

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-532805

(P2005-532805A)

(43) 公表日 平成17年11月4日(2005.11.4)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	4 B 0 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2004-520662 (P2004-520662)
 (86) (22) 出願日 平成15年7月17日 (2003. 7. 17)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年3月16日 (2005. 3. 16)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2003/007786
 (87) 国際公開番号 W02004/008147
 (87) 国際公開日 平成16年1月22日 (2004. 1. 22)
 (31) 優先権主張番号 02015944.8
 (32) 優先日 平成14年7月17日 (2002. 7. 17)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 390040420
 マックス・プランク・ゲゼルシャフト・ツ
 ア・フェルデルング・デア・ヴィッセンシ
 ャフテン・エー・ファオ
 ドイツ連邦共和国 ベルリン (番地なし)
 B e r l i n , B R D
 (74) 代理人 100061815
 弁理士 矢野 敏雄
 (74) 代理人 100094798
 弁理士 山崎 利臣
 (74) 代理人 100099483
 弁理士 久野 琢也

最終頁に続く

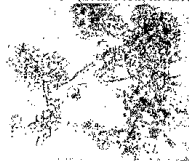
(54) 【発明の名称】 癌細胞浸潤の診断及び予防

(57) 【要約】

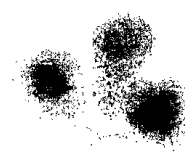
本発明は、悪性疾患の分野における診断及び治療法に関する。更に特には、本発明により、癌細胞浸潤の予防又は治療を含む、悪性疾患の浸潤性の測定法及び悪性疾患の浸潤性の減少法が得られる。

3D growth of invasive BC cell lines on Matrigel (6mg/1mg/ml)

MDA-MB-231 (branched, invasive) MDA-MB-435S (branched-stellate, invasive)



BT-549 (stellate, invasive)



MCF10A (duct-like pattern, non invasive), control



ah x100

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

A X L、G A S、M M P 1 4、A D A M 1 2、A D A M 1 7、M T 3 M M P、F G F 2、F G F 5、F Y N、L Y N、D D R 2、T I M P 1、H B - E G F、S G F、S 6 K I I、M A P 4 K 4、S I R P α 、A n n e x i n 2、S t a t 5 b 及び E D G 2 から成る群から選択した少なくとも 1 種の遺伝子の発現を測定することから成り、その際、高発現が高浸潤と相関している、悪性疾患の浸潤性の判定法。

【請求項 2】

前記群から選択した少なくとも 2 種の遺伝子の発現を測定することから成る、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

少なくとも A X L 遺伝子の発現を測定することから成る、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

悪性疾患が癌、特に乳癌、前立腺癌、腎臓癌、肺癌、結腸癌、神経膠芽腫及びその他の癌から選択した癌である、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

癌が神経膠芽腫である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

発現を m R N A レベルで測定する、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 7】

発現を核酸アレイで測定する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

発現をタンパク質レベルで測定する、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

発現を免疫学的検定法で測定する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

A X L 遺伝子発現及び / 又は A X L リガンド遺伝子発現及び / 又はタンパク質機能及び / 又はタンパク質リガンド機能を抑制することから成る、悪性疾患の浸潤性を減少させる方法。

30

【請求項 11】

A X L タンパク質リガンドが G A S 6 である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

A X L タンパク質の受容体チロシンキナーゼ活性を抑制することから成る、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

A X L 遺伝子の発現を抑制することから成る、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

A X L タンパク質及びそのリガンド間の相互作用を抑制することから成る、請求項 10 に記載の方法。

40

【請求項 15】

A X L 遺伝子、A X L リガンド遺伝子、A X L タンパク質及び / 又は A X L タンパク質リガンドの阻害剤を、悪性疾患の浸潤性を減少させるのに効果的な量でそれを必要としている被験者に投与することから成る、請求項 10 から 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

悪性疾患が癌、特に乳癌、前立腺癌、腎臓癌、肺癌、結腸癌、神経膠芽腫及びその他の癌から選択した癌である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

癌が神経膠芽腫である、請求項 16 に記載の方法。

50

【請求項 18】

被験者が哺乳類、特にヒトである、請求項 15 から 17 に記載の方法。

【請求項 19】

阻害剤が A X L タンパク質に対する抗体である、請求項 15 から 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

阻害剤が、A X L 遺伝子に対するアンチセンス核酸、リボザイム又は R N A 干渉分子又はその転写物である、請求項 15 から 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

阻害剤が A X L 遺伝子の優性阻害型突然変異体である、請求項 15 から 18 のいずれか 1 項に記載の方法。 10

【請求項 22】

薬理学的活性希釈剤、キャリア及び / 又はアジュバントと一緒に、活性剤として A X L 遺伝子、A X L リガンド遺伝子、A X L タンパク質及び / 又は A X L タンパク質リガンドの阻害剤から成る医薬組成物。

【請求項 23】

阻害剤が A X L タンパク質に対する抗体である、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 24】

阻害剤が、A X L 遺伝子に対するアンチセンス核酸、リボザイム又は R N A 干渉分子又はその転写物である、請求項 22 に記載の組成物。 20

【請求項 25】

阻害剤が A X L 遺伝子の優性阻害型突然変異体である、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 26】

悪性疾患の浸潤性を減少させるための請求項 22 から 25 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 27】

悪性疾患で転移形成を減少させるための請求項 22 から 26 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 28】

悪性疾患が神経膠芽腫である、請求項 26 から 27 のいずれか 1 項に記載の組成物。 30

【請求項 29】

少なくとも 1 種のその他の活性剤から成る、請求項 22 から 26 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 30】

その他の活性剤が細胞毒性又は細胞増殖抑制剤である、請求項 29 に記載の組成物。

【請求項 31】

試験化合物が A X L 遺伝子、A X L リガンド遺伝子、A X L タンパク質及び / 又は A X L タンパク質リガンドを抑制することができるかどうかを測定することから成る悪性疾患の浸潤性の同定及び / 又はキャラクタリゼーション法。

【請求項 32】

試験化合物が A X L タンパク質と結合できる及び / 又は A X L 遺伝子発現を減少させることができるかどうかを測定することから成る請求項 31 に記載の方法。 40

【請求項 33】

細胞ベースのアッセイ系を使用する、請求項 31 又は 32 に記載の方法。

【請求項 34】

細胞不含アッセイ系を使用する、請求項 31 又は 32 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、悪性疾患の分野における診断及び治療法に関する。更に特に本発明は、悪性 50

疾患の浸潤度判定法及び癌細胞浸潤の予防又は治療を含む悪性疾患の浸潤度の減少法を提供する。

【0002】

最近、受容体チロシンキナーゼ (RTK) の過剰発現が、ヒトを含む哺乳類において多くの症例で悪性疾患、特に癌の発生と関係があることが判明した。例えば受容体チロシンキナーゼ AXL / UFO (参照 1、2; Genbank accession No. M76125) の過剰発現はヒトの血液学的悪性腫瘍の発生に關与している。更に最新データは、AXL 及びそのリガンド GAS6 のシグナリングが癌細胞の腫瘍起因性血管形成、接着及び生存に關与していることを示す (参照 3、4、5、6、7、8)。Breast Cancer Research and Treatment (1997 年 10 月) 第 46 巻、No. 1、91 頁、Attar、E. C. その他は、ヒト乳癌における AXL 受容体チロシンキナーゼ発現に關する研究を開示している (参照 33)。Dodge Zantek N. その他は乳癌における細胞 - ECM 及び細胞間相互作用を調べるための新しい細胞系として MCF-10A-Neost を発表した (参照 34)。彼らは、AXL の浸潤における潜在的役割及び乳癌の進行因子としての潜在的役割を指摘している。しかし、AXL の過剰発現がその他の悪性疾患における浸潤度及び / 又は転移形成と關与していることを実証しうるデータは提供されていない。

10

【0003】

本発明の目的の一つは、浸潤度及び / 又は攻撃性用の新しいマーカーを確認するために、悪性疾患、特に乳癌及び脳癌における遺伝子、特にプロテインキナーゼ、ホスファターゼ及びその他のシグナリング遺伝子から選択した遺伝子の発現プロファイルを確立することであった。cDNA ハイブリダイゼーションアレイを 7 つの高浸潤性、14 の弱浸潤性乳癌細胞系及び 3 つの正常乳房上皮細胞系の遺伝子発現プロファイルを分析するために使用した。弱浸潤性と高浸潤性乳癌細胞系の間の遺伝子発現の差異を確認したが、これにより乳癌細胞系の浸潤度と相關する遺伝子クラスターの定義が可能となる。このクラスター又はそれからの遺伝子の組合せを使用することによって、高浸潤性乳癌細胞系を弱浸潤性乳癌細胞系及び正常乳房上皮細胞系から識別することができる。

20

【0004】

更に、悪性神経膠腫の生物学に關与する新規受容体チロシンキナーゼ (RTK) を同定するために、ヒト神経膠腫細胞系における RTK 発現プロファイルを cDNA マイクロアレイ法により判定した。EGFR 及び PDGFR- α の他に受容体 UFO / AXL が最も顕著に発現した RTK の一つであった。試験した 9 中 7 のヒト神経膠腫細胞系で、UFO / AXL mRNA が EGFR 用の mRNA より高い発現レベルを有した (第 4 表)。UFO / AXL の優性阻害型突然変異形を過剰発現させることによる UFO / AXL シグナル形質導入の抑制は、UFO / AXL 野生型形を過剰発現させる細胞と比較すると、マウスで腫瘍進行を抑制し、生存を延ばした。UFO / AXL シグナリングの機序及びその神経膠腫増殖における役割を調べるために、腫瘍細胞形態学及び腫瘍細胞挙動を増殖、凝集能、遊走性及び浸潤性に關して試験管内で評価した。更に、腫瘍細胞挙動、腫瘍起因性血管形成及び腫瘍還流を生体内で生体内多蛍光顕微鏡法により分析した。この試験により、UFO / AXL の新しい役割、即ち、神経膠腫細胞間相互作用、神経膠腫細胞遊走及び神経膠腫浸潤を媒介する役割が示される。UFO / AXL は、悪性脳腫瘍の瀰漫性 - 浸潤性、局所転移性増殖を媒介に寄与しうる最初の RTK である。

30

40

【0005】

従って、本発明の最初の態様は、AXL (Genbank M76125)、GAS6 (Genbank L13720)、MMP14 (Genbank NM004995)、ADAM12 (Genbank AF023476)、ADAM17 (Genbank U69611)、MT3MMP (Genbank NM005961)、FGF2 (Genbank NM002006)、FGF5 (Genbank NM004464)、FYN (Genbank M14333)、LYN (Genbank M16038)、DDR2 (Genbank X74764)、TIMP1 (Genbank NM003

50

254)、HB-EGF (Genbank NM001945)、SGK (Genbank Y10032)、RPS6RB1 (Genbank M60724)、MAP4K4 (Genbank XM038748)、SIRP α (Genbank Y10375) 及び Annexin A2 (Genbank D00017) から成る群から選択した少なくとも1種の遺伝子の発現を測定することから成る悪性疾患の浸潤度の判定法に関する。更に、遺伝子 Stat 5b (Acc. NM012488) 又は EDG2 (Acc. NM057159) の発現は、場合により前記の1種以上の遺伝子の発現を測定することに加えて、悪性疾患の浸潤度用の指標として測定することができる。前記遺伝子の少なくとも1種の高い発現は高い浸潤度と相関すると判明した。

【0006】

10

更に本発明では、高い浸潤度は前記遺伝子の少なくとも2種、特に AXL 及び1種以上のその他の遺伝子の高い発現と相関すると判明した。1種以上のその他の遺伝子は、前記遺伝子から選択してもよいし、浸潤性用のマーカーとして既に公知である遺伝子から選択してもよい。

【0007】

従って、方法は有利には、幾つかの前記遺伝子の発現の測定、例えば少なくとも2、3、4、5、6、7又は8種の遺伝子の発現の測定から成る。更に有利には、方法は少なくとも AXL / UFO 遺伝子 (Genbank M76125) の発現の測定から成る。更に方法は、浸潤性のマーカーとして既に公知である少なくとも1種のその他の遺伝子、例えば CD44 (Genbank X66733)、ピメンチン (Genbank X56134)、Cav1 (Genbank Z18951)、CAV2 (Genbank AF03572)、MMP1 (Genbank M13509)、MMP2 (Genbank NM004530)、MMP9 (Genbank NM004994)、M-CSF (Genbank M37435) 及び EPHA2 (Genbank M59371) の発現を測定することから成ってよい。

20

【0008】

前記遺伝子クラスター及び特に AXL 遺伝子と浸潤度の間の相関は、幾つかの種類の悪性疾患、例えば乳癌、特に原発性乳癌、前立腺癌、腎臓癌及び神経膠芽腫又はその他の上皮起源の癌で認められた。1種以上の前記マーカー遺伝子の発現及び特に AXL 遺伝子の発現と神経膠芽腫の浸潤度との間に相関が存在するという発見は特に興味深い。

30

【0009】

更に、AXL 遺伝子の優性阻害型突然変異体の安定過剰発現が、細胞浸潤性及び遊走を強力に抑制することができ、AXL 機能の抑制が高浸潤性悪性疾患、例えば乳癌又は脳癌、例えば神経膠芽腫で転移生成を抑制し、減少させることを示すことを見出した。AXL の細胞外部分に対するポリクローナル抗体は、癌細胞、例えば乳癌又は前立腺癌細胞系の遊走及び浸潤度に対して非常に強力な抑制活性を有する。更に、弱浸潤性乳癌、前立腺癌細胞系及び神経膠腫細胞における野生型 AXL の過剰発現はそれらの浸潤度を増加させた。

【0010】

これらのデータは、AXL 遺伝子及びタンパク質が、悪性疾患の予防又は治療用の、特に悪性疾患における腫瘍浸潤性及び/又は転移形成を抑制するための、有望な新しい標的であることを示す。

40

【0011】

従って、本発明のもう一つの態様は、AXL 遺伝子、AXL リガンド遺伝子又はタンパク質又はそのリガンドを抑制することから成る悪性疾患の浸潤度を減少させる方法に関する。この方法は、(i) AXL タンパク質の受容体チロシンキナーゼ活性を抑制し、(ii) AXL 遺伝子の発現を抑制し、(iii) AXL タンパク質及びそのリガンド、特に GAS6 間の相互作用を抑制し、かつ/又は (iv) AXL と下流シグナル伝達因子の相互作用を抑制することから成ってよい。

【0012】

50

A X L タンパク質リガンドに関して、特に G A S 6 のラミニン G 様ドメイン (G A S 6 - L G) が、A X L 結合及び活性化のような A X L タンパク質との相互作用に関与すると判明した (参照 3 6) 。特に G A S - L G 2 ドメインの残基、例えば L e u ^{6 2 0}、T y r ^{6 6 0} 及び P h e ^{4 8 7} が A X L 結合及び / 又は活性化に影響を与える。本発明の詳細な実施態様によれば、悪性疾患の浸潤度を減らす方法は、1 種以上の G A S 6 - L G の残基、特に L e u ^{6 2 0}、T y r ^{6 6 0} 及び / 又は P h e ^{4 8 7} の抑制から成る。

【 0 0 1 3 】

本発明は、悪性疾患の診断又は予防及び / 又は治療に関し、特に悪性疾患における腫瘍浸潤度及び / 又は転移生成に関する。悪性疾患の有利な例は、乳癌、前立腺癌、腎臓癌、結腸癌、肺癌及び神経膠芽腫である。更に特には悪性疾患は、乳癌又は神経膠芽腫である。

