

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5470041号
(P5470041)

(45) 発行日 平成26年4月16日(2014.4.16)

(24) 登録日 平成26年2月7日(2014.2.7)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
G O 1 N	33/50	(2006.01)	G O 1 N 33/50 P
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/53 D

請求項の数 11 (全 50 頁)

(21) 出願番号	特願2009-532537 (P2009-532537)	(73) 特許権者	508019975
(86) (22) 出願日	平成19年10月9日(2007.10.9)		ザ ヘンリー エム. ジャクソン ファウン デーション フォー ザ アドバンスメ ント オブ ミリタリー メディシン, イ ンコーポレーテッド
(65) 公表番号	特表2010-505446 (P2010-505446A)		アメリカ合衆国 20852 メリーラン ド州, ロックビル, ロックビル ピケ 1 401, スート 600
(43) 公表日	平成22年2月25日(2010.2.25)	(74) 代理人	100091096
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/080826		弁理士 平木 祐輔
(87) 国際公開番号	W02008/063769	(74) 代理人	100096183
(87) 国際公開日	平成20年5月29日(2008.5.29)		弁理士 石井 貞次
審査請求日	平成22年9月15日(2010.9.15)	(74) 代理人	100118773
(31) 優先権主張番号	60/850, 254		弁理士 藤田 節
(32) 優先日	平成18年10月10日(2006.10.10)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/929, 505		
(32) 優先日	平成19年6月29日(2007.6.29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ERG遺伝子発現における前立腺癌特異的変化ならびにそれらの変化に基づく検出および治療方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生物学的サンプルにおいて前立腺癌を検出するためのデータを取得するin vitroの方法であって、

(a) ハイブリダイズする条件下、該生物学的サンプルに少なくとも第1および第2オリゴヌクレオチドプライマーを混ぜ、ここで、第1および第2オリゴヌクレオチドプライマーは、ERG8由来の標的配列を増幅することができ、該標的配列は配列番号1の配列の全て又は一部を含み、

(b) 該生物学的サンプル中に該標的配列が存在する場合には、第1および第2オリゴヌクレオチドプライマーを含有する該生物学的サンプルに少なくとも1つのポリメラーゼ活性を加えることにより、複数の増幅産物を増幅し、

(c) その複数の増幅産物を固定化し、

(d) その固定化された複数の増幅産物にオリゴヌクレオチドプローブを混ぜ、それにより、該プローブを少なくとも1つの固定化増幅産物にハイブリダイズさせ、

(e) 該オリゴヌクレオチドプローブと少なくとも1つの増幅産物との間のハイブリダイゼーションからシグナルが生じるかどうかを検出すること、ここで該シグナルの検出が、該生物学的サンプルにおけるERG8の発現および前立腺癌の存在を示す、を含んでなる方法。

【請求項2】

該標的配列が、配列番号1のヌクレオチド75-1168の全てまたは一部を含む、請求項1記

10

20

載の方法。

【請求項 3】

該標的配列がERG8アイソフォームに選択的にハイブリダイズするが、ERG1、ERG2、ERG3、ERG4、ERG5、ERG6、ERG7、ERG9、EPC1、またはEPC2にハイブリダイズしない、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

該標的配列が配列番号1のヌクレオチド803-1168を含む、請求項2記載の方法。

【請求項 5】

生物学的サンプルが前立腺組織である、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

前立腺癌細胞における前立腺癌特異的ERG8遺伝子転写産物の産生または翻訳を妨げるための医薬の製造における、干渉性RNAまたはアンチセンス核酸の使用。

【請求項 7】

該前立腺癌特異的ERG8遺伝子転写産物が配列番号1のヌクレオチド75-1168を含む、請求項6記載の使用。

【請求項 8】

該前立腺癌特異的ERG8遺伝子転写産物が配列番号1のヌクレオチド803-1168を含む、請求項6記載の使用。

【請求項 9】

該干渉性RNAまたはアンチセンス核酸がERG8（配列番号1）を分解し得るものである、請求項6記載の使用。

【請求項 10】

被験者における前立腺癌を検出または予測するためのデータを取得するin vitroの方法であって、

(a) 被験者由来の生物学的サンプルにおけるERG8の発現レベルを測定し、そして

(b) 該生物学的サンプルにおけるERG8の発現レベルを該被験者における前立腺癌の存在または前立腺癌の重篤度もしくは段階と関連付け、対照サンプルまたは閾値と比較した該生物学的サンプルにおけるERG8の発現レベルの上昇が前立腺癌の存在または前立腺癌の重篤度もしくは段階を示す、

上記方法。

【請求項 11】

ERG8の発現レベルを免疫組織化学、サザンプロットティング、ノーザンプロットティング、ウェスタンプロットティング、ELISA、または核酸増幅を用いて測定する、請求項1または10記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2007年6月29日付け出願の米国仮出願番号60/929,505および2006年10月10日付け出願の米国仮出願番号60/850,254（各出願の全開示は参照に基づくものであり、それを参照により本明細書に組み入れることとする）の利益を主張するものである。

【0002】

米国政府の利害関係

本明細書に記載されている本発明は、それに対する実施料の支払いを伴うことなく米国政府の目的のために製造され、実施許諾され、使用されうる。

【0003】

技術分野

本発明は、ERGポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列、ならびにERG遺伝子発現における変化（前立腺癌に関与または関連しているERG遺伝子のスプライス変異体およびプロモーター配列を含む）に関する。本発明は更に、前立腺癌の治療用組成物ならびに前立腺

10

20

30

40

50

癌の検出、診断および治療方法に関する。本発明はまた、以下の遺伝子：PSA/KLK3、PMEP A1、NKX3.1、ODC1、AMD1およびERGの2以上の発現を検出するための生物マーカーを含む、アンドロゲン受容体シグナリングの機能状態を評価するために及び前立腺癌の予後判定方法において使用されうる一連の前立腺癌生物マーカーに関する。

【背景技術】

【0004】

ETS関連遺伝子 (ETS Related Gene) (ERG) はETS転写ファミリーのメンバーであり、1987年に最初に単離され記載された (Reddyら, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6131-35; Raoら, (1987) Science 237: 635-39)。ETSファミリーの他のメンバーと同様に、それは、MAPK経路を含む主要細胞経路により伝達される細胞増殖シグナルの媒介において中心的な役割を果たしている。ETSファミリー内のタンパク質はヒト組織において多種多様な発現パターンを示す。ERGは内皮組織、造血細胞、腎臓および泌尿生殖路において発現される (OikawaおよびYamada, (2003) Gene, 303: 11-34)。ERGの発現は、ごく一部の前立腺癌では間質の内皮細胞 (微小血管) においても検出されている (Gavrilovら, (2001) Eur. J. Cancer, 37: 1033-40)。

10

【0005】

ERGタンパク質は、5'-GGA(A/T)-3' コンセンサス配列を含むDNAおよびJun/Fosヘテロ二量体の両方に結合することにより、遺伝子発現の調節に関与する。これらの相互作用は、高度に保存されたETSドメインを介して生じる (Vergerら, (2001) J. Biol. Chem., 276: 17181-89)。スプライス変異体が存在し、報告されている9種のうちのERG6およびERG9は、それらを非機能性にする可能性がある複数の終止コドンを含む (Owczarekら, (2004) Gene, 324: 65-77)。ERG7およびERG8はエキソン16の非存在によりERG-15から区別される (同誌)。また、ERG8転写産物は、それがエキソン12の後に3'配列 (そのうちの一部はオープンリーディングフレームの一部を形成する) を含む点で独特である (同誌)。

20

【0006】

ERGは、ETSファミリーの他のメンバーと同様に、トランスフォーム活性を有する癌原遺伝子である (OikawaおよびYamada, (2003) Gene, 303: 11-34; Hsuら, (2004) J. Cell Biochem., 91:896-903; Reddyら, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:6131-35; Hartら, (1995) Oncogene, 10:1423-30; Sementchenkoら, (1998) Oncogene, 17:2883-88)。ERGに影響を及ぼす染色体転座はコーピング肉腫、骨髄性白血病および子宮頸癌に関連づけられている (OikawaおよびYamada, (2003) Gene, 303: 11-34)。ERG1は悪性前立腺組織において最も一般的に過剰発現される原癌遺伝子であることが最近示された (Petrovicsら, (2005) Oncogene 24: 3847-52)。それとは独立して、Tomlinsら, (2005) Science 310: 644-48は、ERG1過剰発現の少なくとも1つの可能なメカニズムを与えうる、アンドロゲン感受性遺伝子であるTMPRSS2およびERGを含む新規遺伝子融合体を記載している。さらに少なくとも2つの研究が前立腺癌におけるERG再編成を確認している (Sollerら, (2006) Genes Chromosomes Cancer, 45:717-19; Yoshimotoら, (2006) Neoplasia, 8: 465-69)。

30

【0007】

前立腺癌は北米の男性における最も一般的な非皮膚癌であり、第3の癌死亡原因である (Jemalら, (2005) CA Cancer J. Clin., 56:106-30)、驚くべきことに、前立腺癌における決定的に重要な事象についてはほとんど知られていない。ERG遺伝子座およびERG1過剰発現を伴う高頻度ゲノム再編成の最近の報告は興味深いものであるが、前立腺癌におけるERG遺伝子座の遺伝子発現産物を同定し特徴づけることが当技術分野で依然として必要とされている。癌由来転写産物、スプライス変異体転写産物、および転写産物間の発現比の変化は、癌発生の種々の段階を通じて癌の診断に使用されうる非常に特異的な手段である。また、これらの産物の標的化抑制もしくは活性化、および/または癌特異的プロモーターの直接的操作は、癌の原因因子を標的化する高度選択的治療法として用いられる。したがって、前立腺癌に特異的な分子的变化の同定は診断および予後判定の最適化を可能にするだけでなく、該腫瘍の分子プロファイルに合わせた個別化治療の確立を可能

40

50

にするであろう。

【0008】

また、前立腺癌は益々早期に検出されてきているが、個々の患者の予後判定は依然として難題である。前立腺癌の進行性形態と緩慢性形態とを早期に区別しうる機能的に関連した経路を代表する分子生物マーカーの同定は、予後判定および治療決定の改善に著しい影響を及ぼすであろう。血清PSA以外には、現在、前立腺癌の臨床実施において利用可能な論理的（腫瘍生物学に基づく）な予後判定用または治療用分子生物マーカーは存在しない。

【0009】

前立腺癌患者の80%は手術、放射線療法または監視下待機に良好に反応するが、約20%は、患者にとってしばしば致命的となる転移を引き起こす。最初は、前立腺癌の発生はアンドロゲン受容体（AR）経路により駆動される（Heinleinら, *Endocrine Rev* 25:276-308 (2004); Linjaら, *J Steroid Biochem Mol Biol* 92: 255-64 (2004); Shafferら, *Lancet Oncol* 4:407-14 (2003); Chenら, *Nat Med* 10: 26-7 (2004)）。しかし、特に転移疾患を伴う前立腺癌の進行中には、ARの構造および/または機能の頻繁な変化がよく認められている。これらの後期アンドロゲン非依存性腫瘍においてしばしば変化する他の遺伝的経路は、p53突然変異、BCL2過剰発現、およびPTENの突然変異または発現低下を含む（Shafferら, *Lancet Oncol* 4:407-14 (2003)）。重要なことに、p53経路およびPTEN経路は共に、AR機能に影響を及ぼしうる。

【0010】

AR媒介シグナリングにおける欠陥は、前立腺癌の進行における潜在的な原因的役割に関して益々重要視されてきている（Heinleinら, *Endocrine Rev* 25:276-308 (2004); Dehmら, *J Cell Biochem* 99: 333-344 (2006)）。AR突然変異、AR遺伝子増幅、AR mRNAまたはARタンパク質レベルの変化、コアクチベーター/コリプレッサーとのARの相互作用および増殖因子/サイトカインによるリガンド非依存性AR活性化における変化を含む種々のメカニズムによるAR機能の前立腺癌関連変化は全て、前立腺癌の進行に関与しうる（Gelmann EP, *J Clin Oncol* 20:3001-15 (2002); Grossmanら, *J Natl Cancer Inst* 93: 1687-97 (2001)）。病理学的標本におけるAR機能不全の明確な知見の欠如のため、ARの機能不全を有する患者を特定することは困難である。

【0011】

後期前立腺癌に対する治療法の選択は全身アンドロゲン除去であるが、これは最終的にほとんどの患者において失敗している。したがって、アンドロゲン除去療法の失敗の前兆となるAR経路機能不全の知見は、新たに現れる治療戦略のための患者の層別に有意な影響を及ぼすであろう。

【0012】

治療決定および予後判定を行う際に原発性腫瘍におけるエストロゲン受容体タンパク質の状態が有効に用いられる乳癌とは異なり（Yamashitaら, *Breast Cancer* 13(1):74-83 (2006); Martinezら, *Am J Surg.* 191(2):281-3 (2006); Giacintiら, *Oncologist* 11(1): 1-8 (2006); Reganら, *Breast* 14(6):582-93(2005); Singhら, *J Cell Biochem.* 96(3):490-505 (2005)）、ARタンパク質の発現状態は前立腺癌においては有用でないようである。なぜなら、おそらく、ARタンパク質の発現レベル以外の多数の要因がAR活性に影響を及ぼしうるからである。AR発現は前立腺癌の進行の全体にわたって検出されうるが、それは不均一であり、時間と共に変化する。いくつかの研究は、より高いグリーソン・スコアを有する分化不良領域においてはAR発現が低下することを示している（Heinleinら, *Endocrine Rev* 25:276-308 (2004); Linjaら, *J Steroid Biochem Mol Biol* 92: 255-64 (2004); Shafferら, *Lancet Oncol* 4:407-14 (2003); Chenら, *Nat Med* 10: 26-7 (2004); Gelmann EP, *J Clin Oncol* 20:3001-15 (2002); Grossmanら, *J Natl Cancer Inst* 93: 1687-97 (2001); Krishnanら, *Clin Cancer Res* 6:1922-30 (2000)）。これとは対照的に、いくつかの最近の研究は、より高いAR発現が、より高い臨床期、より高いグリーソン・スコアおよび低下したPSA再発を伴わない生存と関連していることを見出した（Linjaら, *Canc*

10

20

30

40

50

er Res 61:3550-55 (2001); Sweatら, J Urol 161:1229-32 (1999); Liら, Am J Surg Pathol 28:928-34 (2004))。この議論の理由の1つとして、前立腺におけるAR発現の固有の不均一性、および免疫組織化学的評価の半定量的性質が挙げられる (Krishnanら, Clin Cancer Res 6:1922-30 (2000))。近年、本発明者らの研究室は、アンドロゲンにより調節されるトランスクリプトームに関する新規洞察を確立し、前立腺癌におけるAR機能不全の役割を定めるのに有望な、ならびに前立腺癌の進行中の生物学に基づく新規マーカーおよび治療標的を提供するのに有望なAR標的を同定した (Xuら, Cancer Res. 63(15):4299-304 (2003); Segawaら, Oncogene 21(57):8749-58 (2002); Xuら, Int J Cancer 92(3):322-8 (2001); Xuら, Genomics 66(3): 257-263 (2000); Masudaら, J Mol Biol. 353(4):763-71 (2005).; Richterら, Prostate Cancer Prostatic Dis. 2007 Feb 13; [印刷前の電子公開])。 10

【0013】

それでもやはり、前立腺癌の早期段階におけるAR欠損の機能評価を能率的にすることが尚も必要とされおり、そして、疾患管理に対するこの知見の影響はより大きくなるであろう。本出願は、注意深く選択されたAR下流標的の発現の測定のリードアウト (測定結果) を提供することにより、この必要性を満足させるものである。このリードアウトは、前立腺癌細胞におけるARの *in vivo* 機能状態に関する情報を提供し、これは、ARシグナルの大きさに基づいて患者を層別するのに役立ち、前立腺癌を予後判定するのを助け、これらの患者を管理および治療する新規方法を提供するために用いられうる。 20

【0014】

本明細書における参考文献の引用は、そのような参考文献が本発明の先行技術であると自認するものと解釈されるものではない。

【発明の概要】

【0015】

概要

ERG遺伝子の転写は、前立腺癌細胞においては、良性細胞と比べて変化する。本出願は癌細胞におけるERG8アイソフォームの優勢 (predominant) 発現を初めて記載するものである。本発明はまた、ERG遺伝子座の2つのユニークな癌特異的転写産物、すなわち、ERG前立腺癌特異的アイソフォーム1 (EPC1) およびEPC2の配列および特徴づけを提供する。開示されているERGアイソフォームは、前立腺癌の生物マーカーとして、または治療的介入のための標的として、または治療剤を開発するために、単独でまたは組合せて使用されうる。また、本開示は、新規前立腺癌特異的ERGプロモーターを記載する。ERGプロモーターは、例えば細胞毒素のような治療用タンパク質の発現を前立腺癌細胞へと選択的に標的化するために使用されうる。この新規プロモーターから産生されたポリヌクレオチド転写産物も、前立腺癌の診断のための生物マーカーとして、または前立腺癌の予後判定を助けるために、検出されうる。 30

【0016】

1つの態様においては、本開示は、ERG前立腺癌特異的アイソフォーム1 (EPC1) およびEPC2を含む、ERG遺伝子座の癌特異的遺伝子転写産物の核酸配列およびコード化タンパク質配列を提供する。該コード化ポリペプチドに対する抗体、およびそれらのポリペプチド断片に対する抗体も記載する。いくつかの実施形態においては、該抗体は、直鎖状である該ポリペプチドまたはポリペプチド断片のエピトープに結合し、他の実施形態においては、該エピトープは立体構造をとる (conformational)。いくつかの実施形態においては、該エピトープは、EPC1またはEPC2ポリペプチドのユニークなカルボキシ末端内に含有されているか、または該カルボキシ末端を含んでいる。また、EPC1またはEPC2のカルボキシ末端におけるエピトープに結合する抗体の幾つかは、それぞれのEPC1またはEPC2ポリペプチドに結合する。 40

【0017】

該開示は更に、前立腺癌を検出するためのキットを提供する。これらのキットは、前立腺癌マーカーとして役立つ核酸またはタンパク質を (定量的または定性的に) 検出するた 50

めに使用されうる。例えば、単独でまたは他の癌マーカーと組合せて被験体からの生物学的サンプルにおいて検出された、ERG遺伝子の前立腺癌特異的アイソフォーム（例えば、ERG8、EPC1、EPC2）の、または前立腺癌特異的プロモーターにより産生された転写産物の発現は、被験体における前立腺癌の存在または被験体のもつ前立腺癌を発生するより高い素因を示すために用いられうる。あるいはそれらは、前立腺癌の重症度または病期、例えば、該癌が高リスクの癌であるかまたは中等度のリスクの癌であるか、を予測するために使用されうる。

【0018】

いくつかの実施形態においては、該キットは、一定の条件下でERG配列にハイブリダイズする核酸プローブ（本開示において別の箇所に記載されているプローブなど）を含む。該核酸プローブは、配列番号1（ERG8）、配列番号3（EPC1）、配列番号5（EPC2）（または配列番号1、配列番号3または配列番号5に相補的な配列）にハイブリダイズしうる。あるいは、プローブの組合せを使用して、ERG8およびEPC1、ERG8およびEPC2、EPC1およびEPC2、またはERG8、EPC1およびEPC2にさえもハイブリダイズさせることができる。他の実施形態においては、該キットは、ERG8（配列番号1）、EPC1（配列番号3）またはEPC2（配列番号5）における非重複配列にハイブリダイズする第1および第2オリゴヌクレオチドプライマーを含む。いくつかの実施形態においては、ERG8およびEPC1、ERG8およびEPC2、EPC1およびEPC2、またはERG8、EPC1およびEPC2にハイブリダイズするプライマーペアが、組合せて使用される。そのような場合、ERG8、EPC1またはEPC2プライマーの1以上が同一でありうる。

【0019】

該開示は更に、抗ERGアイソフォーム特異的抗体、例えば抗ERG8抗体、抗EPC1抗体または抗EPC2抗体を含む診断キットを記載する。1つの実施形態においては、該開示は、配列番号4のアミノ酸217-220を含むエピトープに結合する抗EPC1抗体を提供する。もう1つの実施形態においては、該抗体は、配列番号6のアミノ酸28-97内のまたは配列番号6のアミノ酸28-97を含むエピトープに結合する抗EPC2抗体である。それぞれの場合において、該エピトープは直鎖状エピトープまたは立体構造をとった（conformational）エピトープでありうる。いくつかの実施形態においては、該キット内に抗体の組合せが含まれうる。例えば、キットは、抗ERG8および抗EPC1抗体、抗ERG8および抗EPC2抗体、抗EPC1および抗EPC2抗体、または抗ERG8、抗EPC1および抗EPC2抗体を含みうる。該抗体は、場合によっては、検出可能な様態で標識されうる。

【0020】

ERGアイソフォームの発現は、前立腺癌を診断または予後判定するために使用されうる。したがって、該開示はまた、例えば前立腺組織、血液、血清、血漿、尿、唾液または前立腺液のような生物学的サンプル中のERG8、EPC1またはEPC2の1以上の発現を検出するための方法を提供する。例えば、いくつかの実施形態においては、該方法は、ハイブリダイゼーションに基づく技術を用いてERG8、EPC1またはEPC2の増幅産物を検出することを含む。他の実施形態においては、該検出方法の一部として、増幅産物をサイズ分離し、可視化する。前立腺癌を診断または予後判定する該方法は更に、ERG8、EPC1またはEPC2の発現レベル（例えば、mRNAまたはポリペプチド）を測定し、該ERGアイソフォームの発現レベルを被験体における前立腺癌の存在または前立腺癌を発生するより高い素因と、あるいは前立腺癌の重症度または病期段階（例えば、高リスクまたは中等度のリスクの前立腺癌）と関連させることを含む。

