# (12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

# 特開2011-24580

(P2011-24580A)

(43) 公開日 平成23年2月10日 (2011.2.10)

(51) Int.Cl.	F I			テーマコード (参考)
C12Q 1/68	(2006.01) C12Q	1/68	А	2GO45
GO1N 33/574	(2006.01) GO1N	33/574	А	4 B O 2 4
GO1N 37/00	(2006.01) GO1N	37/00 1	02	4BO63
GO1N 33/15	(2006.01) GO1N	33/15	Ζ	4C084
GO1N 33/50	(2006.01) GO1N	33/50	Z	40085
	審査請求	t 有 請求項	の数 34 OL	(全 43 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2010-173646 (P2010-173646)	(71) 出願人	390040420	
(22) 出願日	平成22年8月2日 (2010.8.2)		マックスープラ	ンクーゲゼルシャフト・ツ
(62) 分割の表示	特願2004-520662 (P2004-520662)		ア・フェルデル	シグ・デア・ヴィッセンシ
	の分割		ャフテン・エー	・・ファオ
原出願日	平成15年7月17日 (2003.7.17)		Max-Pla	nck-Gesellsc
(31) 優先権主張番号	02015944.8		haft zu	r Foerderung
(32) 優先日	平成14年7月17日 (2002.7.17)		der Wi	s s e n s c h a f t e n
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		e. V.	
			ドイツ連邦共和	国 ベルリン (番地なし
(特許庁注:以下のそ	ものは登録商標)		)	
1.サランラップ			Berlin,	Germany
		(74)代理人	100061815	
			弁理士 矢野	敏雄
		(74)代理人	100094798	
			弁理士 山崎	利臣
				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】

(19) 日本国特許庁(JP)

【課題】悪性疾患の分野における診断及び治療法並びに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。

【解決手段】AXL、GAS6、MMP14、ADAM12、ADAM17、MT3MM P、FGF2、FGF5、FYN、LYN、DDR2、TIMP1、HB-EGF、SG K、RPS6RB1、MAP4K4、SIRP 及びAnnexin A2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し、並びに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。

【選択図】なし

【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 、 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 。

【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 <sup>30</sup> 方法。

【請求項11】

AXLタンパク質リガンドがGAS6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 1 3 】

AXL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 <sup>40</sup> に記載の方法。

【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。

(3)

【請求項18】 被験者が哺到

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AXL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AXL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Nずれか <sup>10</sup> 1項に記載の方法。
- 【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AXL 遺伝子、AXLリガンド遺伝子、AXLタンパク質及び / 又はAXL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AXL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、AXL遺伝子に対するアンチセンス核酸、リボザイム又はRNA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AXL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 2 6 か ら 2 7 の い ず れ か 1 項 に 記 載 の 組 成 物 。 【 請 求 項 2 9 】
- 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AXL遺伝子、AXLリガンド遺伝子、AXLタンパク質及び/又はAX 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 の浸潤性の阻害剤の同定及び/又はキャラクタリゼーション法。

【請求項32】

40

30

試験化合物がAXLタンパク質と結合できる及び / 又はAXL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。

【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】
- $\begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$
- 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 。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

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. M 76125)の過剰発現はヒトの血液学的悪性腫瘍の発生に関与している。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、 接着及び生存に関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関する研究を開示している(参照33)。Dodge 7 N.その他は乳癌における細胞 - E C M 及び細胞間相互作用を調べるための antek 新しい細胞系としてMCF-10A-NeoSTを発表した(参照34)。彼らは、AX L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、 A X L の過剰発現がその他の悪性疾患における浸潤度及び / 又は転移形成と関与し ていることを実証しうるデータは提供されていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

[0003]

【非特許文献1】J. W. Janssen, A. S. Schulz, A. C. Steenvoorden et al., A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. Oncogene 6 (1991), p p. 2113-2120

【非特許文献 2】J. O'Bryan, R. A. Frye, P. C. Cogswell et al., AXL, a transformi ng gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel rece ptor tyrosine kinase. Mol. Cell. Biol. 11 (1991), pp. 5016-5031

【非特許文献 3】Healy, A. M., Schwartz, J. J., Zhu, X., Herrick, B. E., Varnu m, B., Farber, H. W. (2001). Gas 6 promotes AXL-mediated survival in pulmonary e ndothelial cells. Am. J. Physio. 280: 1273L-1281

【非特許文献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

【非特許文献 5】P. McCloskey, J. Pierce, R. A. Koski, B. Varnum and E. T. Liu, A ctivation of the AXL receptor tyrosine kinase induces mitogenesis and transforma tion in 32D cells. Cell Growth Differ. 5 (1994), pp. 1105-1117

【非特許文献 6】P. Bellosta, Q. Zhang, S. P. Goff and C. Basilico, Signalling th rough the ARK tyrosine kinase receptor protects from apoptosis in the absence of growth stimulation. Oncogene 15 (1997), pp. 2387-2397

【非特許文献7】S. Goruppi, E. Ruaro and C. Schneider, Gas6, the ligand of AL ty rosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts. Oncogene 12 (1996), pp. 471-480

【非特許文献 8】P. McCloskey, Y. W. Fridell, E. Attar et al., GAS6 mediates adhe sion of cells expressing the receptor tyrosine kinase AXL. J. Biol. Chem. 272 (1 997), pp. 23285-3291.

【非特許文献 9】Caron de Fromentel C., Nardeux P. C., Soussi T., Lavialle C., Estrade S., Carloni G., Chandrasekaran K., Cassingena R. Epithelial HBL-100 c ell line derived from milk of an apparently healthy woman harbors SV40 genetic i nformation. Exp. Cell Res., (1985), 160: 83-94

【非特許文献10】Albini A., Iwamoto Y., Kleinman H. K., Martin G. R., Aaron 50

(4)

10

son 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

【非特許文献 1 1】Thompson E. W., Paik S., Brunner N., Sommers C. L., Zugmai er G., Clarke R., Shima T. B., Torri J., Donahue S., Lippman M. E., et al Ass ociation of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen re ceptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. J. Cell. Ph ysiol., 150: 534-544,1992

【非特許文献 1 2】Terranova V. P., Hujanen E. S., Martin G. R. Basement membra ne and the invasive activity of metastatic tumor cells. J. Natl. Cancer Inst. (B ethesda), 77: 311-316,1986

【非特許文献 1 3】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., Las hkari D., Shalon D., Brown P. O., Botstein D. Distinctive gene expression patte rns in human mammary epithelial cells and breast cancers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 9212-9217, 1999

【非特許文献 1 4】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. Nat ure (Lond.), 406: 747-752, 2000

【非特許文献15】Johnston M. Gene chips: array of hope for understanding gene r egulation. Curr. Biol., 8: R171-174, 1998

【非特許文献16】Duggan D. J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P., Trent J. M. Expression profiling using cDNA microarrays. Nat. Genet., 21: 10-14,1999

【非特許文献 1 7】Price J. E., Polyzos A., Zhang R. D., Daniels L. M. Tumorigen icity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. Cancer R es., 50 : 717-721,1990.