10

【 0 0 1 4 】

本発明の診断の実施態様では、浸潤性関与遺伝子の発現を定量的及び / 又は定性的に測定する。発現は、例えばヒト腫瘍患者からの悪性細胞から成る試料で測定する。試料は、組織切片標本、生検試料など又は体液からのものであってよい。試験すべき試料の遺伝子発現を、例えば “ 正常 ” 細胞又は弱浸潤性の悪性細胞からの陰性の対照試料及び / 又は例えば高浸潤性悪性細胞からの陽性対照の対照試料における遺伝子発現と比較することができる。

【 0 0 1 5 】

遺伝子発現は例えば m R N A 又は転写物レベル及び / 又はタンパク質レベルで公知方法により測定することができる。

20

【 0 0 1 6 】

m R N A レベルの遺伝子発現の測定は、逆転写及び / 又は増幅反応、例えば P C R から成ってよい。有利には、遺伝子発現を核酸アレイで測定するが、その際試験すべき試料からの核酸、例えば R N A 又は c D N A を試験すべき核酸に特異的な固定化プローブのアレイにハイブリッドさせる。好適な核酸アレイの有利な例は、P C T / E P 0 2 / 0 1 0 7 3 に記載されている。代わりに、遺伝子発現をその他の方法、例えばノーザンブロットハイブリダイゼーションにより測定することができる。

【 0 0 1 7 】

タンパク質レベルの遺伝子発現は、浸潤度関与遺伝子によりコードされたタンパク質に対する抗体を使用する免疫学的方法により測定することができる。抗体は、公知標識基、例えば当業者に公知であるような、放射性、蛍光、化学発光又は酵素基により直接又は間接的に標識付けされていてよい。

30

【 0 0 1 8 】

本発明の治療の実施態様は、特に A X L 遺伝子、A X L リガンド遺伝子、A X L タンパク質又はそのリガンドの阻害剤をそれを必要とする被験者に悪性疾患の浸潤度の減少に効果的な量で投与することから成る方法に関する。被験者は有利には哺乳類、更に有利にはヒトである。A X L タンパク質のリガンドは有利には G A S 6、特に前記したような G A S 6 - L G の残基である。

【 0 0 1 9 】

A X L 遺伝子、A X L リガンド遺伝子、A X L タンパク質又はそのリガンド、例えば G A S 6 の阻害剤は、抗体、生物学的活性核酸又は低分子量化合物、例えばペプチド又は非ペプチド有機化合物であってよい。

40

【 0 0 2 0 】

有利な態様では、阻害剤は、A X L タンパク質又はそのリガンド、例えば G A S 6 に対する抗体である。用語 “ 抗体 ” とは、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体、特にキメラ又はヒト化モノクローナル抗体又はヒト抗体である。更に、この用語は抗体フラグメント、例えばタンパク質分解フラグメント、例えば F a b、F a b ' 又は F (a b)₂ フラグメント又は組換えフラグメント、例えば単鎖抗体フラグメント、例えば s c F v フラグメントから成る。前記の抗体又は抗体フラグメントの製造法は当業者に公知である。

50

【0021】

更に有利な態様では、阻害剤は、生物学的活性核酸、例えばDNA、RNA又は合成核酸類似物である。生物学的活性核酸の有利な例は、AXL遺伝子又はAXLリガンド遺伝子又はその転写物に対するアンチセンス核酸、リボザイム又はRNA干渉分子である。更に有利な生物学的活性核酸の例は、AXL遺伝子の優性阻害型突然変異体である。生物学的活性核酸は公知方法により、例えばウィルス性又は非ウィルス性遺伝子導入ベクターを使用することによって得られる。

【0022】

更に有利な態様では、阻害剤はペプチド化合物、例えばアミノ酸4～25個の長さを有するペプチド、環状ペプチド、ペプチド誘導体又はこのようなペプチドから誘導されるペプチド模擬物である。代わりに、低分子量阻害剤は非ペプチド有機化合物、例えばAXLキナーゼ活性の阻害剤であってよい。低分子量の阻害剤は、下記に更に詳説する方法で好適な化合物ライブラリーのスクリーニングにより得られる。

【0023】

更に本発明のもう一つの態様は、薬理的活性希釈剤、キャリア及び/又はアジュバントと一緒に、活性剤としてAXL遺伝子、AXLリガンド遺伝子、AXLタンパク質又はそのリガンド(例えばGAS6、特に前記したようなGAS6-LGからの残基)の阻害剤から成る医薬組成物に関する。この組成物は特に悪性疾患の浸潤度を減らしかつ/又は悪性疾患で転移生成を減少させるために好適である。活性剤として使用される阻害剤の種類に応じて、医薬組成物は液体、固体、例えば粉末、錠剤など、乳濁液又は懸濁液であってよい。組成物は、注入、経口、局所、直腸、鼻腔内又はその他の好適な方法により投与することができる。組成物中の活性剤の有効量は、化合物の種類及び治療すべき疾患に応じて過度の負担なしに当業者により決定することができる。

【0024】

組成物は少なくとも1種のその他の活性剤から成ってよい。この少なくとも1種のその他の活性剤は、AXL阻害剤と一緒に単一組成物中に処方することもできるし、AXL阻害剤組成物と同時投与される別々の組成物中に処方することもできる。その他の活性剤は、細胞毒性又は細胞増殖抑制剤、例えばドキソルピシン、シスプラチン、カルボプラチン、抗腫瘍抗体又はその任意の組合せであってよい。

【0025】

本発明のもう一つの態様は、少なくとも試験化合物がAXL遺伝子、AXLリガンド遺伝子、AXLタンパク質又はそのリガンド(例えば前記したようなGAS6)又はタンパク質を抑制することができるかを判定することから成る悪性疾患の浸潤性の阻害剤の確認及び/又は特性付けの方法に関する。更に詳細には、方法は試験化合物がAXLタンパク質と結合することができるか及び/又はAXL遺伝子発現を減少させることができるか判定することから成る。試験化合物は、化合物ライブラリー、例えばペプチド又は非ペプチドライブラリーから誘導することができ、これをAXL阻害活性に関してスクリーニングにかける。スクリーニング法は、細胞系アッセイシステム、例えばAXL遺伝子を過剰発現することができる細胞を使用するシステムの使用から成ってよい。付加的にか又は代わりに、方法は無細胞系アッセイシステムの使用から成ってもよく、その際、試験化合物のタンパク質又はそのフラグメントとの結合を判定するために、試験化合物を実質的に精製したAXLタンパク質又はそのフラグメントと接触させる。

【0026】

更に本発明を下記図及び実施例につき詳説する。

【0027】

第1図：マトリゲル-マトリックスで培養した正常及び乳癌(BC)細胞系の形態学(3D伸展)。

細胞をマトリゲル層上で7～14日間培養した。3つの基本的形態学を表す写真は指示したBC細胞系を表す。倍率は、MDA-MB-231、MDA-MB-435S、BT549及びMCF10Aに関しては×100であった。マトリゲル上の細胞増殖の形態学

10

20

30

40

50

測定は前記したようにして実施した(10、11、12)。簡単には、培地50 μ l中に再懸濁させた細胞(細胞5000個/96ウェルプレートのウェル)を-RPMA基礎培地塩中6mg/mlに希釈したマトリゲル(Bection Dickinson)70 μ lから成る前もって調整したマトリゲルコーティング上で培養した。その上で重合後、マトリゲル(1.0mg/ml)50 μ lを加えた。コロニー伸展を実験の間中モニターし、OpenLab(UK)デジタルカメラを装備したZeiss Axiovert 35顕微鏡を用いて7~14日目に撮影した。各細胞系の名前を示す。

【0028】

第2図：公知キナーゼ及びホスファターゼの遺伝子発現プロファイルによる乳癌細胞系の分類。弱浸潤性対高浸潤性BC細胞系における通常の遺伝子発現変化(クラスターAXL)。

10

遺伝子発現を“材料及び方法”で記載したように、各々指示した細胞系からのRNAのcDNAアレイハイブリダイゼーション(2部の標本)により測定した。22種の選択した遺伝子は少なくとも75%の弱浸潤性BC細胞系、高浸潤性BC細胞系(赤及び緑バー)又は両方とも2倍より大きい中央倍率変化で、識別性に発現した。MCF10Aに関する遺伝子発現のレベルを、クラスターの下部キー中に示した色及びシャドウで表す。各色調は、尺度の下の数により挟まれた範囲の全ての値を包含する。GenBank accession number(第3表参照)及び各遺伝子の説明並びに自作アレイ膜上のスポット場所も得られる(遺伝子の別の第2及び3表参照)。確認試験は、アレイと同じRNA標本を用いて、ノーザン(AXL及びGAS6)又はRT-PCR分析(HER2発現及び増幅に関してはRoche system、未記載)により行った。他に記載のない限り、アレイとその他の方法間の一致は、大多数の試料に相関して、2倍以内であった：少なくとも10倍の、その他の方法論による倍率変化を過小評価するアレイの定性的一致。浸潤性及び弱浸潤性細胞系の位置はカラーバーにより示した。

20

【0029】

第3A、B図：公知キナーゼ及びホスファターゼの遺伝子発現プロファイルによる原発性乳癌及びそれらの細胞系の分類。

遺伝子発現を“材料及び方法”で記載したように、指示した各細胞系及び原発性腫瘍からのRNAのcDNAアレイハイブリダイゼーション(二部の標本)により測定した。26種の選択遺伝子は少なくとも75%の弱浸潤性BC細胞系、高浸潤性BC細胞系(赤及び緑バー)又は両方とも2倍より大きい中央倍率変化で、特異的に発現した。正常な乳房組織(2つの混合)に関する遺伝子発現レベルは、クラスターの下部キー中に示した色及びシャドウで表す。各色調は、尺度の下の数により挟まれた範囲の全ての値を包含する。GenBank accession number(第3表参照)及び各遺伝子の説明並びに自作アレイ膜上のスポット位置も得られる。確認試験は、アレイで使用したと同じRNA標本を用いて、ノーザン(AXL及びGAS6、原発性腫瘍に関しては未記載)又はRT-PCR分析(HER2発現及び増幅に関してのみRoche system、未記載)により行った。他に記載のない限り、アレイとその他の方法間の一致は、大多数の試料に相関して、2倍以内であった；少なくとも10倍の、その他の方法論による倍率変化を過小評価するアレイの定性的一致。

30

40

【0030】

A．正常乳房組織、原発性腫瘍、正常乳房及び癌細胞系の教師なしアレイ分析。AXLクラスターは18種の遺伝子を包含し(発現相関は0.51又は有意)、これらの遺伝子の大部分は乳癌細胞系で確認された(第2図参照)。

【0031】

B．コンセンサス浸潤性遺伝子のみを使用する原発性腫瘍及び乳癌細胞系の分類。全ての原発性腫瘍及びBC細胞系を26種の遺伝子(AXLクラスターに属す)を使用してクラスター分析した。原発性腫瘍及びBC細胞系は識別され、高浸潤性(HI)BC細胞系は同じツリーに属す(赤いバーで示したMDA-MB-231及び原発性腫瘍BC151を除く)。

50

【 0 0 3 2 】

第 4 図：選択した識別性に発現した A X L / G A S 遺伝子のノーザンブロット分析

指示した各細胞系から単離した m R N A (1 5 μ g / レーン) を c D N A アレイ上にデボジットしたフラグメントに相応するプローブを用いるハイブリダイゼーションによって指名遺伝子の発現に関して分析した。A c 7 4 5 (正常乳房上皮細胞) に相応する各 m R N A に関する発現レベルを各帯の下に記録する。主特異的帯に相応する大きさ (右) は各 m R N A に関して文献で報告されたものと一致する。同じフィルターを用いてプローブし、これらの分析用にプローブした。パネル：A - 発現 A X L、B - G A S 及び C - β - アクチン m R N A。β - アクチンのレベルを代表的フィルター用の試料荷重用の対照として表す。m R N A は 2 種の別々に増殖した細胞培養基から調製し、指示遺伝子の発現レベルに関して試験した。 10

【 0 0 3 3 】

第 5 A 及び B：マトリゲル上で培養した場合の B C 細胞系 M D A - M B - 4 3 5 S、B T 5 4 9 及び M D A - M B - 2 3 1 (m o c k) 又は安定発現 d n A X L の形態学。

細胞はマトリゲル層上で 7 ~ 1 4 日間培養した。

A. 3 つの基本的形態学を表す写真は指示した B C 細胞系を表す。B. 傷アッセイ (W o u n d a s s a y) は、M D A - M B - 4 3 5 S m o c k 及び d n A X L 突然変異体クローン 2 に関して表す。位置及び処理は図に記載する。倍率は × 1 0 0 であった。

【 0 0 3 4 】

第 6 A、B 及び C 図：抗 E x - A X L 抗体を用いて処理後の B C 細胞系 M D A - M B - 4 3 5 S、m o c k、安定発現 d n A X L の 3 D 増殖、遊走性及び浸潤性挙動。 20

A. 細胞はマトリゲル層上で 7 ~ 1 4 日間培養した (第 1 図の説明参照)。処理しなかったか又は指示したように抗体によって処理した。

【 0 0 3 5 】

B. 指示した B C 細胞系の浸潤性活性を、“材料及び方法”に記載した方法により、マトリゲル (3 ~ 4 m g / m l) 塗布したフィルターを透過した細胞数を数えることによって B o y d e n c h a m b e r 中で測定した。データは 3 点を有する少なくとも 2 個の個々の実験からの平均である。エラーバー。

【 0 0 3 6 】

C. 遊走能は、浸潤性分析と同じ条件下でマトリゲルなしのフィルターを用いて平行な t r a n s w e l l c h a m b e r 中で分析した。結果は、三点を有する少なくとも 2 個の実験の平均である (エラーバー)。細胞遊走も B o y d e n c h a m b e r 中でマトリゲルバリアーの不在下で評価した。予想通り、細胞系 M D A 2 3 1、M D A 4 3 5 S 及び B T 5 4 9 は弱浸潤性細胞系 M C F 7 より運動性がかなり高い (未記載)。 30

【 0 0 3 7 】

第 7 図：M C F 7 乳癌細胞に対する A X L w t トランスフェクションの作用

A. A X L w t 感染及び強制過剰発現の形態学的作用。M C F 7 細胞における A X L w t の過剰発現は、緊密な丸石形細胞から多数の突出拡張部を有する不規則形細胞への変化を生じる。

【 0 0 3 8 】

B. 細胞浸潤に対する A X L w t 感染の作用を前記したように B o y d e n c h a m b e r アッセイで分析した (材料及び方法参照)。クローン M C F 7 - A X L w t は空のベクター感染細胞より浸潤性が 3 0 倍であった。 40

【 0 0 3 9 】

合計 2 0 0 0 0 個の細胞を B o y d e n c h a m b e r 上に 3 6 ~ 4 8 時間播いた (フィルター孔 8 μ m、濃度 3 ~ 4 m g / m l でマトリゲルマトリックスで覆った)。A X L w t で感染させた細胞は空ベクター対照又は d n A X L 突然変異体形より遙かに早く浸潤する。

【 0 0 4 0 】

第 8 図。

A. 対照ベクターを発現するSF126神経膠腫細胞クローン(SF126-mock)、UFO/AXLの野生型(SF126-Ufo-WT)及びUFO/AXLの切端優性阻害型突然変異体形(SF126-Ufo-DN)のウェスタンブロット分析。血清-減少細胞を処理しないまま(-)か又は200 μ g/ml Gas6で処理した(+). 溶解物を抗ホスホチロシン血清(上部パネル)又はヒトUFO/AXLの細胞外ドメインに対する抗体(下の列)でブロットした。SF126-mock細胞と比較して、分析により、各々SF126-UFO-WT及びSF126-UFO-DN細胞で増加(約30%)及び全廃のGas6/UFO/AXL媒介シグナリングが実証された。B~D. SF126細胞(B)におけるUFO/AXLの切端優性阻害型突然変異体形の発現は、SF126-mock及びSF125-UFO-WT細胞(B及びC)に比べた場合に、それらの形態学を変化させた。 10

【0041】

第9図.