【0021】

いくつかの実施形態においては、該方法は、ERG8アイソフォームの発現を検出することを含む。他の実施形態においては、検出されるのはEPC1アイソフォームの発現である。さらに他の実施形態においては、EPC2アイソフォームを検出する。さらに他の実施形態においては、該方法は、ERG8およびEPC1アイソフォームの組合せ、ERG8およびEPC2アイソフォームの組合せ、EPC1およびEPC2アイソフォームの組合せ、またはERG8、EPC1およびEPC2アイソフォームの組合せを検出することを含む。それぞれの場合において、各ERGアイソフ

10

20

30

40

50

フォームは、該転写産物を検出および/または測定することにより、あるいは対応ポリペプチドを検出および/または測定することにより検出および/または測定されうる。

【0022】

前立腺癌を治療する、および前立腺過増殖の障害を治療する治療方法も開示する。例えば、本開示は、前立腺癌細胞における前立腺癌特異的ERG遺伝子転写産物を不安定化することを含む、前立腺癌の治療方法を提供する。いくつかの実施形態においては、該方法は、ERG8、EPC1、EPC2、ERG1、ERG2および/またはERG3転写産物のうちの1つ、すべてまたは任意の組合せを不安定化して、その結果それらの転写産物の分解およびコード化ポリペプチドの発現の抑制を引き起こすことを含む。1つの実施形態においては、該不安定化はsiRNAを使用する。もう1つの実施形態においては、該方法は小ヘアピンRNA (shRNA) を使用する。さらにもう1つの実施形態においては、該転写産物を不安定化するために、アンチセンス分子を使用する。さらにもう1つの実施形態においては、不安定化を引き起こすために、リボザイムを使用する。1以上のERGアイソフォームの発現を抑制するために、小分子インヒビターも使用されうる。本開示はまた、前立腺癌または前立腺過増殖の障害を治療するための、1以上のERGアイソフォームに対する抗体の使用方法を提供する。したがって、種々の実施形態において、本開示は、抗ERG8、抗EPC1、抗EPC2、抗ERG1および抗ERG2、抗ERG3抗体またはそれらの抗体の組合せを投与することを含む、前立腺癌または前立腺過増殖の障害の治療方法を提供する。いくつかの実施形態においては、単一抗体が、開示されているERGアイソフォームによりコードされる1以上のタンパク質に特異的でありうる。

【0023】

もう1つの実施形態においては、本出願は、前立腺癌に関する一連の生物マーカー、前立腺癌を診断および予後判定するためにそれらの生物マーカーを使用するための方法およびシステム、ならびに該生物マーカーを検出するために使用する試薬を含む診断および予後判定キットを提供する。1つの実施形態においては、該パネルは、6つのアンドロゲン誘導可能/同時調節型遺伝子 (PSA/KLK3、PMEPA1、NKX3.1、ODC1、AMD1およびERG) のセットのうち2以上の組合せを含む。いくつかの実施形態においては、ERG遺伝子はERG8、EPC1、EPC2、ERG1、ERG2、ERG3またはそれらの組合せである。

【0024】

本出願はまた、2以上のアンドロゲン誘導可能/同時調節型遺伝子のレベルを検出または測定する予後判定用キットを提供する。該予後判定用キットは、in vivoアンドロゲン受容体シグナリングの機能状態を予測する方法において、あるいは前立腺癌の進行もしくは重症度を予測する、例えば、前立腺癌が中等度のリスクの前立腺癌であるか若しくは高リスクの前立腺癌であるかを予測する、または前立腺癌の段階を予測する (例えば、T病期分類系 (pTX、pT0、PT1、pT2、pT3、pT4) またはWhitmore-Jewett系 (A、B、C、D) を使用して)、または前立腺癌が進行性、退縮性もしくは寛解にあるかどうかを予測する方法において使用される。また、該予後判定用キットは、例えば前立腺切除後の0.2ng/ml以上の血清PSAレベルにより定められうる、前立腺切除後の、無病生存を予測するために使用されうる。いくつかの実施形態においては、該予後判定用パネルは以下の遺伝子の2以上を含む: PSA/KLK3、PMEPA1、NKX3.1、ODC1、AMD1およびERG。ある実施形態においては、ERG遺伝子はERG8、EPC1、EPC2、ERG1、ERG2、ERG3またはそれらの組合せである。したがって、該予後判定用キットを使用するアッセイはこれらの2以上の遺伝子のレベルを検出または測定しうる。例えば、予後判定用キットは、2、3、4、5、6または更にはより多数のアンドロゲン誘導可能/同時調節型遺伝子のレベルを測定するために使用されうる。

【0025】

ある実施形態においては、該予後判定用アッセイは更に、PSA、% fPSA、PSA倍加時間、PSA速度、前立腺体積またはこれらの指標の組合せを検出または測定することを含む。

【0026】

予後判定の実施形態においては、前立腺癌の予後判定方法は、

(a) 個体からの生物学的サンプルにおいて、PSA/KLK3、PMEPA1、NKX3.1、ODC1、AMD

10

20

30

40

50

1およびERGから選ばれる2以上の遺伝子の発現を検出または測定し、

(b) (a)において検出または測定された各遺伝子の発現に関して、(a)において得られた結果を、対照サンプルにおける同じ遺伝子の発現と比較することを含みうる。

【0027】

予後判定方法においては、対照サンプルと比較した場合の患者のサンプルにおける2以上の遺伝子の発現の変化は疾患の重症度（例えば、中等度のリスクの前立腺癌または高リスクの前立腺癌）を予測するものであるか、あるいは前立腺癌が進行性、退縮性または寛解にあるかどうかを予測するものである。あるいは、対照サンプルとして、遺伝子発現の閾値が選択され、使用されうる。この場合、遺伝子発現レベルが閾値未満であれば、それは減少したとみなされる。該閾値は、公知技術を用いて決定されうる。例えば、該値はmRNAコピー数またはサイクル閾値から決定されうる。

10

【0028】

該予後判定方法においては、対照または閾値と比較して少なくとも10%の増加および減少が用いられうるが、他の値も用いられうる。例えば、該増加または減少は少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400または更には500%でありうる。該増加または減少は統計的有意性によって表してもよく、その発現における統計的に有意な増加または減少（例えば、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.005$ または $p < 0.001$ ）が、前立腺癌の存在、または前立腺癌を発生するより高い素因、前立腺癌の進行性、または疾患重症度を示す。

20

【0029】

いくつかの予後判定的実施形態においては、アンドロゲン誘導可能/同時調節型遺伝子の発現レベルの減少を用いてアンドロゲン受容体シグナリングの減弱が予測され、それが次いで、高リスクまたは進行した段階の前立腺癌の存在または発生素因、あるいは前立腺切除後の無病生存期間の減少を予測するものとなる。

【0030】

本開示はまた、前立腺組織または体液、例えば血液、血清、血漿、尿、唾液もしくは前立腺液のような生物学的サンプル中のPSA/KLK3、PMEPA1、NKX3.1、ODC1、AMD1およびERG（ERG8、EPC1、EPC2、ERG1、ERG2またはERG3を含む）のうち2以上の発現を検出するための方法を提供する。例えば、いくつかの実施形態においては、該方法は、ハイブリダイゼーションに基づく技術を用いてPSA/KLK3、PMEPA1、NKX3.1、ODC1、AMD1またはERGの増幅産物を検出することを含む。他の実施形態においては、該検出方法の一部として、増幅産物をサイズ分離し、可視化する。前立腺癌を予後判定する該方法はまた、抗体を使用して、PSA/KLK3、PMEPA1、NKX3.1、ODC1、AMD1またはERGによりコードされるタンパク質の発現レベルを測定することを含みうる。

30

【0031】

追加的な目的は、ある程度は以下の説明において記載され、ある程度は該説明から理解され、あるいは本発明の実施により認識されうる。前記の全般的な説明および後記の詳細な説明は共に、例示的で解説的なものであるに過ぎず、特許請求されている本発明を限定するものではないと理解されるべきである。

40

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】図1は正常前立腺組織（NP）および前立腺癌細胞系VCaPにおける種々のERG転写産物のPCR増幅ゲルを表す。

【図2】図2は腫瘍細胞（T）および良性上皮細胞（8人の患者からのもの）におけるERG8転写産物発現に関するPCR増幅結果を示す。

【図3】図3は腫瘍細胞（T）および良性上皮細胞（5人の患者からのもの）におけるEPC1転写産物発現に関するPCR増幅結果を示す。

【図4A】図4はERGアイソフォームのコピー数を示す。図4AはEPC1、ERG8およびERG1/2特異的プライマーのプライマー位置の概要図を示す。

50

【図4B】図4はERGアイソフォームのコピー数を示す。図4BはVCaP細胞におけるERG1/2、ERG8およびEPC1のコピー数を示す。

【図4C】図4はERGアイソフォームのコピー数を示す。図4Cは、10人の前立腺癌患者のうち9人の顕微解剖腫瘍細胞を使用した場合のERG8およびERG1/2のコピー数を示す。

【図5】図5は、ERGエキソン9（配列番号7のヌクレオチド486-532）における選択的転写開始部位の地図を示す。

【図6】図6は、LNCaP細胞系と比較した場合のVCaP細胞系におけるルシフェラーゼレポート構築物の発現を支持する前立腺癌特異的ERGプロモーターの3つのセグメントの能力をグラフに示したものである。

【図7】図7は、腫瘍組織におけるERG1、AR、PSA、PMEPA1およびLTF発現とのTMPRSS2-ERG融合体A転写産物発現のピアソン相関分析の結果を示す。

10

【図8】図8は、ERGのダウンレギュレーションがアンドロゲン受容体応答性遺伝子の発現を増加させることを示す。図8Aは、2つの異なるsiRNAによるERGの抑制がアンドロゲン誘導性PSAおよびNKX3.1転写産物の発現の増加をもたらすことを示すゲルである。図8Bは、ERGがsiRNAにより抑制される場合、VCaP細胞の培養上清においてPSAレベルも増加することを示す。

【図9】図9は、ERG発現がアンドロゲン受容体応答性遺伝子PSAおよびNKX3.1の抑制をもたらす、それにより細胞分化を抑制しうることを示す図である。

【図10】図10は、VCaP前立腺癌細胞におけるERG発現のsiRNA抑制の結果を示す。図10Aは、対照で処理されたVCaP細胞の顕微鏡視野であり、図10Bは、siRNA-1で処理された細胞の顕微鏡視野である。

20

【図11】図11は、腫瘍および対応する良性細胞（40人のCaP患者からのもの）におけるアンドロゲン調節型遺伝子PSA/KLK3、NKX3.1、PMEPA1、ODC1、AMD1およびERGの遺伝子発現の強度の比較である。Zスコア正規化GeneChip由来発現強度が、階層的クラスタリング後の高-低尺度での熱地図により図示されている。該熱地図の上に患者の番号（N=40）が記載されている。対応する腫瘍および良性試料が、同じ順序で列挙されている。

【図12】図12は、前立腺組織切片から顕微解剖された細胞における前立腺癌関連遺伝子ERG、AMACR、DD3、PSGRおよびPCGEM1の遺伝子発現の強度を比較する熱地図表示を示す。

【図13】図13は、QRT-PCRを用いた場合の、TMPRSS2-ERG融合体を担持する前立腺癌患者の腫瘍細胞におけるERG発現とのアンドロゲン調節型PSA/KLK3およびPMEPA1遺伝子の相関を示す。

30

【図14】図14は、ERG発現が前立腺癌組織におけるアンドロゲンシグナリングを反映することを示す。TMPRSS2-ERG融合体（左パネル）およびPSA/KLK3（右パネル）転写産物レベルを、定量的PCRにより、pT3およびpT2期の腫瘍の前立腺癌細胞において比較した。Y軸目盛は、ハウスキーピングGAPDH遺伝子の発現に対する組織発現レベルの変化倍率を表す。

【図15】図15は、前立腺癌（CaP）患者の腫瘍細胞における生化学的再発および組織PSA/KLK3 mRNA発現の分布を示す。垂直の棒グラフにより表されている、腫瘍細胞におけるPSA/KLK3 mRNAの相対発現は、log2スケールで示されている。黒塗の棒グラフは、生化学的再発を伴う患者を示す。

40

【図16】図16は、2~10ng/mlの血清PSAを有する患者における腫瘍組織PSA/KLK3 mRNA五分位による、PSA再発を伴わない生存時間に対するKaplan-Meier生存評価曲線を示す。五分位は、漸減する順序で示されており、第1五分位は最も高い、そして第5五分位は最も低い、PSA/KLK3発現を示す（N=79）。前立腺腫瘍細胞におけるより低い組織PSA/KLK3 mRNA発現は、生化学的再発のより高いリスクと相関する。

【発明を実施するための形態】

【0033】

発明の説明

1. 定義

「ERG」なる語は、ERG遺伝子ならびに本開示に記載されている種々のERG cDNAおよびmR

50

NAを意味する。特定のアイソフォームまたはアイソフォームのサブセットが指定されていない限り、ERGなる語はERG1、ERG2、ERG3、ERG4、ERG5、ERG6、ERG7、ERG8、ERG9、EPC1、EPC2、および本明細書に記載されている前立腺癌特異的プロモーターの活性化から生じる末端切断型 (truncated) ERG転写産物を含む。1以上の具体的に挙げられているERGアイソフォーム「以外のERG」なる語は、必ずしも全てではないが幾つかの異なるERGアイソフォームが想定される実施形態において用いられうる。ERG1遺伝子のcDNA配列はアクセッション番号M21535としてGenBankにおいて公開されている。ERG2遺伝子のcDNA配列はアクセッション番号M17254としてGenBankにおいて公開されている。ERGアイソフォーム1~9のエキソン利用はOwczarekら、(2004) Gene, 324: 65-77に示されている。文脈が明らかに除外していない場合には、ERGは、種々のアイソフォームによりコードされる種々のERGポリペプチドをも意味する。さらに、斜体文字は一般には核酸を示すために用いられるが、斜体文字の使用は、コードされるポリペプチドを排除するものと解釈されるべきではない。

10

【0034】

1以上の転写産物の「不安定化」は、コードされるポリペプチドの発現が抑制またはノックダウンされるよう、そのノそれらの転写産物の分解を引き起こすことを意味する。サイレント干渉性RNA (siRNA)、小ヘアピンRNA (shRNA) (例えば、Paddisonら、(2002) Genes Dev. 16 (8): 948-58に記載されているもの)、アンチセンス分子、リボザイムおよびこれらのアプローチの組合せが、転写産物の不安定化の方法において用いられうる。

【0035】

「中等度のリスク」の前立腺癌は、患者が例えばPSA無再発、6~7のGleasonスコア、T2a~T3b期、精嚢無浸潤および十分なまたは中等度の腫瘍分化を有する癌である。

20

【0036】

「高リスク」の前立腺癌は、患者が例えばPSA再発、8~9のGleasonスコア、T3c期、精嚢浸潤および乏しい腫瘍分化を有する癌である。

【0037】

「変化した発現 (発現の変化)」なる語は、定性的相違 (すなわち、その遺伝子またはタンパク質発現が検出可能または検出不能である) および定量的相違 (すなわち、遺伝子またはタンパク質発現の測定レベルでの相違) の両方を意味する。

【0038】

「単離 (された)」なる語は、その天然環境を実質的に伴わない分子を意味する。いずれかの操作 (例えば、過剰発現、部分精製など) により、天然に生じるレベルより上昇した、その分子のいずれかの量が、該定義内に含まれる。部分精製組成物の場合にのみ、該用語は、少なくとも50~70%、70~90%、90~95% (w/w) またはそれ以上純粋である単離された化合物を意味する。

30

【0039】

「実質的に同一」または「記載されているのと実質的に同じ」なる表現は、関連配列が、与えられた配列に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、97、98または99%同一であることを意味する。例えば、そのような配列は対立遺伝子変異体、種々の種に由来する配列であることが可能であり、あるいはそれらは、与えられた配列から、末端切断、欠失、アミノ酸の置換または付加により誘導されうる。ポリペプチドの場合、比較配列の長さは一般には少なくとも20、30、50、100アミノ酸またはそれ以上である。核酸の場合、比較配列の長さは一般には少なくとも50、100、150、300ヌクレオチドまたはそれ以上である。2つの配列の間の同一性 (%) は、例えばAltschulら、(1990) J. Mol. Biol., 215:403-410に記載のBasic Local Alignment Tool (BLAST)、Needlemanら、(1970) J. Mol. Biol., 48:444-453のアルゴリズム、またはMeyersら、(1988) Comput. Appl. Biosci., 4:11-17のアルゴリズムのような標準的なアライメントアルゴリズムにより決定される。

40

【0040】

「タンパク質」は、「ペプチド」および「ポリペプチド」なる語と互換的に用いられ、長さまたは翻訳後修飾 (例えば、グリコシル化またはリン酸化) または起源 (例えば、種

50

)には無関係に、任意のアミノ酸鎖を意味する。

【0041】

「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸」および「DNA」なる語は本明細書において互換的に用いられ、デオキシリボ核酸(DNA)、および適当な場合にはリボ核酸(RNA)を意味する。また、該用語は、ヌクレオチド類似体および一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチドを含むと理解されるべきである。ポリヌクレオチドの具体例には、プラスミドDNAまたはその断片、ウイルスDNAまたはRNA、アンチセンスRNAなどが含まれるが、これらに限定されるものではない。「プラスミドDNA」なる語は、環状である二本鎖DNAを意味する。

【0042】

本明細書中で用いる「所定(defined)条件下のハイブリダイゼーション」または「所定条件下でハイブリダイズさせる」なる語は、お互いに対して有意に同一または相同であるヌクレオチド配列がお互いに結合したままとなる、ハイブリダイゼーションおよび洗浄のための条件を示すと意図される。該条件は、少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、より一層好ましくは少なくとも約85~90%同一である少なくとも約6ヌクレオチド長、好ましくは少なくとも約20、30、40、50、100、150、300ヌクレオチド長またはそれ以上の配列がお互いに結合したままとなるような条件である。同一性(%)は、Altschulら, *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402 (1997)に記載されているとおりに決定されうる。適当なハイブリダイゼーション条件は、Ausubelら, (2004), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sonsに例示されているとおりの最低限の実験により当業者により選択されうる。また、ストリンジентな条件はSambrookら, (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Pressに記載されている。

【0043】

低ストリンジエンシーの所定条件の非限定的な一例は以下のとおりである。DNAを含有するフィルターを、35%ホルミアミド、5×SSC、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、5mM EDTA、0.1% PVP、0.1% フィコール(Ficoll)、1% BSAおよび500 μg/ml 変性サケ精子DNAを含有する溶液中、40 °Cで6時間、前処理する。以下の修飾を伴う同じ溶液中でハイブリダイゼーションを行う: 0.02% PVP、0.02% フィコール(Ficoll)、0.2% BSA、100 μg/ml サケ精子DNA、10% (wt/vol) 硫酸デキストラン、および5~20 × 10⁶ cpm ³²P標識プローブを使用する。フィルターをハイブリダイゼーション混合物中、40 °Cで18~20時間インキュベートし、ついで2×SSC、25mM Tris-HCl (pH 7.4)、5mM EDTAおよび0.1% SDSを含有する溶液中、55 °Cで1.5時間洗浄する。該洗浄溶液を新鮮な溶液と交換し、60 °Cで更に1.5時間インキュベートする。フィルターをプロットして乾燥させ、オートラジオグラフィーにさらす。当技術分野でよく知られている低ストリンジエンシーの他の条件(例えば、交差種ハイブリダイゼーション)も用いられうる。

【0044】

高ストリンジエンシーの所定条件の非限定的な一例は以下のとおりである。DNAを含有するフィルターのプレハイブリダイゼーションを、6×SSC、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02% フィコール、0.02% BSAおよび500 μg/ml 変性サケ精子DNAから構成されるバッファー中、65 °Cで8時間~一晩行う。100 μg/ml 変性サケ精子DNAおよび5~20 × 10⁶ cpmの³²P標識プローブを含有するプレハイブリダイゼーション混合物中、フィルターを65 °Cで48時間ハイブリダイズさせる。2×SSC、0.01% PVP、0.01% フィコールおよび0.01% BSAを含有する溶液中、フィルターの洗浄を37 °Cで1時間行う。この後、0.1×SSC中、50 °Cで45分間洗浄を行う。高ストリンジエンシーの所定条件のもう1つの非限定的な一例は以下のとおりである。DNAを含有するフィルターのプレハイブリダイゼーションを、6×SSC、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02% フィコール、0.02% BSAおよび500 μg/ml 変性サケ精子DNAから構成されるバッファー中、65 °Cで8時間~一晩行う。100 μg/ml 変性サケ精子DNAおよび5~20 × 10⁶ cpmの³²P標識プローブを含有するプレハイブリダイゼーション混合物中、フィルターを65 °Cで12時間ハイブリダイズさせ

10

20

30

40

50

る。2×SSC、0.01% PVP、0.01% フィコールおよび0.01% BSAを含有する溶液中、フィルターの洗浄を37 で1時間行う。この後、0.1×SSC中、50 で45分間洗浄を行う。当技術分野でよく知られている、高ストリンジェンシーの他の条件が用いられうる。オリゴヌクレオチドは、高ストリンジェンシーの条件下、標的配列に特異的にハイブリダイズする。

【0045】

「プライマー」または「オリゴヌクレオチドプライマー」なる語は、標的核酸の領域またはその相補鎖に結合し標的核酸の核酸増幅を促進しうるオリゴヌクレオチドを意味する。一般に、プライマーは、核酸ポリメラーゼにより伸長されうる遊離3'末端を有する。また、プライマーは、一般に、直接的に標的核酸の少なくとも1つの鎖または標的配列に相補的な鎖と相補的塩基相互作用によりハイブリダイズしうる塩基配列を含む。プライマーは標的・特異的配列を、および場合によっては、標的配列に非相補的な他の配列を含みうる。これらの非相補的配列は、例えば、プロモーター配列または制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含みうる。

