<223> synthesized oligonucleotide

<400> 15
ctggtgccat agccactg                18

<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial/Unknown

<220>
<221> misc feature
<222> (1)..(22)
<223> synthesized oligonucleotide

<400> 16
cacggtgtgg cgggggagac at          22

<210> 17
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial/Unknown

<220>
<221> misc feature
<222> (1)..(22)
<223> synthesized oligonucleotide

<400> 17
ctgcggtggg aggtcggagt tc          22

<210> 18
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial/Unknown

<220>
<221> misc feature
<222> (1)..(23)
<223> synthesized oligonucleotide

```

<300>
 <301> Raff T, van der Giet M, Endemann D, Wiederholt T, Paul M.
 <302> Design and testing of β -actin primers for RT-PCR that do not co-amplify
 processed pseudogenes.
 <303> Biotechniques
 <304> 1997
 <305> 23
 <306> 456-460
 <307> 1997-__-__
 <309> -_-_-
 <313> (1)..(23)

<400> 18
 ggatcttcat gagtagtca gtc 23

<210> 19
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(18)
 <223> synthesized oligonucleotide

<300>
 <301> Raff T, van der Giet M, Endemann D, Wiederholt T, Paul M.
 <302> Design and testing of β -actin primers for RT-PCR that do not co-amplify
 processed pseudogenes.
 <303> Biotechniques
 <304> 1997
 <305> 23
 <306> 456-460
 <307> 1997-__-__
 <309> -_-_-
 <313> (1)..(18)

<400> 19
 cctcgccctt gccgatcc 18

<210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(23)
 <223> synthesized oligonucleotide

<300>
 <301> Majello B, Kenyon LC, Dalla-Favera R.
 <302> Human c-myb protooncogene: nucleotide sequence of cDNA and organization
 of the genomic locus.
 <303> Proc Natl Acad Sci
 <304> 1986
 <305> 83
 <306> 9636-9640
 <307> 1986-__-__
 <309> -_-_-
 <313> (1)..(23)

<400> 20
 attagtaat gaattgtagc cag 23

<210> 21
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(23)
 <223> synthesized oligonucleotide

<300>
 <301> Shimamoto, T., S. Nakamura, J. Bollekens, F. H. Ruddle and K. Takeshita.
 <302> Inhibition of Dlx-7 homeobox gene causes decreased expression of GATA-1 and c-myc genes and apoptosis
 <303> Proc. Natl. Acad. Sci. USA
 <304> 1997
 <305> 83
 <306> 9636-9640
 <307> 1997-__-__
 <309> -__-__
 <313> (1)..(23)

<400> 21
 acttagagta atgcttttac tga 23

<210> 22
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> {}..{}
 <223> synthesized oligonucleotide

<300>
 <301> Tsai SF, Martin DIK, Zou LI, D'Andrea AD, Wong GG, Orkin SH.
 <302> Cloning of the cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells.
 <303> Nature
 <304> 1989
 <305> 339
 <306> 446-451
 <307> 1989-__-__
 <309> -__-__
 <313> (1)..(23)

<400> 22
 ccattgctca actgtatgga ggg 23

<210> 23
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(23)
 <223> synthesized oligonucleotide

<300>
 <301> Shimamoto, T., S. Nakamura, J. Bollekens, F. H. Ruddle and K. Takeshita.
 <302> Inhibition of Dlx-7 homeobox gene causes decreased expression of GATA-1 and c-myc genes and apoptosis.
 <303> Proc. Natl. Acad. Sci. USA
 <304> 1997
 <305> 83
 <306> 3245-3249
 <307> 1997-__-__
 <309> -__-__
 <313> (1)..(23)

<400> 23
 actattgggg acagggagtg atg 23

<210> 24
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc feature
 <222> (1)..(24)
 <223> synthesized oligonucleotide

<300>
 <301> Chen Q, Cheng J-T, Tsai L-H, Schneider N, Buchanan G, Carroll A, Crist W, Ozanne B, Siciliano MJ, Baer R.
 <302> The tal gene undergoes chromosome translocation in T cell leukemia and potentially encodes a helix-loop-helix protein.
 <303> EMBO J
 <304> 1990
 <305> 9
 <306> 415-424
 <307> 1990-__-__
 <309> -__-__
 <313> (1)..(24)

<400> 24
 caatcgagtg aagaggagac ctcc 24

<210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc feature
 <222> (1)..(20)
 <223> synthesized oligonucleotide

<300>
 <301> Chen Q, Cheng J-T, Tsai L-H, Schneider N, Buchanan G, Carroll A, Crist W, Ozanne B, Siciliano MJ, Baer R.
 <302> The tal gene undergoes chromosome translocation in T cell leukemia and potentially encodes a helix-loop-helix protein.