【非特許文献 1 8】Sommers C. L., Byers S. W., Thompson E. W., Torri J. A., Ge Imann E. P. Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell I ines. Breast Cancer Res. Treat, 31: 325-335,1994

【非特許文献 1 9】Deborah A. Zajchowski, Marty F. Bartholdi, Yan Gong, Lynn Webs ter, Hsiao-Lai Liu, Alexander Munishkin, Catherine Beauheim, Susan Harvey, Steph en P. Ethier and Paul H. Johnson. Identification of Gene Expression Profiles Tha t Predict the Aggressive Behavior of Breast Cancer Cells. Cancer Research 61,516 8-5178, July 1,2001

【非特許文献20】A. Wimmel, M. Schilli, U. Kaiser et al., Preferential histioty pic expression of CD44-isoforms in human lung cancer. Lung Cancer 16 (1997), pp. 151-172

【非特許文献 2 1】Subburaj Ilangumaran, Anne Briol, and Daniel C. Hoessli. CD44 Selectively Associates With Active Src Family Protein Tyrosine Kinases Lck and F yn in Glycosphingolipid-Rich Plasma Membrane Domains of Human Peripheral Blood L ymphocytes. Blood, Vol. 91 No. 10 (May 15), 1998: pp. 3901–3908

【非特許文献22】Domagala W., Lasota J., Bartowiak J., Weber K., Osborn M. Vimentin is preferentially expressed in human breast carcinomas with low estroge n receptor and high Ki-67 growth fraction. Am. J. Pathol., 136: 219-227, 1990

【非特許文献23】Domagala W., Wozniak L., Lasota J., Weber K., Osborn M. Vime ntin is preferentially expressed in high-grade ductal and medullary but not in I obular breast carcinomas. Am. J. Pathol., 137: 1059-1064, 1990

【非特許文献24】Hayashi K, Matsuda S, Machida K, Yamamoto T, Fukuda Y, Nimura Y, Hayakawa T, Hamaguchi M. Invasion activating caveolin–1 mutation in human sci

10

30

JP 2011-24580 A 2011.2.10

rrhous breast cancers. Cancer Res 2001 Mar 15 ; 61 (6): 2361-4

【非特許文献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 caveol in is associated with prostate and breast cancer. Clin Cancer Res 1998 Aug; 4(8) :1873-80

【非特許文献 2 6】Bachmeier BE, Nerlich AG, Lichtinghagen R, Sommerhoff CP. Matr ix metalloproteinases (MMPs) in breast cancer cell lines of different tumorigeni city. Anticancer Res 2001 Nov-Dec; 21 (6A): 3821-8

【非特許文献 2 7】Sounni NE, Devy L, Hajitou A, Frankenne 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

【非特許文献 2 8】Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. J Exp Med 2001 Ma r 19; 193 (6): 727-40

【非特許文献 2 9】Pederson L, Winding B, Foged NT, Spelsberg TC, Oursler MJ. Ide ntification of breast cancer cell line-derived paracrine factors that stimulate osteoclast activity. Cancer Res 1999 Nov 15; 59 (22): 5849-55

【非特許文献 3 0】Kelly Carles-Kinch, Katherine E. Kilpatrick, Jane C. Stewart a nd Michael S. Kinch. Antibody Targeting of the EphA2 Tyrosine Kinase Inhibits Ma lignant Cell Behavior. Cancer Research 62,2840–2847, May 15,2002

【非特許文献3 1】Bange J., Prechtl D., Cheburkin Y., Specht K., Harbeck N., Schmitt M., Knyazeva T., Muller S., Gartner S., Sures I., Wang H., Imyanitov E., Haring HU, Knyazev P., Iacobelli S., Hofler H., Ullrich A. Cancer progres sion and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg (388) allele. Can cer Res. 2002, Feb. 1,62 (3), 840-7

【非特許文献 3 2】Yanagita M., Arai H., Ishii K., Nakano T., Ohashi K, Mizuno K, Varnum B., Fukatsu A., Doi T., Kita T. Gas6 regulates mesangial cell prolife ration through AXL in experimental glomerulonephritis. Am. J. Pathol, 2001 Apr., 158 (4), 1423–32

【非特許文献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 can cer. Breast Cancer Research and Treatment, (Oct., 1997) Vol. 46, No. 1, pp. 91 【非特許文献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-10AneoSt : A New Cell System for Studying Cell-ECM and Cell-Cell Interactions in Br east Cancer. Clinical Research, Vol. 7, 3640-3548, November 2001

【非特許文献 3 5】Vajkoczy, P., Goldbrunner, R., Farhadi, M., Vince, G., Schil ling, 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

【非特許文献3 6】Sasaki, T., Knyazev, P. G., Cheburkin, Y., Gohring, W., Tis i, D., Ullrich, A., Timpl, R., and Ho-henester, E. Crystal structure of a C-t erminal fragment of growth arrest-specific protein Gas6. Receptor tyrosine kinas e activation by laminin G-like domains, J Biol Chem. 277: 44164-70., 2002

【非特許文献37】Vajkoczy, P., Schilling, L., Ullrich, A., Schmiedek, P., a nd Menger, M. D. Characterization of angiogenesis and microcirculation of highgrade glioma : an intravital multifluorescence micro-scopic approach in the athy mic nude mouse, J Cereb Blood Flow Metab. 18: 510-520,1998

【非特許文献38】Vajkoczy, P., Farhadi, M., Gaumann, A., Heidenreich, R., Erb 50

20

10

h initiates angiogenic sprouting with simultane-ous expression of VEGF, VEGF rec eptor-2, and angiopoietin-2, J Clin Invest. 109: 777-85., 2002 【非特許文献 3 9】Read, T. A. , Farhadi, M., Bjerkvig, R., Olsen, B. R. , Roksta d, A. M., Huszthy, P. C., and Vajko-czy, P. Intravital microscopy reveals novel antivascular and antitumor effects of endostatin deliv-ered locally by alginate -encapsulated cells, Cancer Res. 61: 6830-7., 2001 【非特許文献40】Bjerkvig, R., Laerum, O. D., and Mella, O. Glioma cell inter actions with fetal rat brain aggre-gates in vitro and with brain tissue in vivo, Cancer Res. 46: 4071-9., 1986 【非特許文献41】Stitt, T. N., Conn, G., Gore, M., Lai, C., Bruno, J., Rad ziejewski, C., Mattsson, K., Fisher, J., Gies, D. R., Jones, P. F., and et a I. 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 【非特許文献 4 2】Fridell, Y. W., Villa, J., Jr., Attar, E. C., and Liu, E. T . GAS6 induces AxI-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells, J Biol C hem. 273: 7123-6., 1998 【非特許文献43】Bellosta, P., Costa, M., Lin, D. A., and Basilico, C. The r eceptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding, Mol Cell Biol. 15: 614-25., 1995 【非特許文献44】Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A (1994) Gl ioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. Nature (Lond.) 367: 576-579 【発明の概要】 【発明が解決しようとする課題】 [0004]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