A. SF126細胞クローンに関する腫瘍容量の分析。腫瘍細胞をヌードマウス(n=4群当たりの動物)中に皮下に移植し、14日間追跡した。平均 $\pm$ SEM値を表す。* $p < 0.05$ 対SF126-mock細胞。B. 生体内多蛍光ビデオ顕微鏡法により評価した、SF126細胞クローンをヌードマウスのdorsal skinfold chamber中に移植後の腫瘍面積の定量的分析(左パネル)及び機能性血管密度(右パネル)(n=4、群当たりの動物)。平均 $\pm$ SD値を表す。統計分析をANOVA、次いで適切な事後検定(post hoc test)により群間の個別比較を実施した；* $p < 0.05$ 対SF126-Ufo-DN細胞。C及びD. 腫瘍容量の差異を示すSF126-UFO-WT腫瘍(C)及びSF126-UFO-DN腫瘍(D)の代表的組織形態学像。バーは1mmを表す。H&E染色。E及びF. 腫瘍浸潤の差異を示すSF126-UFO-WT腫瘍(E)及びSF126-UFO-DN腫瘍(F)の代表的組織形態学像。SF126-UFO-WT腫瘍は、隣接皮膚筋肉及び皮下組織を広範囲に浸潤した(E)(矢印は破壊された筋肉層の残遺物を示す)が、SF126-UFO-DN腫瘍細胞浸潤はほぼ完全に抑制された(F)。(F)中で筋肉層の構造は保持された。バーは100 μ mを表す。H&E染色。H及びI. 蛍光顕微鏡を単独(G)及び位相差と組み合わせ(H)、隣接組織層中へのSF126-UFO-DN腫瘍細胞の浸潤の不在を確認。腫瘍細胞は移植の前にDiIで標識付けした。バーは100 μ mを表す。全試料は、ヌードマウスのdorsal skinfold chamber中へ移植後21日目に摘出した。t、腫瘍塊；m、皮膚筋肉層；sc、皮下組織。SF126-mock、対照；SF126-Ufo-WT、UFO/AXLの野生型を発現する細胞；SF126-Ufo-DN、UFO/AXLの切端優性阻害型突然変異体形を発現する細胞。 20 30

【0042】

第10図.

A. SF126細胞クローンのMTT増殖アッセイ。Gas6(200 μ g/ml)の不在及び存在下。細胞は左未処理(-Gas6)又は200 μ g/mlのGas6で処理した(+Gas6)。分析は培養48時間後に実施した。増殖率は刺激しなかったSF126-mock細胞に関して表す。平均値を表す。B及びC. UFO/AXL機能の抑制に付随する変化のない凝集能を実証するSF126-Ufo-WT及びSF126-Ufo-DN細胞クローンによる多細胞凝集体形成。D. 7日間の観察期間中のSF126細胞クローンの遊走性。遊走面積を画像分析システムを用いて面積測定法により分析した。平均 $\pm$ SD値を表す。統計分析は、ANOVA、次いで対応のないスチューデントt検定を使用して行った。* $p < 0.05$ 対SF126-mock。E及びF. 胎児ラット脳凝集体を用いるSF126-UFO-WT腫瘍細胞スフェロイド(E)又はSF126-UFO-DN腫瘍細胞スフェロイド(F)の48時間対比による腫瘍細胞浸潤の分析。SF126-UFO-DN腫瘍細胞スフェロイドと脳細胞凝集体の間の輪郭の鮮明な境界は、UFO/AXL機能の抑制による浸潤性の欠如を示す。B, 脳細胞凝集体；S、腫瘍スフェロイド、SF126-mock、対照；SF-126-Ufo-WT、UFO/AXLの野 40 50

生型を発現する細胞；S F 1 2 6 - U f o - D N、U F O / A X Lの切端優性阻害型突然変異形を発現する細胞。

【 0 0 4 3 】

第 1 1 図 .

A . 脳中にS F 1 2 6 - U f o - W T細胞及びS F 1 2 6 - U f o - D N細胞の定位移植後の成長したヌードマウスの生存曲線 (n = 4、群当たりの動物)。神経欠損を発現するか又は最初の体重の > 3 0 % 減少したら直ちに動物を殺した。B ~ E . 隣接脳組織中への瀰漫性腫瘍細胞浸潤を示す、脳中への移植後のS F 1 2 6 - U f o - W T腫瘍の組織形態学 (B)。腫瘍細胞は、血管周囲間隙 (C)、白質路に添って (D) 及び心室系の壁に添って (E) 浸潤した。H & E 染色、バーは 1 0 0 μ m を表す。

10

【 0 0 4 4 】

実施例

A . 乳癌及び前立腺癌試験

1 . 材料及び方法

1 . 1 . 腫瘍試料及び細胞系

乳癌 (B C) 及びその他の腫瘍の種類及び大きさに関する選択の偏向を排除するために、試験すべきRNAは任意抽出試料から調製した。原発性浸潤性乳癌の試料は手術を受ける患者72人から集めた。外科切除後、腫瘍をマクロ解剖し：切片を病理学的診断用に取り出し、隣接片をmRNA抽出用の液体窒素中で素早く凍結させた。診断時の患者の平均年齢は55才 (29 ~ 81才の範囲) であり、大多数は閉経後であった。腫瘍は、乳癌のWHO組織学的分類法により分類した：管癌、小葉癌、管小葉混合癌及び髄様癌。正常乳房mRNAから得てプールした“正常”cDNAを対照及び標準化用を使用した。前記“正常”cDNA中のプロテインキナーゼ (P K) 及びホスファターゼ (P P) の発現プロファイルを別々に評価した。本試験に21種のBC及び3種の正常乳房上皮細胞系を含めた。乳癌細胞系の供給源は下記の通りであった：BT - 20、BT - 474、BT - 483、BT - 459、Du - 4475、MDA - MB - 134、- 157、- 175、- 361、- 436、- 453、- 468、SK - BR - 3及びZR - 75 - 1、T - 47D、MDA - MB - 231、ZR - 75 - 30はAmerican Type Culture Collection (ATCC、Rockville、MD) から入手した。MCF - 7、クローン及びBC細胞系DALはSUGEN (Redwood City、CA) から入手した。HBL - 100細胞系はATCCからのものであった。この細胞系は正常組織からのものであったが、縦列統合SV - 40配列を有する (9)。培養はグルタミン6mM、ヒトインシュリン10 μ g / ml 及び10%の胎児ウシ血清 (FCS) を補充したRPMI 1640培地 (CSL、Parkville、オーストラリア) 中で対数増殖で維持した。正常乳房上皮細胞株MCF10A、MCF10T - 24及びMCF10neoはDr . M . Gilles (Arizona Cancer center) から得た。Ac745はDr . B . Stampferから入手し、Hs578Bst、インシュリン、ヒドロコルチゾン、EGF、コレラ毒素、ビタミン及び抗生物質のコンディション培地を補充したDMEM F12培地で増殖させた。

20

30

【 0 0 4 5 】

細胞はマイコプラズマ汚染してなかった。

40

【 0 0 4 6 】

1 . 2 . RNA及びDNAの単離及び分別

全RNA及びゲノムDNAをグアニジニウムイソチオシアネート溶液 (GTS緩衝剤：4Mグアニジニウムイソチオシアネート、25mMクエン酸ナトリウムpH7.0、0.5%サルコシル及び0.1Mβ - メルカプトエタノール) 中で溶解、次いでフェノール - クロロホルム抽出により同じ細胞ペレットから単離した。全RNAを修正を加えた標準法 (Sambrookその他 [1989]) を用いて単離した。DNAを集め、同じ容量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25：24：1) で2回抽出した。RNA及びDNAを各細胞系から最小3つの別々の場合で単離した。

50

【0047】

全及びmRNAインテグリティ及びcDNA複合体を、特異的プローブを用いてアガロースゲル電気泳動法及びノーザンブロットによりコントロールした。mRNA抽出をOligo Tex mRNA isolation Kit (Quagen、Biotech、ドイツ)を用いて行った。細胞ペレットを溶解/結合緩衝剤中に再懸濁させ、簡単にボルテックス混合し、21Gニードルを3回通し、スピンライセイトカラムに入れ、13000gで3分間遠心分離した。次いで溶解物をOligo-dTセルロース (Stratagene Inc.)と静かに攪拌し、前もって湿らせたOligotex molecular biology column (Quagen Biotech)に入れた。mRNAを前もって温めた(65)溶離緩衝剤で溶離する前に、カラムを溶解/結合緩衝剤で3回洗浄し、洗浄緩衝剤で4回洗浄した。mRNAの量をOD260を用いて測定した。

10

【0048】

1.3. cDNAアレイ標本

PK及びPP遺伝子発現をナイロンフィルターアレイ上で放射性標的を用いてハイブリダイゼーションにより分析した(cDNA)。アレイはキナーゼ、ホスファターゼ及びその他のシグナリングプロテインをコードする645種の遺伝子:リガンド、アダプター、転写因子、メタロプロテイナーゼ/ADAM、アポトーシス関与遺伝子及び11種のハウスキーピング遺伝子を含む(リストは<http://www.biochem.mpg.de>又はullrich@biochem.mpg.deで得られる)。これらのアイデンティティをプラスミドDNAのシーケンス法により実証し、GenBank配列情報と比較した。PK及びPPのアイデンティティはナイロンフィルター上に、1個又は2部、スポットされた全クローンに関して合致した。標準化目的用に、GFP遺伝子をゲノム及びベクターDNAと同様に2回スポットした。プラスミドの精製はプラスミド精製キット(Quagen、ドイツ)を用いて行った。

20

【0049】

1.4. cDNAアレイハイブリダイゼーション

フィルターを先ず0.5%SDS中で攪拌しながら5分間予備洗浄した。プレハイブリダイゼーション溶液10ml中には、酵母tRNAが含まれていた。ヒトCot-1DNA(BRL/Life法)をハイブリダイゼーション工程で使用したが、これはRoller bottle (Hybaid Inc.)中で16時間回転炉中で65で行った。標識付けしたプローブを100で10分間変性し、次いで直ちにハイブリダイゼーション混合物中に入れ、これを更に18時間65で培養した。18時間後、ハイブリダイゼーション混合物を捨て、アレイを2塩化ナトリウム:クエン酸ナトリウム(SSC)緩衝剤、0.2%SDS中で42で20分間連続的に回転させながらインキュベーター中で2回洗浄した。3回めの洗浄をプラスチック箱中で0.2xSSC、0.1%SDS中で15~60分間65で水平に振りながら行った。3回目の洗浄後、フィルターを湿らせた1枚のWhatman paper上に載せ、サラップで覆った。次いでアレイをPhosphorimager storage screenを有するimager cassette (Fujii、日本)に入れ、2日間露光した。

30

40

【0050】

1.5. 画像取得及び分析

露光した蛍光画像記憶スクリーンをPhosphorimager Scanner (Fujii)で解像度50ミクロンでスキャンし、MacBAS2000 (Fujii)を用いて視覚化した。画像をソフトウェアプロトコルにより分析するためにArrayVision V (カナダ)に送った。個々のエレメントの内部参照データベースへのマッピングは、全ゲノム対照DNA、GFP及びベクターを表す合計4つの対照要素を用いてソフトウェアベースの基板上に画像を整列させることによって行った。標準化は、各データ要素の未処理強度を100(この値は、アレイ開発で我々が実施した多数の異なるハイブリダイゼーションから導き出した、全要素の平均未処理強度である)に分けた全ベクター要素

50

の平均未処理強度と等しい標準化率を掛けることによって行った。標準化した画像のソフトウェアによる対比較を、前記したように正常乳房RNA、不死（新生物発生前の）乳房上皮細胞系から得てプールした“正常”cDNAから取った標識付けcDNAのハイブリダイゼーションから得た画像に対して行った。発現レベルの変化を標準化した強度を用いて計算し、比（プラスの比は転写レベルの増加を示し、マイナスの比は転写レベルの減少を示した）として表し、Scatter-blotグラフィック及びTree View programにより視覚化した（13～16）。

【0051】

1.6. アレイデータ分析

結果を分析する前に、重複スポット又は2つの別々のアレイ上の同じcDNAを用いた1つのハイブリダイゼーション又は同じRNAから調製したcDNAを用いて2つの別々のハイブリダイゼーションを比較することによって、実験の再現性を実証した。各場合に、結果は各々相関係数0.96、0.98及び0.98での良好な再現性を示した（データは未記載）。再現性は2倍発現差を有意な差異とみなすのに十分であった。二次分析はエクセル及び統計ソフトウェアを用いて行った。腫瘍パラメーターと関連させた発現レベルを有する遺伝子の探査を数回の連続工程で行った。先ず、遺伝子を重要な要因により相違する腫瘍の2つのサブグループにおけるそれらの中央発現レベルを比較することによって検出した。我々は平均値よりも中央値を用いた。それは、多くの遺伝子で発現レベルの可変性が高く、その結果、標準偏差で発現レベルが平均値と同じか又は上位となり平均との比較が不可能となるからである。第2に、これらの検出した遺伝子を図面で視覚により調べ、最後に、相関を確認すると確認されるものに対して適正な統計分析を行った。ER-陽性腫瘍及びER-陰性腫瘍間のHER2発現の比較を、Mann-Whitney試験を用いて検証した。相関係数を使用して遺伝子発現レベルを含まれた腋窩リンパ節の数と比較した。

【0052】

1.7. クラスター分析

この試験からのデータを記載したように分析し、表示した（13～16）。簡単には、階層的クラスタリングアルゴリズムにより結果の表を作成するが、その際要因/アレイのcDNA（特異的遺伝子を表す）を遺伝子発現のパターンの類似性に基づいて一緒に分類する。同じアルゴリズムを適用して、実験試料（即ち細胞系及び腫瘍）をそれらの遺伝子発現の全般的パターンの類似性に従ってクラスターする。こうして整理したデータ表を着色画像として図示する。垂直軸に添って、分析された遺伝子はクラスタリングアルゴリズムによる順序付けて配列されるので、最も類似した発現パターンを有する遺伝子は相互に隣接している。水平軸に添って、実験試料は、全遺伝子中で最も類似した発現パターンを有するようなものが相互に隣接しているように配列される。この表の画像の各細胞/区画の色は、該当する各遺伝子の測定した発現比を表す。色彩度は測定した遺伝子発現比の強度に正比例し、最も明るい赤区画は最高T/N比（即ち>8倍の差異）を有し、最も明るい緑区画は最低のT/N比、黒区画は約1の比を有し、灰色の区画は不十分なデータ品質を示す。

【0053】

1.8. ノーザンプロットによるRNA分析

我々は幾つかの乳癌標本及び全乳癌細胞系における発現AXL及びGAS6遺伝子の検出用にノーザンプロット分析の標準プロトコルを使用した。負荷RNA試料をヒトβ-アクトチンプローブを用いるフィルターの再ハイブリダイゼーションにより実証した。

【0054】

1.9. 化学浸潤及び遊走分析

化学浸潤分析は、Albiniその他の方法を修正して使用して行った（10）。トリプシン化後、細胞（20000）をBoyden chamber中のマトリゲル塗布（4.0mg/mlの150μl）8μmポリプロピレンフィルターインサートに載せた（Biocoat Matrigel Invasion Chamber、Becton

10

20

30

40

50

Dickinson、Bedford、MA or Nunc 10mm tissue culture inserts、Naperville、IL)。下部チェンバーは、Albiniその他により記載されているようにして製造した0.55mlのNIH 3T3 - 調整培地又は幾つかの細胞系に関しては通常増殖培地を含有した。

【0055】

ATCCから得たBC細胞系をトリプシン化し、遠心分離し、10% FBSを含有するRPMI培地中に細胞 4×10^5 個/mlで再懸濁させた。残りの細胞系はそれらの標準増殖培地に再懸濁させた。