 <303> EMBO J
 <304> 1990
 <305> 9
 <306> 415-424
 <307> 1990-__-__

<309> -__-__
 <313> (1)..(20)

<400> 25
 ttgcggagct cggcaaaggc 20

【図1】

グロビンの上流の-100 ~ -600 bpの概略図である。

【図2】

EMSA競合分析の結果を示すオートラジオグラムである。

【図3】

図3Aは、K562 RNAのノーザンプロットの結果を示すオートラジオグラムである

。

図3Bは、図3Aと同じプローブを用いた胎児組織のノーザンプロットの結果を示すオートラジオグラムである。

【図4】

BP1の配列である。

【図5】

図5A及び図5Bは、pRSV/BP1-ORF(ここに記載されるようにサブクローン化した)の増加量又はエンptyベクターに関する一時トランスフェクション分析におけるK562細胞の相対CAT活性を示すグラフである。

【図6】

RT-PCRで求めた、赤芽球と骨髄の系統細胞系におけるBP1の発現を示すオートラジオグラムである。

【図7】

図7Aは、RT-PCRで求めた、T細胞ALL細胞系におけるBP1、DLX7及びDLX4を示すオートラジオグラムである。

図7Bは、RT-PCRで求めた、赤血球骨髄細胞系におけるBP1、DLX7及びDLX4を示すオートラジオグラムである。

【図8】

正常骨髄、B細胞及びT細胞におけるBP1、DLX7及びDLX4の発現を示すオートラジオグラムである。

【図9】

急性骨髄白血病におけるBP1、DLX7及びDLX4の発現を示すオートラジオグラムである。

【図10】

AML及びT細胞ALLにおけるBP1、DLX7及びDLX4の発現を比較しているグラフである。

【図11】

CD34⁺細胞とCD34⁻細胞におけるBP1発現を示すオートラジオグラムである。

【図12】

エンブティベクターを導入した対照細胞(9A及び9B)と比較したBP1アンチセンス産生プラスミド(10B及び10D)で形質転換した細胞系の4日間の経過について生存率%を示すグラフである。

【図13】

エンブティベクターを導入した細胞系9A-9B(ライン1-2)及びBP1アンチセンス産生プラスミド10B-10Dで形質転換した細胞系(ライン3-4)のBP1発現を示すオートラジオグラムである。

【図14】

乳がん系MCF7、ADR、MDA468及びT47Dを含む数種の乳がん細胞系によるBP1の発現を示し、新規な乳房組織には発現がないことを示すオートラジオグラムである。