30

20

10

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。 c D N A ハイブリダイゼーションアレイを 7 つの高浸潤性、1 4 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関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。

更に、悪性神経膠腫の生物学に関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 - 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 /AXLmRNAがEGFR用のmRNAより高い発現レベルを有した(第4表)。UF O/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関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、U FO/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、悪性脳腫瘍の瀰浸性-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。

50

40

er, R., Wunder, A., Tonn, J. C., Menger, M. D., and Breier, G. Microtumor growt

[0006]

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(G enbank NM002006)、FGF5(Genbank NM004464)、 FYN (Genbank M14333), LYN (Genbank M16038), DDR2 (Genbank X74764)、TIMP1 (Genbank NM003 254)、HB-EGF(Genbank NM001945)、SGK(Genban k Y10032)、RPS6RB1(Genbank M60724)、MAP4K4 (Genbank XM038748), SIRP (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.N M 0 5 7 1 5 9 )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。

(8)

【 0 0 0 7 】

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。

[0008]

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)、ビメンチン(Genbank X56 134)、Cav1(Genbank Z18951)、CAV2(Genbank A F03572)、MMP1(Genbank M13509)、MMP2(Genban k 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。

【 0 0 0 9 】

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。

【 0 0 1 0 】

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

[0011]

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。

10

[0012]

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、(i i)AXL遺伝子の発現を抑制し、(i i i)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(i v)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。

(9)

[0013]

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 <sup>6 2 0</sup>、T y r <sup>6 6 0</sup> 及び P h e <sup>4 8 7</sup> 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 <sup>6 2 0</sup>、T y r <sup>6 6 0</sup> 及び / 又は P h e <sup>4 8 7</sup>の抑制から成る。 【 0 0 1 4 】

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

【0015】

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。

[0016]

遺伝子発現は例えばmRNA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。

【0017】

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。

【0018】

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。

【0019】

本発明の治療の実施態様は、特に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。AXLタンパク質のリガンドは有利にはGAS6、特に前記したようなGA SG-LGの残基である。

【0020】

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

20

10

50

ペプチド有機化合物であってよい。

【0021】

有利な態様では、阻害剤は、AXLタンパク質又はそのリガンド、例えばGAS6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Fab、Fab'又はF(ab)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scFv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。

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。

[0023]

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。

【0024】

更に本発明のもう一つの態様は、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。

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、例えばドキソルビシン、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。

【0026】

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イ 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。

10

20



50

(11)

【図面の簡単な説明】

[0027]

【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3A】図3A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3B】図3B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 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 20 35S、mock、安定発現dnAXLの3D増殖、遊走性及び浸潤性挙動を表す図であ る

【図6B】図6Bは、抗Ex-AXL抗体を用いて処理後のBC細胞系MDA-MB-4 35S、mock、安定発現dnAXLの3D増殖、遊走性及び浸潤性挙動を表す図であ る

【図6C】図6Cは、抗Ex-AXL抗体を用いて処理後のBC細胞系MDA-MB-4 3 5 S、mock、安定発現dnAXLの3D増殖、遊走性及び浸潤性挙動を表す図であ る

【図7A】図7Aは、MCF7乳癌細胞に対するAXL wtトランスフェクションの作 用を表す図である

30 【図7B】図7Bは、MCF7乳癌細胞に対するAXL wt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 - UFO - WT腫瘍の組織形態学像である。Dは、SF126 - UFO - DN腫瘍の組 織形態学像である。Eは、SF126-UFO-WT腫瘍の組織形態学像である。Fは、 SF126-UFO-DN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10】図10において、Aは、SF126細胞クローンのMTT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、SF126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48時間対比による腫瘍細胞浸潤の分析 図である

【図11】図11において、Aは、脳中にSF126-Ufo-WT細胞及びSF126 - Ufo-DN細胞の定位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

 $\begin{bmatrix} 0 & 0 & 2 & 8 \end{bmatrix}$ 

更に本発明を下記図及び実施例につき詳説する。 [0029]

50

40

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( B C ) 細胞系の形態学( 3 D 伸展)。

【 0 0 3 0 】

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50µ1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/m1に希釈したマトリゲル(Becton Dickinson)70µ1から成る前もって調整したマトリゲルコーチング上で培養した。その上で重合後、マトリゲル(1.0mg/m1)50µ1を加えた。コロニー伸展を実験の間中モニターし、〇penLab(UK)デジタルカメラを装備したZeiss A×iovert35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。

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)。

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 c DNA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。GenBankacce ssion 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R NA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。

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。GenBankaccession 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Rochesystem、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。

【 0 0 3 3 】

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)。 10

30

【0034】

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)。

【 0 0 3 5 】

第4図:選択した識別性に発現したAXL/GAS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mRNA(15µg/レーン)をcDNAアレイ上にデ ポ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。Ac745(正常乳房上皮細胞)に相応する各mR NA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 mRNA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AXL、B-GAS及びC- -ア クチンmRNA。 - 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。mRNA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

[0036]

第5A及びB:マトリゲル上で培養した場合のBC細胞系MDA-MB-435S、B
 T549及びMDA-MB-231(mock)又は安定発現dnAXLの形態学。
 細胞はマトリゲル層上で7~14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×100であった。 【0037】

第6A、B及びC図:抗Ex-AXL抗体を用いて処理後のBC細胞系MDA-MB 435S、mock、安定発現dnAXLの3D増殖、遊走性及び浸潤性挙動。

A.細胞はマトリゲル層上で7~14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 8 】

B.指示したBC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(3~4mg/ml)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 Boyden chamber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。

【0039】

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 transwell chamber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Boyden chamber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MDA231、MDA4355 及びBT549は弱浸潤性細胞系MCF7より運動性がかなり高い(未記載)。 【0040】

第7図:MCF7乳癌細胞に対するAXL wtトランスフェクションの作用

A.AXL 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。

【0041】

B.細胞浸潤に対するAXL wt感染の作用を前記したようにBoyden cha mberアッセイで分析した(材料及び方法参照)。クローンMCF7-AXL wtは 空のベクター感染細胞より浸潤性が30倍であった。 【0042】

50

40

10

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 µm、濃度 3 ~ 4 mg / ml でマトリゲルマトリクッスで覆った)。 A XL wtで感染させた細胞は空ベクター対照又はdnAXL突然変異体形より遙かに早 く浸潤する。

[0043]

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200µg/m1Gas6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-moc細胞と比較して、分析により 、 各 々 S F 1 2 6 - U F O - W T 及 び S F 1 2 6 - U F O - D N 細 胞 で 増 加 ( 約 3 0 % ) 及び全廃のGas6/UFO/AXL媒介シグナリングが実証された。 B ~ D 。 S F 1 2 6 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、SF12 6 - moc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。

[0044]

第9図.