【0056】

20～36時間後に、インサートの残っている細胞を綿棒で除去し、フィルター底部の細胞を異なるプロトコルを用いて数えた：Diff-quick (American Scientific Products、McGraw Park、IL)中に固定し、室温(RT)で1分間沃化プロピジウム(PBS中 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$)で染色する前に、RNase Aで処理した($50 \mu\text{g}/\text{ml}$ で37℃で20分間)。乾燥させたフィルターを除去し、Cytoseal 60 mounting media (Stephens Scientific、Kalamazoo、MI)を用いてスライド上に載せた。フィルター上の個々のヨウ化プロピジウム染色核を計数した。結果はトリプシン化及び細胞計数を用いて得られた。各実験で3部作った試料を計数した。特定範囲外の値は平均浸潤活性の計算から除いた。

【0057】

抗体の存在における浸潤アッセイ用に、細胞をマトリゲル上に播き、接着したら、指示抗体を培地に加えた。抗体はアッセイの全期間上部チェンバー中に存在した；アッセイ終了時に、上部チェンバーの細胞増殖率をトリパンブルーで評価した。遊走活性は、浸潤アッセイで記載した方法に従って測定したが、但しその際、細胞はBoyden chamber中で塗布してない $8 \mu\text{m}$ 孔のポリプロピレンフィルター上に載せた。

【0058】

1.10. マトリゲル増殖

マトリゲル上で増殖した細胞の形態学の測定は前記したようにして行った(10)。簡単には、培地 $50 \mu\text{l}$ 中に再懸濁させた細胞(細胞5000個/96ウェルプレートのウェル)を-RPMA基礎培地塩中6.0mg/mlに希釈したマトリゲル(Becton Dickinson) $70 \mu\text{l}$ から成る前もって調製したマトリゲルコーティング上で培養した。これらの上で重合後、希釈したマトリゲル($1.0 \text{mg}/\text{ml}$) $50 \mu\text{l}$ を加えた。コロニー伸展を実験の間中モニターし、OpenLab (UK) デジタルカメラを装備したZeiss Axiovert 35顕微鏡を用いて7～14日目に撮影した。

【0059】

1.11. 傷アッセイ

一夜断餌後、融合細胞単分子膜上にプラスチックチップで傷を付けた。写真撮影(位相差)する前に、MDA-MB-345S-mock及びMDA-MB-435-dnAXL、クローン2細胞を培地(10% FCS)及びGAS6($200 \text{ng}/\text{ml}$)を含有する培地で12、24及び48時間処理した。細胞遊走を定量するために、傷の3個の無作為選択部分(長さ1mm)を倍率40Xで写真撮影した；平均傷幅を $20 \mu\text{m}$ 毎に測定し、傷閉合平均%を計算した。試料当たり3つの別個の傷を調べ、傷閉合平均%を計算した。

【0060】

1.12. 抗体を用いる細胞処理

乳癌細胞(3D増殖アッセイ用に5000個及びBoyden chamber中での浸潤アッセイ用に20000個)を抗体 $50 \mu\text{l}$ 及び細胞懸濁液 $500 \mu\text{l}$ を使用してEx-AXLポリクローナル抗体($200 \mu\text{g}/\text{ml}$)により処理した。細胞を抗体と一緒に室温で60分間培養し、次いで室温でPBS中で洗浄した。細胞のプレート及び次の24時間処理間隔は同じ濃度のEx-AXL抗体を用いて行った。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 1 】

1 . 1 3 . B C 細胞の組換えレトロウイルス感染

ウイルスの A X L w t 及び d n - A X L 突然変異形を修正を加えた標準プロトコル (3 1) に従って得た。簡単には、p L X S N - A X L w t 及び p L X S N - d n A X L を E c o R I / B a m H I 及び N o t I / X b a I 位置経由でクローン化した。

【 0 0 6 2 】

パッケージング細胞系 P h o e n i x A を 燐 酸 カ ル シ ウ ム を 用 い て こ れ ら ベ ク タ ー で 感染させた。感染した P h o e n i x A 細胞の上澄液を集め、0 . 4 5 μ m フィルターで濾過した。ヒト癌細胞系の感染用に、細胞をウイルス上澄み液と一緒に24時間培養した。48時間後、培地を400 μ g / m l の G 1 4 8 を 含 有 す る 培 地 と 取 り 換 え た 。 更 に 10
選別するために、細胞をG418と一緒に14日間培養した。ポリクローナル及びモノクローナル細胞系は限定希釈により生成させた。A X L 発現をウェスタンブロット及びアレイ分析によりモニターした。A X L w t 及び d n - A X L の 同 じ 発 現 レ ベ ル を 有 す る ポ リ ク ロ ー ナ ル 及 び 3 つ の モ ノ ク ロ ー ナ ル 細胞系を次の実験用に選択した。

【 0 0 6 3 】

1 . 1 4 . 抗体

A X L / U F O 特異性抗体は、ウサギをアミノ酸残基1 - 4 1 0 (A X L - E x) を 含 有 す る 組 換 え G S T - A X L 細胞外ドメイン融合タンパク質で免疫処理することによって産生した。組換えG S T - A X L - E x タンパク質は感染したH E K 2 9 3 細胞 (ベ ク タ ー p c D N A 3 - G S T) に より 安 定 的 に 分 泌 さ れ た 。 培 地 を 集 め 、 G S T - A X L - E 20
x タンパク質を標準G S T - t a g プロトコル (P h a r m a c i a , S w e d e n) を 用 い て 精 製 し た 。 A X L - E x ポ リ ク ロ ー ナ ル 抗 体 を G A T - S e p h a r o s e ア フィ ニ テ ィ ー カ ラ ム で 部 分 的 に 精 製 し た 。

【 0 0 6 4 】

2 . 結果

本試験の目的は、乳癌攻撃性用の新しいマーカーを確認する目的で乳癌細胞中のプロテインキナーゼ、ホスファターゼ及びシグナリング遺伝子の発現プロファイルを確認することであった。c D N A ハイブリダイゼーションアッセイを使用して、14の弱浸潤性、7の高浸潤性乳癌細胞系及び3つの正常乳房上皮細胞系の遺伝子発現プロファイルを分析した (第 1 表、図 1、浸潤性 B C 細胞系及び対照の 3 D 増殖) 。 30

第 1 表：浸潤性のコンセンサスを発生させるために使用した乳癌細胞系の特徴

【 0 0 6 5 】

【表 1】

細胞系試料起源 <i>a</i>		腫瘍発生 <i>b</i>	マトリゲル形態学 <i>c</i>	
マーカー遺伝子発現 <i>d</i>				
		ER-	E-cad	Vim
弱侵潤性				
ZR-75-1				
T47D	浸潤性管癌 Ca; PE		+e	融合
+	+	-		
ZR75-1	浸潤性管癌 Ca; 腹水		+e	融合
+	+	-		
MCF7	乳腺癌 ; PE		+e	融合
+	+	-		
MDA361	乳腺癌 ; 脳転移		+e	融合
+	+	-		
BT474	侵襲性管癌 Ca; PT		+e	融合
+	+	-		
BT20	乳腺癌 : PT		+	融合 -
ND	-			
MDA468	転移性腺癌 ; PE		+	融合 -
-	-			
SKBR3	乳腺癌 ; PE		+	長球
-	-			
MDA453	転移性腺癌 Ca; PE		-	長球
-	-			
BT483				
MDA175				
Du44-75				
DAL				
ZR-75-30				
HBL-100				
高侵潤性				
MDA435S	転移性管腺癌		+, 転移	星形
-	-	+		
BT549	乳頭侵襲性管癌 Ca; PT		-	星形
-	-	+		
Hs578T	管癌 Ca; PT		+, 転移	星形
-	-	+		

【 0 0 6 6 】

【表 2】

MDA231	乳腺癌 : PE		+, 転移	星形
-	-	+		
MDA436	進行中			星形
MDA415	進行中			
MDA157	進行中			星形

10

20

30

40

50

注釈：

a) 試料起源及び病理学的評価情報はATCCカタログから得た。PT、原発性腫瘍；PE、胸膜滲出液；Ca、癌。

b) 腫瘍データはATCCカタログ又は参照17に報告されていた。

+、無胸腺ヌードマウス又はSCIDマウスの異種移植片として産出された触診できる腫瘍；

-、非腫瘍形成性；met、対照18及び19により報告されたような転移性細胞系。

c) マトリゲル中で培養した細胞の形態学の記載及びBoyden chamber浸潤性アッセイにおけるそれらの活性は対照10から得た。

【0067】

遺伝子650個を含有するcDNAマイクロアレイ膜をこれらの試験で使用した。各浸潤性表現型に関する“浸潤性のコンセンサス”の定義を可能にする弱浸潤性と高浸潤性BC細胞間の遺伝子発現の差異を確認した(図2、クラスターAXL、相関>0.71)。高浸潤性BC細胞系(BT549、MDA-MB-231、MDA-MB-436、MDA-MB-415、Hs578T、MDA-MB-157及びMDA-MB-435S)はAXLを過剰発現し、これらを弱浸潤性BC細胞系及び“正常”乳房上皮細胞と区別する特定の遺伝子発現プロファイルを示す。これらクラスターは浸潤性のマーカーとして既に公知である遺伝子を含有した(CD44、VIM、CAV1, 2及びMMPs(参照20~27))。これらの遺伝子の中には癌細胞浸潤性との関連があるとのみ考えられていたものもある(M-CSF及びEPHA2(参照28~30)及び第2表)。クラスターのその他の遺伝子は癌細胞攻撃性に関連した遺伝子として初めて確認された：AXL、GAS、MMP14、Adam17、MT3MMP、FGF2及び5、Fyn、Lyn、DDR2、TIMP1、HB-EGF、SGK、SGKII、MAP4K4、SIRPα及びAnnexin2。

【0068】

顕著なことには、これらのBC細胞系でエストロゲン受容体を発現したものは全くなかった(BC細胞系特徴に関して示されたように、第3図参照)。共発現遺伝子のクラスターAXLは、原発性BC(第3図)及びその他の腫瘍及び癌細胞系(腎臓、前立腺及び神経芽腫)でも確認された(データ未記載)。浸潤性BC細胞系におけるAXL及びGAS遺伝子の発現は、ノーザンブロットハイブリダイゼーションにより確認した(第4図)。

【0069】

高浸潤性BC細胞系中で安定過剰発現されたAXL遺伝子(dnAXL)の優性阻害型突然変異体は強力に、幾つかのBC細胞系の浸潤性、遊走性及び生存度を抑制した：MDA-MB-435S、BT549及び部分的にMDA-MB-231(第5A及びB)。安定なdn-AXL発現を有するクローンは全て、非浸潤性又は弱浸潤性乳癌細胞系、例えばMCF7のように、マトリゲルマトリックス上で3D-増殖を有した。dn-AXL発現は有意にGAS6シグナリングを抑制し、その結果GAS処理でAXL磷酸化は減少又は欠如する。これらの細胞中のERKシグナリングも遮断された。

【0070】

AXLの細胞外部分(アミノ酸残基1-410を含有する、Ex-AXL)に対するポリクローナル抗体は細胞形態学を変え(第6A図)、MDA-MB-435S及びBT549BC細胞系の遊走及び浸潤に対して非常に強力な抑制活性を有する(第6B及びC)。同じ結果が前立腺癌細胞系PPC1を用いて得られた。更に、弱浸潤性BC細胞系MCF7及び前立腺癌細胞系LNCaPで野生型(wt)AXLの過剰発現は高浸潤性表現型への形質転換を生じた。

【0071】

B. 神経膠芽腫試験

1. 材料及び方法

1.1 ヒト神経膠腫

10

20

30

40

50

下記ヒト神経膠腫細胞をこの試験で使用した：U - 118、U - 1242、SF126、A - 172、U - 373、U - 1240、T - 98G、SF763及びSF767。細胞は全て5%CO₂加湿インキュベーター中で10%胎児ウシ血清(PAA GmbH、Linz、オーストリア)中で37で増殖させ、Hoechst33258染料を用いてマイコプラズマ汚染に関して定期的に試験した。下記のように増殖培地(全てGibco、カールスルーエ、ドイツ)を使用した：U - 118、T - 98G及びSF763用にDMEM；U - 1242用にMEM、非必須アミノ酸(原料の1：100希釈；Gibco)、1mM Na - Pyruvate；SF - 126、A - 172及びU373用にグルコース4.5g/Lを有するDMEM及びU - 1240及びSF767用にMEM。dorsal skinfold chamber 標本中への腫瘍移植の前に、前記したように細胞をDilで染色した(参照35)。

10

【0072】

1.2 cDNAアレイハイブリダイゼーション

cDNAアレイ並びにそのハイブリダイゼーション法は前記で詳説した(参照31)。アレイは84のRTK及び30のプロテインチロシンホスファターゼに相応する125のcDNAフラグメント+対照cDNAから成っていた。全RNA、Poly(A)+RNA及びcDNAプローブは前記したようにして産生した(対照31)。cDNA3~5μlの標識付けは[³²-P]dATPの50μCiの存在でMegaprime kit(Amersham)を用いて行った。プレハイブリダイゼーション溶液を5×SSC、0.5%(v/v)SDS、パン酵母tRNA(Roché)100μg/ml及び標識付けしたcDNAプローブ(2~5×10⁶cpm/ml)を含有するハイブリダイゼーション溶液と取り換え、68で16時間培養した。膜を厳しい条件下で洗浄した。phosphorimager system(Fuji BAS1000；Fuji)を使用してハイブリダイゼーションシグナルを定量した。各スロットの平均値を式： $A = (AB - B) \times 100 / B$ を用いて計算した[A、最終容量；AB、各スロットシグナルの強度(ピクセル/mm²)；B、背景(ピクセル/mm²)]。cDNAアレイの結果は、前記したようにRT-PCR分析により確認すべきであった(参照31)。

20

【0073】

1.3 発現コントラクト及び安定細胞系の生成

AXL用コード2.7kbpのcDNAシーケンスをレトロウィルスベクターpLXSNのEcoRI/BamHI制限部位中にクローンした。優性阻害型変異体を1.5kbpのEcoRI/FspIフラグメントを同じベクター中にサブクローンすることによって産生した。発現プラスミド及び空ベクターを燐酸カルシウム共沈殿法を用いてPhoenix-Ampho細胞中にトランスインフェクションした。組換えレトロウィルスを含有する上澄みをトランスインフェクション後28時間ハーベストし、最終濃度8μg/mlでポリブレンと混合し、サブコンフルエントSF126細胞に3時間適用した。感染を同じプロデューサー細胞の新しい上澄みを用いて2回繰り返した。感染した細胞を1日後に通過させ、1mg/mlのG418を用いて2週間選別した。モノクローナル細胞系をウェスタンブロット分析によりモニターしたようにAXLの高発現用を選択した。

30

【0074】

1.4 免疫沈降法及びウェスタンブロット

細胞は、50mM Hepes pH7.5、150mM NaCl、1mM EDTA、10%グリセロール、1% Triton X-100、Aprotinin10μg/mlを補充した10mM Na₄P₂O₇、1mM PMSF、2mM Na₃VO₄、10mM NaF中で溶解した。タンパク質濃度はマイクロBCAプロテインアッセイ(PIERCE、Rockford、Illinois)により測定した。AXLを全細胞タンパク質1.8mgから、プロテインAセファローズ懸濁液(CL-4B、Amersham Biosciences、Freiburg、ドイツ)30μl及び抗-AXLポリクローナルウサギ血清(対照36)3μlを用いて一夜4で沈殿させた。沈殿をHNTG緩衝剤(20mM Hepes pH7.5、150mM NaCl、10%