【図15】

正常乳房組織及び悪性乳房組織におけるBP1の発現を示すオートラジオグラムである。

【図1】

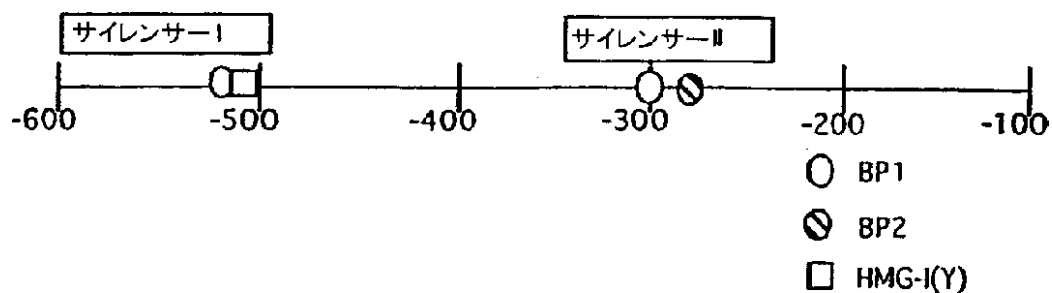


Fig. 1

【図2】

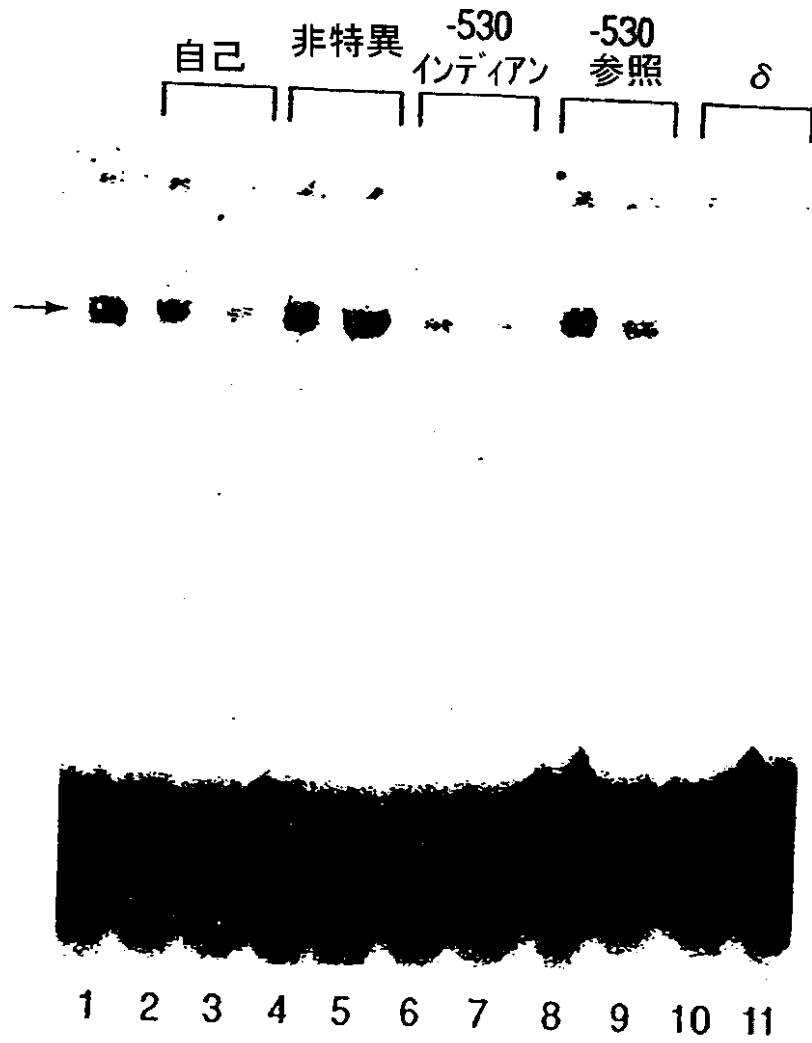
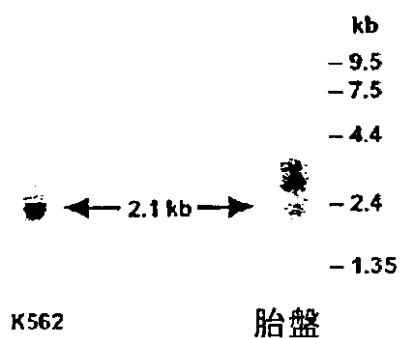


Fig. 1

【図3】

A.



B.



Fig. 3

【図4】

CCGCCCGGC AGGTGGGAAC CGAACCCGAT GGAGAGGAGG GGGCCCCAT GGATTTAGGG 60
 GGGGAGGGGA AAGTCATGGG GGGGCACCCC CCCGGAACCC CTTTCCCAGG CGCGCGTTCT 120
 CCGCTGAAAG AGGCTCAGAG AGACACTTTC TCCGGGATCT TAAGTGTTGG GGCTCCTGGC 180
 TGGGGGGCCC GTCCGGCCCA ACGCCGGAGG CTTGGAAAAG AGAGTTAGCA GCGGGAGCGG 240
 ACTACGTGCC GGGCCATGGC CTTTCTGCC GGGCCCTGGC GACA 284

ATGACCTCTTTGCCCTGCCCCCTCCCGGC GGGACGCTCCAAAGCTGTCTTCCCAGACCTC 347
 M T S L P C P L P G R D A S K A V F P D L (21)

GCCCTGTCCCGTGGTAGCGGCTGCTACCGCTTGGCTTGTCCCCTACAACCGCAGCCTCC 410
 A P V P S V A A A Y P L G L S P T T A A S (42)

CCCAATTTGTCTACTCCAGGCCGTATGGCCACCTCCTGTCTTACCCCTACACCGAGCCAGCG 473
 P N L S Y S R P Y G H L L S Y P Y T E P A (63)

AACCCCGGAGACTCCTACTGTCTGCCAGCAACCCGCGCGCTCTCTCAGCCCCCTCTGCGGA 536
 N P G D S Y L S C Q Q P A A L S Q P L C G (84)

CCTGCAGAGCACCTCAGGAACCTCGAGGCAGACTCGGAGAAGCCGCGGCTGTCCCCGGAACCC 599