20 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±SEM値を表す。 \*р < 0.05対SF126-moc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 cham ber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 ± S D 値を表す。統計分析を A N O V A 、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;<sup>\*</sup>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-UF O - W T 腫瘍(E)及びS F 1 2 6 - U F O - D N 腫瘍(F)の代表的組織形態学像。S F126-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100μm 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て(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Dilで標識付けした。バーは100μm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; s c、 皮下組織。 S F 1 2 6 - m o c、 対照; S F 1 2 6 -Ufo-WT、UFO/AXLの野生型を発現する細胞;SF126-Ufo-DN、U FO/AXLの切端優性阻害型突然変異体形を発現する細胞。

【0045】

第10図.

A . S F 1 2 6 細胞クローンの M T T 増殖アッセイ。 G a s 6 ( 2 0 0 µ g / m l )の 不在及び存在下。細胞は左未処理( - G a s 6 ) 又は 2 0 0 µ g / m l の G a s 6 で処理 した (+ G a s 6 )。 分析は培養 4 8 時間後に実施した。 増殖率は刺激しなかった S F 1 2 6 - m o c 細胞に関して表す。平均値を表す。 B 及び C . U F O / A X L 機能の抑制に 付 随 す る 変 化 の な い 凝 集 能 を 実 証 す る 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。 D.7 日間の観察期間中の S F 1 2 6 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±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

10

使用して行った。 \* p < 0 , 0 5 対 S F 1 2 6 - m o c 。 E 及び F 。 胎児ラット脳凝集体 を用いる 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。 S F 1 2 6 - U F O - D N 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、 U F O / A X L 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、 S F 1 2 6 - m o c k、対照 ; S F - 1 2 6 - U f o - W T、 U F O / A X L の野 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。

[0046]

第11図.

A . 脳中にSF126 - Ufo - WT細胞及びSF126 - Ufo - DN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>30%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SF126 - Ufo - WT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100μmを表す。

## 【実施例】

[0047]

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(BC)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オ(29~81オの範囲)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 m R N A から得て プールした " 正常 " c D N A を対照及び標準化用に使用した。前記 " 正 常"cDNA中のプロテインキナーゼ(PK)及びホスファターゼ(PP)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 : B T - 2 0 , B T - 4 7 4 、 B T - 4 8 3 、BT-459、Du-4475、MDA-MB-134、-157、-175、-36 1、-436、-453、-468、SK-BR-3及びZR-75-1、T-47D、 MDA-MB-231、ZR-75-30はAmerican Type Cultur e Collection (ATCC、Rockville、MD)から入手した。MC F-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 6 m M 、 ヒトインシュリン 1 0 μ g / m l 及び 1 0 %の胎児子ウシ血清 ( FCS ) を補 充した R P M I 1 6 4 0 培地 (C S L 、 P a r k v i l l e 、 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MCF10 neo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。

#### [0048]

細胞はマイコプラズマ汚染してなかった。

#### [0049]

1.2. R N A 及び D N A の単離及び分別 全 R N A 及びゲノム D N A をグアニジニウムイソチオシアネート溶液(G T S 緩衝剤: <sup>50</sup>

4 M グアニジニウムイソチオシアネート、2 5 m M クエン酸ナトリウム p H 7 . 0、0. 5% サルコシル及び0.1M - 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 R N A 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。 R N A 及び D N A を各細胞系から最小3つの別々の場合で単離した。 【0050】

全及びmRNAインテグリティ及び c DNA 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。 m R N A 抽出をO 1 igo T e x m R N A isolation Kit (Quagen、Biotec h、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、13 000gで3分間遠心分離した。次いで溶解物をO 1 igo - d T セルロース(S t r a tagene Inc.)と静かに攪拌し、前もって湿らせたO 1 igo t e x mo 1 e c u 1 a r b i o 1 o g y c o 1 u m n (Quagen B i o t e c h)に入れ た。m R N A 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。m R N A の量をO D 2 6 0 を用いて 測定した。

[0051]

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有した(リストはhttp://www.biochem.mp g.de 又は ullrich@biochem.mpg.deで得られる)。これら のアイデンティティーをプラスミドDNAのシークエンス法により実証し、GenBan k配列情報と比較した。PK及びPPのアイデンティティー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 ド精製キッット(Qiagen、ドイツ)を用いて行った。

【 0 0 5 2 】

1.4. c D N A 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-1DN A(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Roll er 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0.2×SSC、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、サランラップで覆った。次いでアレイ をPhotosphorimager storage screenを有するimag er cassette(Fuji、日本)に入れ、2日間露光した。

【 0 0 5 3 】

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Phosphoimager Scanner(F uji)で解像度50ミクロンでスキャンし、MacBAS2000(Fuji)を用い <sup>50</sup>

10

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ArrayVisi on 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 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TreeView p rogramにより視覚化した(13~16)。 【0054】

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 c D N A を用いた 1 つのハイブリダイゼーション又は同じ R N A から調製した c D N A 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相関させた発現レベ 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証されるものに対して適正な統計分析を行った。E R - 陽性腫瘍及びE R - 陰性腫瘍間のH E R 2発現の比較を、M a n n - W i t n e y 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。

【 0 0 5 5 】

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。

#### 【0056】

1.8.ノーザンブロットによる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 出用にノーザンブ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 - ア クチンプローブを用いるフィルターの再八イブリダイゼーションにより実証した。 10

30

[0057]

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 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NIH3T3-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。

A T C C から得た B C 細胞系をトリプシン化し、遠心分離し、10% F B S を含有する R P M I 培地中に細胞4×10<sup>5</sup>個/m1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。

【 0 0 5 9 】

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 S cientific 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10µg/m1)で染色する前に、R NaseAで処理した(50µg/m1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。

[0060]

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 cham ber中で塗布してない8μm孔のポリプロピレンフィルター上に載せた。 【0061】

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50µ1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 - R P M A 基礎培地塩中6.0mg/m1に希釈したマトリゲル(Becton Dickinson)70µ1から成る前もって調製したマトリゲルコーチング上で培 養した。これらの上で重合後、希釈したマトリゲル(1.0mg/m1)50µ1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 A xioVert35顕微鏡を用いて7~14日目に撮影した。 【0062】

1.11.傷アッセイ

ー 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 、 M D A - M B - 3 4 5 S - m o c k 及 び M D A - M B - 4 3 5 - d n A X L 、 ク ロ ー ン 2 細 胞 を 培 地 ( 1 0 % F C S ) 及 び G A S 6 ( 2 0 0 n g / m l ) を 含 有 す る 培 地 で 1 2 、 2 4 及 び 4 8 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 1 m m ) を 倍 率 4 0 X で 写 真 撮 影 し た ; 平 均 傷 幅 を 2 0 μ 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