10

【0046】

「固体支持体」なる語は、オリゴヌクレオチドまたは核酸を結合させるために利用可能な遊離化学基を含む、アッセイ方法の溶媒および温度条件下で実質的に不溶性である物質を意味する。好ましくは、固体支持体は、標的核酸に直接的または間接的に結合するよう設計されたオリゴヌクレオチドに共有結合している。標的核酸がmRNAである場合、固体支持体に結合したオリゴヌクレオチドは、好ましくは、ポリT配列である。好ましい固体支持体は粒子、例えばマイクロンまたはサブマイクロンのサイズのビーズまたは球状体である。種々の固体支持体物質、例えばシリカ、ポリアクリラート、ポリアクリルアミド、金属、ポリスチレン、ラテックス、ニトロセルロース、ポリプロピレン、ナイロンまたはそれらの組合せが想定される。いくつかの実施形態においては、固体支持体は、例えば磁鉄鉱コアを有する固体支持体のように、磁場によりいずれかの位置に結合しうる。

20

【0047】

「検出する」または「検出」なる語は、核酸またはタンパク質の存在を決定するための、当技術分野で公知の種々の方法のいずれかを意味する。例えば、標識プローブを核酸の一部にハイブリダイズさせることは、その核酸を検出するための1つの方法である。直接的または間接的に標識されている抗体を、関心のあるタンパク質へ結合させることは、そのタンパク質を検出するための方法の一例である。核酸および抗体（および他のタンパク質）を標識するための方法は当技術分野でよく知られている。標識は、検出可能または機能的な標識であることが可能であり、放射標識（例えば、¹³¹I、¹²⁵I、³⁵Sおよび⁹⁹Tc）、酵素標識（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）、化学発光標識、および他の化学的部分（例えば、ビオチン）を包含する。標識プローブは、別の配列に特異的に結合するオリゴヌクレオチドであり、それは、例えば蛍光部分、化学発光部分（例えば、（米国特許第5,283,174号に記載のとおり））適当な条件下で化学発光により検出されうるアクリジニウムエステル（AE）部分）、放射性同位体、ビオチン、アビジン、酵素、酵素基質または他の反応性基でありうる検出可能な基を含有する。他のよく知られた検出技術には、例えば、ゲル濾過、ゲル電気泳動、および例えば臭化エチジウムでの染色によるアンプリコンの可視化、および高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が含まれる。抗体に基づく検出方法には、ELISA、ウエスタンブロット法、RIA、免疫組織化学、および当技術分野でよく知られている他の技術が含まれる。本明細書の全体にわたって用いられている「検出する」または「検出」なる語は、定性的または定量的検出を含む。

30

40

【0048】

「治療」なる語は、本明細書においては、「治療方法」なる語と互換的に用いられ、治療的処置および予防的手段の両方を意味する。治療を要するものには、特定の医学的障害を既に有する個体、および最終的に該障害を獲得しうる個体が含まれうる。

【0049】

50

「有効用量」または「有効量」なる語は、患者における症状の改善または所望の生物学的結果、例えば細胞増殖の抑制をもたらす、該化合物の量を意味する。有効量は、後記の節に記載されているとおりに決定されうる。

【0050】

「モジュレーション性化合物」なる語は「治療（用）」と互換的に用いられ、本明細書中で用いられる場合には、転写、翻訳または翻訳後レベルで前立腺癌特異的遺伝子発現を「モジュレーション」しうる、または前立腺癌特異的ポリペプチドの生物活性をモジュレーションしうる任意の化合物を意味する。「モジュレーション」なる語およびその同族語は、化合物が或る反応または活性のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用しうることを意味する。したがって、モジュレーションなる語は「活性化」および「抑制」なる語を含む。「活性化」なる語は、例えば、モジュレーション性化合物の存在下の前立腺癌特異的遺伝子の発現または前立腺癌特異的ポリペプチドの活性が、同じ化合物の非存在下の該遺伝子または該ポリペプチドの活性と比較して増加することを意味する。該発現レベルまたは該活性の増加は、好ましくは、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれより高い。同様に、「抑制」なる語は、モジュレーション性化合物の存在下の前立腺癌特異的遺伝子の発現または前立腺癌特異的ポリペプチドの活性が、同じ化合物の非存在下の該遺伝子または該ポリペプチドの活性と比較して減少することを意味する。該発現レベルまたは該活性の減少は、好ましくは、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれより高い。前立腺癌特異的遺伝子の発現レベルまたは前立腺癌特異的ポリペプチドの活性は、本明細書に記載されているとおりに、または当技術分野で一般に公知の技術により測定されうる。

10

20

【0051】

「抗体」は免疫グロブリンまたはそのフラグメントを意味し、抗原結合性フラグメントまたは抗原結合性ドメインを含む任意のポリペプチドを含む。該用語は、ポリクローナル、モノクローナル、単一特異性、多重特異性、ヒト化、ヒト、一本鎖、キメラ、合成、組換え、ハイブリッド、突然変異、グラフト化、およびin vitro生成抗体を含むが、これらに限定されるものではない。「無傷」なる語が先行しない限り、「抗体」なる語は、抗体フラグメント、例えばFab、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、dAb、および抗原結合機能を保有する他の抗体フラグメントを含む。特に示さない限り、抗体は、必ずしも、いずれかの特定の起源に由来するわけではなく、また、それはいずれかの特定の方法により産生されるわけでもない。

30

【0052】

「特異的相互作用」、「特異的結合」などの語は、2つの分子が、物理的条件下で相対的に安定な複合体を形成することを意味する。該用語はまた、例えば、抗原結合ドメインが、多数の抗原により担持される特定のエピトープに特異的である場合に適用可能であり、この場合、該抗原結合ドメインを担持する特異的結合メンバーは、該エピトープを担持する種々の抗原に結合しうるであろう。特異的結合は、高い親和性（アフィニティ）かつ低いし中等度の容量により特徴づけられる。非特異的結合は、通常、中等度ないし高い容量と共に、低い親和性を有する。典型的には、親和定数K_aが10⁶ M⁻¹より高い場合、より好ましくは、10⁷ M⁻¹より高い場合、最も好ましくは、10⁸ M⁻¹である場合に、該結合は特異的とみなされる。必要に応じて、特異的結合に実質的に影響を及ぼすことなく、結合条件を変化させることにより、非特異的結合を減少させることが可能である。そのような条件は当技術分野で公知であり、当業者は、通常の技術を用いて、適当な条件を選択することが可能である。該条件は、通常、抗体の濃度、溶液のイオン強度、結合のために許容される、温度、時間、非関連分子（例えば、血清アルブミン、乳カゼイン）の濃度などにおいて定められる。

40

【0053】

II. 前立腺癌特異的ERG核酸

本開示は、前立腺癌特異的ERGアイソフォーム核酸、特にERG8、EPC1、EPC2、およびERG遺伝子のエキソン9内に位置する前立腺癌特異的プロモーターを記載する。ERG8の場合、E

50

RG遺伝子のこのスプライス変異体が記載されているが (Owczarekら, Gene 324: 65-77 (2004))、前立腺癌の場合のその過剰発現は従前公知ではなかった。ERG8によりコードされるタンパク質は、ERG1およびERG2において見出されるDNA結合ドメインを欠くが、全タンパク質-タンパク質相互作用ドメインを保持する。したがって、ERG8の発現はERG1およびERG2のタンパク質相互作用相手の機能的無効化を引き起こして、それによりドミナントネガティブ効果をもたらさう。

【 0 0 5 4 】

本開示はまた、ERG8とTMPRSS2との間で融合体が生じることを示す。TMPRSS2-ERG8融合転写産物の一例として、以下のものが挙げられる。

TAGGCGCGAG CTAAGCAGGA GGCGGAGGCG GAGGCGGAGG GCGAGGGGCG 50	10
GGGAGCGCCG CCTGGAGCGC GGCAGGAAAGC CTTATCAGTT GTGAGTGAGG 100	
ACCAGTCGTT GTTTGAGTGT GCCTACGGAA CGCCACACCT GGCTAAGACA 150	
GAGATGACCG CGTCCTCCTC CAGCGACTAT GGACAGACTT CCAAGATGAG 200	
CCCACGCGTC CCTCAGCAGG ATTGGCTGTC TCAACCCCCA GCCAGGGTCA 250	
CCATCAAAAT GGAATGTAAC CCTAGCCAGG TGAATGGCTC AAGGAACTCT 300	
CCTGATGAAT GCAGTGTGGC CAAAGGCGGG AAGATGGTGG GCAGCCCAGA 350	
CACCGTTGGG ATGAACTACG GCAGCTACAT GGAGGAGAAG CACATGCCAC 400	
CCCCAAACAT GACCACGAAC GAGCGCAGAG TTATCGTGCC AGCAGATCCT 450	20
ACGCTATGGA GTACAGACCA TGTGCGGCAG TGGCTGGAGT GGGCGGTGAA 500	
AGAATATGGC CTTCCAGACG TCAACATCTT GTTATTCCAG AACATCGATG 550	
GGAAGGAACT GTGCAAGATG ACCAAGGACG ACTTCCAGAG GCTCACCCCC 600	
AGCTACAACG CCGACATCCT TCTCTCACAT CTCCACTACC TCAGAGAGAG TCAGAGAGAC 650	
TCCTCTTCCA CATTGACTT CAGATGATGT TGATAAAGCC TTACAAAAC 700	
CTCCACGGTT AATGCATGCT AGAAACACAG GGGGTGCAGC TTTTATTTTC 750	
CCAAATACTT CAGTATATCC TGAAGCTACG CAAAGAATTA CAACTAGGCC 800	
AGGTACGAAA ACACCCCTGT GTGATCTCTT CATTGAGAGA CATCCCAGAT 850	
<u>GTCCTGCTGA</u> <u>GATCCGTGCC</u> <u>CTAAGTCACG</u> <u>TGATACAAAG</u> <u>AGAGCTGATC</u> 900	30
<u>CCGGAGCTGA</u> <u>AGCCAGTCCC</u> <u>AGACAGTCTT</u> <u>ATTCTGCCTC</u> <u>TGTTGATTG</u> 950	
<u>GAGACTAAAT</u> <u>CCACTCAAAC</u> <u>CATTTTATTC</u> <u>AAAGACCACA</u> <u>CTAAAGGAAT</u> 1000	
<u>TAAGAGCAGA</u> <u>TTAGCCCTTT</u> <u>AACTAGCTTT</u> <u>TCAGAAAGAC</u> <u>AGATGGGCAA</u> 1050	
<u>AGAAGGCATC</u> <u>CTGGATGCCT</u> <u>GGCAGTTAGG</u> <u>AATAGGCCGA</u> <u>CTTTTGAAC</u> 1100	
<u>AACAGAAGGA</u> <u>TCTGTCCCTC</u> <u>CTCGGGGGAA</u> <u>GAGCACAAAA</u> <u>CAAGGACACT</u> 1150	
<u>CCCCAGATTC</u> <u>ACAGTGAC</u>	

(配列番号1)。TMPRSS2由来配列が太字で示されている。エキソン結合部が灰色の枠内に示されている。開始コドンおよび終止コドンが太字斜体で示されている。ユニークな3'配列が下線で示されている。ERG8のアミノ酸配列は以下のとおりである。

MTASSSSDYG QTSKMSRPVP QQDWLSQPPA RVTIKMECNP SQVNGSRNSP 50	
DECSVAKGGK MVGSPDTVGM NYGSYMEEKH MPPPNMTTNE RRVIVPADPT 100	
LWSTDHVRQW LEWAVKEYGL PDVNILLFQN IDGKELCKMT KDDFQRLTPS 150	
YNADILLSHL HYLRETPLPH LTSDDVDKAL QNSPRLMHAR NTGGAAFIFF 200	
NTSVYPEATQ RITTRPGTKT <u>PLCDLFIERH</u> <u>PRCPAEIRAL</u> <u>SHVIQRELIP</u> 250	
<u>ELKPVPDSL</u> <u>LPLLIWRLNP</u> <u>LKPFHSTTL</u> <u>KELRAD</u>	

(配列番号2)。ERG8のユニークなカルボキシ末端が下線で示されている。

50

【 0 0 5 5 】

EPC1は、癌性前立腺細胞において選択的に発現されるERGアイソフォームである。EPC1の核酸配列は以下のとおりである。

```

CGAGGAGGCG GAGGCGGAGG CGGAGGGCGA GGGGCGGGGA GCGCCGCCTG 50
GAGCGCGGCA GGAAGCCTTA TCAGTTGTGA GTGAGGACCA GTCGTTGTTT 100
GAGTGTGCCT ACGGAACGCC ACACCTGGCT AAGACAGAGA TGACCGCGTC 150
CTCCTCCAGC GACTATGGAC AGACTTCCAA GATGAGCCCA CGCGTCCCTC 200
AGCAGGATTG GCTGTCTCAA CCCCAGCCA GGGTCACCAT CAAAATGGAA 250
TGTAACCCTA GCCAGGTGAA TGGCTCAAGG AACTCTCCTG ATGAATGCAG 300
TGTGGCCAAA GCGGGGAAGA TGGTGGGCAG CCCAGACACC GTTGGGATGA 350
ACTACGGCAG CTACATGGAG GAGAAGCACA TGCCACCCCC AAACATGACC 400
ACGAACGAGC GCAGAGTTAT CGTGCCAGCA GATCCTACGC TATGGAGTAC 450
AGACCATGTG CGGCAGTGGC TGGAGTGGGC GGTGAAAGAA TATGGCCTTC 500
CAGACGTCAA CATCTTGTTA TTCCAGAACA TCGATGGGAA GGAAGTGTGC 550
AAGATGACCA AGGACGACTT CCAGAGGCTC ACCCCAGCT ACAACGCCGA 600
CATCCTTCTC TCACATCTCC ACTACCTCAG AGAGATCCT CTTCCACATT 650
TGACTTCAGA TGATGTTGAT AAAGCCTTAC AAAACTCTCC ACGGTTAATG 700
CATGCTAGAA ACACAGGGGG TGCAGCTTTT ATTTTCCCAA ATACTTCAGT 750
ATATCCTGAA GCTACGCAA GAATTACAAC TAGGCCAGTC TCTTACAGAT 800
AAAACAACAG AACCAGTGCC AGAAAGCAGC CTTCCCTTAC ATGGGCACTT 850
CTGCCAAGCA TATGAGTTCA TTGCCTTGAA GATCAAAGTC AAAGAGAAAT 900
GGAGAGGGTG TTGAAATGAT CAGCGAAAAT TAAATGTAAA ATATATTCTT 950
ATTGGAAGTC TGATGCTCTA TTATCAATAA AGGACACATA GCAAAGATAA 1000
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

```

10

20

(配列番号3)。該配列においては、TMPRSS2由来配列が太字で示されている。エキソン結合部が灰色の枠内に示されている。開始コドンおよび終止コドンが太字斜体で示されている。EPC1転写産物の3'末端は全ての公知ERGアイソフォームとは異なる。このユニークな配列は下線で示されている。EPC1のアミノ酸配列は以下のとおりである。

30

【 0 0 5 6 】

```

MTASSSSDYG QTSKMSPRVP QQDWLSQPPA RVTIKMECNP SQVNGSRNSP 50
DECSVAKGGK MVGSPDTVGM NYGSYMEEKH MPPPNMTTNE RRVIVPADPT 100
LWSTDHVRQW LEWAVKEYGL PDVNILLFQN IDGKELCKMT KDDFQRLTPS 150
YNADILLSHL HYLRETPLPH LTSDDVDKAL QNSPRLMHAR NTGGAAFIFP 200
NTSVYPEATQ RITTRPVSYR

```

40

(配列番号4)。EPC1は、その3'末端に、EPC1タンパク質のカルボキシ末端の4つのユニークなアミノ酸をコードする追加的なヌクレオチドを含む。配列番号4において、これらの4つのユニークなアミノ酸は下線で示されている。EPC1は、ERG8と同様に、DNA結合ドメインのコード配列を欠くため、それもドミネントネガティブ効果をもたらさう。

【 0 0 5 7 】

EPC2も、癌性前立腺細胞において選択的に発現される。EPC2の核酸配列は以下のとおりである。

ACATCTTGTT ATTCCAGAAC ATCGATGGGA AGGAACTGTG CAAG**ATG**ACC 50
 AAGGACGACT TCCAGAGGCT CACCCCCAGC TACAACGCCG ACATCCTTCT 100
 CTCACATCTC CACTACCTCA GAGAG**AGTAA** GCTCCCCCTT CCTCCAAGGA 150
 TAGATGGCTG TGGCTATGGT TCTTATGACC CGAGCTTCAG AGGGTTCAAC 200
 CAGGTGTGTC GACAGCATCC TCCTGCCCTC GCCCAGTTCC CACTGGGGAT 250
 CCGAGGGAGC CACATGCTTG GGTCCCTGCCA CCAAGAAGAT GGAATGTCAA 300
 AGGGGAAAGG AAGCGTTAAC TGGTCACACA TTAGT**TAAGT** CTCCATGATA 350
 CCCCGAATCA AAATAGAATC ATTAAGGCTT CTCTTTCGTA GGAATTAGGG 400
 GGATTATTCT CCCTAAAGCT ACATGAAGCC CCACTTTATA TTCTAACCTG 450
 AGCACAGAAC AAGGGAAAGT TTCACTTTGT ATCATGTGAT TCGGCTTAAC 500
 CTGACAGAAA GGGATGGCAT GTTGGCATGA ATCCAGAATG TTTGCTGCAT 550
 GCTTTAATTT CTACAACGTC CAGCATGGTG AGAAGGAAGT AGTGTGACAG 600
 ACAGTGAGGT GGATAAATTC TCCTCCATTG CTTTGCCTGG CATCCCAACC 650
 ACTTCTTCCC TGAATTAAAG ACGGGCCCC ATGTAGGTTT TAACATGCTA 700
 ACAAGTAGCA GGTTCCTGGA AATAGTTATA AGCTTCCCAT GATGTTAGTG 750
 TGGGAGTGGG GGAACGGTTT CTTTCTTTCT TTTTCTTTCT TTTTTTTTTT 800
TTTTTTTT

10

20

(配列番号5)。開始コドンおよび終止コドンが太字斜体で示されている。エキソン結合部が灰色の枠内に示されている。ユニークな3'配列が下線で示されている。EPC2のアミノ酸配列は以下のとおりである。

MTKDDFQRLT PSYNADILLS HLHYLRESKL PLPPRIDGCG YGSYDPSFRG 50
FNQVCRQHPP ALAQFPLGIR GSHMLGSCDQ EDGMSKKGKS VNWSHIS

(配列番号6)。配列番号6において、EPC2のユニークなカルボキシ末端が下線で示されている。

【0058】

30

本開示はまた、前立腺癌細胞におけるプロモーターの活性化を記載する。このプロモーターの活性化は、野生型ERGのN末端タンパク質-タンパク質相互作用ドメインを欠くERGアイソフォームをコードする転写産物を生成する。したがって、前立腺癌細胞におけるこのプロモーター配列の発現産物はドミナントネガティブまたは機能獲得 (gain-of-function) 分子として作用すると思われる。該プロモーターはERG遺伝子のエキソン9からの以下の配列内に位置する。

TCTGTCGCCA GTCTGGAGTG CAGTGGCATG ATCTCAGCTC ACTGCAACCT 50
 CCACCTCCCG GATTCAAGCA ATTTTCCTGC CTCAGCCTCC TGAGTAGCTG 100
 GGACTACAGG CATGCCAGC TAATTTTTGT ATTTTGTAGTA GAGACGGGGT 150
 TTCACCATGT TGGCCAGGAT GGTCTGGATC TCTTGACCTC ATGATCCGCC 200
 CACCTCGGCA TCCCAAAGTG TTGGGACTAC AGGCATGAGC CACGGCACCC 250
 CGCCTGTATT TGGCTTTTCA CACTTGTCTT TTCTCCCCCA GTCTCTTCCG 300
 CCTTGCCCTT CTTTGGTTCT CTCTGTGTAT TGTGAGAAGT CGATGGAGAC 350
 ATGCTCTTTG ATTGCTGTTA TAATGGAAGA ATATTTCTTC TCCTCCAGGA 400
 ACTCTCCTGA TGAATGCAGT GTGGCCAAAG GCGGGAAGAT GGTGGGCAGC 450
 CCAGACACCG TTGGGATGAA CTACGGCAGC TACATGGAGG AGAAGCACAT 500
 GCCACCCCA AACATGACCA **CGA**ACGAGCG CAGAGTTATC GTGCCAGCAG 550
 GTCAGGTGCC CACAGCTTCA CTGCCCTCGG CAGATCGCAA CTTCCCCAAG 600
 GCTAGGCTGA GCCTCAGGGA GCTCTTCTCC CCCACCTGTG GCATTGATCA 650

10

(配列番号7)。該配列においては、最も3'側の転写開始部位が太字で示されており、灰色の枠内に示されている。配列番号7の少なくともヌクレオチド521-650を含む配列はプロモーター活性を保持する。

【0059】

20

III. 診断用組成物および方法

ERG8、EPC1、EPC2、および前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物は、それぞれ、前立腺癌と関連づけられているため、ERGアイソフォーム核酸、それらがコードするポリペプチド、およびそれらのポリペプチドに対する抗体は、前立腺癌の種々の診断および予後判定用途において使用されうる。

【0060】

したがって、本開示は、生物学的サンプルにおいて前立腺癌を検出するための方法であって、

(a) ハイブリダイズする条件下、該生物学的サンプルに少なくとも第1および第2オリゴヌクレオチドプライマーを混ぜ、ここで、第1オリゴヌクレオチドプライマーは、ERG 8、EPC1、EPC2、または前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物由来の標的配列内の第1配列にハイブリダイズする配列を含み、第2オリゴヌクレオチドプライマーは、該標的配列に相補的な核酸鎖内の第2配列にハイブリダイズする配列を含み、第1配列は第2配列と重複しておらず、