 P A E H P Q E L E A D S E K P R L S P E P (105)

TCCGAGCGGCGCCCTCAGGCCCCCGCAAAAAGCTCCGCAAGCCGAGGACCATCTACTCCAGC 662
 S E R R P Q A P A K K L R K P R T I Y S S (126)

CTGCAGCTGCAGCACCTAAACCAGCGTTTCCAGCACACGAGTACCTGGCGCTGCCCGAGAGG 725
L Q L Q H L N Q R E Q H T Q Y L A L P E R (147)
 ヘリックス¹

GCCGAGCTGGCAGCGCAGCTCGGCCCTCACCCAGACCCAGGTAAAGATCTGGTTTTCAGAACAA 788
A Q L A A Q L G L T Q T O V K I W F O N K (168)
 ヘリックス²

CGCTCCAAGTATAGAAAGCTCCTGAAGCAGAATTTGGGGGGCAGGAAGGGGACTTCCCTGGG 851
R S K Y K K L L K Q N S G G Q E G D F P G (189)

AGGACCTTCTGTGTCTCCCTGCTCCCCACCCCTCCCTCCTCTGGGATCTACCCAAGGCA 914
 R T F S V S P C S P P L P S L W D L P K A (210)

GGGACCTGCCACCAAGTGGCTATGGCAACAGCTTTGGAGCCTGGTATCAGCATCACTCCTCA 977
 G T L P T S G Y G N S F G A W Y Q H H S S (231)

GATGTCTGGCTTCGCCTCAGATGATG 1004
 D V L A S P Q M M (240)

TGAATCTGGG GAAGGGCGGG TCAGGCCAC AGCCTTCTG CAAAGCCCAG GACCCAGGCA 1064
 GTCCACCTGC ACCCTTCTG GGCTGGGAGG AAACCAGCTC CAGATGGGTT TTCTCTGGAG 1124
 GACAAACAGT TAGAGGAGAA AAAGGAATGG AGCAGAGCCT GTACCCCTAA CCCTAACAGC 1184
 TAAATCAAG ACCTCAGCCT TATATAATCA TTGTCCCCAC CACTACCATG GACTGAACAC 1244