【0063】

10

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2000個)を抗体50µ1及び細胞懸濁液500µ1を使用してE ×-AXLポリクローナル抗体(200µg/m1)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2 4時間処理間隔は同じ濃度のEx-AXL抗体を用いて行った。

【0064】

1.13.BC細胞の組換えレトロウィルス感染

ウィルスのAXLwt及びdn-AXL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、pLXSN-AXLwt及びpLXSN-dnAXLをE coRI/BamHI及びNot1/Xbal位置経由でクローン化した。 【0065】

パッケージング細胞系 Phoenix 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 Phoenix A細胞の上澄液を集め、0.45µmフィルター で濾過した。ヒト癌細胞系の感染用に、細胞をウィルス上澄み液と一緒に24時間培養し た。48時間後、培地を400µg/mlのG148を含有する培地と取り換えた。更に 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。AXL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。AXL wt及びdn-AXL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。

[0066]

1.14.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 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 7 】

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 - 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ファイルを確立する 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、 1 4 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)。

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

30

20

10

【表1】

۹	ن س کی نم چذ قد کی بی ہو <u>سے نم کی جا</u> ک کا بی بات کر ان سا	کر جا سر بال و او ورا چر بلا غذ گاگرور رو نادی دو ور غو کک که خان که	ان ہے ہے وہ با سنا از اندان اور ہے سے سر جر ہے ہو ہو ہو اور انداز اور انداز اور انداز اور انداز اور انداز اور ا
細胞系試料起源	a	腫瘍発生 し	マトリゲル形態学 c
マーカー遺伝子発現	d		

ER- E-cad Vim برزاد بالارتيان بذكر بالاري با د هده د د جنگر بک او

弱侵潤性	<u>4</u>			
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	
+			라스	
MCF7	乳腺癌;上島	+e		
		l e	러스	2
	孔脉瘤 ,脑虹移 上	72		
т Вт <i>474</i> 1	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	+0	合幅	
+	+ -	• <b>L</b>	174,009 Securi	
BT20	乳腺癌 : PT	÷	融合 -	
ND	-			
MDA468	転移性腺癌 ;PE	÷	融合 -	
-	-			
SKBR3	乳腺癌 ;PE	+	長球	
-				2
MDA453	転移性腺癌 Ca; PE	-	長球	3
-				
D1405 MD 1175				
$Dndd_{75}$				
DAL				
ZR-75-30				
HBL-100				
高侵潤性				
MDA435S	転移性管腺癌	+, 転移	星形	
-	- +			4
BT549	乳頭侵襲性管癌 Ca; PT	-	星形	
-		1 4-16		
Hs5781	官酒 Ca; F1	十,虹移	星形	
-	- +			
7 6 8 <b>]</b>				

【表2】

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

(21)

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;P E、 胸 膜 滲 出 液 ; C a 、 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 S C I D 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 ; m e t 、 対 照 1 8 及 び 1 9 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。

 $\begin{bmatrix} 0 & 0 & 6 & 9 \end{bmatrix}$ 

20 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 B C 細 胞 間 の 遺 伝 子 発 現 の 差 異 を 確 認 し た ( 図 2 、 ク ラ ス タ ー A X L 、 相 関 > 0 . 7 1 )。 高 浸潤性BC細胞系(BT549、MDA-MB-231、MDA-MB-436、MDA - M B - 4 1 5、 H s 5 7 8 T、 M D A - M B - 1 5 7 及び M D A - M B - 4 3 5 S)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 30 の他の遺伝子は癌細胞攻撃性と関連した遺伝子として初めて確認された:AXL、GAS 、 M M P 1 4 、 A d a m 1 7 、 M T 3 M M P 、 F G F 2 及び 5 、 F y n 、 L y n 、 D D R 2、TIMP1、HB-EGF、SGK、S6KII、MAP4K4、SIRP 及びA nnexin2。

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 膠 腫 ) で も 確 認 さ れ た ( デ ー タ 未 記 載 ) 。 浸 潤 性 B C 細 胞 系 に お け る A X L 及 び G A S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)

**[**0071**]** 

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:MD A - M b - 4 3 5 S 、 B T 5 4 9 及び部分的に M D A - M B - 2 3 1 (第 5 A 及び B 図) 。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-AX L 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燐酸化は減 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。 

A X L の細胞外部分(アミノ酸残基1 - 4 1 0 を含有する、 E x - A X L )に対するポ 50

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BT5 49BC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図 )。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M CF7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。

#### [0073]

B. 神経膠芽腫試験

#### 1.材料及び方法

1.1 ヒト神経膠腫

下記ヒト神経膠腫細胞をこの試験で使用した:U - 1 1 8、U - 1 2 4 2、SF 1 2 6 、A - 1 7 2、U - 3 7 3、U - 1 2 4 0、T - 9 8 G、SF 7 6 3 及びSF 7 6 7。細胞は全て 5 % C O 2 加湿インキュベーター中で 1 0 % 胎児ウシ血清(P A A G m b H、 L i n z、オーストリア)中で 3 7 で増殖させ、H o e c h s t 3 3 2 5 8 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G i b c o、カースルスーエ、ドイツ)を使用した:U - 1 1 8、T - 9 8 G及びSF 7 6 3 用に D M E M;U - 1 2 4 2 用にM E M、非必須アミノ酸(原料の1:1 0 0 希釈;G i b c o)、1 m M Na - P y r u v a t e;SF - 1 2 6、A - 1 7 2 及びU 3 7 3 用にグ ルコース4 . 5 g / Lを有するD M E M 及びU - 1 2 4 0 及びSF 7 6 7 用にM E M。d o r s a 1 skinfold chamber標本中への腫瘍移植の前に、前記したように細胞をD i 1 で染色した(参照 3 5)。

【0074】

1.2 cDNAアレイハイブリダイゼーション

c D N A 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)+RN Α 及び c D Ν Α プローブは前記したようにして産生した(対照 3 1 )。 c D Ν Α 3 ~ 5 μ 1の標識付けは「<sup>32</sup>-P]dATPの50µCiの存在でMegaprime k i t (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(Roche)100µg/ml及び標識 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。ph osphorimager 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=(A B - B ) × 1 0 0 / B を用いて計算した [A 、最終容量; A B 、各スロットシグナルの強 度(ピクセル / m m<sup>2</sup>); B、背景(ピクセル / m m<sup>2</sup>)]。 c D N A 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)。 