30

(b) 該生物学的サンプル中に該標的配列が存在する場合には、第1および第2オリゴヌクレオチドプライマーを含有する該生物学的サンプルに少なくとも1つのポリメラーゼ活性を加えることにより、複数の増幅産物を増幅し、

(c) その複数の増幅産物を固体支持体上に固定化し、

(d) その固定化された複数の増幅産物にオリゴヌクレオチドプローブを混ぜ、それにより、該プローブを少なくとも1つの固定化増幅産物にハイブリダイズさせ、

40

(e) 該オリゴヌクレオチドプローブと少なくとも1つの増幅産物との間のハイブリダイゼーションからシグナルが生じるかどうかを検出すること、ここで、該シグナルの検出が、該生物学的サンプルにおけるERG8、EPC1、EPC2、または前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物の発現および前立腺癌の存在を示す、を含んでなる方法を提供する。該オリゴヌクレオチドプローブと少なくとも1つの該増幅産物との間のハイブリダイゼーションから生じるシグナルの検出は、前立腺癌を診断または予後判定するために用いられうる。

【0061】

ERGアイソフォームがTMPRSS2と融合している幾つかの実施形態においては、第1オリゴヌクレオチドプライマーは、TMPRSS2からの標的配列内の第1配列にハイブリダイズする配

50

列を含み、第2オリゴヌクレオチドプライマーは、ERG8、EPC1、EPC2、または前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物由来の標的配列に相補的な核酸鎖内の第2配列にハイブリダイズする配列を含む。

【0062】

したがって、本開示は、標的配列が配列番号1、配列番号3、配列番号5または配列番号7の全部または一部を含む、生物学的サンプル中の前立腺癌を検出するための方法を提供する。他の実施形態においては、標的配列は配列番号1のヌクレオチド75-1168、配列番号1のヌクレオチド803-1168、配列番号3のヌクレオチド61-1019、配列番号3の788-1019、配列番号5を含む核酸分子、または配列番号5のヌクレオチド127-807を含む。

【0063】

いくつかの実施形態においては、場合によっては、増幅産物ではなく該オリゴヌクレオチドプローブが固体支持体に固定されうる。

【0064】

さらに他の実施形態においては、工程(c)~(e)が省略され、サイズ分離およびそれに続く、DNAを検出する試薬(例えば、臭化エチジウム)での染色により、複数の増幅産物が検出される。この実施形態は、場合によっては更に、結果を保存するために、染色されたDNAを写真撮影することを含みうる。これらの実施形態においては、増幅産物の検出も、前立腺癌を診断または予後判定するために用いられうる。

【0065】

生物学的サンプル中のERGアイソフォーム発現を検出する場合には、該オリゴヌクレオチドプローブ、第1オリゴヌクレオチドプライマーおよび第2オリゴヌクレオチドプライマーはそれぞれ、所定条件下(例えば、高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件下、例えば、6×SSC中、65℃で12時間のハイブリダイゼーション、およびそれに続く、0.1×SSC中、50℃で45分間の洗浄)でERGアイソフォームの核酸配列にハイブリダイズできる核酸配列を含む。したがって、該オリゴヌクレオチドプローブ、第1オリゴヌクレオチドプライマーおよび第2オリゴヌクレオチドプライマーは、例えば、ERGアイソフォームの核酸配列、例えば配列番号1(ERG8)、配列番号3(EPC1)、配列番号5(EPC2)、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物(配列番号7)またはそれらの断片を含む核酸分子、またはそれらに相補的な配列を含む。該オリゴヌクレオチドプローブ、第1オリゴヌクレオチドプライマーまたは第2オリゴヌクレオチドプライマーは、ERG8、EPC1、EPC2、もしくは前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物の核酸配列またはそれらに相補的な配列の少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約30、少なくとも約40または少なくとも約50個連続したヌクレオチドを含む断片でありうる。

【0066】

いくつかの実施形態においては、該方法は、ERG8アイソフォームの発現を検出することを含む。他の実施形態においては、EPC1アイソフォームの発現を検出する。さらに他の実施形態においては、EPC2アイソフォームの発現を検出する。いくつかの実施形態においては、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物を検出する。さらに他の実施形態においては、該方法は、ERG8およびEPC1アイソフォームの組合せ、ERG8およびEPC2アイソフォームの組合せ、EPC1およびEPC2アイソフォームの組合せ、またはERG8、EPC1およびEPC2アイソフォームの組合せを検出することを含む。他の実施形態においては、該方法は、前立腺癌特異的プロモーターからの1以上の転写産物を、単独で、またはERG8、EPC1もしくはEPC2のうち1以上と組合せて検出することを含む。いくつかの実施形態においては、該方法は更に、他の前立腺癌特異的マーカー、例えばERG1、ERG2、PSA、DD3、AMAR、LTF、NPY、SPOCK、CRISP3、PLA2G7、TMEFF2、F5、SMOC、ACPP、TGM4、MSMB、WIF1、OLFM4、PI15、PDGFD、CHGA、CAV1、RLN1、IGFBP7、BGN、FMOD、AGR2、SERPINA3、AZGP1、FAM3B、CD164、またはTMPRSS-ERG融合体の存在を検出することを含む。

【0067】

ERG8、EPC1またはEPC2によりコードされるポリペプチドも、生物学的サンプルにおいて検出および/または測定されうる。例えば、よく知られた技術、例えばELISAを用いて、

10

20

30

40

50

各ポリペプチドを検出するために、抗体、場合によっては標識されている抗体が使用されうる。

【0068】

該生物学的サンプルは、前立腺組織、血液、血清、血漿、尿、唾液または前立腺液でありうる。

【0069】

もう1つの態様においては、本開示は、

(a) ERG8、EPC1、EPC2、または前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物の発現レベル（例えば、mRNAまたはポリペプチド）を測定し、さらに

(b) ERGアイソフォームの発現レベルを、被験体における前立腺癌の存在または前立腺癌を発生するより高い素因と相関させること、
を含んでなる、前立腺癌を診断または予後判定する方法を提供する。

【0070】

ERG8、EPC1、EPC2、または前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物の発現レベルまたは発現パターンを前立腺癌の存在または前立腺癌発生のより高い素因と相関させる方法は、当業者に理解されるであろう。例えば、対照サンプルまたは他の標準化された値もしくはは数的範囲と比較した場合の発現レベルの増加または減少が前立腺癌の存在または前立腺癌発生のより高い素因を示すよう、該発現レベルを定量することが可能である。

【0071】

発現レベルの増加または減少は、例えば同じ被験体からの良性前立腺上皮細胞のような正常かつ対応する組織におけるERG8、EPC1、EPC2、もしくは前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物、または対応ポリペプチドの発現レベルと比較して測定されうる。あるいは、ERG8、EPC1、EPC2、もしくは前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物、または対応ポリペプチドの発現レベルは、被験体からの他の非癌性サンプルにおける、または癌を有さない個体から得られたサンプルにおける遺伝子またはポリペプチドの発現と比較して測定されうる。また、遺伝子または対応ポリペプチドの発現は、それを他の癌特異的マーカーの発現と比較することによっても正規化されうる。例えば、ERG8、EPC1、EPC2、もしくは前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物、または対応ポリペプチドの発現レベルを比較および/または正規化するための対照として、前立腺特異的マーカー、例えばPSAまたはTMPRSS2-ERGが使用されうる。

【0072】

例えば、前立腺癌の診断または予後判定方法は、ERG8、EPC1、EPC2、もしくは前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物、アイソフォーム、またはそれらの任意の組合せの発現レベルを測定すること、および前立腺癌を診断または予後判定することを含みうる。ここで、対照サンプルと比較して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%またはそれ以上増加したERG8、EPC1またはEPC2の発現レベルは、前立腺癌の存在または被験体における、前立腺癌発生のより高い素因を示し、または前立腺癌の重症度もしくはは段階（例えば、該癌が高リスクの前立腺癌であるかまたは中等度のリスクの前立腺癌であるか）を示す。

【0073】

ERG8、EPC1、EPC2、または前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物（例えば、mRNAまたはポリペプチドの発現）の発現レベルは、本明細書に記載されている方法に従い、または免疫組織化学的方法、サザンブロット法、ノーザンブロット法、ウエスタンブロット法、ELISAおよび核酸増幅法 [PCR、転写媒介増幅 (transcription-mediated amplification) (TMA)、核酸配列に基づく増幅 (nucleic acid sequence-based amplification) (NASBA)、セルフ・サステインド配列複製 (self-sustained sequence replication) (3SR)、リガーゼ連鎖反応 (ligase chain reaction) (LCR)、鎖置換増幅 (strand displacement amplification) (SDR) およびループ媒介等温増幅 (loop-mediated isothermal amplification) (LAMP) を含むが、これらに限定されるものではない] を含む（これらに限定されるものではない）任意の他の公知検出方法を用いて検出されうる。

10

20

30

40

50

【0074】

また、前立腺癌を検出するための核酸をも提供し、これらの核酸の1以上は、場合によっては、キットの一部として提供されうる。いくつかの実施形態においては、該核酸は、前立腺癌特異的転写産物にハイブリダイズする核酸プローブ、例えば、本開示に記載されているプローブである。1つの実施形態においては、該核酸プローブは、所定ハイブリダイゼーション条件下、配列番号1、または配列番号1のヌクレオチド75-1168もしくは801-1168 (ERG8) 内の配列、またはそれらの相補鎖にハイブリダイズする。例えば、1つの実施形態においては、該プローブは、高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件下 (例えば、6×SSC中、65 で12時間のハイブリダイゼーション、およびそれに続く、0.1×SSC中、50 で45分間の洗浄)、所望の配列にハイブリダイズしうる。該プローブは、配列番号1自体、または配列番号1のうち少なくとも約15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150もしくは200個連続したヌクレオチドを含む配列番号1の断片、またはそれらに相補的な配列を含みうる。1つの実施形態においては、該断片は配列番号1のヌクレオチド75-1168の全部または一部を含む。例えば、該断片は、配列番号1のヌクレオチド801-1168、または配列番号1のヌクレオチド801-1168のうち少なくとも約15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150もしくは200個連続したヌクレオチドを含む核酸分子を含みうる。いくつかの実施形態においては、該プローブはERG8アイソフォームには選択的にハイブリダイズするが、所定条件 (例えば、高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を含む) 下、ERG1、ERG2、ERG3、ERG4、ERG5、ERG6、ERG7、ERG9、EPC1、EPC2、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物、またはTMPRSS2にはハイブリダイズしない。該プローブの長さは、例えば、ハイブリダイゼーション条件、および標的配列と該プローブとの同一性 (%) に応じて変動することがあり得、したがって、約6、10、20、30、40、50、100、150、200、300、400または500ヌクレオチド長まででありうる。

10

20

【0075】

したがって、いくつかの実施形態においては、本開示は、配列番号1のヌクレオチド801-1168のうち少なくとも約15個連続したヌクレオチドを含んでなる単離された核酸を提供し、ここで、該核酸は、高ストリンジェンシーの条件下、配列番号1またはその相補鎖にはハイブリダイズしうるが、ERG1、ERG2、ERG3、ERG4、ERG5、ERG6、ERG7、ERG9、EPC1、EPC2、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物、またはTMPRSS2にはハイブリダイズしない。いくつかの実施形態においては、該核酸は約50ヌクレオチド長までである。他の実施形態においては、該プローブは、6×SSC中、65 で12時間のハイブリダイゼーションおよびそれに続く、0.1×SSC中、50 で45分間の洗浄を含む高ストリンジェンシーの条件下、所望の配列にハイブリダイズしうる。

30

【0076】

もう1つの実施形態においては、該プローブは、所定ハイブリダイゼーション条件下、配列番号3、または配列番号3のヌクレオチド61-1019もしくは788-1068 (EPC1) 内の配列、またはそれらの相補鎖にハイブリダイズする。例えば、1つの実施形態においては、該プローブは、高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件下 (例えば、6×SSC中、65 で12時間のハイブリダイゼーションおよびそれに続く、0.1×SSC中、50 で45分間の洗浄)、所望の配列にハイブリダイズしうる。該プローブは、配列番号3自体、または配列番号3の少なくとも約15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150もしくは200個連続したヌクレオチドを含む配列番号3の断片、またはそれらに相補的な配列を含みうる。1つの実施形態においては、該断片は配列番号3のヌクレオチド61-1019の全部または一部を含む。例えば、該断片は、配列番号3のヌクレオチド788-1019、または配列番号3のヌクレオチド788-1019のうち少なくとも約15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150もしくは200個連続したヌクレオチドを含む核酸分子を含みうる。いくつかの実施形態においては、該プローブはEPC1には選択的にハイブリダイズするが、所定条件 (例えば、高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を含む) 下、ERG1、ERG2、ERG3、ERG4、ERG5、ERG6、ERG7、ERG8、ERG9、EPC2、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物、またはTMPRSS2にはハイブリダイズしない。該プローブの長さは、例えば、ハイブリダイ

40

50

ゼーション条件、および標的配列と該プローブとの同一性(%)に応じて変動することがあり得、したがって、約6、10、20、30、40、50、100、150、200、300、400または500ヌクレオチド長まででありうる。

【0077】

したがって、いくつかの実施形態においては、本開示は、配列番号3のヌクレオチド788-1019のうち少なくとも約15個連続したヌクレオチドを含んでなる単離された核酸を提供し、ここで、該核酸は、高ストリンジェンシーの条件下、配列番号3またはその相補鎖にはハイブリダイズしうるが、ERG1、ERG2、ERG3、ERG4、ERG5、ERG6、ERG7、ERG8、ERG9、EPC2、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物、またはTMPRSS2にはハイブリダイズしない。いくつかの実施形態においては、該核酸は約50ヌクレオチド長までである。他の実施形態においては、該プローブは、6×SSC中、65 で12時間のハイブリダイゼーションおよびそれに続く、0.1×SSC中、50 で45分間の洗浄を含む高ストリンジェンシーの条件下、所望の配列にハイブリダイズできる。

10

【0078】

さらにもう1つの実施形態においては、該プローブは、所定ハイブリダイゼーション条件下、配列番号5(EPC2)、または配列番号5のヌクレオチド127-807、またはそれらの相補鎖にハイブリダイズする。例えば、1つの実施形態においては、該プローブは、高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件下(例えば、6×SSC中、65 で12時間のハイブリダイゼーションおよびそれに続く、0.1×SSC中、50 で45分間の洗浄)、所望の配列にハイブリダイズしうる。該プローブは、配列番号5自体、または配列番号5の少なくとも約15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150もしくは200個連続したヌクレオチドを含む配列番号5の断片、またはそれらに相補的な配列を含みうる。1つの実施形態においては、該断片は配列番号5のヌクレオチド127-807の全部または一部を含む。例えば、該断片は、配列番号5のヌクレオチド127-807、または配列番号5のヌクレオチド127-807のうち少なくとも約15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150もしくは200個連続したヌクレオチドを含む核酸分子を含みうる。いくつかの実施形態においては、該プローブはEPC2には選択的にハイブリダイズするが、所定条件(例えば、高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を含む)下、ERG1、ERG2、ERG3、ERG4、ERG5、ERG6、ERG7、ERG8、ERG9、EPC1、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物、またはTMPRSS2にはハイブリダイズしない。該プローブの長さは、例えば、ハイブリダイゼーション条件、および標的配列と該プローブとの同一性(%)に応じて変動することがあり得、したがって、約6、10、20、30、40、50、100、150、200、300、400または500ヌクレオチド長まででありうる。

20

30

【0079】

したがって、いくつかの実施形態においては、本開示は、配列番号5のヌクレオチド127-807のうち少なくとも約15個連続したヌクレオチドを含んでなる単離された核酸を提供し、ここで、該核酸は、高ストリンジェンシーの条件下、配列番号5またはその相補鎖にはハイブリダイズしうるが、ERG1、ERG2、ERG3、ERG4、ERG5、ERG6、ERG7、ERG8、ERG9、EPC2、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物、またはTMPRSS2にはハイブリダイズしない。いくつかの実施形態においては、該核酸は約50ヌクレオチド長までである。他の実施形態においては、該プローブは、6×SSC中、65 で12時間のハイブリダイゼーションおよびそれに続く、0.1×SSC中、50 で45分間の洗浄を含む高ストリンジェンシーの条件下、所望の配列にハイブリダイズしうる。

40

【0080】

核酸プローブは、場合によっては、固体支持体に固定されうる。

【0081】

他の実施形態においては、該核酸はオリゴヌクレオチドプライマーである。本開示は、多数のオリゴヌクレオチドプライマーおよびプライマーペア(例えば、実施例に記載されているもの)を提供する。いくつかの実施形態においては、オリゴヌクレオチドプライマーペアは第1オリゴヌクレオチドプライマーおよび第2オリゴヌクレオチドプライマーを含

50

み、ここで、第1オリゴヌクレオチドプライマーは、配列番号1における第1配列にハイブリダイズする配列を含有し、第2オリゴヌクレオチドプライマーは、配列番号1に相補的な核酸鎖における第2配列にハイブリダイズする配列を含有し、ここで、第1配列は第2配列と重複していない。第1および第2オリゴヌクレオチドプライマーは、ERG8における関心のある標的配列を増幅しうる。したがって、いくつかの実施形態においては、該プライマーペアは、配列番号1のヌクレオチド75-1168の全部もしくは一部または配列番号1のヌクレオチド801-1168の全部もしくは一部を含む標的配列を増幅する。他の実施形態においては、標的配列は、配列番号1のヌクレオチド75-1168または配列番号1のヌクレオチド801-1168内の核酸分子を含む。いくつかの実施形態においては、該プライマーペアは、ERG8アイソフォームには選択的にハイブリダイズするが所定条件（例えば、高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件、例えば、6×SSC中、65 で12時間のハイブリダイゼーションおよびそれに続く、0.1×SSC中、50 で45分間の洗浄）下でERG1、ERG2、ERG3、ERG4、ERG5、ERG6、ERG7、ERG9、EPC1、EPC2、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物またはTMPRSS2にはハイブリダイズしない標的配列を増幅する。

10

【0082】

さらに他の実施形態においては、オリゴヌクレオチドプライマーペアは第1オリゴヌクレオチドプライマーおよび第2オリゴヌクレオチドプライマーを含み、ここで、第1オリゴヌクレオチドプライマーは、配列番号3における第1配列にハイブリダイズする配列を含有し、第2オリゴヌクレオチドプライマーは、配列番号3に相補的な核酸鎖における第2配列にハイブリダイズする配列を含有し、ここで、第1配列は第2配列と重複していない。第1および第2オリゴヌクレオチドプライマーは、EPC1における関心のある標的配列を増幅しうる。したがって、いくつかの実施形態においては、該プライマーペアは、配列番号3のヌクレオチド61-1019の全部もしくは一部または配列番号3のヌクレオチド788-1019の全部もしくは一部を含む標的配列を増幅する。他の実施形態においては、標的配列は、配列番号3のヌクレオチド61-1019または配列番号3のヌクレオチド788-1019内の核酸分子を含む。いくつかの実施形態においては、該プライマーペアは、EPC1アイソフォームには選択的にハイブリダイズするが所定条件（例えば、高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件、例えば、6×SSC中、65 で12時間のハイブリダイゼーションおよびそれに続く、0.1×SSC中、50 で45分間の洗浄）下でERG1、ERG2、ERG3、ERG4、ERG5、ERG6、ERG7、ERG8、ERG9、EPC2、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物またはTMPRSS2にはハイブリダイズしない標的配列を増幅する。

20

30

【0083】

さらに他の実施形態においては、オリゴヌクレオチドプライマーペアは第1オリゴヌクレオチドプライマーおよび第2オリゴヌクレオチドプライマーを含み、ここで、第1オリゴヌクレオチドプライマーは、配列番号5における第1配列にハイブリダイズする配列を含有し、第2オリゴヌクレオチドプライマーは、配列番号5に相補的な核酸鎖における第2配列にハイブリダイズする配列を含有し、ここで、第1配列は第2配列と重複していない。第1および第2オリゴヌクレオチドプライマーは、EPC2における関心のある標的配列を増幅しうる。したがって、いくつかの実施形態においては、該プライマーペアは、配列番号5の全部もしくは一部または配列番号5のヌクレオチド127-807の全部もしくは一部を含む標的配列を増幅する。他の実施形態においては、標的配列は、配列番号5内の核酸分子または配列番号5のヌクレオチド127-807を含む。いくつかの実施形態においては、該プライマーペアは、EPC2アイソフォームには選択的にハイブリダイズするが所定条件（例えば、高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件、例えば、6×SSC中、65 で12時間のハイブリダイゼーションおよびそれに続く、0.1×SSC中、50 で45分間の洗浄）下でERG1、ERG2、ERG3、ERG4、ERG5、ERG6、ERG7、ERG8、ERG9、EPC1、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物またはTMPRSS2にはハイブリダイズしない標的配列を増幅する。

40

【0084】

該オリゴヌクレオチドプライマーおよびプライマーペアはキット形態で提供されうる。いくつかの実施形態においては、該キットは、ERG8における関心のある標的配列を増幅し

50

うるオリゴヌクレオチドプライマーのペア（例えば、本開示に記載されているもの）、EPC1における関心のある標的配列を増幅しうるオリゴヌクレオチドプライマーのペア（例えば、本開示に記載されているもの）、および/またはEPC2における関心のある標的配列を増幅しうるオリゴヌクレオチドプライマーのペア（例えば、本開示に記載されているもの）を含む。この及び他の実施形態においては、該オリゴヌクレオチドプライマーが全て、異なる配列を有する必要はない。例えば、ERG8にユニークなヌクレオチド配列またはその相補鎖にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマー、EPC1にユニークなヌクレオチド配列またはその相補鎖にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマー、EPC2にユニークなヌクレオチド配列またはその相補鎖にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマー、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物にユニークなヌクレオチド配列またはその相補鎖にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマー、およびERG8、EPC1およびEPC2により共有されるヌクレオチド配列またはその相補鎖にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーを選択することにより、ERG8、EPC1、EPC2、または前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物のそれぞれに特異的な標的配列を増幅することが可能である。したがって、僅か4種のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、ERG8、EPC1およびEPC2のそれぞれにおいて標的配列を選択的に増幅することが可能である。例えばERG8およびEPC1、ERG8およびEPC2、EPC1およびEPC2、またはそれらのアイソフォームの1以上と前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物との組合せを増幅するために、他の組合せのプライマーが選択されうる。