 CTTCAAC 1251

FIGURE 4

【図5】

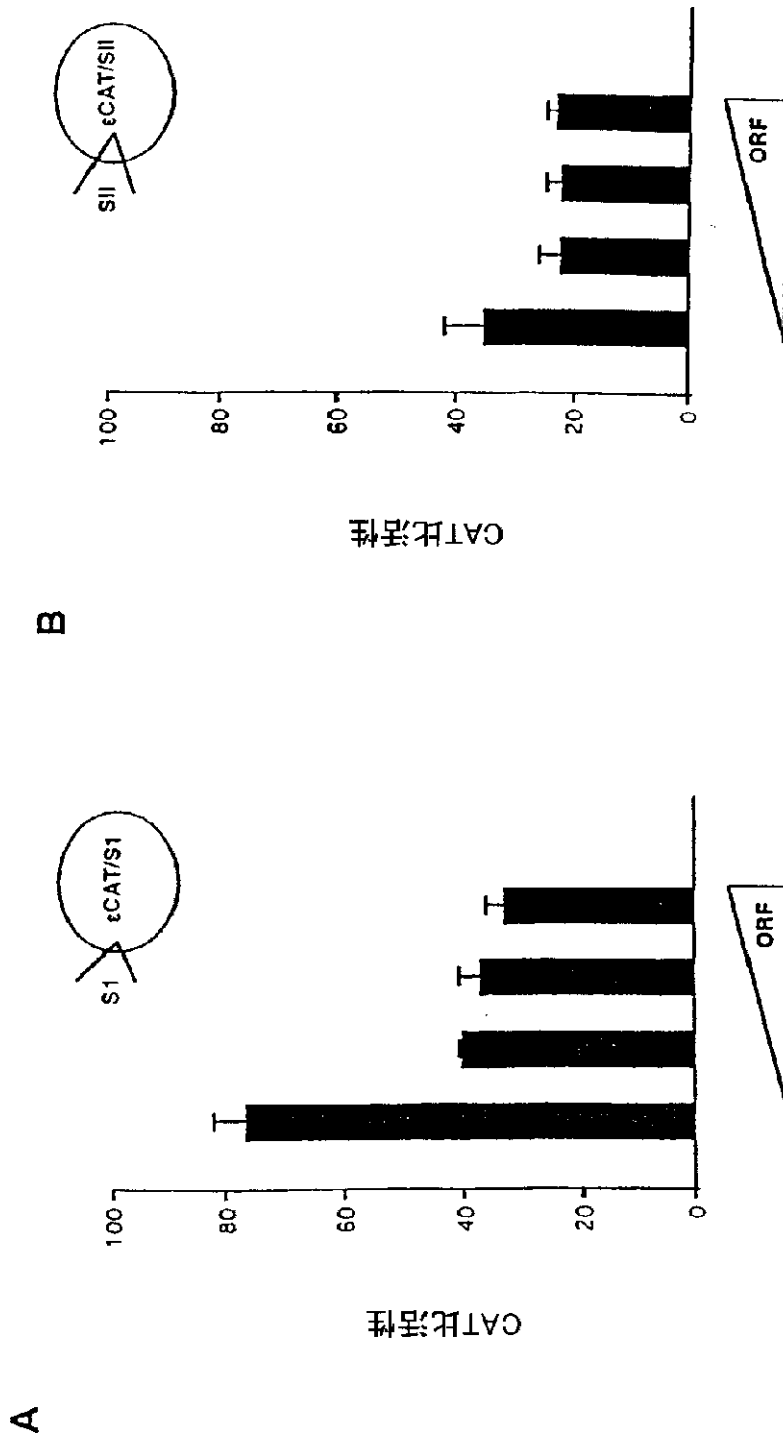


Figure 5

【図6】

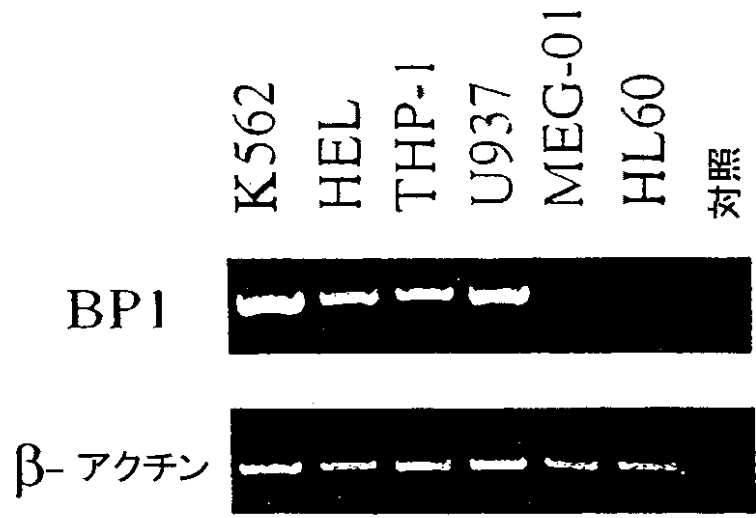


Fig. 6

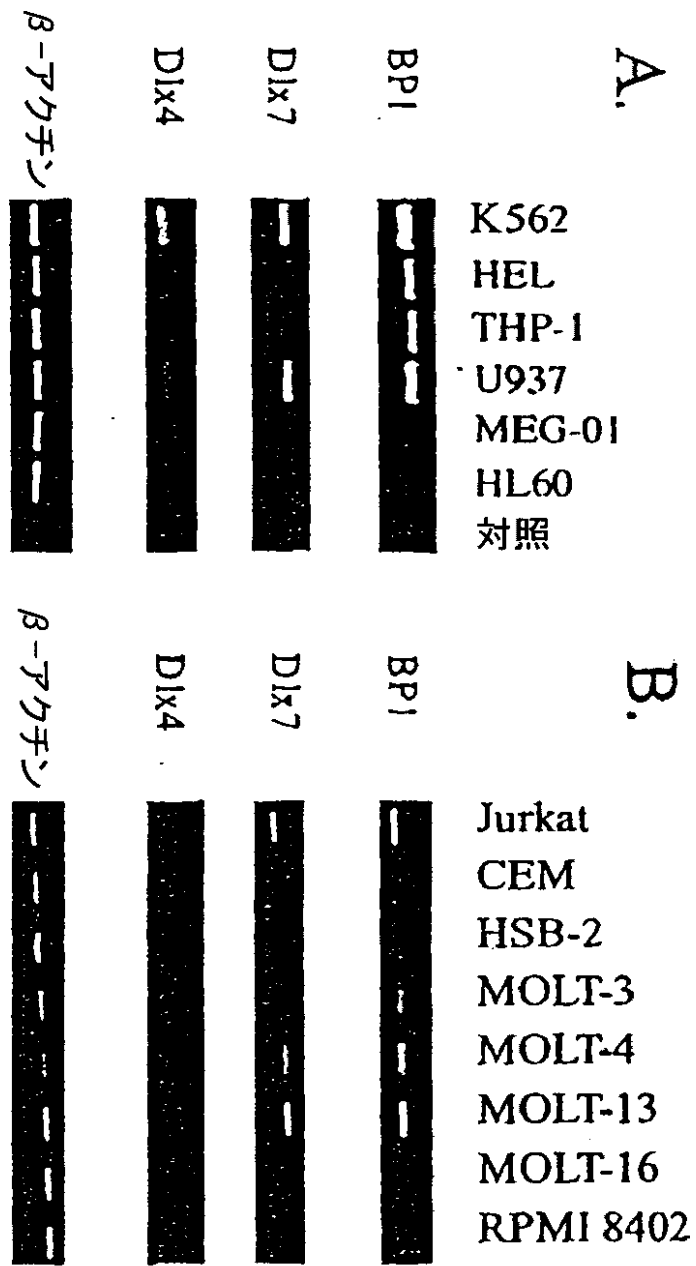


Fig. 7

【図7】

【図8】

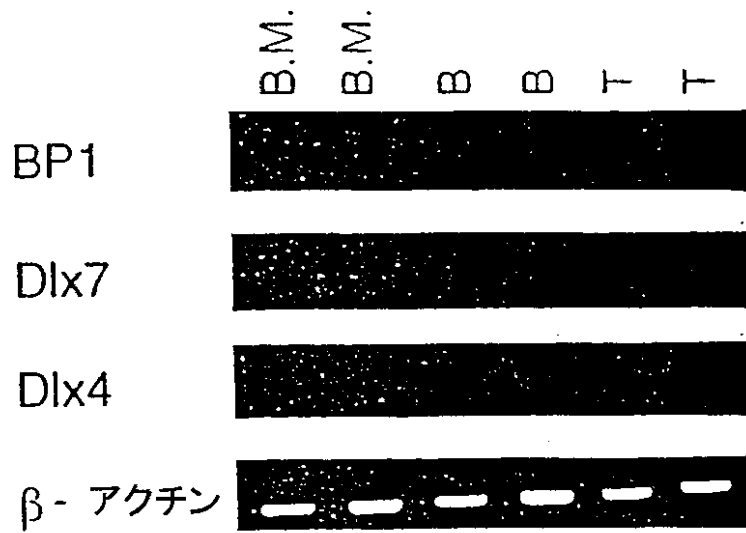


Fig. 8

【図9】

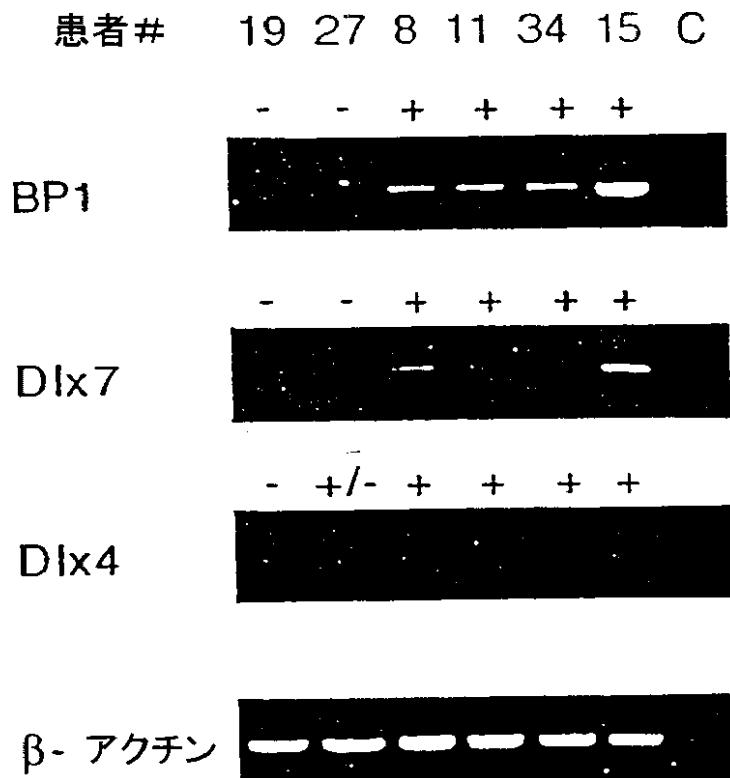


Fig. 9

【图10】

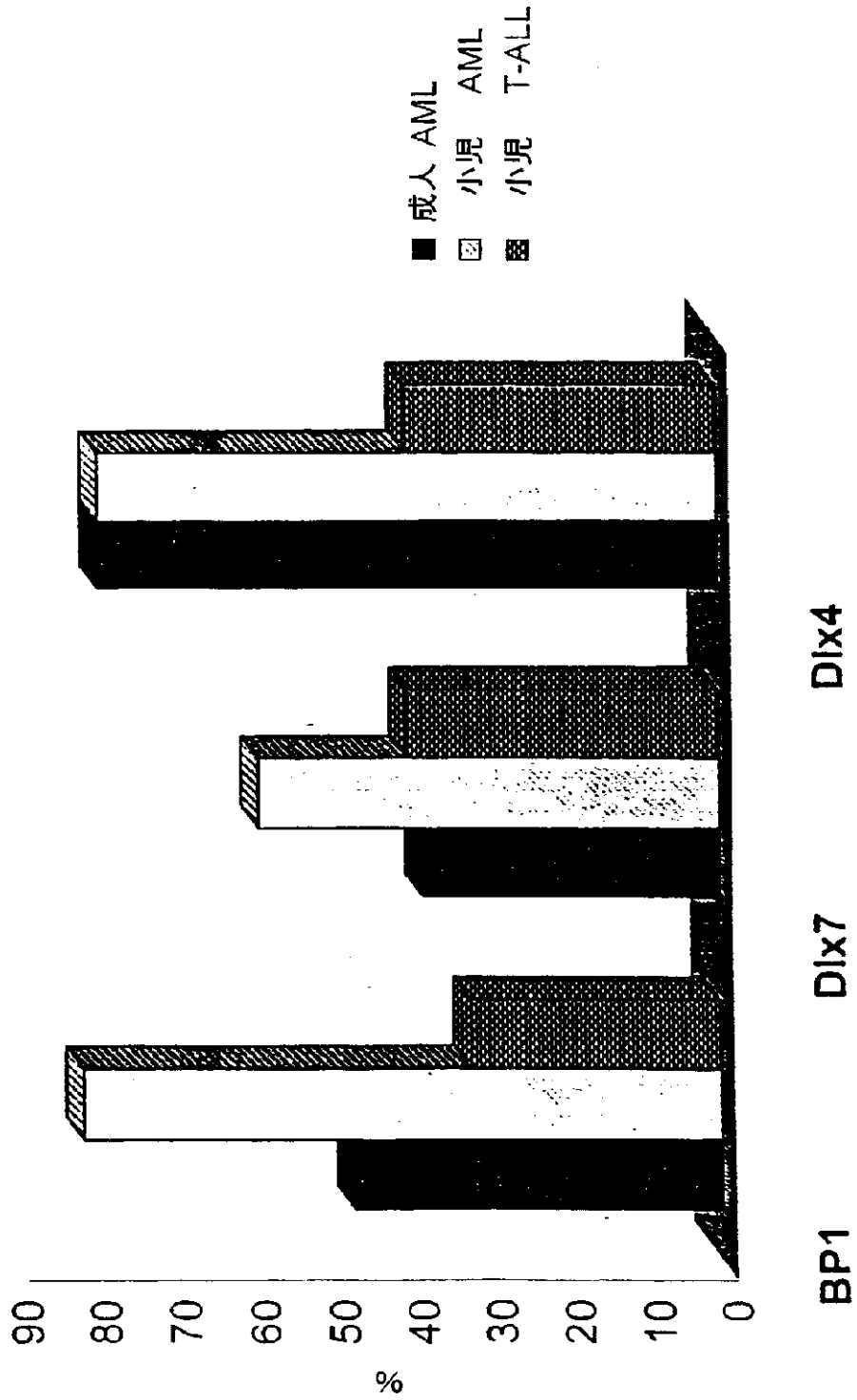


Fig.10

【図11】

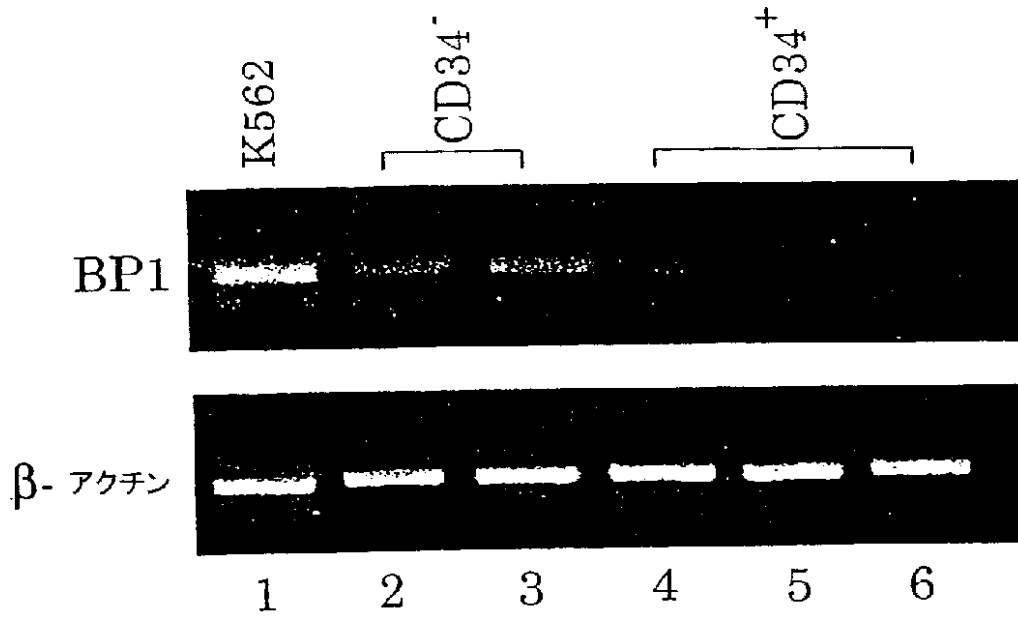


Fig. 11

【図12】

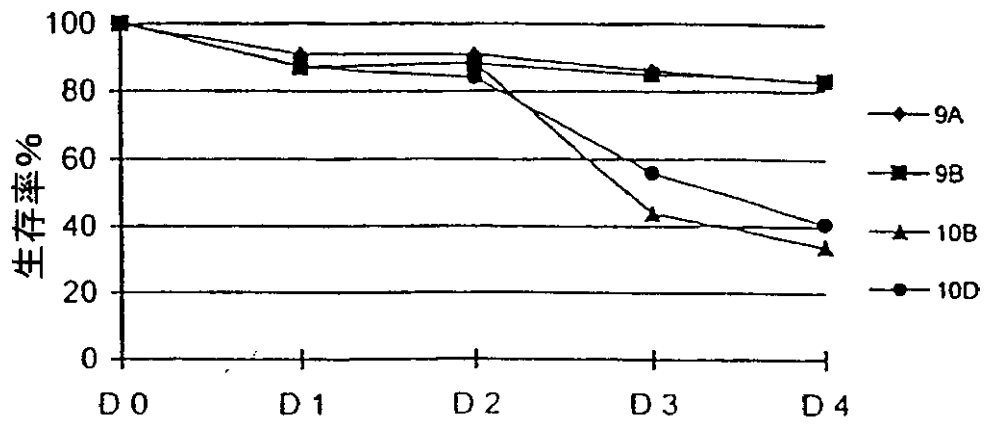


Fig. 12

【図13】

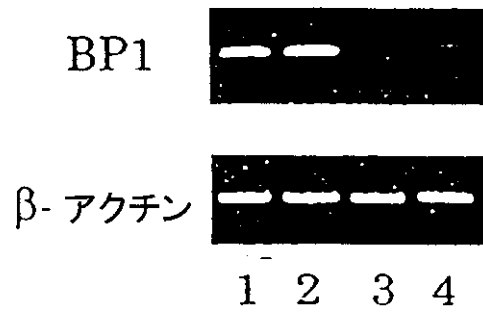


Fig. 13

【図14】



Fig. 14

【図15】

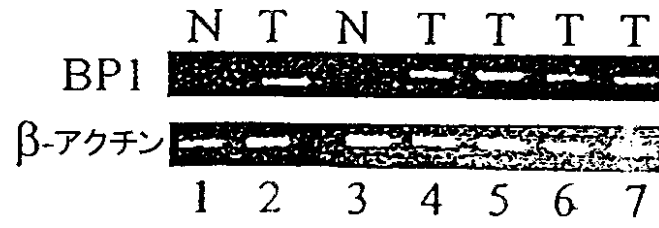


Fig. 15

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/22093
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C07H 21/04; C12Q 1/68; G01N 33/53; C07K 16/00 US CL : 536/23.5; 435/6, 7.1; 530/387.1 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. : 536/23.5; 435/6, 7.1; 530/387.1		
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) MPSRCH, DIALOG, WEST search terms: transcription factor, homeobox gene, distal-less		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Database Genbank, Accession No. U73328, NAKAMURA et al. 