40

50

グリセロール、0.1% Triton X-100)で3回洗浄した。免疫沈殿又は全細胞タンパク質200 µg/レーンを還元試料緩衝剤と混合し、7.5% SDS-PAGEによって分離し、ニトロセルロース膜(Protran; Schleicher & Schuell, Dassel, ドイツ)に移した。膜を150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl pH 7.5、5 mM EDTA、0.05% Triton X-100中で0.25%ゼラチンでブロックし、同じ緩衝剤中で1:5000に希釈した抗ホスホチロシンモノクローナル抗体4G10と一緒に一夜-4℃で培養した。二次抗体ヤギ抗マウスHRP(1:10000、BioRad)を室温で60分間適応した。抗-AXL(ポリクローナルウサギ血清。1:1000)及びプロテインA-HRP(BioRad、1:40000)で再プローブする前に、膜を55℃で90分間ストリッピングした。10
検出はWestern Lightning試薬(Perkin Elmer Life Sciences、ボストン)を用いて行った。

【0075】

1.5 マウス

無胸腺ヌードマウス(nu/nu;雄/雌)を特異的病原菌不含環境内部で飼育、維持し、6~10週の年齢で使用した。実験はInstitutional Animal Care and Use Committeeの認証研究プロトコル及びガイドラインに従って行った。外科処理用にマウスをケタミン/キシラジンの皮下注射により麻酔した。

【0076】

1.6 皮下及び同所性異種移植片

神経腫異種移植片は 1×10^6 個のC6細胞(対照44)のヌードマウス左腋腹中への注射により皮下で増殖させた。腫瘍増殖は移植後14日までノギスを用いて評価した。腫瘍容量を(長さ×幅×高さ)/2として計算した。大脳内腫瘍細胞移植用に、ヌードマウスの頭を定位ネズミ頭ホルダー(stereotactic rodent head holder)に固定した。移植は、細胞 5×10^5 個を右線条体に定位に注射することによって行った。一つの実験群の動物が神経学的欠損を発現するか又は動物の体重が>30%減少したら直ちに、腫瘍増殖を比較するために、動物を殺した。

【0077】

1.7 Dorsal skinfold chamberモデル

2枚の対照的チタン枠を動物の背面皮膚の襞に置き、皮膚の伸ばした二重層を挟み、1層の黄紋筋層、皮下組織及び表皮から成るdorsal skinfold chamberを作った。ガラスカバーガラスで覆った観察窓により、チェンバー内で増殖する腫瘍の微小血管系の生体内顕微鏡観察を繰り返し行うことができた。チェンバー製造2日後に、腫瘍細胞移植用にdorsal skinfold chamberのカバーガラスを一時的に取り除いた。動物はskinfold chamberによく耐え、睡眠及び食餌挙動において不快又は変化の徴候を示さなかった。

【0078】

1.8 生体内多蛍光顕微鏡法

生体内エピ蛍光ビデオ顕微鏡法を移植後21日間に渡って実施した(対照37、38、39)。神経腫細胞のDiI標識付けにより、隣接宿主組織からの腫瘍の詳細な描写並びに緑色光エピイルミネーション(520~570 nm)適用により個々の腫瘍細胞の確認が可能となった。FITC結合デキストラン(MW=150000;0.1 ml 静脈内)でコントラスト増強及び青色光エピイルミネーション(450~490 nm)の使用を適用して個々の血管を可視性にした。腫瘍増殖を、蛍光により標識付けした腫瘍塊により覆われた組織面積の測定により評価した。宿主及び腫瘍微小血管系の分析は、血管密度及び血管直径が含んだ(対照37)。

【0079】

1.9 組織学

実験終了時に、神経腫含有dorsal skinfold chamber標本及 50

び脳を切開し、組織形態学分析用に液体窒素中で凍結した。切片をスタブに載せ、Tissue-Tek (Miles Laboratories Inc., Naperville, IL) 中に包埋し、液体N₂で冷却した2-メチルブタン (E. Merck, Darmstadt, ドイツ) 中で凍結した。連続軸切片 (5 μm) を切断し、ゼラチンを前塗布したスライド上に載せた (Sigma)。切片を標準工程に従ってハリス・ヘマトキシリン及びエオシンG (Merck) で染色した。

【0080】

1.10 増殖アッセイ

神経膠腫細胞系の増殖を、3 - (4, 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル) - 2, 5 - ジフェニルテトラゾリウムブロミド (MTT) アッセイ (Boehringer Mannheim, Mannheim, ドイツ) で評価した。細胞を96ウェル組織培養プレート中で細胞3000個/ウェルの濃度で播き、Gas6 (200 μg/ml) の不在又は存在で48時間培養した。次いで細胞を、MTT染料の着色ホルマゼン生成物へのそれらの還元力を細胞増殖指数として検定した。

10

【0081】

1.11 遊走性アッセイ

神経膠腫スフェロイドを細胞5 × 10⁶個を培地中で1.0% Noble寒天 (DIFCO, Detroit, MI) を前もって下塗した75 cm² フラスコ中へ播くことにより産生した。培養中で7~10日後、300 μmより小さい直径を有するスフェロイドを遊走性及び浸潤性試験用に選択した。神経膠腫スフェロイドを24ウェルプレートの中央に置いた。スフェロイド外植片から遊走する腫瘍細胞により覆われた面積を細胞遊走性指数として使用した。各外植片の2つの直交直径を7日間に渡って位相差顕微鏡を用いて毎日測定し、腫瘍細胞により覆われた平均面積を計算した。遊走性アッセイは4回実施した。

20

【0082】

1.12 浸潤性アッセイ

胎児ラット脳細胞凝集体を前記した標準化方法により産生した (対照40)。簡単には、18日の年齢のBD IXラット胎児を帝王切開により取り出した。脳を注意深く切開し、ミンチし、連続的にトリプシン化した。遠心分離後、細胞1 × 10⁷個 (培地に再懸濁) を24ウェルプレートの寒天塗布ウェル中に播いた。再凝集2日後、スフェロイドを新しいウェルに移し (凝集体5~7個/ウェル)、そこで18~21日間成熟させた。その時間までに成熟脳凝集体は生成した。胎児ラット脳凝集体及び神経膠腫スフェロイドは、*in situ*で脳及び神経膠腫細胞に似ている標準化された原発性無血管脳及び腫瘍塊を表し、従って試験管内での神経膠腫細胞遊走及び血管に無関係な浸潤を調べるための好適なモデルとなる。浸潤性アッセイ用に、単一成熟脳凝集体 (直径 = 250 ~ 300 μm) を寒天塗布96ウェルプレート中に入れた。同じ大きさの単一神経膠腫スフェロイドを同じくウェル中へ移し、脳凝集体と接触させた。対比を各々24時間及び48時間培養し、その後ハーベストし、パラホルムアルデヒド中に固定し、準薄 (semithin) 切片 (2 μm) の製造用にプラスチック樹脂中に包埋した。切片をトルイジンブルーで染色した。神経膠腫細胞浸潤工程を無傷のままのラット脳凝集体の量に関して評価した。浸潤性アッセイは4回行った。

30

40

【0083】

1.13 統計

群間の差異を分析するために、群間の個々の比較用に、一元配置分析 (ANOVA)、次いで適切な事後試験 (post hoc test) を実施した。p < 0.05の結果は有意であるとみなした。

【0084】

2. 結果

2.1

神経膠腫細胞生物学におけるUFO/AXLの関連性を調べるために、細胞内RTKド

50

メインを欠くヒトUFO/AXLの切端ドメインネガティブ突然変異体をレトロウィルス発現系を用いてSF126神経膠腫細胞(SF126-Ufo-DN)中に導入した。空ベクターで感染させた細胞(SF126-mock)又はUFO/AXLのヒト野生型形(SF126-Ufo-WT)を対照として使用した。ヒトUFO/AXLの細胞外ドメインに対する抗体を用いるウェスタンブロット法により、SF126-Ufo-DN細胞クローン中の野生型及び切端受容体の高発現レベルを確認した(図8A低いパネル)。切端受容体の発現がUFO/AXLシグナル伝達を遮断するか否かを確認するために、そのリガンドGas6で刺激に次ぐUFO/AXL受容体磷酸化を測定した(図8Aトップレーン)。SF126-mock細胞中で、中程度のベースラインシグナルが観察され、これはGas6刺激で増加した。SF126-Ufo-WT中でGas6-誘発シグナルが増加した。反対に、SF126-Ufo-DN細胞中でベースライン及びGas6-誘発磷酸化はほぼ完全に抑制された。

10

【0085】

UFO/AXLシグナリングの遮断は、標準培養条件下及びそのリガンド不在で、神経膠腫細胞形態学に著しい影響を有した。SF126-mock細胞及びSF126-Ufo-WT細胞(図8B及びC)は多数の細胞間接触を有する伸張した紡錘形態を示したが、SF126-Ufo-DN細胞は丸い形態及び減少した細胞間接触が特徴的であった(図8D)。SF126-Ufo-DN細胞はまたプラスチックに対するその良好な接着性を失ったようであった。

20

【0086】

2.2

腫瘍増殖に関するUFO/AXLの相関を調べるために、各クローンの細胞 1×10^6 個を大人のヌードマウスの腋腹中に皮下移植した。SF126-mock細胞に比較すると、SF126-Ufo-DN細胞の腫瘍形成性は劇的に損なわれ、腫瘍増殖は97%減少した(図9A)。反対にSF126-Ufo-WT細胞では腫瘍増殖は僅かに促進された(図9A)。生体内における神経膠腫細胞生物学におけるUFO/AXLの役割を更に詳細に検証するために、SF126-Ufo-WT細胞及びSF126-Ufo-DN細胞を大人のヌードマウスのdorsal skin foldの透明なチェンバー中へ移植した。腫瘍細胞の蛍光標識付け及び蛍光血漿マーカーの全身投与により、このモデルは腫瘍増殖、腫瘍細胞挙動、腫瘍の腫瘍起因性血管形成及び腫瘍灌流を生体内多蛍光ビデオ顕微鏡により繰り返しかつ非観血的に評価することができる。この方法を用いて腫瘍増殖に関するUFO/AXLシグナリングの有意性を確認することができた。

30

【0087】

SF126-Ufo-WT腫瘍との比較で、SF126-Ufo-DN腫瘍の拡大は有意に抑制された(図9B)。UFO/AXLが腫瘍増殖及び拡大に影響を与えうる機序の一つは、血管機能及び腫瘍への栄養血液供給のその調整である。この仮説は、Gas6/UFO/AXL媒介シグナリングが凝集カスケード並びに血管形成及び成熟を妨害することを示す最近の研究により支持される(参照41、42)。これを試験するために腫瘍機能性血管密度及び微小血管直径を腫瘍の腫瘍起因性血管形成及び腫瘍灌流のマーカーとして定量的に分析した。しかし、図9Bに図示したように、これらの分析はSF126-Ufo-DN腫瘍増殖の劇的な抑制に関する血管の説明(例えば抗腫瘍起因性血管形成、腫瘍血管血栓症による灌流不全)を支持することはできなかった。

40

【0088】

腫瘍試料の組織形態学的分析は、UFO/AXLシグナリングが神経膠腫細胞生物学で中心的役割を演じるという仮説を更に強調した。図9C及びEで実証したように、SF126-Ufo-WT腫瘍は、大きな硬い腫瘍塊並びに個々の腫瘍細胞による大規模な浸潤及び隣接する宿主組織(即ち筋肉及び皮下組織)の二次的破壊を特徴としていた。対照的に、SF126-Ufo-DN腫瘍は遙かに小さく、周囲の宿主組織への浸潤がなかった(図9D及びF)。このSF126-Ufo-DN腫瘍浸潤組織の欠如は更に、隣接組織内部のDI-標識付けされたSF126-Ufo-DN細胞の欠如を実証する凍結した切

50

片の蛍光及び位相差顕微鏡法により確認された（図 9 G 及び H）。

【 0 0 8 9 】

2 . 3

U F O / A X L 機能の遮断による腫瘍増殖の抑制の下にある機序を更に解明するために、試験管内の神経膠腫細胞挙動を分析した。M T T アッセイは S F 1 2 6 - U f o - D N 細胞の増殖が標準培養条件下で、各々 S F 1 2 6 - m o c 及び S F 1 2 6 - U f o - W t 細胞に比較して 5 0 % 及び 3 5 % 減少したことを実証した（図 1 0 A）。注目に値することには、この結果は U F O / A X L リガンド G a s 6 を用いる刺激と無関係であったことであり、これは G a s 6 / U F O / A X L シグナリングが細胞分裂促進性作用を発揮しないという前記仮説を確認する。U F O / A X L は細胞間接着を媒介すると指摘された（参
照 4 3）ので、細胞の多細胞凝集体形成力を調べた。S F 1 2 6 - m o c 及び S F 1 2 6
- U f o - W T 細胞は迅速にスフェロイドを形成した（図 1 0 B）。それらの凝集力は S
F 1 2 6 - U f o - D N 細胞中で減弱せず（図 1 0 C）、これは細胞凝集が U F O / A X
L の細胞外ドメインによってのみ媒介されることを確認する。次ぎに、神経膠腫細胞遊走
を腫瘍スフェロイドを培養し、遊走する腫瘍細胞と最初のスフェロイドからの距離を測定
することによってアドレスした。S F 1 2 6 - m o c 及び S F 1 2 6 - U f o - W T 細胞
が相当距離遊走したが、腫瘍細胞遊走性は S F 1 2 6 - U f o - D N 細胞で非常に減少し
ていた（図 1 0 D）。細胞遊走性は腫瘍浸潤に必要な不可欠であるので、S F 1 2 6 細胞ク
ローンの浸潤性を腫瘍スフェロイドを胎児のラット脳細胞凝集体と対比させることによっ
てアドレスした。共培養 4 8 時間後、S F 1 2 6 - m o c 及び S F 1 2 6 - U f o - W t
細胞の両方が能凝集体を瀰漫性に浸潤した（図 1 0 E）。対照的に、同じ時間後に S F 1
2 6 - U f o - D N 腫瘍スフェロイドと脳細胞凝集体との間の明確な境界を観察することが
でき、これらの細胞が正常な脳組織中へ浸潤できなかったことを示す（図 1 0 F）。

10

20

【 0 0 9 0 】

総合して、腫瘍異種移植片の組織形態学及び試験管内の結果は、U F O / A X L が神経
膠腫細胞の増殖、遊走及び浸潤性を有意に調整し、U F O / A X L シグナリングの抑制が
腫瘍細胞増殖及び隣接組織中への浸潤の遮断により腫瘍拡大を抑制するという明白な証拠
を示した。悪性神経膠腫の治療用の新しい標的となる U F O / A X L の能力を試験するた
めに、S F 1 2 6 - U f o - W T 細胞及び S F 1 2 6 - U f o - D N 細胞を大人のヌード
マウスの脳中へ移植し、それらの生存を評価した。神経学的欠損を発現するか又は最初の
体重の > 3 0 % 減少が見られたら直ちに動物を殺した。S F 1 2 6 - U f o - W t 腫瘍は
、全動物を急速な臨床的悪化により 8 日間以内に殺さざるをえなかった攻撃的臨床過程
を特徴とした（図 1 1 A）。対照的に、S F 1 2 6 - U f o - D N 腫瘍を有する動物はあ
る観察期間の間、症状なしにかつ体重減少なしに生存した（0 日の体重 = 2 9 ± 2 g 対 8
日の体重 = 2 8 ± 1 g）（図 1 1 A）。組織形態学的分析から、S F 1 2 6 - U f o - W
T 細胞は脳実質に瀰漫性に浸潤したが、硬い腫瘍塊の影響を有する間隙は中程度でしかな
かったことが判明した（図 1 1 B）。ここでヒト腫瘍細胞浸潤の典型が観察された：血管
周囲の間隙に添って（図 1 1 C）。白色路に添って（図 1 1 D）及び脳質系の壁に添って
（図 1 1 E）。対照的に、S F 1 2 6 - U f o - D N 腫瘍形成はどの動物でも確認するこ
とができなかった。