10

【0085】

20

本開示はまた、抗ERGアイソフォーム特異的抗体、例えば抗ERG8抗体、抗EPC1抗体または抗EPC2抗体を含む診断キットを記載する。1つの実施形態においては、本開示は、配列番号4のアミノ酸217-220を含むエピトープに結合する抗EPC1抗体を提供する。もう1つの実施形態においては、該抗体は、配列番号6のアミノ酸28-97内のまたはそれを含むエピトープに結合する抗EPC2抗体である。いずれの場合も、該エピトープは直鎖状エピトープまたは立体構造エピトープである。いくつかの実施形態においては、抗体の組合せが該キットに含まれる。例えば、キットは、抗ERG8および抗EPC1抗体、抗ERG8および抗EPC2抗体、抗EPC1および抗EPC2抗体、または抗ERG8、抗EPC1および抗EPC2抗体を含みうる。該抗体は、場合によっては、検出可能な状態で標識される。核酸プローブおよびプライマーに関して記載されているのと同様に、該抗体は診断および予後判定用途に使用される。

30

【0086】

前立腺癌を診断および予後判定するのに使用する核酸、ポリペプチドおよび抗体は、一般に、製薬上許容される担体とともに製剤化される。核酸、ポリペプチドまたは抗体がキットの一部である場合には、所望により、微生物の増殖を軽減または抑制する物質、例えばアジ化ナトリウムが、該製剤中で加えられうる。

【0087】

IV. 治療用組成物および方法

ERGアイソフォーム（例えば、ERG8、EPC1、EPC2、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物、ERG1、ERG2またはERG3）核酸、それらがコードするポリペプチド、およびそれらのポリペプチドに対する抗体は、適当な医薬担体と混合される。得られた医薬組成物は、種々の用途、例えば、既に記載されている診断用途、および治療用途においても使用される。該用途が治療である場合には、該組成物は、該核酸、ポリペプチドまたは抗体の治療的有効量、および製薬上許容される担体または賦形剤を含む。そのような担体には、塩類液（食塩水）、緩衝塩類液、デキストロース、水、グリセロール、エタノールおよびそれらの組合せが含まれるが、これらに限定されるものではない。該製剤は投与方式に適したものであるべきである。

40

【0088】

治療用途においては、ERGアイソフォーム（例えば、ERG8、EPC1、EPC2、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物、ERG1、ERG2またはERG3）核酸、ポリペプチド、不安定化に使用される化合物、小分子インヒビターおよび抗体組成物は、個々の被験体の臨床状態

50

、送達部位、投与方法、投与計画および実施者に公知の他の要因を考慮して、医学実施基準 (good medical practice) に合致した様態で製剤化され投与される。したがって、この場合の目的のためのERGアイソフォーム (例えば、ERG8、EPC1、EPC2、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物、ERG1、ERG2またはERG3) 核酸、ポリペプチド、不安定化に使用される化合物、小分子インヒビターおよび抗体組成物の有効量は、そのような考慮事項により決定される。

【0089】

本開示はまた、記載されている医薬組成物の成分の1以上で満たされた1以上の容器を含む医薬パックまたはキットを提供する。そのような容器には、医薬または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関により定められた形態の通知書が付随しうる。該通知書は、ヒトへの投与に関する、製造、使用または販売の該機関による承認を表すものである。また、ERGアイソフォーム (例えば、ERG8、EPC1、EPC2、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物、ERG1、ERG2またはERG3) 核酸、ポリペプチド、不安定化に使用される化合物、小分子インヒビターおよび抗体組成物は、他の治療用化合物と共に使用されうる。

10

【0090】

該医薬組成物は、簡便な方法で、例えば、経口、局所、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、鼻腔内または皮内経路により投与されうる。該医薬組成物は、具体的な適応症の治療および/または予防に有効な量で投与される。一般に、それらは、少なくとも約10マイクログラム/kg体重の量で投与され、ほとんどの場合、それらは、1日当たり約8ミリグラム/kg体重を超えない量で投与される。

20

【0091】

医薬剤形において、開示されている組成物はそれらの製薬上許容される塩の形態で投与されうる。あるいは、それらはまた、単独で、または他の薬学的に活性な化合物と適切に関連づけて及び組合せて使用されうる。本組成物は、潜在的な投与方式に従い製剤化される。該物質の投与は、経口、バツカル、鼻腔内、直腸、非経口、腹腔内、皮内、経皮、皮下、静脈内、動脈内、心臓内、心室内、頭蓋内、気管内および鞘内投与など、または移植もしくは吸入を含む種々の方法により達成されうる。したがって、本組成物は、固体、半固体、液体または気体形態の製剤、例えば錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、軟膏剤、水剤 (溶液剤)、坐剤、浣腸剤、注射剤、吸入剤およびエアゾール剤に製剤化されうる。本開示に記載されている方法および賦形剤は単なる例示に過ぎず、何ら限定的なものではない。

30

【0092】

経口投与用の組成物は、水剤 (溶液剤)、懸濁剤、錠剤、丸剤、顆粒剤、カプセル剤、徐放製剤、口洗剤または散剤を形成しうる。経口製剤の場合、該物質、ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、単独で、または適当な添加剤、例えば通常の添加剤、例えばラクトース、マンニトール、コーンスターチまたはジャガイモデンプン; 結合剤、例えば結晶性セルロース、セルロース誘導體、アカシア、コーンスターチまたはゼラチン; 崩壊剤、例えばコーンスターチ、ジャガイモデンプンまたはナトリウムカルボキシメチルセルロース; 滑沢剤、例えばタルクまたはステアリン酸マグネシウム; および所望により、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤、保存剤と組合せて使用されうる。

40

【0093】

ERGアイソフォーム (例えば、ERG8、EPC1、EPC2、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物、ERG1、ERG2またはERG3) 核酸、ポリペプチド、不安定化に使用される化合物、小分子インヒビターおよび抗体組成物は、それらを水性または非水性溶媒、例えば植物性または他の同様の油、合成脂肪酸グリセリド、高級脂肪酸またはプロピレングリコールのエステルに、所望により、通常の添加物、例えば可溶化剤、等張化剤、懸濁化剤、乳化剤、安定化剤および保存剤と共に溶解、懸濁または乳化することにより、注射用製剤に製剤化されうる。当技術分野で通常の、経口または非経口送達用の他の製剤も使用されうる。

【0094】

50

また、ERGアイソフォーム（例えば、ERG8、EPC1、EPC2、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物、ERG1、ERG2またはERG3）核酸、ポリペプチド、不安定化に使用される化合物、小分子インヒビターおよび抗体組成物は、他の経路、例えばウイルス感染、マイクロインジェクションまたは小胞融合により、組織または宿主細胞内に導入されうる。例えば、本明細書に記載されているとおり、細胞内に核酸組成物を導入するために、発現ベクターが使用されうる。さらに、筋肉内投与のために、ジェット・インジェクション（jet injection）が用いられうる（Furthら, Anal. Biochem. 205:365-368 (1992)）。該DNAは金微粒子上に被覆され、粒子射入装置、または文献に記載されている「遺伝子銃」（Tangら, Nature 356:152-154 (1992)）により皮内送達されることが可能であり、この場合、金微小発射体が該DNAで被覆され、ついで皮膚細胞内に射入される。

10

【0095】

いくつかの実施形態においては、遺伝子治療により、ERG機能を促進するために、ERGアイソフォーム（例えば、ERG8、EPC1、EPC2、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物、ERG1、ERG2またはERG3）タンパク質またはその機能的誘導体をコードする配列を含む核酸を投与する。あるいは、ERGの発現または機能に拮抗させるために、ERG8、EPC1、EPC2、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物、ERG1、ERG2またはERG3配列のsiRNA、shRNAまたはアンチセンスを含む核酸を投与する。当技術分野で利用可能な遺伝子治療の任意の方法が用いられうる。具体的なプロトコールに関しては、Morgan (2001) Gene Therapy Protocols, 2nd ed., Humana Pressを参照されたい。遺伝子治療の方法の総説としては、Goldspielら, (1993) Clinical Pharmacy, 12:488-505; Wuら, (1991) Biotherapy, 3: 87-95; Tolstoshev (1993) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32:573-596; Mulligan (1993) Science, 260:926-932; およびMorganら (1993) Ann. Rev. Biochem., 62:191-217; May (1993) TIBTECH, 11(5):155-215を参照されたい。用いられうる、組換えDNA技術の分野で一般に公知の方法は、Current Protocols in Molecular Biology (2004), Ausubelら編, John Wiley & Sons, NY; およびKriegler (1990) Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NYに記載されている。

20

【0096】

いくつかの実施形態においては、該治療剤は、ERGアイソフォーム、例えばERG8、EPC1、EPC2、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物、ERG1、ERG2もしくはERG3、またはこれらのERGアイソフォームの1以上のアンチセンスを含む。該核酸は、該ERGアイソフォームコード領域またはアンチセンス分子に機能的に連結された例えばプロモーターのような調節配列を有するベクターの一部であり、該プロモーターは誘導性または構成的であり、場合によっては組織特異的である。もう1つの実施形態においては、ERGアイソフォーム（例えば、ERG8、EPC1、EPC2、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物、ERG1、ERG2またはERG3）コード配列および任意の他の所望の配列が、ゲノム内の所望の部位において相同組換えを促進する領域に隣接しており、それによりERGアイソフォームの染色体内発現をもたらす、核酸分子が使用される（Kollerら, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86:8932-8935; Zijlstraら, (1989) Nature, 342:435-438）。

30

【0097】

いくつかの実施形態においては、遺伝子治療の目的のために導入される核酸は、該核酸の発現が転写の適当な誘導因子により制御されうるよう、所望の核酸に機能的に連結された誘導性プロモーターを含む。

40

【0098】

患者内への該核酸の送達は、直接的（この場合、該患者は該核酸または核酸担持ベクターに直接的にさらされる）または間接的（この場合、まず、細胞を該核酸でin vitroで形質転換し、ついで該患者内に移植する）でありうる。これらの2つのアプローチは、それぞれ、in vivoまたはex vivo遺伝子治療として公知である。

【0099】

特定の実施形態においては、核酸がin vivoで直接投与され、この場合、それが発現されて、コード化産物を産生する。これは、当技術分野で公知の多数の方法のいずれかによ

50

り達成されることが可能であり、例えば、適当な核酸発現ベクターの一部としてそれを構築し、それが細胞内物となるよう、それを投与することにより達成されうる。該投与は、例えば、欠損または弱毒化レトロウイルスまたは他のウイルスベクターを使用する感染により（参照により本明細書に組み入れる米国特許第4,980,286号を参照されたい）、あるいは裸DNAの直接注射により、あるいは微粒子射入（例えば、遺伝子銃；Biolistic, DuPont）または脂質もしくは細胞表面受容体での被覆またはトランスフェクト化剤、リポソーム、微粒子もしくはマイクロカプセル内への封入の利用、あるいは核内に進入することが知られているペプチドに連結してそれを投与することにより、あるいは受容体媒介エンドサイトーシスを受けるリガンドに連結してそれを投与することにより（例えば、Wuら, (1987) *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432を参照されたい）行われうる。もう一つの実施形態においては、核酸-リガンド複合体が形成されることが可能であり、この場合、該リガンドは、該核酸がリソソーム分解を回避することが可能となるようエンドソームを破壊する融合誘導性ウイルスペプチドを含む。さらにもう一つの実施形態においては、該核酸は、特異的受容体を標的化することにより、細胞特異的取り込み及び発現のために *in vivo* で標的化されうる（例えば、PCT公開WO 92/06180; WO 92/22635; WO92/20316; WO93/14188; WO 93/20221を参照されたい）。あるいは、該核酸は細胞内に導入され、相同組換えにより、発現のために宿主細胞DNA内に取り込まれうる（Kollerら, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86:8932-8935; Zijlstraら, (1989) *Nature*, 342:435-438）。

【 0 1 0 0 】

いくつかの実施形態においては、ERGアイソフォーム（例えば、ERG8、EPC1、EPC2、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物、ERG1、ERG2またはERG3）核酸またはアンチセンス核酸を含有するウイルスベクターが使用される。例えば、レトロウイルスベクターが使用されうる（Millerら, (1993) *Meth. Enzymol.*, 217:581-599）。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムのパッケージングおよび宿主細胞DNA内への組込みに必要でないレトロウイルス配列を欠失させるために修飾されている。遺伝子治療において使用されるERGアイソフォーム（例えば、ERG8、EPC1、EPC2、前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物、ERG1、ERG2またはERG3）核酸が該ベクター内にクローニングされ、それは患者内への該遺伝子の送達を促進する。レトロウイルスベクターに関する更なる詳細はBoesenら, (1994) *Biotherapy*, 6:291-302において見出されうる。該文献は、造血幹細胞を化学療法に対して、より抵抗性にするために、MDRL遺伝子を造血幹細胞に送達するためのレトロウイルスベクターの使用を記載している。遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの使用を例示している他の参考文献として以下のものが挙げられる：Clowesら, (1994) *J. Clin. Invest.*, 93:644-651; Kiemら, (1994) *Blood*, 83:1467-1473; Salmonsら, (1993) *Hum. Gene Ther.*, 4:129-141; およびGrossmanら, (1993) *Curr. Opin. Gen. Devel.*, 3:110-114。

【 0 1 0 1 】

遺伝子治療において使用されうる他のウイルスベクターには、非分裂細胞に感染しうるアデノウイルスが含まれる。Kozarskyら, *Curr. Opin. Gen. Devel.*, 3:499-503 (1993) は、アデノウイルスに基づく遺伝子治療の総説を記載している。Boutら, *Hum. Gene Ther.*, 5:3-10 (1994) は、アカゲザルの呼吸上皮に遺伝子を導入するための、アデノウイルスベクターの使用を示した。遺伝子治療におけるアデノウイルスの使用の他の例は、Rosenfeldら, *Science*, 252:431-434 (1991); Rosenfeldら, *Cell*, 68:143-155 (1992); およびMastrangeliら, *J. Clin. Invest.*, 91:225-234 (1993)において見出されうる。遺伝子治療における使用に関して、アデノ随伴ウイルス (AAV) も提示されている (Walshら, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 204:289-300 (1993))。

【 0 1 0 2 】

遺伝子治療に対するもう一つのアプローチは、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム媒介トランスフェクションまたはウイルス感染のような方法により、組織培養内の細胞内に遺伝子を導入することを含む。通常、該導入方法は該細胞への選択マーカーの導入を含む。ついで該細胞を、取り込まれており導入遺伝子を発現してい

10

20

30

40

50

る細胞を単離するための選択下に配置する。ついでそれらの細胞を患者に送達する。この実施形態においては、生じる組換え細胞の *in vivo* 投与の前に、細胞内に核酸を導入する。そのような導入は、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、該核酸配列を含有するウイルスまたはバクテリオファージベクターの感染、細胞融合、染色体媒介遺伝子導入、マイクロセル媒介遺伝子導入、スフェロプラスト融合などを含む（これらに限定されるものではない）当技術分野で公知の任意の方法により行われうる。細胞内への外来遺伝子の導入のための多数の技術が当技術分野で公知であり（例えば、Loefflerら, *Meth. Enzymol.*, 217:599-618 (1993); Cohenら, *Meth. Enzymol.*, 217:618-644 (1993); Cline, *Pharmac. Ther.*, 29:69-92 (1985)を参照されたい）、受容細胞の、必要な発生的および生理的機能が破壊されない限り、本発明において用いられ

10

【0103】

前立腺癌特異的転写産物は、癌細胞の発生に直接的または間接的に関与すると考えられるタンパク質産物をコードする。したがって、これらの転写産物を不安定化する方法を用いて、コード化タンパク質産物の発現を軽減または予防し、それにより、該細胞を非癌状態に維持し、または該細胞を非癌表現型に復帰させるために用いられうる。したがって、いくつかの実施形態においては、ERG8、EPC1、EPC2、ERG1、ERG2、ERG3、または前立腺癌特異的プロモーター（例えば、配列番号7またはそれらの断片（例えば、配列番号7の少なくともヌクレオチド521-650を含む断片））から開始される転写産物によりコードされるアイソフォームに対応する核酸を使用して、それらの対応転写産物の産生または翻訳を妨げる。いくつかの場合には、該核酸は該転写産物配列の相補鎖である。これらの場合、該核酸は、例えばERG8、EPC1、EPC2、ERG1、ERG2、ERG3、または前立腺癌特異的プロモーターから開始される転写産物によりコードされるアイソフォームのようなERGアイソフォームをコードする核酸の機能をモジュレーションし、それにより該コード化アイソフォームの発現を改変するため、該核酸は治療用である。

20

【0104】

1以上のERGアイソフォームの機能をモジュレーションする1つの方法は、例えば、該ERGアイソフォームに対するsiRNAまたはshRNAを使用するRNA干渉によるものである。該siRNAは、標的の領域に相補的なヌクレオチド配列を含む約18~25ヌクレオチドの短い二本鎖RNA分子である。それは、例えば発現プラスミドを使用して、標的細胞または組織内に導入されることが可能であり、ここで、それはERGアイソフォーム、例えばERG8、EPC1、EPC2、ERG1、ERG2、ERG3、または前立腺癌特異的プロモーター、例えば配列番号7（またはそれらの断片）から開始される転写産物によりコードされるアイソフォームの翻訳を妨げる。RNA干渉技術は、例えば、公開されている米国特許出願20060058255、20040192626、20040181821および20030148519（それらのそれぞれを参照により本明細書に組み入れることとする）に記載されている公知方法を用いて行われうる。

30

【0105】

1以上のERGアイソフォームをコードする核酸分子の機能をモジュレーションして、産生されるERGアイソフォームの量をモジュレーションするために使用される本開示により提供されるもう1つのクラスの核酸として、アンチセンス化合物が挙げられる。これは、ERGアイソフォームをコードする1以上の核酸にハイブリダイズするアンチセンス化合物を、例えば遺伝子治療技術を用いて細胞に供与することにより達成される。該核酸は、ERGアイソフォーム（例えば、ERG8、EPC1、EPC2、ERG1、ERG2、ERG3、または前立腺癌特異的プロモーター、例えば配列番号7から開始される転写産物によりコードされるアイソフォーム）をコードするDNA、そのようなDNAから転写されるRNA（プレmRNAおよびmRNAを含む）であることが可能であり、また、そのようなRNAに由来するcDNAでありうる。アンチセンス化合物の、その標的核酸へのハイブリダイゼーションは、該核酸の正常な機能を妨げる

40

50

。このような干渉は、該DNAの複製または転写、タンパク質翻訳の部位への該RNAのトランスロケーション、該RNAからのタンパク質の翻訳、1以上のmRNA種を与える該RNAのスプライシング、または該RNAが関わりうる若しくは促進しうる触媒活性のレベルで作用しうる。標的核酸機能に対するそのような干渉の全体的な効果は、ERGアイソフォーム、例えばERG8、EPC1、EPC2、ERG1、ERG2、ERG3、または前立腺癌特異的プロモーター、例えば配列番号7（またはその断片、例えば、配列番号7の少なくともヌクレオチド521-650を含む断片）から開始される転写産物によりコードされるアイソフォームの発現のモジュレーションである。

【0106】

アンチセンスオリゴヌクレオチドはアンチセンス化合物の一形態である。これらは、しばしば、約8～約30核酸塩基（すなわち、約8～約30個の連結ヌクレオシド）を含む。いくつかの場合には、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、約12～約25、約15～約22、または約18～約20核酸塩基を含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、修飾されたバックボーンまたは非天然ヌクレオシド間結合をも含む。ヌクレオシド間バックボーン内にリン原子を有しない修飾オリゴヌクレオチドもオリゴヌクレオチドとみなされる。修飾オリゴヌクレオチドバックボーン的具体例には、例えば、ホスホロチオアート、キラルホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチルおよび他のアルキルホスホナート、例えば3'-アルキレンホスホナートおよびキラルホスホンジット、ホスフィナート、ホスホルアミダート、例えば3'-アミノホスピリオルアミダートおよびアミノアルキルホスホルアミダート、チオノホスホイアミダート、チオノアルキルホスホナート、チオノアルキルホスホトリエステル、ボラノホスファート（通常の3'-5'結合を有するもの）、これらの2'-5'結合類似体、ならびにヌクレオシド単位の隣接ペアが3'-5'から5'-3'へまたは2'-5'から5'-2'へ結合している逆の方向性、およびモルホリノ結合により形成されたバックボーンを有するものが含まれる。

【0107】

ペプチド核酸（PNA）化合物もアンチセンス化合物である。しかし、PNA化合物においては、オリゴヌクレオチドの糖-バックボーンがアミノエチルグリシンバックボーンで置換されている。核酸塩基は保持され、該バックボーンのアミド部分のアザ窒素原子に直接的または間接的に結合している。

【0108】

アンチセンス化合物、それらの製造方法および核酸機能を妨げるためのそれらの使用は当技術分野でよく知られている。例えば、米国特許第6,054,316号（これを参照により本明細書に組み入れる）は、Ets-2をコードする核酸に対するアンチセンス化合物の製造、およびこれらのアンチセンス化合物の使用方法を記載している。これらの同じ方法が、ERGアイソフォーム、例えばERG8、EPC1、EPC2、ERG1、ERG2、ERG3もしくは前立腺癌特異的プロモーター、例えば配列番号7（またはその断片、例えば、配列番号7の少なくともヌクレオチド521-650を含む断片）から開始される転写産物によりコードされるアイソフォームをコードする核酸に対するアンチセンス化合物の製造に適用されうる。