'Genomic analysis of a new mammalian distal-less gene: Dlx7. Gene sequence'. Genomics. 1996, Vol. 38, No. 3, pages 314-324. See entire document.	11, 26
Y		15, 17, 20, 29, 30
Y	SHIMAMOTO et al. Inhibition of DLX-7 homeobox gene causes decreased expression of GATA-1 and c-myc genes and apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. April 1997, Vol. 94, pages 3245-3249. See entire document.	15, 17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *A* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 02 NOVEMBER 2000		Date of mailing of the international search report 05 DEC 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer MINH-TAM DAVIS Telephone No. (703) 308-0916

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
C 0 7 K	16/18	C 1 2 N	1/19	4 C 0 8 4
C 1 2 N	1/15	C 1 2 Q	1/02	4 H 0 4 5
	1/19		1/68	A
	5/10	G 0 1 N	33/48	M
C 1 2 Q	1/02			P
	1/68		33/53	D
G 0 1 N	33/48		33/574	A
			33/577	B
	33/53	C 1 2 P	21/08	
	33/574	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/577	A 6 1 K	37/02	
// C 1 2 P	21/08	C 1 2 N	5/00	A
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U Z , V N , Y U , Z A , Z W			
Fターム(参考)	2G045 AA26 BA14 BB24 CA25 CB13 CB17 DA12 DA13 DA14 DA78 FB03 FB09 4B024 AA01 AA12 CA04 CA11 DA03 GA11 HA15 HA17 4B063 QA19 QQ08 QQ43 QR08 QR62 QS25 QS33 4B064 AG27 DA01 4B065 AB01 BA02 CA24 CA44 CA46 4C084 AA02 AA13 BA35 CA29 CA31 CA34 CA56 DC50 NA01 NA13 NA14 ZA552 ZB272 4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA51			

专利名称(译)	新型转录因子BP1		
公开(公告)号	JP2003507028A	公开(公告)日	2003-02-25
申请号	JP2001517546	申请日	2000-08-14
申请(专利权)人(译)	乔治华盛顿盐湖城大学		
[标]发明人	バーグパトリシアー		
发明人	バーグ パトリシア イー		
IPC分类号	G01N33/48 A61K38/00 A61K48/00 A61P7/06 A61P35/02 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N5/08 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6886 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/577		
CPC分类号	C12Q1/6886 C07K14/4702 C12Q2600/158		
FI分类号	A61K48/00 A61P7/06 A61P35/02 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/48.M G01N33/48.P G01N33/53.D G01N33/574.A G01N33/577.B C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A A61K37/02 