1.3 発現コントラクト及び安定細胞系の生成

A X L 用 コード2.7 k b p の c D N A シークエンスをレトロウィルスベクター p L X S N の E c o R I / B a m H I 制限部位中にクローンした。優性阻害型変異体を1.5 k b p の E c o R I / F s p 1 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 P h o e n i x - A m p h o 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8 µ g / m 1 でポリブレンと混合し、サブコンフルエント S F 1 2 6 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、1 m g / m 1 の G 4 1 8 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 A X L の高発現用に選択した。 【0076】

1.4免疫沈降法及びウェスタンブロット

20

10

細胞は、50mM Hepes pH7.5、150mM NaCl、1mM EDT A、10%グリセロール、1% Triton X-100、Aprotinin10µ g/mlを補充した10mM Na₄P₂Oァ、1mM PMSF、2mM Na₃VO ₄、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、I11inois)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、Ame rsham Biosciences、Freiburg、ドイツ)30µl及び抗-A XL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% 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 2 0 0 μ g /レーンを還 元 試料 緩 衝 剤 と 混 合 し 、 7 . 5 % S D S - P A G Eによって分離し、ニトロセルロース膜(Protran; Schleicher&Sc huell、Dassel,ドイツ)に移した。膜を150mM NaCl、50mM Tris-HClpH7.5、5mM EDTA、0.05% Triton X - 1 0 0 中で 0 . 2 5 % ゼラチンでブロックし、同じ緩衝剤中で 1 : 5 0 0 0 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H R P (1:10000、B i o R a d )を室温で60分間適応した。抗 - A X L (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。 検出はWestern Lightning試薬(Perkin Elmer Life Sciences、ボストン)を用いて行った。

(23)

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

[0078]

1.6 皮下及び同所性異種移植片

神経 膠 腫 異 種 移 植 片 は 1 × 1 0 <sup>6</sup> 個 の C 6 細 胞 ( 対 照 4 4 ) 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5×105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。 [0079]

1.7 Dorsal skinfold chamberモデル

40 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 chamb e r 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。

 $\begin{bmatrix} 0 & 0 & 8 & 0 \end{bmatrix}$ 

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、 3 9 )。神経膠腫細胞のDil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

30

50

10

びに緑色光エピイルミネーション(520~570nm)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;0.1ml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(450~490nm)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)。

【 0 0 8 1 】

## 1.9 組織学

実験終了時に、神経膠腫含有dorsal skinfold chamber標本及 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、Tis sue - Tek(Miles Laboratories Inc.、Napervil le、IL)中に包埋し、液体N<sub>2</sub>で冷却した2-メチルブタン(E.Merck、Da rmstadt、ドイツ)中で凍結した。連続軸切片(5μm)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。

【0082】

## 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(Boeringer Mann heim、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(200µg/m1)の不在又は存 在で48時間培養した。次いで細胞を、MTT染料の着色ホルマザ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。

【 0 0 8 3 】

1.11 遊走性アッセイ

神経膠腫スフェロイドを細胞5×10<sup>6</sup>個を培地中で1.0%Noble寒天(DIF CO、Detroit、MI)を前もって下塗した75cm<sup>2</sup>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、300µm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

[0084]

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1×10<sup>7</sup>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=250~300μm)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(2μm)の製造用にプラスチック樹脂中に包埋した。切片をトルイジンプルーで染色した。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。

10

30

【0085】

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。

[0086]

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‐UTO/AXLのビト野生型形(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プロット法により、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受容体燐酸化を測定した(図8Aトップレーン)。SF126‐moc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‐DN細胞中でベースライン及びGas6-誘発燐酸化はほぼ完全に抑制された。

【0087】

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-moc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。

[0088]

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<sup>6</sup> 個を大人のヌードマウスの腋腹中に皮下移植した。SF126-moc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 skinfold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。

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-U fo-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 10

30

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。

【 0 0 9 0 】

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、SF1 26-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 片の蛍光及び位相差顕微鏡法により確認された(図9G及びH)。 【0091】

2.3

UFO/AXL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。MTTアッセイはSF126-Ufo-DN 細胞の増殖が標準培養条件下で、各々SF126-moc及びSF126-Ufo-Wt 細胞に比較して50%及び35%減少したことを実証した(図10A)。注目に値するこ とには、この結果はUFO/AXLリガンドGas6を用いる刺激と無関係であったこと であり、これはGas6/UFO/AXL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。UFO/AXLは細胞間接着を媒介すると指摘された(参 照43)ので、細胞の多細胞凝集体形成力を調べた。SF126-moc及びSF126 - Ufo-WT細胞は迅速にスフェロイドを形成した(図10B)。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。SF126-moc及びSF126-Ufo-WT細胞 が相当距離遊走したが、腫瘍細胞遊走性はSF126-Ufo-DN細胞で非常に減少し ていた(図10D)。細胞遊走性は腫瘍浸潤に必要不可欠であるので、SF126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48時間後、SF126-moc及びSF126-Ufo-Wt 細胞の両方が能凝集体を瀰漫性に浸潤した(図10E)。対照的に、同じ時間後にSF1 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10F)。 [0092]

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、UFO/AXLが神経 膠腫細胞の増殖、遊走及び浸潤性を有意に調整し、UFO/AXL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UFO/AXL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った攻撃的臨床過程 を特徴とした(図11A)。対照的に、SF126-Ufo-DN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 = 29 ± 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11B)。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11C)。白色路に添って(図11D)及び脳質系の壁に添って (図11E)。対照的に、SF126 - Ufo - DN腫瘍形成はどの動物でも確認するこ とができなかった。

【 0 0 9 3 】

20

10

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RTK UFO/AXLの新 しい基本的役割を示す。所見は、UFO/AXLが、EGFR又はPDGFR -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。UFO/AXLは神経膠腫浸潤に関与すると報 告された最初のRTK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UFO/AXL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。

[0094]

UFO/AXL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 FO/AXL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、UFO/AXL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、UFO/AXL 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 殖に関与していることも示す。

[0095]

中枢神経系は、UFO/AXL、そのリガンドGas6及び類似RTK、例えばTyr o3又はMerの顕著な発現を特徴とする。本試験の所見は、Gas6/UFO/AXL 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UFO/AXL及びそのリガンド Gas6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。

[0096]

C.討論

30 単一遺伝子としてのRTK AXL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。

[0097]

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、AXL及びGAS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。

[0098]

このデータは、血清の存在における B T - 5 4 9 細胞のGAS治療(dn-AXLの安 定発現)がERK1/2MAPK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AXL抑制を効果的に遮断する。

[0099]

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。AXL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dnAXL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AXL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 10



検出用の診断道具として使用することができる。

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

[0101]

2. A X L の優性阻害型突然変異体(dn-AXL)は、高浸潤性乳癌細胞系を強力に 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。AX <sup>10</sup> 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1-410、Ex-AXL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。 【0102】

3.単一遺伝子としてのRTK AXL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BC-MCF7-wtAXL及び前立腺癌細胞系-LNCaP-w tAXL)。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 段工程であるという現行の見解と対比する。

[0103]