【0109】

ERGアイソフォーム（例えば、ERG8、EPC1、EPC2、ERG1、ERG2、ERG3または前立腺癌特異的プロモーター、例えば配列番号7から開始される転写産物によりコードされるアイソフォーム）の発現の抑制に関連した治療用途に加えて、アンチセンス化合物は、診断および予後判定方法においても有用でありうる。なぜなら、これらの化合物は、ERGアイソフォームをコードする核酸にハイブリダイズし、当技術分野で認識されている技術（例えば、該アンチセンス化合物への酵素の結合、該アンチセンス化合物の放射標識、または任意の他の適当な検出方法）を用いて検出されうるからである。該アンチセンス化合物と、サンプル中のそれを検出するための手段とを含むキットも、全般的にオリゴヌクレオチドプローブを含むキットに関して記載されているとおりに製造されうる。

【0110】

ERGアイソフォーム発現のアンチセンスモジュレーションは、当技術分野で公知の種々

10

20

30

40

50

の方法によりアッセイされうる。例えば、mRNAレベルは、例えばノーザンブロット分析、競合ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）またはリアルタイムPCR（RT-PCR）により定量されうる。RNA分析は全細胞RNAまたはポリ(A)+ mRNA上で行われうる。その代わりにまたはそれに加えて、当技術分野でよく知られた種々の方法、例えば免疫沈降、ウエスタンブロット分析（免疫ブロット法）、ELISAまたは蛍光活性化細胞分取法（FACS）により、コード化タンパク質のレベルが定量されうる。

【0111】

また、例えば配列番号7に記載されているプロモーター配列のような前立腺癌特異的プロモーターの制御下で発現される細胞毒性遺伝子産物または細胞増殖抑制遺伝子産物を前立腺癌細胞に送達することにより、前立腺癌を殺し、またはその増殖（成長）を遅延させることが可能である。配列番号7に記載されているヌクレオチド配列の末端切断体および変異体も、それらが、機能的に連結されたレポーター遺伝子の、前立腺癌細胞内での発現を支持するのに十分である限り、使用可能である。具体例には、配列番号7の少なくともヌクレオチド521-650、404-650、または138-650を含むプロモーター配列が含まれる。細胞毒性または細胞増殖抑制タンパク質をコードする核酸に機能的に連結された前立腺癌特異的プロモーターを含むベクターを前立腺癌細胞内に導入するために、遺伝子治療が用いられうる。そのような遺伝子治療方法は本明細書に記載されている。しかし、該遺伝子治療ベクターにおいて前立腺癌特異的プロモーターを使用する場合、該遺伝子治療ベクターの細胞範囲に無関係に、該細胞毒性または細胞増殖抑制タンパク質が前立腺癌細胞内でのみ発現されるよう、該プロモーターは前立腺癌細胞内でのみ活性である。

【0112】

前立腺癌特異的プロモーターの制御下に異種遺伝子を配置することにより発現されうる多数の異なる細胞毒性または細胞増殖抑制タンパク質が存在する。そのような遺伝子の具体例には、細菌毒素、例えばジフテリア毒素、シュードモナス毒素、リシン、コレラ毒素およびPE40をコードする遺伝子；腫瘍抑制遺伝子、例えばAPC、CYLD、HIN-1、KRAS2b、p16、p19、p21、p27、p27mt、p53、p57、p73、PTEN、Rb、ウテログロビン（Uteroglobulin）、Skp2、BRCA-1、BRCA-2、CHK2、CDKN2A、DCC、DPC4、MADR2/JV18、MEN1、MEN2、MTS1、NF1、NF2、VHL、WRN、WT1、CFTR、C-CAM、CTS-1、zac1、scFV、MMAC1、FCC、MCC、Gene 26（CACNA2D2）、PL6、Beta⁺（BLU）、Luca-1（HYAL1）、Luca-2（HYAL2）、123F2（RASSF1）、101F6およびGene 21（NPRL2）；アポトーシス誘導タンパク質、例えばCD95、カスパーゼ-3、Bax、Bag-1、CRADD、TSSC3、bax、hid、Bak、MKP-7、PERP、bad、bcl-2、MST1、bbc3、Sax、BIK、BIDおよびmda7をコードする遺伝子；ならびに細胞毒性産物、例えばチミジンキナーゼ（単純ヘルペスまたは水痘・帯状疱疹ウイルス由来）、シトシンデアミナーゼ、ニトロレダクターゼ、シトクロムp-450 2B1、チミジンホスホリラーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、アルカリホスファターゼ、カルボキシペプチダーゼAおよびG2、リナメラーゼ、 α -ラクタマーゼおよびキサンチンオキシダーゼにプロドラッグを変換する薬物代謝酵素をコードする遺伝子が含まれる。

【0113】

したがって、本開示は、配列番号7を含むプロモーター配列、または機能的に連結されたレポーター遺伝子の前立腺癌細胞内発現を支持するのに十分な配列番号7に記載のヌクレオチド配列の断片（例えば、配列番号7の少なくともヌクレオチド521-650を含む配列を含む）に機能的に連結された、細胞毒性または細胞増殖抑制遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを、前立腺癌の治療を要する被験体に投与することを含んでなる、前立腺癌の治療方法を提供する。もう1つの実施形態においては、本開示は、配列番号7を含むプロモーター配列、または機能的に連結されたレポーター遺伝子の前立腺癌細胞内発現を支持するのに十分な配列番号7に記載のヌクレオチド配列の断片（例えば、配列番号7の少なくともヌクレオチド521-650を含む配列を含む）に機能的に連結された、細胞毒性または細胞増殖抑制遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを前立腺癌細胞に投与することを含んでなる、前立腺癌細胞の増殖（成長）を軽減する方法を提供する。いずれの実施形態においても、該細胞毒性または細胞増殖抑制遺伝

子産物は、細菌毒素、腫瘍抑制遺伝子産物、アポトーシス誘導タンパク質、およびプロドラッグを細胞毒性産物に変換する薬物代謝酵素から選ばれる。

【0114】

前立腺癌細胞を殺しまたはその増殖を抑制もしくは遅延させるためのもう1つの方法は、該細胞内のタンパク質の活性をモジュレーションすることによるものである。例えば、ERGアイソフォームによりコードされるタンパク質に結合する抗体が、そのタンパク質の機能を抑制または刺激するために使用されうる。いくつかの実施形態においては、該抗体は、2以上のERGアイソフォームによりコードされるタンパク質内に存在するエピトープに結合する。他の実施形態は、特定のERGアイソフォーム、例えばERG8、EPC1、EPC2、ERG1、ERG2、ERG3、または前立腺癌特異的プロモーター、例えば配列番号7（またはその断片、例えば、配列番号7の少なくともヌクレオチド521-650を含む断片）から開始される転写産物によりコードされるアイソフォームによりコードされるタンパク質に結合する抗体を含む。したがって、1つの実施形態においては、本開示は、配列番号4のアミノ酸残基217-220を含むエピトープに結合する抗体を提供する。もう1つの実施形態においては、該抗体は、配列番号6のアミノ酸28-97内のまたはそれを含むエピトープに結合する。該抗体または抗体の組合せは、本明細書に記載されている遺伝子治療を用いて、細胞内で発現される。もう1つの例においては、該抗体は、配列番号6のアミノ酸28-97内のまたはそれを含むエピトープに結合し、それは、配列番号6よりなるタンパク質にも結合する。

10

【0115】

これらの種々の抗体は、当技術分野で公知の技術を用いて製造されうる。例えば、1以上のERGアイソフォーム（例えば、ERG8、EPC1、EPC2、ERG1、ERG2、ERG3、または前立腺癌特異的プロモーター、例えば配列番号7から開始される転写産物によりコードされるアイソフォーム）によりコードされるタンパク質を免疫原として使用し、ついで所望の特異性および機能特性を有する1以上の抗体を選択することが可能である。そのような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体および抗体フラグメントが含まれるが、これらに限定されるものではない。該抗体は、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ヤギ、ラマ、ヒトまたは他の種に由来するものでありうる。

20

【0116】

分泌タンパク質の1以上のエピトープに対するポリクローナル抗体の製造のためには、当技術分野で公知の種々の方法が用いられうる。ウサギ、マウス、ラット、ヤギ、ラマなどを該天然タンパク質、該タンパク質の合成物または該タンパク質の誘導體（例えば、断片）で免疫化することが可能である。宿主種に応じて、免疫応答を増強するために、種々のアジュバントが使用されうる。アジュバントの具体例には、フロイント（完全および不完全）、無機ゲル、例えば水酸化アルミニウム、界面活性物質、例えばリゾレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノールおよび潜在的に有用なヒトアジュバント、例えばBCG (*bacille Calmette-Guerin*) およびコリネバクテリウム・パルブム (*corynebacterium parvum*) が含まれるが、これらに限定されるものではない。

30

【0117】

モノクローナル抗体の製造のためには、当技術分野で認識されている多数の技術のいずれかが用いられうる。例えば、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術 (Kohlerら, *Nature*, 256:495-97 (1975); および以下のものに記載されているとおり: *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlowら編, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; *Current Protocols in Immunology*, Chpt. 2; Colliganら編, National Institutes of Health, Published by John Wiley & Sons, Inc., 2006) を用いて製造されうる。抗体はまた、組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号）またはファージ提示抗体ライブラリー（例えば、Clacksonら, *Nature*, 352: 624-28 (1991); Marksら, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-97 (1991)）を用いて製造されうる。所望により、当技術分野で公知の方法（例えば、Morrisonら, *Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.*, 81:6851-55 (1994); Neubergerら, *Nature*, 312:604-08 (1984); Takedaら, *Nature*, 314:452-54 (1985)）を用いて、キメラ抗体が製造され

40

50

うる。一本鎖抗体も製造されうる（例えば、米国特許第4,946,778号）。ヒト抗体は、ヒトハイブリドーマを使用して（Coteら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:2026-30 (1983)）、またはEBVウイルスでヒトB細胞を *in vitro* で形質転換することにより（Coleら, (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pp. 77-96）、または1以上のヒト免疫グロブリン遺伝子に関してトランスジェニックである動物からハイブリドーマを調製することにより（例えば、米国特許第5,939,598号）製造されうる。モノクローナル抗体は、そのコードDNA配列を使用して容易に発現されることが可能であり、遺伝子治療方法を含むそのような発現のための方法は当技術分野でよく知られている。

【0118】

公知技術を用いて、抗体フラグメントも作製されうる。フラグメントには、抗体分子のペプシン消化により産生されるF(ab')₂フラグメント、F(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋を還元することにより作製されうるFab'フラグメント、抗体分子をパインおよび還元剤で処理することにより作製されうるFabフラグメント、および一本鎖Fv (scFv) フラグメントを含むFvフラグメントが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0119】

例えばハイブリドーマ技術による抗体の製造の後、所望の抗体のスクリーニングを、当技術分野で公知の技術、例えばELISAにより達成することが可能であり、それは通常の技術（例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, Harlowら編, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Current Protocols in Immunology, Chpt. 2; Colliganら編, National Institutes of Health, Published by John Wiley & Sons, Inc., 2006）を用いて行うに過ぎない。したがって、直鎖状エピトープまたは立体構造エピトープに結合する抗体が選択されうる。また、抗体は、大きなタンパク質のポリペプチドフラグメントおよび無傷（例えば、完全長または野生型）タンパク質の両方への結合の特性に関して選択されうる。

【0120】

ERGアイソフォーム（例えば、ERG8、EPC1、EPC2、ERG1、ERG2、ERG3、または前立腺癌特異的プロモーター、例えば配列番号7から開始される転写産物によりコードされるアイソフォーム）によりコードされるタンパク質に対する抗体を製造することが必要な場合には、標準的な技術を用いて該タンパク質、その断片または他の誘導体が製造されうる。タンパク質を発現させるために核酸を操作する方法は当技術分野でよく知られており、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd Ed., Sambrook, FritschおよびManiatis, Cold Spring Harbor) およびCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubel, Brent, Kingston, More, Feidman, SmithおよびStuhl編, Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY, N.Y., 1992)に記載されている方法を包含する。

【0121】

一般に、ERGアイソフォーム（例えば、ERG8、EPC1、EPC2、ERG1、ERG2、ERG3、または前立腺癌特異的プロモーター、例えば配列番号7から開始される転写産物によりコードされるアイソフォーム）によりコードされるタンパク質を発現させるためには、公知調節配列の制御下でそのタンパク質をコードするDNA配列で適当な細胞系を形質転換する。形質転換された宿主細胞を培養し、該タンパク質を回収し、培地から単離する。単離された発現タンパク質は、それと共に産生される他のタンパク質および他の混入物を実質的に含有しない。適当な細胞または細胞系は、哺乳類細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、サル腎COS-1細胞系または哺乳類CV-1細胞でありうる。適当な哺乳類宿主細胞の選択、ならびに形質転換、培養、増幅、スクリーニング、産物製造および精製のための方法は、当技術分野で公知である（例えば、GethingおよびSambrook, Nature, 293:620-625 (1981); Kaufmanら, Mol Cell Biol., 5(7):1750-1759 (1985); Howleyら, 米国特許第4,419,446号を参照されたい）。

【0122】

分泌タンパク質の発現のための適当な宿主として、細菌細胞も使用されうる。例えば、大腸菌（*E. coli*）（例えば、HB101、MC1061）の種々の株がバイオテクノロジーの分野に

10

20

30

40

50

おける宿主細胞としてよく知られている。B. subtilis、Pseudomonas、他の桿菌などの種々の株も使用されうる。細菌細胞内でのタンパク質の発現のためには、該プロペプチドをコードするDNAは一般には必要でない。

【0123】

当業者に公知の酵母細胞の多数の株も、分泌タンパク質生物マーカーの発現のための宿主細胞として利用可能でありうる。また、所望により、本発明の方法における宿主細胞として、昆虫細胞が使用されうる。例えば、Millerら、Genetic Engineering, 8:277-298 (Plenum Press 1986)を参照されたい。

【0124】

いくつかの実施形態においては、ERGアイソフォーム（例えば、ERG8、EPC1、EPC2、ERG1、ERG2、ERG3、または前立腺癌特異的プロモーター、例えば配列番号7から開始される転写産物によりコードされるアイソフォーム）によりコードされるタンパク質は、該タンパク質をコードする完全長DNA配列と適当な発現制御配列とを含有するベクターを使用して発現される。そのようなベクターのための発現制御配列は当業者に公知であり、宿主細胞に応じて選択されうる。そのような選択は常套的なものである。他の実施形態においては、該分泌タンパク質生物マーカーは、該生物マーカーのタンパク質配列と、例えば生じる融合タンパク質を安定化するためのまたは該分泌タンパク質生物マーカーの精製を単純化するためのタグを含む融合タンパク質として発現される。そのようなタグは当技術分野で公知である。代表例には、一連のヒスチジン残基、エピトープタグFLAG、単純ヘルペス糖タンパク質D、ベータ-ガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク質、ストレプトアビジンタグまたはグルタチオンS-トランスフェラーゼをコードする配列が含まれる。

【0125】

したがって、いくつかの実施形態においては、ERG8、EPC1、EPC2、ERG1、ERG2、ERG3、または前立腺癌特異的プロモーター、例えば配列番号7から開始される転写産物によりコードされるアイソフォームのタンパク質発現は、完全にin vitro法によるものである。もちろん、既に記載されているとおり、他の実施形態においては、該タンパク質発現はin vivoで生じさせることが望ましい。

【0126】

本発明の更なる目的および利点は、ある程度は後記の説明において記載され、ある程度は該説明から理解され、あるいは本発明の実施により認識されうる。本発明の目的および利点は、添付の特許請求の範囲において特に示されている要素および組合せにより認識され達成されるであろう。さらに、本明細書の本文に記載されている利点は、特許請求の範囲に含まれていない場合であっても、それ自体が、特許請求されている本発明を限定するものではない。

【0127】

前記の全般的な説明および後記の詳細な説明は共に、例示的で解説的なものであるに過ぎず、特許請求されている本発明を限定するものではないと理解されるべきである。さらに、本発明は、記載されている個々の実施形態に限定されるものではなく、したがって勿論、様々に変更されうると理解されなければならない。さらに、個々の実施形態を説明するために用いられている用語は限定的ではないと意図される。なぜなら、本発明の範囲は、その特許請求の範囲のみにより限定されるからである。特許請求の範囲は公共財産における実施形態を含まない。

【0128】

値の範囲に関しては、文脈と明らかに矛盾しない限り、本発明は、下限の単位の少なくとも10分の1までの、該範囲の上限と下限との間のそれぞれの中間的な値を含む。さらに、本発明は、任意の他の示されている中間的な値を含む。さらに、本発明は、示されている範囲から特に除外されていない限り、該範囲の上限および下限の一方または両方を除外した範囲をも含む。

【0129】

特に示されていない限り、本明細書中で用いられている全ての科学技術用語は、本発明

10

20

30

40

50

が属する技術分野の当業者により一般に理解されているものである。また、本発明を実施または試験するために、本明細書に記載されているものと類似または同等の任意の方法および材料が用いられうる、と当業者は理解するであろう。さらに、本明細書に挙げられている全ての刊行物の全体を参照により本明細書に組み入れることとする。

【0130】

本明細書および添付の特許請求の範囲において用いられる単数表現は、文脈と明らかに矛盾しない限り、複数指示物を含むことに留意しなければならない。したがって、例えば、「本ポリペプチド」に対する言及は複数のそのようなポリペプチドを含み、「物質」に対する言及は、当業者に公知の1以上の物質およびその均等物に対する言及を含む。

【0131】

さらに、本明細書および特許請求の範囲において用いられている、成分、反応条件、純度(%)、ポリペプチドおよびポリヌクレオチド長などの量を表す全ての数字は、特に示さない限り、「約」なる語により修飾される。したがって、本明細書および特許請求の範囲に記載されている数的パラメーターは、本発明の所望の特性に応じて変動しうる近似値である。少なくとも、そして、特許請求の範囲に対する均等論の適用の限定を意図したものではないが、各数的パラメーターは、少なくとも、通常の丸めの技術を適用して、報告されている有効数字の数を考慮して解釈されるべきである。それにもかかわらず、具体的な実施例に記載されている数値は、可能な限り厳密に報告されている。しかし、いずれの数値も、本来、その実験測定 of 標準偏差からの或る誤差を含む。

【0132】

本明細書は、本明細書中に引用されている参考文献を参照することにより、十分に理解される。これらの参考文献のそれぞれの全体を参照により本明細書に組み入れることとする。

【実施例】

【0133】

V. 前立腺癌組織および細胞系におけるERGアイソフォームの発現
実施例1: ERG8は前立腺癌組織において選択的に発現される

ERG1は、悪性前立腺組織において最も一般的に過剰発現される原癌遺伝子である(Petrovicsら, (2005) Oncogene 24: 3847-52)。この過剰発現はTMPRSS2遺伝子と該ERG遺伝子との融合によるものである可能性がある(Tomlinsら, (2005) Science 310: 644-48)。選択的スプライシングは複数のERGアイソフォームを生成する(Owczarekら, (2004) Gene 324: 65-77)。したがって、ERGの他のアイソフォームも過剰発現され、あるいは選択的に発現されることが起こり得る。

【0134】

初期実験において、本発明者らは、レーザー顕微解剖(LCM)された前立腺腫瘍細胞から得られたcDNAにおいてERG8アイソフォームを検出することを試みた。TMPRSS2遺伝子のエキソン1のゲノム配列由来(プライマー-p2178: 5'-TAGGCGCGAGCTAAGCAGGAG-3'-配列番号8)およびERGコード配列由来(プライマー-p2220: 5'-CCAGGATGCCTTCTTTGCCCATC-3'-配列番号9)のプライマーペアを使用して、該cDNAを増幅した。前立腺癌においては、TMPRSS2遺伝子は、しばしば、ERG遺伝子と融合している。p2718プライマーは配列番号1のヌクレオチド1-21に対応し、p2220は配列番号1のヌクレオチド1042-1062の逆相補鎖に対応する。このプライマーペアはPCR産物を与えた。配列決定により、それがERG8であることを確認した。

【0135】

ついで、本発明者らは、正常前立腺細胞と前立腺癌由来細胞系VCaPにおけるERG1、ERG2、ERG3およびERG8アイソフォームの発現比の、より徹底した検査を行った。11人の正常前立腺および前立腺癌由来VCaP細胞から、それぞれ、mRNAを単離した。該mRNAをcDNAに変換した後、半定量的マルチプレックスPCR法においてアイソフォーム特異的PCR産物のその強度を比較することにより、ERGアイソフォーム比を評価した。図1は該マルチプレックスPCR分析の結果を示す。該PCRに使用したERGプライマーは以下のとおりであった:p2192(エ

10

20

30

40

50

キソン9): 5'-ACCGTTGGGATGAACTACGGCA-3' (配列番号10, これは配列番号1のヌクレオチド352-373に対応する); p2220: (ERG8特異的): 5'-CCAGGATGCCTTCTTTGCCCATC-3' (配列番号11, これは配列番号1のヌクレオチド1042-1064の逆相補鎖に対応する); p2207: (エキソン16): 5'-CCCTCCCAAGAGTCTTTGGATCTC-3' (配列番号12); p2197: (エキソン15): 5'-CCTGGATTGCAAGCGGCTACT-3' (配列番号13); およびp2198: (エキソン11): 5'-CTCTCCACGGTTAATGCATGCTAG-3' (配列番号14, これは配列番号1のヌクレオチド699-722に対応する)。

【0136】

ERG8が存在する場合には、プライマーペアp2192-p2220は713bpのPCR産物を与える。プライマー-p2192およびp2207の組合せは、ERGアイソフォーム1、2および3に相当する約1300bpの産物群を増幅する。p2192 (エキソン9) がプライマー-p2197 (エキソン15) とペアになっている場合には、そのプライマーの組合せはERGアイソフォーム1、2および3のうち1以上を増幅する。また、プライマーペアp2198-p2220はERG8アイソフォームに特異的であり、ERG8が存在する場合には、このプライマーペアは366bpのPCR産物を増幅する。p2198 (エキソン11) とp2207 (エキソン16) との組合せは、ERGアイソフォーム1、2および3を検出する959bpの産物を与え、一方、p2198-p2197の組合せは279bp (アイソフォーム3) および207bp (アイソフォーム1および2) の産物を与える。