C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/BA14 2G045/BB24 2G045/CA25 2G045/CB13 2G045/CB17 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA78 2G045/FB03 2G045/FB09 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/DA03 4B024/GA11 4B024/HA15 4B024/HA17 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS33 4B064/AG27 4B064/DA01 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA35 4C084/CA29 4C084/CA31 4C084/CA34 4C084/CA56 4C084/DC50 4C084/NA01 4C084/NA13 4C084/NA14 4C084/ZA552 4C084/ZB272 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA51		
优先权	60/148940 1999-08-13 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了编码转录因子BP1的SEQ ID NO : 1的分离的DNA，据信该转录因子是β-珠蛋白基因的阻遏物。用含有DNA的载体转导的宿主细胞可用于制备BP1。具有可操作地连接至BP1开放阅读框的可调节启动子的载体可用于转化镰状细胞性贫血患者的产生β-珠蛋白的细胞，并因此得到治疗。由于BP1在白血病和乳腺癌中过表达，因此可以通过确定在具有这些症状的患者的细胞样本中BP1是否过表达来筛选急性髓细胞性白血病，急性淋巴细胞性白血病或乳腺癌。并可以诊断。编码BP1或该DNA的RNA的反义DNA可用作治疗急性髓细胞性白血病，急性淋巴细胞性白血病或乳腺癌的方法。

強い、	弱い、	なし	なし
胎盤 腎	大脳皮質 脾 乳腺 小腸 肺 胎児肺 胎児腎	全脳 扁桃腺 尾状核 小脳 海馬 前頭葉 延髄 後頭葉 被殻 黒質 側頭葉 視床腹側部 核 胸腺 心臓 大動脈 骨格筋 結腸 膀胱 子宮 前立腺 胃 精巣 卵巣 脾臓 副腎	甲状腺 唾液腺 下垂体 気管腺 末梢 白血球 リンパ節 骨髓 垂 視床 肝 脊髄 胎児脾 胎児胸腺 胎児脳 胎児心臓 胎児肝