4. PTK AXL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。dn-AXL突 20 然変異体による及び/又は阻害抗体を用いる治療によるAXL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。

[0104]

5. 腫瘍治療におけるAXL遺伝子発現の抑制は、遺伝子又は転写物レベルでのAXL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、siRNA、RNAi又はAXL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AXLキナーゼ阻害剤、AXL類似物、例えばEx-AXL融合タンパク質、例えばEx-AXLとJgG1Fcフラグメントの融合(参照32)又は抑制抗体により行うことができる。更に、AXL遺伝子発現の抑制はAXL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。

【 0 1 0 5 】

第2表:浸潤性のコンセンサス

	乳癌細胞系及び対照	
No No	AXLクラスターの遺伝子	公知機能又は關与
	AXL/GAS	増殖、接着、抗アポプトーシス機能、しかし浸潤にはまだ関与せず
5	HBEGF	く Sulv 諸母 BGF
ς.)	EPHA2	乳癌、前立腺癌、メラノーマ、神経膠芽腫血管新生
4	SekII	STK、リボンーマルS6キナーゼ2、浸潤性とはまだ相関せず
Ś	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
9	ADAM17	TACE TNF α 受容体の発散に関与
ſ	Lyn/Fyn	SRC-ファミリーキナーゼ
×	MAP4K4	STK, JNK (しかしゅ38及びERKではない)を活性化、SLKと同じくTNFロングナリングに関与すると考えられる
9	CD44META1	癌細胞浸潤性のマーカー
10	ADAM12	インテグリンと相互作用、 醸ひだ中の SRC 及び GRB2 の共存 , SH3 によるシグナリングに関与する細胞酸ドメイン
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、細胞湿潤促進
12	2 M-CSF	CSF-R1 のリガンド、脈管形成、湿潤性乳癌細胞による構成的発現
e1	3[MMP14	上皮細胞中のunic発現、CD44シェディングに特異的
14	t Vimentin	細胞形質転換と関連、細胞遊走及び湿潤促進、癌細胞の上皮ー間葉性移行のマーカー
15	SIRP alpha	接着、シグナリング、遊走、湿潤関与は不明

[0106]

第 3 表

50

10

20

30

、 [NO] スポット練識(HNGO 分類 )	野楫	GenBank/Lìnk	文献
□ 0	M76125	M76125	Mol. Cell. Biol. 11 (10), 5016-5031 (1991)
■ O 2 ADAM12 (ディスインテグリン及びメタロプロティナーゼドメイン 12= メルトリンアル	·ファ)AF023476	AF023476	J. Biol. Chem. 273 (1), 157-166 (1998)
	U69611	<u>U69611</u>	Nature 385 (6618), 729-733 (1997)
H 【 4 ANXA2 ( アネキシン A2, p35 sro- 結合 )	D00017	D00017	Cell 46 (2), 191-199 (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 (ガベオリン 2)	AF035752	<u>AF035752</u>	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関与 )	X66733	<u>X66733</u>	J. Invest. Dermatol. 99, 381-385 (1992)
+ B DDR2(ディスコイジンドメイン奥容体ファミリー 、 メンバー 2)	X74764	<u>X74764</u>	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)
式 10 FGF5 ( 繊維芽細胞増殖因子 5)	NM004464	<u>NM 004464</u>	Mol. Cell. Biol. 8 (8), 3487-3495 (1988)
」 11 EPHA2 (EphA2= エフィリンタイプ- a 受容体 ZL)	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 (B), 4976-4985 (1993)
Z 13 FRK ( f y n 関連キナーゼ )	U00803	<u>U00803</u>	Gene 138, 247-251 (1994)
A 14 (HB-EGF)DTR(へパリン結合上皮増殖因子様増殖因子)	NM001945	NM 001945	Science 251, 936-939 (1991)
へ 12 TAN(チロシン-プロデインキナーゼ )	M16038	<u>M1603B</u>	Mol. Cell. Biol. 7 (1), 237-243 (1987)
く 16 PTPNS1 (PTP, 非受容体型基質 1)	Y10375	Y10375	Nature 386 (6621), 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	<u>M13509</u>	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	<u>NM 004995</u>	Nature 370 (6484), 61-65 (1994)
こ (g MMP2(マトリックス メタロプロテイナーゼ 2, ゼラチナーゼ A)	NM004530	NM 004530	J. Biol. Chem. 263, 6579-6587 (1988)
治 50 MMP9(マトリックスメタロプロテイナーゼ 9=ゼラチナーゼ B)	NM004994	<u>NM 004994</u>	J. Blol. Chem. 264 (29), 17213-17221 (1989)
ヨ   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 4)	XM038748	NT 022171	Direct Submission
マ 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	XM 042409	J. Biol. Chem. 270 (39), 23013-23020 (1995)
、 53 TIMP1(メタロプロテイナーゼ1の組織阻害剤 )	NM003254	<u>NM 003254</u>	Nature 315 (6022), 768-771 (1985)
T 24 VIM(ビメンチン)	X56134	X56134	Nucleic Acids Res. 18 (22), 6692 (1990)
<b>▼   26 SGK ( 血清/グルココルチコイド調節キナーゼ )</b>	Y10032	<u>Y10032</u>	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94(9) , 4440-4445 (1997)
➡	M60724	<u>M60724</u>	Mol. Cell. Biol. 11 , 5541-5550 (1991)
w 27 FYN(原癌遺伝子 チロシン-プロティンキナーゼ (syn)	M14333	<u>M14333</u>	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5459-5463 (1986)
The second se			
细丨			
物系			
ж			

(30)

【表4】

# る E G F R 及び U F O / A x l の発現

【表5】

	UFO/Axl : EGFR	UFO/Axl	EGFR	細胞系
	10.6	1793	169	U-118
10	5.5	1793	324	U-1242
	5.4	1612	296	SF126
	4.4	1935	438	A-172
	3.4	190	56	U-373
	1.9	262	139	U-1240
	1.5	800	540	T-98G
20	0.0	39	5526	SF763
	0.0		1039	SF767

参考文献

- 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.
- 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.
- 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
- 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.
- 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.
- 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.

[0108]

10

20

 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.

- 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.
- Caron de Fromentel C., Nardeux P. C., Soussi T., Lavialle 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.
- 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.
- 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.
- 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.

[0109]

- 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.
- 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.
- 15. Johnston M. Gene chips: array of hope for understanding gene regulation. Curr. Biol., 8: R171-174, 1998.
- Duggan D. J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P., Trent J. M. Expression profiling using cDNA microarrays. Nat. Genet., 21: 10-14, 1999.
- 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.
- 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.
- 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.

[0110]

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
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

**[**0 1 1 1 **]** 

- 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, Frankenne 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.
- 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.
- 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.
- 31. Bange J., Prechtl D., Cheburkin Y., Specht K., Harbeck N., Schmitt M., Knyazeva T., Muller S., Gartner S., Sures I., Wang H., Imyanitov 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.