10

【0137】

図1においては、正常前立腺サンプルが「NP」と表示されており、一方、VCaP細胞を使用したサンプルは「VC」と表示されている。ERG8は、VCaP細胞において検出される優勢なアイソフォームである (図1、右側の写真、上側の矢印)。それは正常前立腺においてもERG1およびERG2より高いレベルで存在するが、正常前立腺におけるそのレベルはERG3のレベルと同等である。

20

【0138】

本発明者らはまた、14人の前立腺癌患者の、レーザー顕微解剖 (LCM) した、腫瘍および良性上皮細胞から抽出されたRNA試料におけるERG8転写産物の発現をアッセイした。ERG8アイソフォームを特異的に認識するプライマー (p2198-p2220) を、同じRT-PCR反応チューブ中で内部対照としてのGAPDHプライマーと共に使用した。図2は、該患者のうち8人に関するデータと共に、PCRゲルの写真を示す。腫瘍細胞サンプルは「T」と表示されており、一方、各患者からの良性上皮細胞サンプルは「N」と表示されている。試験した14人の前立腺癌患者のうち11人の腫瘍細胞サンプルにおいて、ERG8の発現が検出された。このコホートのいずれの患者の良性細胞においても、ERG8発現は検出されなかった。すなわち、ERG8アイソフォームの検出は、癌表現型を有する細胞の存在を示す。図2において、上皮細胞のみを含む正常サンプルにおいては、ERG8のレベルは検出限界より低い。したがって、図1と図2とのERG8検出の間の相違は、図1の分析に使用したプールされた前立腺組織に含まれるその他の細胞型 (例えば、ストロマおよび内皮細胞) の存在により説明されうる。

30

【0139】

興味深いことに、ERG8転写産物 (配列番号1) はTMPRSS2とERG8との融合体である。しかし、そのオープンリーディングフレームは、完全にERG8配列 (配列番号1のヌクレオチド75-1168) によりコードされている。したがって、コード化タンパク質 (配列番号2) はTMPRSS2からのいかなるアミノ酸配列をも含有しない。

40

【0140】

癌細胞は、細胞増殖促進遺伝子を活性化し細胞増殖の抑制遺伝子をサイレンシングすることにより、増殖優位性を獲得する。これらの細胞成長または増殖の経路内の特定の遺伝子は、天然転写産物の機能に拮抗作用する選択的転写産物を産生しうる。ERG8の場合、そのコード化タンパク質産物は、例えばERG1およびERG2のDNA結合ドメインを欠くが、それはタンパク質-タンパク質相互作用ドメイン全体を保持する。したがって、前立腺癌の場合のERG8の過剰発現は、ERG1およびERG2のタンパク質相互作用相手の機能的無効化を引き起こして、ドミナントネガティブ効果をもたらす可能性がある。また、ERG8は発癌性「機能獲得」アイソフォームに相当するであろう。

50

【0141】

前立腺癌細胞においてERG8が選択的に発現されるという知見は、治療のための有力な選択肢をもたらす。なぜなら、この発癌性ERG8産物は、その独特の3'配列を通じた選択的標的化により抑制されうるからである。癌治療のためのこの選択的標的化は、siRNAを使用して、またはshRNAを使用して、またはERG8特異的配列を標的化しうる、核酸に基づく他の産物を使用して達成されうる。タンパク質レベルでは、ERG8により産生されるタンパク質の活性を抑制するために、またはそのタンパク質を分解へと導くために、抗体および小分子抑制性ペプチドのような治療用物質が使用されうる。さらに、ERG8は、前立腺試料における正常上皮細胞から腫瘍細胞を分化させうる。したがって、例えば増幅プライマーまたはハイブリダイゼーションに基づく方法を用いるERG8の検出も、前立腺癌を診断および予後判定するために用いられうる。

10

【0142】

実施例2：EPC1およびEPC2は、前立腺癌組織において選択的に発現される新規に同定された転写産物である

腫瘍特異的ERG転写産物を同定するために、本発明者らは6人の患者からの前立腺腫瘍組織サンプルをプールし、全RNAを抽出した。ついでポリアデニル化RNA(mRNA)を単離し、cDNAに変換し、ラムダZap発現系(Stratagene)内にパッケージングして、バクテリオファージライブラリーを得た。放射標識されたERG2プローブのハイブリダイゼーションにより、ファージプラークをスクリーニングした。ERG2配列は、すべての他のERGアイソフォームにより用いられるエクソンを含む。したがって、それは一般的ERGプローブとして使用されうる。ハイブリダイゼーション溶液1ml当たり 1×10^6 cpmの ^{32}P 放射標識ヒトERG2 cDNAを使用して、65℃で一晩、ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、メンブレンを、0.1% SDSを添加した $2 \times \text{SSC}$ 、ついで、0.1% SDSを添加した $0.2 \times \text{SSC}$ で65℃で順次洗浄した。配列決定のためにDNAを単離する前に、ハイブリダイゼーション陽性クローンを更に2ラウンドのプラークスクリーニングに付して、単プラークを得た。

20

【0143】

2個のクローンが新規ERGアイソフォーム転写産物を与えた。各クローンはユニーク(特有)な3'配列を有する。これらのERG転写産物は前立腺癌組織において観察されているに過ぎないため、本発明者らは、これらのクローンを、ERG Prostate Cancer-Specific Isoform 1および2(ERG前立腺癌特異的アイソフォーム1および2)にちなんで、「EPC1」および「EPC2」と命名した。

30

【0144】

EPC1クローンの核酸配列を配列番号1に記載する。この転写産物も、ERGとTMPRSS2のエキソンの間の融合体である。該TMPRSS2由来配列は開始メチオニン(配列番号3の140-142のATG)の上流の5'末端に見出される。EPC1アミノ酸配列(配列番号4)の最後の4個のカルボキシ末端アミノ酸はいずれのERGエキソンにおいても見出されず、それらはERGイントロン配列に由来するものと思われる。EPC1のユニークな3'末端は配列番号3のヌクレオチド788-1019に対応し、それは、試料および生体液中の癌細胞または前癌細胞の検出のための、核酸検出方法(例えば、増幅およびハイブリダイゼーションに基づく)およびタンパク質検出方法(例えば、抗体に基づく)の両方において使用されうる。

40

【0145】

EPC2クローンの核酸配列を配列番号5に記載する。EPC2のアミノ酸配列を配列番号6に記載する。ユニークな3'配列は配列番号5のヌクレオチド127-807に対応する。5'末端はERGエキソン10内の配列に対応し、該配列は、スプライシング無しで、隣接する3'エキソンへと続くようであり、ユニークな転写産物配列を与える。

【0146】

つぎに、RT-PCRを用いて、14人の前立腺癌患者のレーザー顕微解剖(LCM)した腫瘍および良性上皮細胞から抽出されたRNA試料におけるEPC1転写産物の発現を調べた。EPC1アイソフォームを特異的に認識するプライマー(p2301-p2302)を選択し、同じ反応チュー

50

ブ中で内部対照としてのGAPDHプライマー (p2135-p2144) と共にそれらを使用した。EPC1プライマー配列は以下のとおりであった: p2302: 5'-CAGAAAGCAGCCTTCCCTTA-3' (配列番号15, これは、配列番号3のヌクレオチド820-839に対応する); およびp2301: 5'-TTGATAA TAGAGCATCAGACTTCCA-3 (配列番号16, これは配列番号3のヌクレオチド953-977の逆相補鎖に対応する)。

【0147】

図3は、それらの14人の患者のうちの5人のデータと共に、PCRゲルの写真を示す。腫瘍細胞サンプルは「T」と表示されており、一方、各患者の良性上皮細胞サンプルは「N」と表示されている。対照遺伝子GAPDHと共に、EPC1発現を測定した。試験した14人の前立腺癌患者のうちの11人の腫瘍細胞においてEPC1発現が検出された。7人の患者においては、彼らの前立腺腫瘍細胞においてのみEPC1発現が検出可能であったが、4人の患者においては、彼らの腫瘍細胞および良性上皮細胞の両方においてEPC1発現が検出可能であった。腫瘍細胞および良性上皮細胞の両方においてEPC1が検出された場合、EPC1発現は、良性上皮細胞と比較して腫瘍細胞において高かった。

【0148】

EPC1およびEPC2は、癌性前立腺において特有に発現されるERGアイソフォームである。転写産物レベルでは、各転写産物の3'末端がユニーク(特有)であり、すべての公知ERGアイソフォームと異なる。EPC1および/またはEPC2 mRNAを(例えば、siRNAまたはshRNAを使用して)分解すること、あるいはそれぞれの特有のC末端領域に対して産生された抗体を使用してEPC1および/またはEPC2タンパク質を抑制することは、治療上有益でありうる。

【0149】

実施例3: ERG8およびEPC1アイソフォームは豊富に発現される

ERG8およびEPC1アイソフォームの相対存在量をERG1のそれと比較するために、前立腺癌由来VCaP細胞から、および前立腺癌患者由来の顕微解剖した腫瘍細胞からサンプルを調製した。ついで、EPC1、ERG8に対し、およびERG1とERG2との間で共通の配列に対し特異的なプライマーペアを使用して、そのコピー数を決定するために定量的PCRを用いた。種々のプライマーの位置およびERGアイソフォームのドメイン構造を図4Aに示す。この概要図においては、「TM」はTMPRSS2を示し、8~16の番号が付けられた枠はエキソンに対応し、その番号はOwczarekら、(2004) Gene 324: 65-77に従ったものである。ERG8特異的プライマーおよびプローブは以下のとおりであった:

ERG8フォワードプライマー: TTCAGAAAGACAGATGGGCAAA (配列番号17);

ERG8リバースプライマー: GTTCAAAAGTCGGCCTATTCTCTAA (配列番号18);

ERG8プローブ: AAGGCATCCTGGATGCCTGGCA (配列番号19);

EPC1フォワードプライマー: GCACTTCTGCCAAGCATATGAGT (配列番号20);

EPC1リバースプライマー: CGCTGATCATTTC AACACCCT (配列番号21);

EPC1プローブ: TGCCTTGAAGATCAAAGTCAAAGAGAAATGGA (配列番号22);

ERG1/2 Ex 11-13フォワードプライマー: TTCAGATGATGTTGATAAAGCCTTACA (配列番号23);

ERG1/2 Ex11-13リバースプライマー: TCCAGGCTGATCTCCTGGG (配列番号24);

ERG1/2 Ex 11-13プローブ: ATGCATGCTAGAAACACAGATTTACCAT (配列番号25)。

【0150】

図4Aに示す特異的プライマーおよびプローブを使用するTaqMan QRT-PCRにより、VCaP細胞において、種々のERGアイソフォームのコピー数を決定した。その結果を図4Bに示す。標的遺伝子(種々のERGアイソフォーム)インサートを含むプラスミド構築物を使用して、希釈系列におけるプラスミドのコピー数が判明している標準希釈系列を作製した。Ct値を標的遺伝子コピー数と相関させるために、標準曲線から式を導き出した。この式および標準曲線を用いて、サンプル中の標的遺伝子のコピー数を計算した。

【0151】

図4Bに示すとおり、VCaP細胞において、ERG8およびEPC1の両方のコピー数はERG1とERG2との組合せのコピー数より2倍以上多い。また、10人の前立腺癌患者のうちの9人の顕微解

10

20

30

40

50

剖腫瘍細胞は、ERG1とERG2との組合せより高いERG8コピー数を示した(図4C)。これらのデータは、ERG8およびEPC1アイソフォームが豊富に発現され、したがって、診断および予後判定用途における標的となりうることを示している。

【0152】

実施例4：ERG8およびEPC1の組合せ検出は、検査された全てのTMPRSS2-ERG融合体を含み、前立腺癌に関する頑強な検出系をもたらす

前立腺癌においてERG8が過剰発現され、前立腺癌組織においてEPC1が選択的に発現されるという本発明者らの知見は、これらの2つの遺伝子がユニーク(特有)な3'末端を有することから、特に診断および予後判定の頑強なアッセイを開発するために用いられうる。mRNA転写産物の3'末端は、分解に対して、その5'末端と比べて比較的、抵抗性であり、このことは、仮にそれが該配列の5'末端付近に位置していれば検出困難となりうる、臨床サンプルにおける3'末端付近の配列を検出することを可能にする。したがって、ERG8、EPC1およびEPC2の過剰発現または選択的発現の1つのメカニズムはTMPRSS2の5'への融合を伴いうるが、ERG8、EPC1およびEPC2配列の3'部分は、臨床サンプルにおいて、5' TMPRSS2配列よりも安定で、より容易に検出可能なはずである。その結果、ERG8、EPC1およびEPC2転写産物の3'末端の検出は、TMPRSS2-ERG融合転写産物中の5' TMPRSS2配列のような5'配列の検出と比べて偽陰性を減少させることができる。また、入手はより容易かつより安上がりであるがmRNA分解をより受けやすい尿、血清、血漿、唾液および前立腺液のような生体液が、ERG8、EPC1およびEPC2の3'配列を検出するために使用されうる。

【0153】

したがって、本発明者らは、任意のタイプのERG融合事象による異常発現を検出する簡便なPCRアッセイを開発した。本発明者らは、3つのペアのPCRプライマーを使用するアッセイを試験した。すなわち、本発明者らは、EPC1を検出するためにp2302(配列番号15)およびp2301(配列番号16)を使用し、ERG8を検出するためにp2220(配列番号11)およびp2198(配列番号14)を使用し、そしてERG1/2の3' UTRを検出するために、Petrovicら、(2005) Oncogene 24: 3847-3852に記載されているp2236およびp2237を使用した。これらのプライマーの組合せは、例えばTMPRSS2の任意の5'融合後に保持されており分解に対して比較的抵抗性である3'末端中の配列を、検出する。

【0154】

本発明者らは、これらの3つのプライマーペアを使用し、LCMで選択された前立腺癌細胞におけるERGアイソフォームの存在または非存在を試験した。TMPRSS2-ERG融合転写産物を検出可能であるかどうかに基づいて、該サンプルを2つの群に分類した。表1はその結果を示す。

【表1】

FP	ERG融合体A	ERG融合体A	EPC1	ERG8	ERG1	組合せ シグナル
FP347	0.865	有り	T	T		有り
FP411	8.07	有り	T	T		有り
FP413	2.52	有り	T	T		有り
FP473	5.105	有り	T	T	T	有り
FP480	12.005	有り	T	無し		有り
FP519	1.44	有り	T	T		有り
FP521	1.07	有り	T	T	T	有り
FP554	3.9	有り	T	無し		有り
FP564	2.24	有り	TおよびN	T		有り
FP703	2.66	有り	TおよびN	T		有り
FP245	-3.305	有り	TおよびN	T		有り
FP349	1.315	有り	T	T		有り
FP355	2.12	有り	T	T	T	有り
FP391	2.16	有り	T	T		有り
FP402	3.595	有り	T	T	T(およびN)	有り
FP430	2.77	有り	T	T		有り
FP441	6.2	有り	TおよびN	無し		有り
FP489	3.6	有り	T	T		有り
FP504	5.435	有り		T		有り
FP510	4.47	有り	T	無し		有り
FP553	2.94	有り	T	無し		有り
FP320		無し	無し	無し		
FP326		無し	無し	無し		
FP346		無し	無し	無し		
FP393		無し	無し	無し		
FP513		無し	無し	無し		
FP535		無し	無し	無し		
FP573		無し	無し	無し		
FP590		無し	無し	無し		
FP598		無し	無し	無し		
FP620		無し	無し	無し		
FP257		無し	TおよびN	無し		有り
FP260		無し	無し	無し		
FP318		無し		無し		
FP394		無し	無し	無し		
FP446		無し	無し	無し		
FP488		無し, 融合体C を有する	TおよびN	T		有り
FP491		無し	無し	無し		
FP493		無し	無し	無し		
FP495		無し	無し	無し		
FP508		無し	無し			
FP523		無し	無し	無し		
FP575		無し, 融合体C を有する	T	T		有り

10

20

30

40

表1において、左列における「FP」番号は、コード化された試料番号である。示されている最初の21個のサンプルは、本発明者らが「A型」TMPRSS2-ERG融合転写産物を検出できたものである。ERG融合体Aは、最も頻繁な融合体であり（全融合転写産物の95%）、ERGエキソン8とのTMPRSS2の第1エキソンの融合を含む。「ERG融合体A」と表示された1番目の列中の数値は、定量的RT-PCR分析における、GAPDHに対して正規化された閾値サイクル数を示す。22個のサンプルにおいてはERG融合体Aを検出することはできなかったが、2個のサンプル（FP488およびFP575）において、ERG融合体Cを検出した。融合体「C」は、TMPRSS2エキソン1とERGエキソン9との間の稀な融合体である。EPC1、ERG8およびERG1の列において、「T」は腫瘍細胞における検出を示し、「N」は正常上皮細胞における検出を示し、「無し」は、シグナルが検出されなかったことを示す。「組合せシグナル」の列には、ERG産物の累積的検出をまとめている（「有り」= アイソフォームEPC1、ERG8またはERG1のいずれかの発現）。

【0156】

この組合せシグナルアプローチを用いることにより、本発明者らは、ERG融合体を含む全サンプルにおいて増幅産物を検出することができた。さらに、EPC1は検出されたがERG8は検出されなかったサンプル（例えば、FP480）において、尚も組合せシグナルを得た。該アッセイの妥当性を実証するために幾つかのサンプルにおいてERG1発現を調べたが、結果は、該分析にERG1を含める必要がないことを示している。実際、EPC1およびERG8からの組合せシグナルが、全ての融合事象を検出するために必要とされた全てであった。したがって、該組合せシグナルアプローチは、特定のERG転写産物のみを調べることにより、生じうる偽陰性を最小にするのに役立つ。また、本発明者らは、より5'側のTMPRSS2-ERG融合事象に対するプライマーと共に使用するのが不適切な、生体液のような臨床サンプルにおいて、該組合せアプローチが容易に用いられうると予想する。

【0157】

実施例5：新規ERGプロモーターは前立腺癌において活性化される

前立腺癌におけるERG遺伝子座において生じる追加的な変化が存在するかどうかを判定するために、本発明者らは、5'オリゴキャッピング法を用いて、ERG遺伝子座内の転写開始部位を体系的に評価した。この情報を用いて、癌特異的ERG選択的転写開始部位を位置決定した。確認されたERG遺伝子再編成を伴う6人の患者の前立腺癌組織から全RNAを単離し、該RNAをプールし、ついでそれをデホスファターゼで処理して非キャップ化RNA分子を分解し、それにより、5'キャップ保護mRNA分子を富化した。RNAオリゴヌクレオチドアダプターを連結して該5'キャッピング構造を置換し、逆転写によりcDNAを得た。ついで該オリゴキャップアダプターおよび内部プライマー（ERGエキソン10からのもの）を使用して、5' ERG配列を増幅した。第1増幅においては、ERGプライマー-p2181: 5'-GGCGTTGTAGCTGGGGTGAG-3'（配列番号26）を使用した。第2増幅においては、ERGプライマー-p2268: 5'-CAATGAATTCGTCTGTACTCCATAGCGTAGGA-3'（配列番号27）を使用した。得られたPCR産物をpUC19ベクター内にクローニングし、ついで配列決定した。腫瘍組織におけるERG配列からの転写開始部位を示すDNA配列をERG遺伝子座に合致させ、該遺伝子座内の個々の転写開始部位の頻度を表すスコアを得ることにより分析した。ERG遺伝子転写産物の5'キャッピング頻度地図（CaPMap）を図5に示す。配列決定した152個のクローンのうち、137個の5'キャッピングクローンが、23bpのERGエキソン9領域内に新規の前立腺癌特異的転写開始部位を有していた。

【0158】

別のオリゴキャッピング実験において、前立腺癌陰性の診断を受けた11人の個体から集めた正常前立腺からのRNA（AMBION）において5'キャップ部位を評価した。この実験では、産物が均一であったため、30クローン後に本発明者らの分析を終了した。結果は、正常前立腺における転写開始が一樣にERGエキソン5において生じることを示した。これは、本発明者らが腫瘍試料において観察した、複数のエキソン9開始部位とは著しく対照的である。ERGエキソン5における転写開始は、ERGアイソフォーム3が正常前立腺において発現されることを示している。また、本発明者らの結果は、ERGアイソフォーム1、2、5、6、7、

8および9が正常前立腺においては発現されないが、またはそれらが低レベルで存在することを示唆している。

【0159】

前立腺癌サンプルにおいて検出された転写開始部位は、ERGエキソン9の中央セグメントが癌特異的プロモーター部位であることを示した。該プロモーター領域は、該位置決定実験において検出された最も3'側の転写開始部位を基準として、-520bp~+130bpの領域として定められる。該プロモーター配列を以下に示す。

【0160】

```
TCTGTCGCCA GTCTGGAGTG CAGTGGCATG ATCTCAGCTC ACTGCAACCT 50
CCACCTCCCG GATTCAAGCA ATTTTCCTGC CTCAGCCTCC TGAGTAGCTG 100
GGACTACAGG CATGCCAGC TAATTTTTGT ATTTTGTAGTA GAGACGGGGT 150
TTCACCATGT TGGCCAGGAT GGTCTGGATC TCTTGACCTC ATGATCCGCC 200
CACCTCGGCA TCCCAAAGTG TTGGGACTAC AGGCATGAGC CACGGCACCC 250
CGCCTGTATT TGGCTTTTCA CACTTGTCTT TTCTCCCCCA GTCTCTTCCG 300
CCTTGCCCTT CTTTGGTTCT CTCTGTGTAT TGTGAGAAAGT CGATGGAGAC 350
ATGCTCTTTG ATTGCTGTTA TAATGGAAGA ATATTTCTTC TCCTCCAGGA 400
ACTCTCCTGA TGAATGCAGT GTGGCCAAAG GCGGGAAGAT GGTGGGCAGC 450
CCAGACACCG TTGGGATGAA CTACGGCAGC TACATGGAGG AGAAGCACAT 500
GCCACCCCCA AACATGACCA CGAACGAGCG CAGAGTTATC GTGCCAGCAG 550
GTCAGGTGCC CACAGCTTCA CTGCCCTCGG CAGATCGCAA CTTCCCCAAG 600
GCTAGGCTGA GCCTCAGGGA GCTCTTCTCC CCCACCTGTG GCATTGATCA 650
```