30

40

【 0 0 9 1 】

2 . 4 総括

総合して、本分析の結果は、悪性脳腫瘍の生物学における R T K U F O / A X L の新
しい基本的役割を示す。所見は、U F O / A X L が、E G F R 又は P D G F R - α と比較
可能な程度まで、有意数のヒト神経膠腫細胞系によって過剰発現されかつ神経膠腫増殖並
びに神経膠腫浸潤を媒介することを示す。U F O / A X L は神経膠腫浸潤に関与すると報
告された最初の R T K であり、従ってこれらの高攻撃性であり、しかも難治性の腫瘍を抑
制するための新しい治療標的である。これは U F O / A X L シグナリングの抑制が神経膠
腫増殖を抑制し、正位移植による生存を伸ばすことを実証する本発明の結果により支持さ
れる。

50

【 0 0 9 2 】

U F O / A X L の生物学的機能を調べるために、このヒト神経膠腫細胞のお互いの相互作用の複合力及びマトリックスを詳細に分析した。結果として、切端優性阻害型受容体突然変異体を発現させることによる U F O / A X L 機能の抑制が細胞の健康な脳組織中への遊走及び浸潤力をほぼ完全に抑制することを実証することができた。本実験で使用した U F O / A X L の突然変異体が細胞内ドメインを欠き、細胞外ドメインはなお機能的に無傷であることを特記すべきである。従って、U F O / A X L は腫瘍細胞浸潤を単に受容体のマトリックスとの相互作用だけによって媒介するのではなく、むしろ複合シグナリングカスケード下流受容体を巻き込むことによって媒介する。更に、本結果は、U F O / A X L が潜在的に再び細胞間及び細胞 - マトリックス相互作用を調整することにより腫瘍細胞増殖に参与していることも示す。 10

【 0 0 9 3 】

中枢神経系は、U F O / A X L、そのリガンド G a s 6 及び類似 R T K、例えば T y r o 3 又は M e r の顕著な発現を特徴とする。本試験の所見は、G a s 6 / U F O / A X L シグナリングがニューロン及び神経膠細胞の遊走及び誘導を調整する分子系の一部であるかもしれないことを示す。更に宿主及び腫瘍組織による U F O / A X L 及びそのリガンド G a s 6 の顕著な発現は、脳内部に起因する腫瘍の独特な浸潤力を更に解明する手がかりとなるかもしれない。

【 0 0 9 4 】

C . 討 論

単一遺伝子としての R T K A X L が実験系で腫瘍転移を誘発するのに十分であるという事実は、転移表現型の取得が数種の遺伝及びエピ遺伝現象を含む多段工程であるという現行の見解と対比するので、意外である。 20

【 0 0 9 5 】

良性及び悪性腫瘍が抑制されてない状態で増殖する。しかし悪性腫瘍の細胞だけが周囲の組織に浸潤し、遠隔器官に移動する（転移する）。この攻撃性に関する分子ベースの解明から、良性から悪性への腫瘍の移行を阻止し、局所疾患を食い止める治療が導き出されるであろう。我々は、A X L 及び G A S というタンパク質を浸潤性だけでなく、腫瘍細胞の生存及び運動 - 転移に必要な三組の特徴を調整する分子検問所における受容体 - リガンド対として確認した。d n - A X L / G A S 6 複合体も腫瘍細胞抗アポプトーシス力を抑制する。 30

【 0 0 9 6 】

このデータは、血清の存在における B T - 5 4 9 細胞の G A S 治療（d n - A X L の安定発現）が E R K 1 / 2 M A P K の活性化を誘発することができないことを示す。従って、このシグナリング経路は A X L 抑制を効果的に遮断する。

【 0 0 9 7 】

総括すると、本データにより、A X L / G A S が腫瘍細胞浸潤に影響を与えることによってヒトの癌で重要な役割を演じることが実証された。A X L タンパク質は癌の診断及び治療（抗浸潤性）の新しい標的である。例えば、癌細胞における d n A X L の発現は浸潤及び転移発生を防止することができる。更に A X L クラスターの遺伝子（第 2 表に列記）は原発性腫瘍、特に乳房、前立腺、腎臓の腫瘍及び神経膠芽腫における浸潤前段階発達の検出用の診断道具として使用することができる。 40

【 0 0 9 8 】

D . 結 論

1 . B C 細胞系、原発性腫瘍及び神経膠芽腫細胞の c D N A アレイ分析を使用して、“浸潤性のコンセンサス”（クラスター A X L）を確認した。この 3 2 種の遺伝子から成る浸潤性のコンセンサスを使用して癌細胞及び原発性腫瘍の攻撃性を予言することができる。

【 0 0 9 9 】

2 . A X L の優性阻害型突然変異体（d n - A X L）は、高浸潤性乳癌細胞系を強力に 50

抑制し、それらの血清停止（アポトーシス）に対するそれらの感受性を増加させる。A X L の細胞外部分に対するポリクローナル抗体（アミノ酸残基 1 - 4 1 0、E x - A X L を含む）は治療した癌細胞の攻撃性を抑制することができる。

【 0 1 0 0 】

3 . 単一遺伝子としての R T K A X L は実験系で乳癌細胞浸潤を誘発するのに十分である（2 及びモデル系 B C - M C F 7 - w t A X L 及び前立腺癌細胞系 - L N C a P - w t A X L ）。この結果は、転移表現型の取得がいくつかの遺伝及びエピ遺伝現象を含む多段階工程であるという現行の見解と対比する。

【 0 1 0 1 】

4 . P T K A X L は、癌浸潤及び転移を引き起こす活動過多の細胞シグナリングの重要経路を標的とする“シグナル伝達治療”の治療戦略の有望な候補である。d n - A X L 突然変異体による及び / 又は阻害抗体を用いる治療による A X L シグナリング機能の抑制は、副行又は代償性経路により迂回され得ない。

10

【 0 1 0 2 】

5 . 腫瘍治療における A X L 遺伝子発現の抑制は、遺伝子又は転写物レベルでの A X L の抑制、例えば突然変異体の遺伝子トランスファー、アンチセンス分子、リボザイム、s i R N A、R N A i 又は A X L 遺伝子発現サプレッサー又はタンパク質レベルでの抑制、例えば低分子量 A X L キナーゼ阻害剤、A X L 類似物、例えば E x - A X L 融合タンパク質、例えば E x - A X L と J g G 1 F c フラグメントの融合（参照 3 2 ）又は抑制抗体により行うことができる。更に、A X L 遺伝子発現の抑制は A X L シグナル阻害剤、例えば下流阻害剤により行われるかもしれない。

20

第 2 表：浸潤性のコンセンサス

【 0 1 0 3 】

【表 3】

乳癌細胞系及び対照		公知機能又は関与
No	AXLクラスターの遺伝子	
1	AXL/GAS	増殖、接着、抗アポトーシス機能、しかし浸潤にはまだ関与せず
2	HBEGF	ヘパリン結合 EGF
3	EPHA2	乳癌、前立腺癌、メラノーマ、神経膠芽腫血管新生
4	S6KII	STK, リボソームルS6キナーゼ2、浸潤性とはまだ相関せず
5	SGK	STK, グルココルチコイド調整キナーゼ、抗アポトーシス機能、細胞生存に関与
6	ADAM17	TACE TNF α 受容体の発散に関与
7	Lyn/Fyn	SRC- ファミリーキナーゼ
8	MAP4K4	STK, JNK (しかし p38 及び ERK ではない) を活性化、SLK と同じく TNF α シグナリングに関与すると考えられる
9	CD44/META1	癌細胞浸潤性のマーカー
10	ADAM12	インテグリンと相互作用、膜ひた中の SRC 及び GRB2 の共存、SH3 によるシグナリングに関与する細胞膜ドメイン
11	Caveolin 1, 2	シグナリングにおける重要な役割、細胞形質転換と関連、細胞浸潤促進
12	M-CSF	CSF-R1 のリガンド、断管形成、浸潤性乳癌細胞による構造的発現
13	MMP14	上皮細胞中の unique 発現、CD44 シグナリングに特異的
14	Vimentin	細胞形質転換と関連、細胞遊走及び浸潤促進、癌細胞の上皮-間葉性移行のマーカー
15	SIRP alpha	接着、シグナリング、遊走、浸潤関与は不明

第 3 表

【 0 1 0 4 】

10

20

30

40

【表 4】

NO	スポンジ標識 (HUGO 分類)	評価	GenBankLink	文献
1	AXL (AXL 受容体チロシンキナーゼ)	M76125	M76125	Mol. Cell. Biol. 11 (10), 5016-5031 (1991)
2	ADAM12 (ディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼドメイン 12= メルトリンアルファ)	AF023476	AF023476	J. Biol. Chem. 273 (1), 157-166 (1998)
3	ADAM17 (ディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼドメイン 17=TACE)	U69811	U69811	Nature 385 (6618), 729-733 (1997)
4	ANXA2 (アネキシン A2, p85 src- 結合)	D00017	D00017	Cell 46 (2), 191-198 (1986)
5	CAV1 (カベオリン 1, カベオラタンパク質, 22KD)	Z18951	Z18951	FEBS Lett. 314 (1), 45-48 (1992)
6	CAV2 (カベオリン 2)	AF035752	AF035752	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (1), 131-135 (1996)
7	CD44 (抗原 = マトリックス接着に關与)	X66733	X66733	J. Invest. Dermatol. 99, 381-385 (1992)
8	DDR2 (ディスコイジンドメイン受容体ファミリー, メンバー 2)	X74764	X74764	Oncogene 8 (12), 3433-3440 (1993)
9	FGF2 (繊維芽細胞増殖因子 2 (塩基性))	NM002006	NM 002006	EMBO J. 5 (10), 2523-2528 (1986)
10	FGF5 (繊維芽細胞増殖因子 5)	NM004464	NM 004464	Mol. Cell. Biol. 8 (8), 3487-3495 (1988)
11	EPHA2 (EphA2= エフィリンタイプ-a受容体 2L)	M59371	M59371	Mol. Cell. Biol. 10 (12), 6316-6324 (1990)
12	GAS6 (AXL リガンド, 増殖アレスト特異性 6)	L13720	L13720	Mol. Cell. Biol. 13 (8), 4976-4985 (1993)
13	FRK (fyn 関連キナーゼ)	U00803	U00803	Gene 138, 247-251 (1994)
14	(HB-EGF)DTR (ヘパリン結合上放増殖因子様増殖因子)	NM001945	NM 001945	Science 251, 936-939 (1991)
15	LYN (チロシン-プロテinkinase)	M16038	M16038	Mol. Cell. Biol. 7 (1), 237-243 (1987)
16	PTPNS1 (PTP, 非受容体型基質 1)	Y10375	Y10375	Nature 366 (6521), 181-186 (1997)
17	MMP1 (マトリックスメタロプロテイナーゼ 1= 間質性コラゲナーゼ)	M13509	M13509	J. Biol. Chem. 261, 6600-6605 (1986)
18	MMP14 (マトリックスメタロプロテイナーゼ 14 (膜挿入))	NM004995	NM 004995	Nature 370 (6484), 61-65 (1994)
19	MMP2 (マトリックスメタロプロテイナーゼ 2, セラチナーゼ A)	NM004530	NM 004530	J. Biol. Chem. 263, 6579-6587 (1988)
20	MMP9 (マトリックスメタロプロテイナーゼ 9=セラチナーゼ B)	NM004994	NM 004994	J. Biol. Chem. 264 (29), 17213-17221 (1989)
21	MAP4K4 (マイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼキナーゼキナーゼ 4)	XM038748	XM 038748	Direct Submission
22	MT3MMP, 又は MMP16 (マトリックスメタロプロテイナーゼ 16 (膜挿入))	NM005941	NM 042409	J. Biol. Chem. 270 (39), 23013-23020 (1995)
23	TIMP1 (マタロプロテイナーゼ 1 の組織阻害剤)	NM003254	NM 003254	Nature 315 (6022), 768-771 (1985)
24	VIM (ビメンチン)	X56134	X56134	Nucleic Acids Res. 18 (22), 6692 (1990)
26	SGK (血清/グルココルチコイド調節キナーゼ)	Y10032	Y10032	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 (9), 4440-4445 (1997)
26	RPS6KB1 (リボソームアルブプロテイン S 6 キナーゼ, 70KD, ポリペプチド 1)	M60724	M60724	Mol. Cell. Biol. 11, 5541-5550 (1991)
27	FYN (原癌遺伝子 チロシン-プロテinkinase)	M14333	M14333	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5459-5463 (1986)

10

20

30

40

第 4 表：チロシンキナーゼ cDNA アレイにより評価した、ヒト神経膠腫細胞系における
EGFR 及び UFO/Ax1 の発現
【0105】

【表 5】

細胞系	EGFR	UFO/Axl	UFO/Axl : EGFR
U-118	169	1793	10.6
U-1242	324	1793	5.5
SF126	296	1612	5.4
A-172	438	1935	4.4
U-373	56	190	3.4
U-1240	139	262	1.9
T-98G	540	800	1.5
SF763	5526	39	0.0
SF767	1039	--	0.0

10

20

参考文献

1. J.W. Janssen, A.S. Schulz, A.C. Steenvoorden et al., A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. *Oncogene* 6 (1991), pp. 2113-2120.
2. J. O'Bryan, R.A. Frye, P.C. Cogswell et al., AXL, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991), pp. 5016-5031. 10
3. Healy, A. M., Schwartz, J. J., Zhu, X., Herrick, B. E., Varnum, B., Farber, H. W. (2001). Gas 6 promotes AXL-mediated survival in pulmonary endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 280: 1273L-1281
4. A. Neubauer, A. Fiebeler, D.K. Graham et al., Expression of axl, a transforming receptor tyrosine kinase, in normal and malignant hematopoiesis. *Blood* 84 (1994), pp. 1931-1941. 20
5. P. McCloskey, J. Pierce, R.A. Koski, B. Varnum and E.T. Liu , Activation of the AXL receptor tyrosine kinase induces mitogenesis and transformation in 32D cells. *Cell Growth Differ.* 5 (1994), pp. 1105-1117.
6. P. Bellosta, Q. Zhang, S.P. Goff and C. Basilico , Signalling through the ARK tyrosine kinase receptor protects from apoptosis in the absence of growth stimulation. *Oncogene* 15 (1997), pp. 2387-2397. 30

7. S. Goruppi, E. Ruaro and C. Schneider , Gas6, the ligand of AXL tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 12 (1996), pp. 471-480.
8. P. McCloskey, Y.W. Fridell, E. Attar et al., GAS6 mediates adhesion of cells expressing the receptor tyrosine kinase AXL. *J. Biol. Chem.* 272 (1997), pp. 23285-3291. 10
9. Caron de Fromentel C., Nardeux P. C., Soussi T., Lavielle C., Estrade S., Carloni G., Chandrasekaran K., Cassingena R. Epithelial HBL-100 cell line derived from milk of an apparently healthy woman harbors SV40 genetic information. *Exp. Cell Res.*, (1985), 160: 83-94.
10. Albini A., Iwamoto Y., Kleinman H. K., Martin G. R., Aaronson S. A., Kozlowski J. M., McEwan R. N. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res.*, 47: 3239-3245, 1987. 20
11. Thompson E. W., Paik S., Brunner N., Sommers C. L., Zugmaier G., Clarke R., Shima T. B., Torri J., Donahue S., Lippman M. E., et al Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J. Cell. Physiol.*, 150: 534-544, 1992. 30
12. Terranova V. P., Hujanen E. S., Martin G. R. Basement membrane and the invasive activity of metastatic tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)*, 77: 311-316, 1986.