【0112】

10

- 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.
- 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.
- 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.
- 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 Cterminal fragment of growth arrest-specific protein Gas6. Receptor tyrosine kinase activation by laminin G-like domains, J Biol Chem. 277: 44164-70., 2002.
- Vajkoczy, P., Schilling, L., Ullrich, A., Schmiedek, P., and Menger, M. D. Characterization of angiogenesis and microcirculation of highgrade glioma: an intravital multifluorescence micro-scopic approach in the athymic nude mouse, J Cereb Blood Flow Metab. 18: 510-520, 1998.

(37)

20

10

40

【0113】

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 simultane-ous 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 Vajko-czy, P. Intravital microscopy reveals novel antivascular and antitumor effects of endostatin deliv-ered locally by alginate-encapsulated cells, Cancer Res. 61: 6830-7., 2001.

- 40. Bjerkvig, R., Laerum, O. D., and Mella, O. Glioma cell interactions with fetal rat brain aggre-gates in vitro and with brain tissue in vivo, Cancer Res. 46: 4071-9., 1986.
- 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/AxI family of receptor tyrosine kinases, Cell. 80: 661-70., 1995.
- Fridell, Y. W., Villa, J., Jr., Attar, E. C., and Liu, E. T. GAS6 induces AxI-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells, J Biol Chem. 273: 7123-6., 1998.
- 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.



(39)

【図 3 A】

【図3B】



【図5A】



## 【図 5 B】

傷アッセイ

MIDA-ME-435S, mock 10%FCS 14DA-D/E435S-dnAFL, el 2



【図6A】



全元00





# 【図7A】

















【図10】



【図11】



フロントページの続き

(51)Int.CI.			FΙ		
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	31/713	(2006.01)	A 6 1 K	31/713	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/04	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	Ν
			C 1 2 N	15/00	А

テーマコード(参考) 4 C 0 8 6

(74)代理人	100099483
	弁理士 久野 琢也
(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 ブルンシュトラーセ 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ーセ 66
(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ーセ 66
(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 アグネスシュトラーセ 10
(72)発明者	ペーター ファコッツィー
	ドイツ連邦共和国 マンハイム アム シェルメンブッケル 55
Fターム(参	考) 2G045 AA26 CB02 DA14 DA36 FB02 FB03
	4B024 AA12 CA12 HA14
	4B063 QQ52 QR32 QR56 QS34 QS39 QX07
	4C084 AA13 AA17 AA19 MA02 NA05 NA14 ZB261 ZB262
	4C085 AA13 AA14
	4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 NA14 ZB26

# patsnap

专利名称(译)	癌细胞侵袭的诊断和预防		
公开(公告)号	JP2011024580A	公开(公告)日	2011-02-10
申请号	JP2010173646	申请日	2010-08-02
[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 - GESELLSCHAF	「楚-Feruderungu德维托里奥·森沙夫	ter-fao
[标]发明人	アクセルウルリッヒ ピョートルニャツェフ タティアナニャツェファ ユーリチェブルキン ペーターファコッツィー		
发明人	アクセル ウルリッヒ ピョートル ニャツェフ タティアナ ニャツェファ ユーリ チェブルキン ペーター ファコッツィー		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/574 G01N37/0 A61K31/7088 A61K31/713 A61P3 G01N33/68	0 G01N33/15 G01N33/50 A61K48/ 5/00 A61P35/04 C12N15/09 G01N	/00 A61K45/00 A61K39/395 33/53 A61P43/00 C12Q1/02
CPC分类号	A61K2039/505 A61P35/00 A61P3 /3955	5/04 A61P43/00 C07K16/2863 C12	Q1/6886 C12Q2600/136 A61K39
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/574.A G01N A61K39/395.D A61K31/7088 A61k /00.G C12Q1/6886.C C12Q1/6886	37/00.102 G01N33/15.Z G01N33/5 (31/713 A61P35/00 A61P35/04 A6 .Z	0.Z A61K48/00 A61K45/00 1K39/395.N C12N15/00.A C12N15
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CB02 2G045/ /CA12 4B024/HA14 4B063/QQ52 4 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084// /ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/	DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/0 AA19 4C084/MA02 4C084/NA05 40 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/0 ZB26	G045/FB03 4B024/AA12 4B024 QS34 4B063/QS39 4B063/QX07 C084/NA14 4C084/ZB261 4C084 EA16 4C086/MA01 4C086/MA02
代理人(译)	矢野俊夫		
优先权	2002015944 2002-07-17 EP		
外部链接	<u>Espacenet</u>		

摘要(译)

要解决的问题:提供恶性疾病领域的诊断和治疗方法,确定恶性疾病的侵入性的方法,包括预防和治疗癌细胞侵袭,以及降低恶性 疾病的侵入性的方法。 ŽSOLUTION:通过测定选自AXL,GAS6,MMP14,ADAM12,ADAM17,MT3MMP,FGF2,FGF5, FYN,LYN,DDR2,TIMP1,HB的至少一种基因的表达来降低恶性疾病的侵袭性。 -EGF,SGK,RPS6RB1,MAP4K4,SIRPα 和膜联蛋白A2,并抑制AXL基因,AXL配体基因或其蛋白质或配体。 Ž

	乳癌罐酸系及16时间	
2	AXL 257.9-0進行	的機能打扰導手
-	AXLUCAS	補紙、後方、ポフポントーンス酸素、しかし透射にはまた得生せず
	BBC	~r19>#85 EGP
	EPEA2	乳底 前は離島、メラノーマ、林器等等値皆軒生
~3-	SKKII	STK、リオソーマルS 6キナーゼ2、透照性とはまた総勝セガ
~	SGK	STK、グルココルチュイド響整ナナーゼ、約7ポトーシス建築、鍵腔生在に裏与
9	<b>TUNACA</b>	TACE TWFise存在中国主要的
e	Lynllyn	SSC 7729-44-4
~~	MAPAKA	STK, NK ( U.M.D. 38000 ERK TATALIV ETABL. S.L.K.LAUKT TRF #5/04197902473546
5	CDWMETA1	鶴鶴 感感的 マーカー
0	ADAM12	インテゲリンと毎年作用、願いた中の SRC Rof GRB2 の共存、SH3 によるジゲナリングに関与する糖酸酸ドメイン
=	Careelin 1, 2	シがナリングにおける重要な役割、戦略が有容良と発品、戦略呈悪だき
13	M-CSF	CSFE R1 のりガンド、修言形成、湿潤性混合細胞による環境的発現
5	HUNN	-上鉄鐵路中のunic男風、GD44シンエディンがに精美的
2	Vimentin	維色的實業最佳業品。能產差五化量素與產業的合化一個一個素的不一力一
S	SIRP alpha	後意、シガナリング、後走、遠洋県中水不県