13. Perou C. M., Jeffrey S. S., van de Rijn M., Rees C. A., Eisen M. B., Ross D. T., Pergamenschikov A., Williams C. F., Zhu S. X., Lee J. C., Lashkari D., Shalon D., Brown P. O., Botstein D. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 9212-9217, 1999.
14. Perou C. M., Sorlie T., Eisen M. B., van de Rijn M., Jeffrey S. S., Rees C. A., Pollack J. R., Ross D. T., Johnsen H., Akslen L. A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S. X., Lonning P. E., Borresen-Dale A. L., Brown P. O., Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature (Lond.)*, 406: 747-752, 2000. 10
15. Johnston M. Gene chips: array of hope for understanding gene regulation. *Curr. Biol.*, 8: R171-174, 1998.
16. Duggan D. J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P., Trent J. M. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat. Genet.*, 21: 10-14, 1999. 20
17. Price J. E., Polyzos A., Zhang R. D., Daniels L. M. Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res.*, 50: 717-721, 1990.
18. Sommers C. L., Byers S. W., Thompson E. W., Torri J. A., Gelmann E. P. Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat*, 31: 325-335, 1994. 30
19. Deborah A. Zajchowski, Marty F. Bartholdi, Yan Gong, Lynn Webster, Hsiao-Lai Liu, Alexander Munishkin, Catherine Beauheim, Susan Harvey, Stephen P. Ethier and Paul H. Johnson. Identification of Gene Expression Profiles That Predict the Aggressive Behavior of Breast Cancer Cells. *Cancer Research* 61, 5168-5178, July 1, 2001. 40

20. A. Wimmel, M. Schilli, U. Kaiser et al., Preferential histiotypic expression of CD44-isoforms in human lung cancer. *Lung Cancer* 16 (1997), pp. 151-172.
21. Subburaj Ilangumaran, Anne Briol, and Daniel C. Hoessli. CD44 Selectively Associates With Active Src Family Protein Tyrosine Kinases Lck and Fyn in Glycosphingolipid-Rich Plasma Membrane Domains of Human Peripheral Blood Lymphocytes . *Blood*, Vol. 91 No. 10 (May 15), 1998: pp. 3901-3908 10
22. Domagala W., Lasota J., Bartowiak J., Weber K., Osborn M. Vimentin is preferentially expressed in human breast carcinomas with low estrogen receptor and high Ki-67 growth fraction. *Am. J. Pathol.*, 136: 219-227, 1990.
23. Domagala W., Wozniak L., Lasota J., Weber K., Osborn M. Vimentin is preferentially expressed in high-grade ductal and medullary but not in lobular breast carcinomas. *Am. J. Pathol.*, 137: 1059-1064, 1990. 20
24. Hayashi K, Matsuda S, Machida K, Yamamoto T, Fukuda Y, Nimura Y, Hayakawa T, Hamaguchi M. Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers. *Cancer Res* 2001 Mar 15;61(6):2361-4. 30
25. Yang G, Truong LD, Timme TL, Ren C, Wheeler TM, Park SH, Nasu Y, Bangma CH, Kattan MW, Scardino PT, Thompson TC. Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998 Aug;4(8):1873-80.

26. Bachmeier BE, Nerlich AG, Lichtinghagen R, Sommerhoff CP. Matrix metalloproteinases (MMPs) in breast cancer cell lines of different tumorigenicity. *Anticancer Res* 2001 Nov-Dec;21(6A):3821-8.

27. Sounni NE, Devy L, Hajitou A, Franken F, Munaut C, Gilles C, Deroanne C, Thompson EW, Foidart JM, Noel A. MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *FASEB J* 2002 Apr;16(6):555-64. 10

28. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 2001 Mar 19;193(6):727-40.

29. Pederson L, Winding B, Foged NT, Spelsberg TC, Oursler MJ. Identification of breast cancer cell line-derived paracrine factors that stimulate osteoclast activity. *Cancer Res* 1999 Nov 15;59(22):5849-55. 20

30. Kelly Carles-Kinch, Katherine E. Kilpatrick, Jane C. Stewart and Michael S. Kinch . Antibody Targeting of the EphA2 Tyrosine Kinase Inhibits Malignant Cell Behavior. *Cancer Research* 62, 2840-2847, May 15, 2002. 30

31. Bange J., Prechtel D., Cheburkin Y., Specht K., Harbeck N., Schmitt M., Knyazeva T., Muller S., Gartner S., Sures I., Wang H., Imyaninov E., Haring HU, Knyazev P., Iacobelli S., Hofler H., Ullrich A. Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg(388) allele. *Cancer Res.* 2002, Feb. 1, 62(3), 840-7.

32. Yanagita M., Arai H., Ishii K., Nakano T., Ohashi K., Mizuno K., Varnum B., Fukatsu A., Doi T., Kita T. Gas6 regulates mesangial cell proliferation through AXL in experimental glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.* 2001 Apr., 158(4), 1423-32.

33. Attar E.C, Fridell Y.C, Xu L., Jin Y., Maia D.M., Schell M.J., and Liu E.T. AXL receptor tyrosine kinase expression in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, (Oct., 1997) Vol. 46, No. 1, pp. 91. 10

34. Dodge Zantek N., Walker-Daniels J., Stewart J., Hansen R. , Robinson D., Miao H., Wang B., Kung H-J., Bissell M. J. and Kinch M. MCF-10A-neoSt: A New Cell System for Studying Cell-ECM and Cell-Cell Interactions in Breast Cancer. *Clinical Research*, Vol. 7, 3640-3548, November 2001. 20

35. Vajkoczy, P., Goldbrunner, R., Farhadi, M., Vince, G., Schilling, L., Tonn, J. C., Schmiedek, P., and Menger, M. D. Glioma cell migration is associated with glioma-induced angiogenesis in vivo, *Int J Dev Neurosci.* 17: 557-63, 1999.

36. Sasaki, T., Knyazev, P. G., Cheburkin, Y., Gohring, W., Tisi, D., Ullrich, A., Timpl, R., and Ho-henester, E. Crystal structure of a C-terminal fragment of growth arrest-specific protein Gas6. Receptor tyrosine kinase activation by laminin G-like domains, *J Biol Chem.* 277: 44164-70, 2002. 30

37. Vajkoczy, P., Schilling, L., Ullrich, A., Schmiedek, P., and Menger, M. D. Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: an intravital multifluorescence micro-scopic approach in the athymic nude mouse, *J Cereb Blood Flow Metab.* 18: 510-520, 1998. 40

38. Vajkoczy, P., Farhadi, M., Gaumann, A., Heidenreich, R., Erber, R., Wunder, A., Tonn, J. C., Menger, M. D., and Breier, G. Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2, *J Clin Invest.* 109: 777-85., 2002.
39. Read, T. A., Farhadi, M., Bjerkvig, R., Olsen, B. R., Rokstad, A. M., Huszthy, P. C., and Vajkoczy, P. Intravital microscopy reveals novel antivascular and antitumor effects of endostatin delivered locally by alginate-encapsulated cells, *Cancer Res.* 61: 6830-7., 2001. 10
40. Bjerkvig, R., Laerum, O. D., and Mella, O. Glioma cell interactions with fetal rat brain aggregates in vitro and with brain tissue in vivo, *Cancer Res.* 46: 4071-9., 1986.
41. Stitt, T. N., Conn, G., Gore, M., Lai, C., Bruno, J., Radziejewski, C., Mattsson, K., Fisher, J., Gies, D. R., Jones, P. F., and et al. The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases, *Cell.* 80: 661-70., 1995. 20
42. Fridell, Y. W., Villa, J., Jr., Attar, E. C., and Liu, E. T. GAS6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells, *J Biol Chem.* 273: 7123-6., 1998. 30
43. Bellosta, P., Costa, M., Lin, D. A., and Basilico, C. The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding, *Mol Cell Biol.* 15: 614-25., 1995.
44. Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A (1994) Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature (Lond.)* 367: 576-579. 40

【図面の簡単な説明】

【 0 1 0 6 】

【図 1】図 1 は、マトリゲル - マトリックスで培養した正常及び乳癌（BC）細胞系の形態学（3D 伸展）を表す図である

【図 2】図 2 は、公知キナーゼ及びホスファターゼの遺伝子発現プロファイルによる乳癌細胞系の分類を表す図である

【図 3 A】図 3 A は、公知キナーゼ及びホスファターゼの遺伝子発現プロファイルによる原発性乳癌及びそれらの細胞系の分類を表す図である

【図 3 B】図 3 B は、公知キナーゼ及びホスファターゼの遺伝子発現プロファイルによる 50

原発性乳癌及びそれらの細胞系の分類を表す図である

【図 4】図 4 は、選択した識別性に発現した A X L / G A S 遺伝子のノーザンブロット分析図である

【図 5 A】図 5 A は、マトリゲル上で培養した場合の B C 細胞系 M D A - M B - 4 3 5 S、B T 5 4 9 及び M D A - M B - 2 3 1 (m o c k) 又は安定発現 d n A X L の形態学を表す図である

【図 5 B】図 5 B は、マトリゲル上で培養した場合の B C 細胞系 M D A - M B - 4 3 5 S、B T 5 4 9 及び M D A - M B - 2 3 1 (m o c k) 又は安定発現 d n A X L の形態学を表す図である

【図 6 A】図 6 A は、抗 E x - A X L 抗体を用いて処理後の B C 細胞系 M D A - M B - 4 3 5 S、m o c k、安定発現 d n A X L の 3 D 増殖、遊走性及び浸潤性挙動を表す図である 10

【図 6 B】図 6 B は、抗 E x - A X L 抗体を用いて処理後の B C 細胞系 M D A - M B - 4 3 5 S、m o c k、安定発現 d n A X L の 3 D 増殖、遊走性及び浸潤性挙動を表す図である

【図 6 C】図 6 C は、抗 E x - A X L 抗体を用いて処理後の B C 細胞系 M D A - M B - 4 3 5 S、m o c k、安定発現 d n A X L の 3 D 増殖、遊走性及び浸潤性挙動を表す図である

【図 7 A】図 7 A は、M C F 7 乳癌細胞に対する A X L w t トランスフェクションの作用を表す図である 20

【図 7 B】図 7 B は、M C F 7 乳癌細胞に対する A X L w t トランスフェクションの作用を表す図である

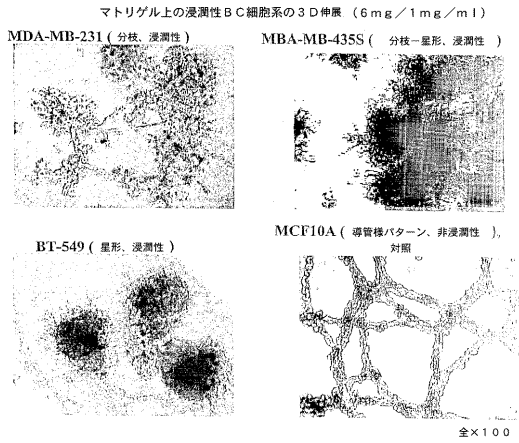
【図 8】図 8 は、ウェスタンブロット分析の図である

【図 9】図 9 において、A は、S F 1 2 6 細胞クローンに関する腫瘍容量の分析補足データを表す図である。B は、生体内多蛍光ビデオ顕微鏡法による図である。C は、S F 1 2 6 - U F O - W T 腫瘍の組織形態学像である。D は、S F 1 2 6 - U F O - D N 腫瘍の組織形態学像である。E は、S F 1 2 6 - U F O - W T 腫瘍の組織形態学像である。F は、S F 1 2 6 - U F O - D N 腫瘍の組織形態学像である。G は、蛍光顕微鏡図である。H は、蛍光及び位相差顕微鏡による図である

【図 1 0】図 1 0 において、A は、S F 1 2 6 細胞クローンの M T T 増殖アッセイを表す図である。B 及び C は、S F 1 2 6 - U f o - W T 及び S F 1 2 6 - U f o - D N 細胞クローンによる多細胞凝集体形成図である。D は、S F 1 2 6 細胞クローンの遊走性の図である。E 及び F は、S F 1 2 6 - U F O - W T 腫瘍細胞スフェロイド (E) 又は S F 1 2 6 - U F O - D N 腫瘍細胞スフェロイド (F) の 4 8 時間対比による腫瘍細胞浸潤の分析図である 30

【図 1 1】図 1 1 において、A は、脳中に S F 1 2 6 - U f o - W T 細胞及び S F 1 2 6 - U f o - D N 細胞の定位置移植後の成長したヌードマウスの生存曲線である。B から E は隣接脳組織中への瀰漫性腫瘍細胞浸潤を示す図である

【 図 1 】



【 図 2 】

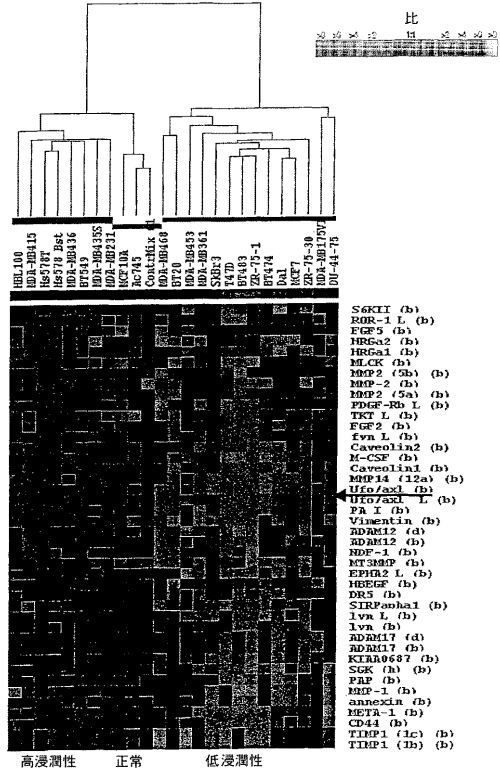


Fig. 3A

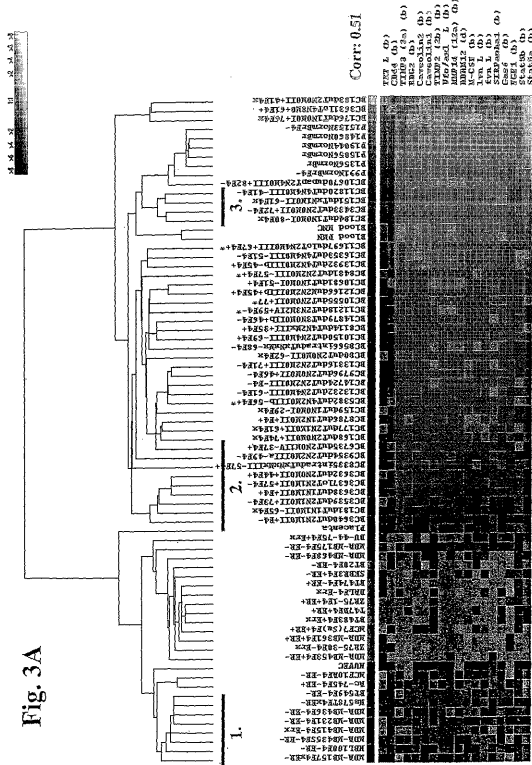
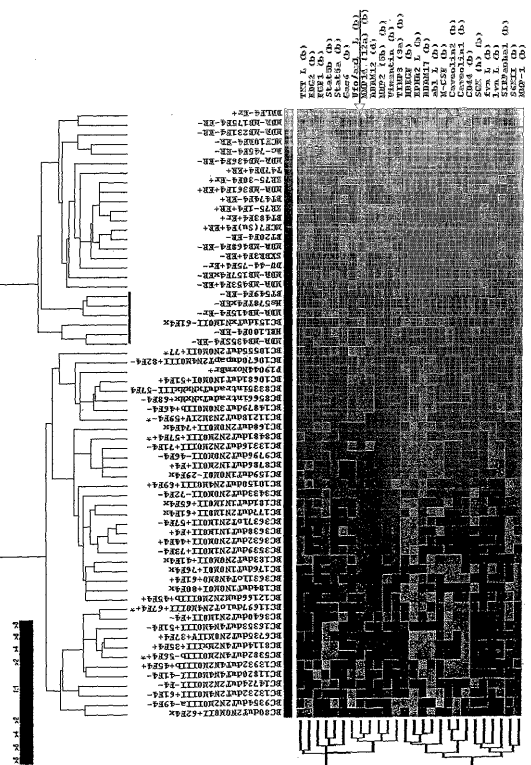
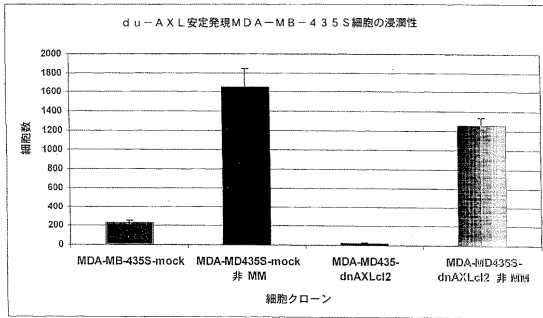


Fig. 3B

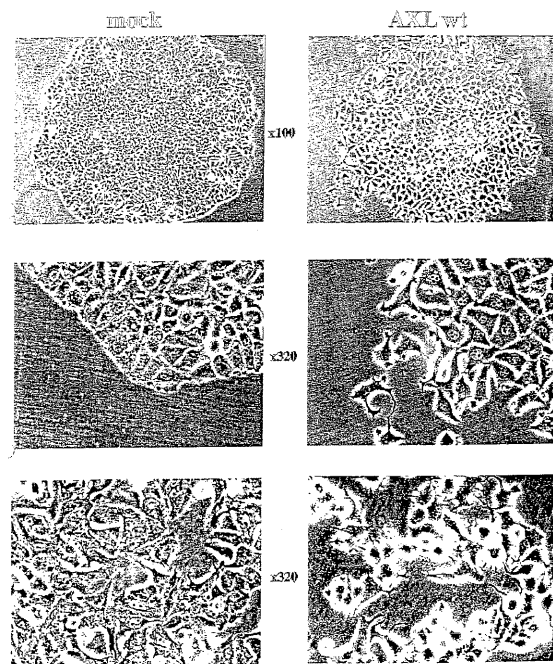


【図 6 C】

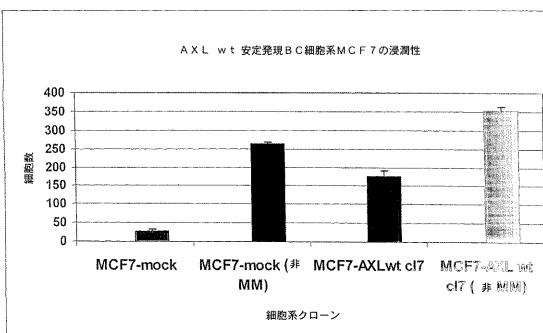


【図 7 A】

強制過剰発現 RTK AXL wt を有する乳癌細胞系 MCF7 の形態学

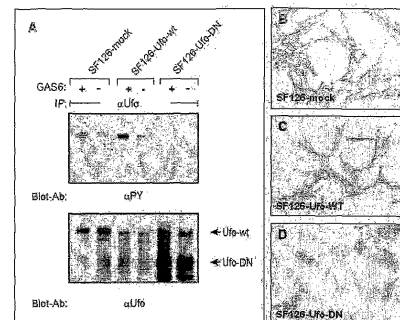


【図 7 B】

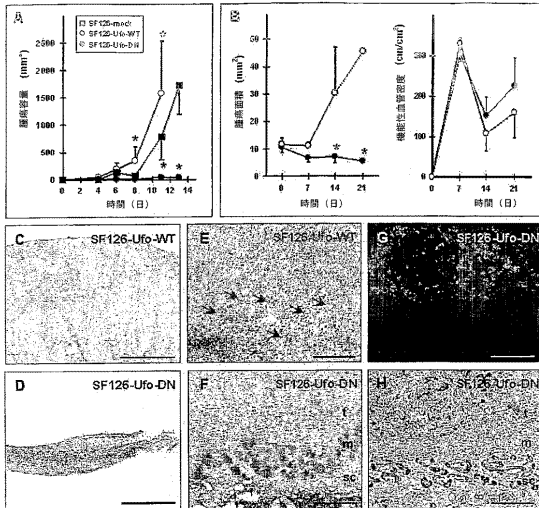


【図 8】

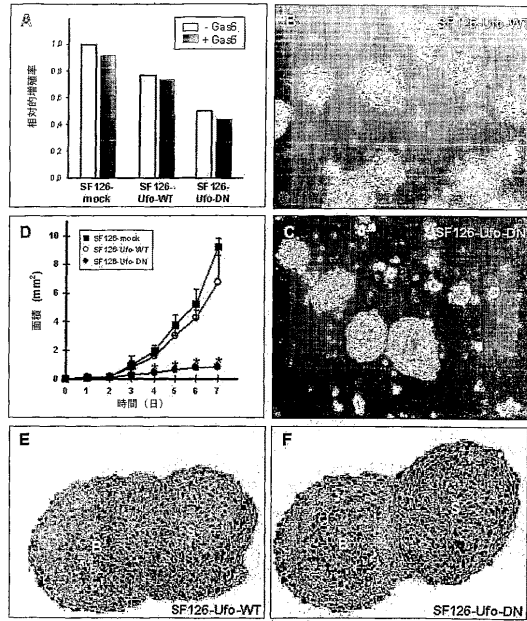
Figures 8



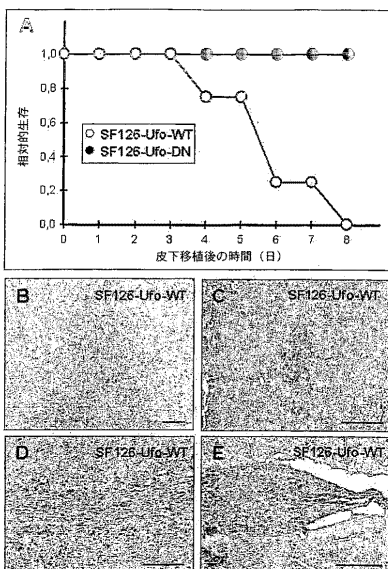
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 03/07786

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/574 A61P35/04 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DOMAGALA W ET AL: "VIMENTIN IS PREFERENTIALLY EXPRESSED IN HUMAN BREAST CARCINOMAS WITH LOW ESTROGEN RECEPTOR AND HIGH KI-67 GROWTH FRACTION" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 136, no. 1, 1990, pages 219-228, XP008006515 ISSN: 0002-9440 cited in the application abstract --- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 January 2004

Date of mailing of the international search report

22 01 2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Gundlach, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

onal Application No

EP 03/07786

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BACHMEIER BEATRICE E ET AL: "Matrix metalloproteinases (MMPs) in breast cancer cell lines of different tumorigenicity." ANTICANCER RESEARCH, vol. 21, no. 6A, November 2001 (2001-11), pages 3821-3828, XP008006514 ISSN: 0250-7005 cited in the application abstract ---	1
A	WO 92 17608 A (BIRCHMEIER WALTER) 15 October 1992 (1992-10-15) abstract claim 1 example 4 ---	1
X	ATTAR, E. C. ET AL: "Ax1 receptor tyrosine kinase expression in human breast cancer." BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT, (OCT., 1997) VOL. 46, NO. 1, PP. 91 MEETING INFO.: 20TH ANNUAL SAN ANTONIO BREAST CANCER SYMPOSIUM SAN ANTONIO, TEXAS, USA DECEMBER 3-6, 1997, October 1997 (1997-10), XP008006520 abstract ---	1-9
X	DODGE ZANTEK N. ET AL: "MCF-10A-NeoST: A new cell system for studying cell-ECM and cell-cell interactions in breast cancer." CLINICAL CANCER RESEARCH, 7/11 (3640-3648)., November 2001 (2001-11), XP001074226 page 3646, right-hand column, paragraph 5 -page 3647, left-hand column ---	1-9
A	FRIDELL YIH-WOEI C ET AL: "GAS6 induces Ax1-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 273, no. 12, 20 March 1998 (1998-03-20), pages 7123-7126, XP002154999 ISSN: 0021-9258 abstract --- -/-	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/07786

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WU CHEW-WUN ET AL: "Clinical significance of AXL kinase family in gastric cancer." ANTICANCER RESEARCH, (2002 MAR-APR) 22 (2B) 1071-8., XP008006835 abstract page 1075, left-hand column, paragraph 2 -page 1076, left-hand column, paragraph 2	1-9
X	MERIC F. ET AL: "Expression profile of tyrosine kinases in breast cancer." CLINICAL CANCER RESEARCH, 8/2 (361-367)., February 2002 (2002-02), XP001074227 abstract page 366, left-hand column, paragraph 2	1-9
X	BERCLAZ G ET AL: "Estrogen dependent expression of the receptor tyrosine kinase axl in normal and malignant human breast." ANNALS OF ONCOLOGY, (2001 JUN) 12 (6) 819-24., XP008006834 abstract page 821, left-hand column, paragraph 2 -page 822, right-hand column, paragraph 1	1-9
X	WO 00 76309 A (VLAAMS INTERUNIVERSITAIR INST ;COLLEN DESIRE (BE); CARMELIET PETER) 21 December 2000 (2000-12-21) page 6; claims 4-10	10-34
X	KRUPITZA G ET AL: "GENES RELATED TO GROWTH AND INVASIVENESS ARE REPRESSED BY SODIUM BUTYRATE IN OVARIAN CARCINOMA CELLS" BRITISH JOURNAL OF CANCER, LONDON, GB, vol. 73, no. 4, 1 February 1996 (1996-02-01), pages 433-438, XP000574908 ISSN: 0007-0920 abstract page 435, left-hand column, paragraph 6 -right-hand column, paragraph 1; figure 3	10,11, 15-18, 22, 26-28,31
P,X	ITO M ET AL: "Expression of receptor-type tyrosine kinase, Ax1, and its ligand, gas6, in pediatric thyroid carcinomas around chernobyl" THYROID 01 NOV 2002 UNITED STATES, vol. 12, no. 11, 1 November 2002 (2002-11-01), pages 971-975, XP008026096 ISSN: 1050-7256 abstract	1-11

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 03/07786

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	SASAKI TAKAKO ET AL: "Crystal structure of a C-terminal fragment of growth arrest-specific protein Gas6. Receptor tyrosine kinase activation by laminin G-like domains." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 46, 15 November 2002 (2002-11-15), pages 44164-44170, XP001168602 ISSN: 0021-9258 abstract	10,11,14
A	WO 01 78778 A (VLAAMS INTERUNIVERSITAIR INST ;CARMELIET PETER (BE); LEUVEN RES &) 25 October 2001 (2001-10-25) the whole document	1-34
A	PEDROCCHI M ET AL: "EXPRESSION OF CA2+-BINDING PROTEINS OF THE S100 FAMILY IN MALIGNANT HUMAN BREAST-CANCER CELL LINES AND BIOPSY SAMPLES" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, NEW YORK, NY, US, vol. 57, no. 5, 1 June 1994 (1994-06-01), pages 684-690, XP001064860 ISSN: 0020-7136 the whole document	1-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national application No.
PCT/EP 03/07786

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

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

1. ☒ Claims Nos.: —
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☒ Claims Nos.: 18, 20, 22-25 (all partially)
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
All claims were searched concerning AXL and GAS-6
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/EP 03 07786

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 10-21 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.1

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 18, 20, 22-25 (all partially)

Present claims 22, 24, 26-30 relate to compounds defined by reference to a desirable characteristic or property, namely being active inhibitors of AXL gene/protein.

The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the examples (pages 16-23).

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

International Application No. PCT/EP 03 07786

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

Invention 1: Claims 1,2,4-9 (partially), 3,
10-34 (fully)

Determination/treatment of invasivity of cancer cells using
AXL as presented in claim 1

Inventions 2-17: Claims 1,2,4-9 (partially)

Determination/treatment of invasivity of cancer cells using
one of the further markers (not AXL/GAS-6) as presented in
claim 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/07786

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9217608	A	15-10-1992	DE 4110405 A1 AT 158344 T DE 59208916 D1 WO 9217608 A1 EP 0582582 A1 JP 7500723 T	01-10-1992 15-10-1997 23-10-1997 15-10-1992 16-02-1994 26-01-1995
WO 0076309	A	21-12-2000	AU 5077100 A WO 0076309 A2 EP 1185635 A2	02-01-2001 21-12-2000 13-03-2002
WO 0178778	A	25-10-2001	EP 1199081 A1 AU 6021401 A WO 0178778 A1 EP 1272217 A1 US 2003144237 A1	24-04-2002 30-10-2001 25-10-2001 08-01-2003 31-07-2003

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 1 2 N 15/09	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/68	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 33/68	
	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	C 1 2 N 15/00	A
	C 1 2 N 15/00	F

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

(74) 代理人 100114890

弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト

(72) 発明者 アクセル ウルリッヒ

ドイツ連邦共和国 ミュンヘン ブルンシュトラッセ 5

(72) 発明者 ピョートル ニャツェフ

ドイツ連邦共和国 ガウティング フーベルトゥスシュトラッセ 6 6

(72) 発明者 タティアナ ニャツェファ

ドイツ連邦共和国 ガウティング フーベルトゥスシュトラッセ 6 6

(72) 発明者 ユーリ チェブルキン

ドイツ連邦共和国 ミュンヘン アグネスシュトラッセ 1 0

(72) 発明者 ペーター ファコツィー

ドイツ連邦共和国 マンハイム アム シェルメンブッケル 5 5

F ターム(参考) 2G045 BB20 CB02 DA14 DA36 FB02 FB03

4B024 AA01 AA12 BA10 CA04 CA09 CA12 GA11 HA12

4B063 QA12 QA19 QQ27 QQ53 QQ95 QR07 QR55 QR62 QR69 QR77

QR80 QR82 QS24 QS25 QS28 QS34

4C084 AA13 AA17 BA44 DC01 NA14 ZB212 ZB262 ZC202

4C085 AA13 BB01 CC02 EE01

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB21 ZB26 ZC20

专利名称(译)	癌细胞侵袭的诊断和预防		
公开(公告)号	JP2005532805A	公开(公告)日	2005-11-04
申请号	JP2004520662	申请日	2003-07-17
[标]申请(专利权)人(译)	马普科技促进协会		
申请(专利权)人(译)	马克斯 - 普朗克 - GESELLSCHAFT 楚-Feruderungu 德维托里奥·森沙夫十ER-FAO		
[标]发明人	アクセルウルリッヒ ピョートルニャツエフ タティアナニャツエフ ユーリチェブルキン ペーターファコツツイー		
发明人	アクセル ウルリッヒ ピョートル ニャツエフ タティアナ ニャツエフ ユーリ チェブルキン ペーター ファコツツイー		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P43/00 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/574 G01N33/68 G01N37/00		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P35/00 A61P35/04 A61P43/00 C07K16/2863 C12Q1/6886 C12Q2600/136 A61K39/3955		
FI分类号	C12Q1/68.A A61K31/7088 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00.105 A61P43/00.111 C12Q1/02 G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/68 G01N37/00.102 C12N15/00.A C12N15/00.F		
F-TERM分类号	2G045/BB20 2G045/CB02 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA10 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA12 4B063/QA19 4B063/QQ27 4B063/QQ53 4B063/QQ95 4B063/QR07 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/DC01 4C084/NA14 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZC202 4C085/AA13 4C085/BB01 4C085/CC02 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZC20		
代理人(译)	矢野俊夫		
优先权	2002015944 2002-07-17 EP		
其他公开文献	JP5419316B2 JP2005532805A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及恶性疾病领域的诊断和治疗方法。更具体地，本发明提供了确定恶性疾病的侵入性的方法和降低恶性疾病的侵入性的方法，包括预防或治疗癌细胞侵袭。

F10A (duct-like pattern, non invasive
control