(配列番号7)。該配列において、頻繁に用いられる最も3'側の転写開始部位が太字および枠内に示されている。

【0161】

推定TATA非含有プロモーターは、該転写開始部位から-20、-40bpに位置すると推定される。興味深いことに、+130領域にMED (Multiple Elements of Initiation Downstream) も存在し、これは、本発明者らが観察した複数の開始部位を説明しうるものである。本発明者らは、ルシフェラーゼレポーター遺伝子に機能的に連結することにより、このプロモーターが機能的であることを確認している。図6は、前立腺癌特異的プロモーターが、TMPRSS2-ERG融合体を含有する前立腺癌由来VCaP細胞 (淡灰色の棒グラフ) においてはルシフェラーゼタンパク質の発現を誘導できるが、LNCaP細胞 (濃灰色の棒グラフ) においては誘導できないことを示している。該ルシフェラーゼアッセイにおいては、-177~+130のプロモーター断片 (配列番号7のヌクレオチド404-650) が最大発現レベルを与え、続いて+1~+130断片 (配列番号7のヌクレオチド521-650)、次いで-393~+130断片 (配列番号7のヌクレオチド138-650) の順であった。

【0162】

ERG遺伝子座内の休眠プロモーターの癌特異的活性化は、N末端欠失突然変異体をコードする転写産物を与える。該コード化タンパク質産物は野生型ERGのタンパク質-タンパク質相互作用ドメインを欠く。したがって、この休眠プロモーターの発現産物はドミナントネガティブまたは機能獲得 (gain-of-function) 分子として作用しうる。したがって、このプロモーターの活性を操作する、核酸またはタンパク質に基づく産物は、前立腺癌治療に使用されうる。また、このプロモーターの前立腺特異的発現は、毒素または他の細胞増殖インヒビターをコードする遺伝子に該プロモーターが機能的に連結されている発現ベクターが、前立腺癌細胞においてコード化タンパク質を選択的に発現させるために使用されうることを意味する。

【0163】

実施例6 : ERGとアンドロゲン受容体との間に調節ループが存在する

10

20

30

40

50

アンドロゲン受容体により調節されるTMPRSS2遺伝子プロモーターとERGとの融合を伴う遺伝子再編成が前立腺癌においては高頻度（約60%）で生じ、該遺伝子再編成が前立腺細胞トランスフォーメーションの直接原因である可能性が高いが、ゲノム変化が前立腺癌を招くメカニズムは現在不明である。このゲノム変化が、前立腺癌におけるERG1の過剰発現を引き起こす、または少なくともそれに関与するものと思われる。また、アンドロゲン受容体機能は正常前立腺の発達および分化の中核をなすことが公知である。さらに、アンドロゲン受容体機能不全は前立腺癌細胞の増殖および生存を助け、前立腺癌の進行に役割を果たしていると思われる。しかし、これらの変化がどのように相互作用して前立腺癌を引き起こすのかは不明である。

【0164】

ERGタンパク質が、アンドロゲン受容体シグナリングを妨げることにより前立腺癌に関与するのかどうかを調べるために、本発明者らは、TMPRSS2-ERG融合転写産物の発現をERG1、アンドロゲン受容体（AR）、PSAおよびアンドロゲン調節型遺伝子PMEPA1と関連させた。陰性対照として、LTFも分析した。この分析の結果を図7に示す。この図においては、TMPRSS2-ERG融合体に関する定量的RT-PCRデータが、ERG（「ERG1」）の3'非翻訳領域を増幅することにより得た定量的RT-PCRデータと比較されている。

【0165】

次に、本発明者らは、アンドロゲン受容体の転写標的に対するERG発現の効果を調べた。本発明者らは、2つの異なるERG siRNAをVCaP前立腺癌細胞系に導入した。該siRNAの配列は、エキソン11を標的とするsiRNA-1（p2094）：TGATGTTGATAAAGCCTTA（配列番号28）、およびエキソン10を標的とするsiRNA-2（p2095）：CGACATCCTTCTCTCACAT（配列番号29）である。VCaP細胞はTMPRSS2-ERG融合体を含むし、ERGを過剰発現する。これらの実験の結果を図8に示す。いずれのsiRNAの導入もNKX3.1およびPSA/KLK3のアップレギュレーションを招いた（図8A）。VCaP培養上清においても、PSA/KLK3のアップレギュレーションがPSAレベルの上昇として検出可能であった（図8B）。

【0166】

したがって、TMPRSS2-ERGまたはERGの*in vivo*発現と、例えばPSA/KLK3およびNKX3.1のような他のアンドロゲン調節型遺伝子の発現との間に関連性が存在する。ERG発現のダウンレギュレーションはNKX3.1およびPSA/KLK3の発現の上昇と相関するため、これは、これらのアンドロゲン調節型遺伝子が異所性ERG発現によりダウンレギュレーションされることを示している。NKX3.1は腫瘍抑制遺伝子であり、アンドロゲン受容体の転写標的でもある。したがって、前立腺癌細胞におけるERGの過剰発現によるNKX3.1の抑制は、アンドロゲン受容体媒介細胞分化および細胞増殖の負の調節を妨げる。このモデルの概要図を図9に示す。

【0167】

分解のためにERG遺伝子座の転写産物の標的化において抑制性分子を使用する適用の一例として、本発明者らは、VCaP前立腺癌細胞におけるERG発現を抑制するために、siRNA-1を使用した。記載されているとおり、siRNA-1は、ERG1、ERG2、ERG3、ERG8、EPC1およびPC2転写産物において並びに選択的内部プロモーターの推定産物において見出されるエキソン11を標的とする。VCaP細胞はアンドロゲンホルモン処理に反応し、したがって、細胞増殖に対するERG抑制の効果は、該細胞をアンドロゲンホルモンで刺激することにより試験されうる。

【0168】

siRNA抑制を行うために、まず、細胞を、100mm細胞培養皿内で、30%コンフルエントとなるようにプレーティングした。該細胞をホルモン枯渇血清（cFBS）含有培地内で3日間インキュベートすることにより、増殖を同調させた。ついで、リポフェクタミン2000試薬（Invitrogen, Carlsbad, CA）を使用して、該細胞をsiRNA-1および非標的化（NT）対照siRNAでトランスフェクトした。トランスフェクション後、0.1nMのR1881合成アンドロゲンを該培地に加えた。培地を3日ごとに交換しながら、該細胞を9日間インキュベートした。ついで細胞培養物を写真撮影し、100倍の倍率の代表的視野を取り込んだ。

10

20

30

40

50

【0169】

VCaP細胞の顕微鏡画像を図10に示す。対照NT siRNAで処理された細胞を図10Aに示し、一方、図10Bは、siRNA-1で処理された細胞を示す。siRNA-1で処理されたVCaP細胞は、細胞数における確固たる減少を示した。また、細胞形態学的特徴における顕著な変化も明らかであった。したがって、本発明者らは、siRNA-1処理がVCaP細胞のアンドロゲン刺激増殖を抑制することを示すことができた。

【0170】

総合すると、これらのデータは、ERGとアンドロゲン受容体との間に調節ループが存在すること、およびERGによるアンドロゲン受容体の負の調節が前立腺腫瘍形成に関与していることを示唆している。したがって、TMPRSS2-ERG融合体またはERG過剰発現を有する早期前立腺癌（例えば、十分な低中等度に分化した腫瘍）において適用される幾つかの治療的介入が存在する。例えば、PSA後スクリーニング段階において同定される前立腺癌の最も一般的な段階である早期前立腺癌におけるERG発現を減少させるために、ERG-siRNA、shRNAまたは他の小分子が使用される。その代わりにまたはそれに加えて、アンドロゲン受容体が、有益な効果を伴って、選択的に抑制される。

【0171】

ここでもまた、文脈によりまたは1以上の当該アイソフォームの明示的な除外により特に示されていない限り、治療的介入の文脈における「ERG」に対するいずれの言及も、ERG8、EPC1、EPC2、および本明細書に記載されている前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物だけでなく、ERG1、ERG2およびERG3ならびにそれらの組合せをも含むことに留意すべきである。したがって、本発明者らは、ERG1、ERG2、ERG3、ERG8、EPC1およびEPC2転写産物により共有されるエキソン11に特異的なsiRNAでのアンドロゲン刺激増殖の抑制を示しているが、それらのアイソフォームの1つのみまたは2以上の任意の組合せに標的化されるsiRNA、shRNAまたは他の小分子インヒビターも使用される。ERG1、ERG2、ERG3、ERG8、EPC1、EPC2、もしくは前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物の1つのみの特異的であるかまたはそれらのアイソフォームの組合せを抑制するそのようなsiRNA、shRNAまたは他のインヒビターは、実施例において提供されている配列データを使用して設計することが可能であり、記載されている種々のプライマーおよびプローブ配列を含む。

【0172】

ERGを発現しないまたはERGを低レベルで発現するに過ぎない進行性腫瘍は、無傷アンドロゲン受容体シグナリングネットワークからの逸脱を反映している。これらの腫瘍は、ERGとアンドロゲン受容体との間のフィードバック調節の保護成分を回復させるよう、アンドロゲン調節型遺伝子（例えば、腫瘍抑制剤または細胞分化および増殖インヒビター、例えば、NKX3.1およびPMEPA1）の選択的アップレギュレーションにより治療される。

【0173】

VI. アンドロゲン受容体機能指標

アンドロゲン受容体（「AR」）により調節される遺伝子のリードアウト（読み出し）は、究極的には、原発性前立腺癌組織におけるin vivo AR機能（ARF）の状態を反映し、その結果、予後判定および合理的治療決定に関する重要な情報を伝える。前立腺癌サンプルにおけるAR機能の状態の評価はアンドロゲン非依存性の早期警告徴候を与えうる（van Gilsら、Eur Urol. 48(6):1031-41 (2005)）。前立腺癌生物マーカー遺伝子を特定し実証するためのハイスループットスクリーニングにおいて、CPDR Biospecimen Bankから得た十分に特徴づけられアノテーションされ保管されているヒト組織（長期追跡データを伴う）を使用した。

【0174】

近年、本発明者らは、顕微解剖された対応する腫瘍細胞および良性前立腺上皮細胞からの細胞型特異的遺伝子発現を分析してきた。本発明者らは、前立腺癌の進行と共にアンドロゲン調節型遺伝子発現が全般的に低下することを見出した（Petrovicsら、Oncogene 24:3847-52 (2005)）。また、他の研究者は最近、後期段階、特に、ヒト試料の転移前立腺

10

20

30

40

50

癌 (Tomlins et al., Nat Genet. 39(1): 41-51 (2007)) および異種移植片モデル系 (Hendriksenら, Cancer Res. 66(10):5012-20 (2006)) におけるAR機能の低下の徴候を認めた。12遺伝子パネルの一部として、侵襲性前立腺癌においてはPSAが過少発現されることが判明した (Bismarら, Neoplasia 8(1):59-68 (2006))。しかし、いくつかの研究室は、後期段階の転移性前立腺癌における、高いAR発現、増幅または活性を報告していることに注目すべきである (Heinleinら, Endocrine Rev 25:276-308 (2004); Chenら, Nat Med 10: 26-7 (2004); Dehmら, J Cell Biochem 99: 333-344 (2006); Linjaら, Cancer Res 61:3550-55 (2001); Liら, Am J Surg Pathol 28:928-34 (2004))。これらの異なる知見は、後期段階の、特に、アンドロゲン非依存性転移性前立腺癌の、異質性を強調するものである (Shahら, Cancer Res. 64(24):9209-16 (2004))。

10

【0175】

前立腺癌細胞におけるAR機能状態のin vivoリードアウトを開発するために、本発明者らは、実施例7に示すとおり、200個を超える試料の注意深く単離された良性および腫瘍細胞における、種々のAR調節型遺伝子の並行定量的測定を追求してきている。2000を超えるデータ点を表す、mRNAレベルでのアンドロゲン調節型遺伝子 (例えば、PSA/KLK3、PMEPA1、PCA3) およびアンドロゲン非依存性遺伝子 (AMACR、LTF) の定量的発現分析は、PSA/KLK3および他のアンドロゲン調節型遺伝子がARのin vivo機能状態を反映すること、ならびにそれらの発現レベルが、例えばグリーンソンの腫瘍分類、病理学的病期および/または生化学的再発により定められる前立腺癌の侵襲性との正または負の相関を測定するために用いられうることを示唆している。最初に、本発明者らは、PSA/KLK3 mRNAに焦点を絞ることを選択した。なぜなら、それは、ARの最も確固たる直接的な転写標的の1つであり、前立腺癌細胞において容易に検出可能だからである (Kimら, J Cell Biochem. 93(2):233-41 (2004))。

20

【0176】

本発明者らの最も最近のデータは、原発性前立腺癌における一連のAR調節型遺伝子の定量的遺伝子発現パターンが予後を示すフィンガープリント (fingerprint) を与えることを示している。ハイスループットアッセイおよび論理的候補遺伝子戦略を用いて、本発明者らは6個のアンドロゲン誘導性/同時調節型遺伝子 (PSA/KLK3、PMEPA1、NKX3.1、ODC1、AMD1およびERG) の組合せを定めた。これらの6個の遺伝子またはそれらのアイソフォームのうち2以上の様々な組合せが、前立腺癌試料におけるin vivo AR機能の定量的尺度、すなわち、アンドロゲン受容体機能指標、すなわち、ARF指標 (ARFI) を得るために用いられうる。これらの遺伝子の発現レベルを測定するためにはリアルタイム定量的PCR (QRT-PCR) を用いたが、当技術分野で公知の他の技術、例えば免疫組織化学法を用いてRNAまたはタンパク質レベルを検出することもできる。

30

【0177】

ARFIリードアウトは、全体的なin vivo AR活性を表す単一の数値指標に変換することが可能であり、それは次に、例えば、根治的前立腺切除術後の前立腺癌再発の10年確率を予測する上でのPSA、グリーンソン和、被膜外浸潤 (extra-capsular extension)、切除縁、精嚢浸潤、リンパ節転移、治療年数および補助放射線療法の重要性を実証したKattanらにより作成されたもののようなノモグラムに組み込まれうる。該ノモグラムは、このエンドポイントを予測する確立された臨床および病理学的特徴と組み合わせた、前立腺癌の進行の予測を含む時間対事象データをモデル化するために使用されうる。ARFIを含める際のモデルフィットにおける改善を評価するために、一致指数Cが用いられうる (Harrellら, JAMA 247(18):2543-6 (1982))。手術後のPSA再発のような結果を予測し、侵襲的手法に先立つ治療決定を補助するために、測定可能な患者因子を使用する試みにおいて、現行のノモグラム計算図表はそのような測定可能な患者因子を組み込んでいる。

40

【0178】

ARFI遺伝子群はARの直接的な標的であるか、またはARにより厳重に調節されており、そして前立腺癌においてARにより調節される主要な生物学的機能を担う。その遺伝子セットは5個のアンドロゲン調節型遺伝子およびERGを含む。本発明者らによる前立腺癌における

50

ERGの特定のアイソフォームの頻繁な過剰発現の最初の観察 (Foleyら, *Endocr Relat Cancer* 11(3):477-88 (2004))、およびAR調節型TMPRSS2遺伝子プロモーターを介したERG発現の活性化を招く一般的な染色体再編成を示す後続の独立した研究 (Tomlinsら, *Science* 310(5748):644-8 (2005))は、前立腺癌に特異的な異常AR活性化遺伝子としてのERGにスポットを当てている。したがって、ERG発現の定量的評価がARFIに統合されている。ERGリードアウトは、前立腺癌患者の60%以上を占めるTMPRSS2-ERG陽性腫瘍に適用されうる (同誌)。

【0179】

以下の実施例はモデルERGアイソフォームとしてERG1を使用しているが、実施例5に記載されている前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物と同様にERG2、ERG3、ERG8、EPC1、EPC2およびそれらのERGアイソフォームの組合せも使用されうる。したがって、文脈によりまたは1以上の当該アイソフォームの明示的な除外により特に断られていない限り、ARFIリードアウトに関する「ERG」に対するいずれの言及も、ERG1だけでなく、ERG2、ERG3、ERG8、EPC1、EPC2および本明細書に記載されている前立腺癌特異的プロモーターからの転写産物ならびにそれらの組合せをも含む。例えば、ARFIリードアウトは、ERG1でもERG2でもないERG遺伝子を使用しうる。同様に、いくつかの実施形態においては、リードアウトにERG8、EPC1またはEPC2を含めるが、ERG1もERG2も含めないことが望ましいかもしれない。

【0180】

実施例7: ARFI遺伝子の同時調節はARシグナリングに対する頑健なin vivo機能的関連を反映している

本発明者らは最近、40人の患者の根治的前立腺切除試料からの顕微解剖した前立腺癌細胞および対応する良性上皮細胞の包括的な遺伝子発現分析 (80個のGeneChip) を完了した (Petrovicsら, *Oncogene* 24:3847-52 (2005))。該GeneChipデータセットをアンドロゲン調節型遺伝子発現に関して評価した。ERG (これは、大多数の患者において、TMPRSS2プロモーターとの融合により前立腺癌細胞においてアンドロゲン調節型となりうる) と共にPSA/KLK3、PMEPA1、NKX3.1、ODC1およびAMD1が、それらの広いダイナミックレンジの発現およびアンドロゲン刺激に対するそれらの報告されている応答により (Heinleinら, *Endocrine Rev* 25:276-308 (2004); Linjaら, *J Steroid Biochem Mol Biol* 92: 255-64 (2004); Shafferら, *Lancet Oncol* 4:407-14 (2003); Chenら, *Nat Med* 10: 26-7 (2004); Dehmら, *J Cell Biochem* 99: 333-344 (2006); Segawaら, *Oncogene* 21(57):8749-58 (2002); Xuら, *Int J Cancer* 92(3):322-8 (2001))、選択された。さらに、これらの遺伝子の幾つか (NKX3.1、ERG、PMEPA1) は前立腺癌の発生に因果的に関連づけられうる。

【0181】

この遺伝子パネル (ARFI) の協調発現はin vivo AR活性の機能状態を反映するものである。正規化された発現強度値が熱地図形態で示されている (図11)。教師無し (non-supervised) 階層型クラスター解析 (TIGR, Gaithersburg, MDからのソフトウェア) を患者毎に及び遺伝子毎に行い、それは前立腺癌患者の腫瘍細胞におけるARFI遺伝子の頑健なin vivo同時調節を示し、これは活性化または機能不全のARのいずれかを反映している (図11)。2つの緊密な遺伝子サブクラスターが出現した: PSA/KLK3、NKX3.1、PMEPA1、およびODC1、AMD1 (ポリアミン経路) (これらは、中央12患者クラスターにおける発現のみで異なり、これは、異なる下流AR経路を表す一連のARFI遺伝子を使用する重要性を強調するものである)。その他の2つの大きな患者クラスターは、活性化AR (左の17患者クラスター) または機能不全AR (右の11患者クラスター) を反映する全てのARFI遺伝子の緊密な同時調節を示す (図11)。また、大多数の前立腺癌患者の腫瘍細胞においては、ERGは、緊密に他のARFI遺伝子と共に同時調節され、ここで、ERGは、アンドロゲン調節型TMPRSS2プロモーターと融合されて高度特異的腫瘍細胞マーカーをもたらしているようである。

【0182】

また、本発明者らは、ERGが、アンドロゲン調節型ではない他の前立腺癌関連遺伝子と共に、多遺伝子パネルの一部として使用されうることを示している。図12は、ERG、AMACR

、DD3、PSGRおよびPCGEM1を含む多遺伝子パネルに関する熱地図を示す。該熱地図 (heat map) は、前立腺組織切片からの顕微解剖細胞サンプルのTaqMan QRT-PCR分析から得られた腫瘍対正常遺伝子発現比の教師無し階層型クラスタリングである。該多遺伝子パネルにおいて非AR遺伝子を使用した場合に、本発明者らは、異なるが重複している患者サブセットにおける種々のマーカー遺伝子の強力な過剰発現を見出した。

【0183】

実施例8：QRT-PCRによるARFI遺伝子のin vivo同時調節の検証

QRT-PCRを用いて、本発明者らは、TMPRSS2-ERG融合体を有する患者の前立腺癌細胞において、ERG転写産物の発現を、アンドロゲン調節型遺伝子PSA/KLK3およびPMEPA1 (Dehmら, J Cell Biochem 99: 333-344 (2006); Xuら, Cancer Res. 63(15):4299-304 (2003))の発現との関係に関して評価した。非アンドロゲン調節型制御遺伝子であるLTF (Wardら, Cell Mol Life Sci. 62(22):2540-8 (2005))を同じ腫瘍細胞においてアッセイした (図13)。この図においては、有意な相関 ($R > 0.5$) が黒塗の棒グラフで示されている。非アンドロゲン調節型遺伝子であるLTFは、陰性対照として使用した。棒グラフの上にピアソン相関係数 (R) が示されている。P値、および該実験において評価された患者の数 (n) が、棒グラフの下に示されている。

【0184】

前立腺癌細胞における検出可能なTMPRSS2-ERG融合転写産物を有する65人の患者をこの研究のために選択した。検出可能なTMPRSS2-ERG転写産物を有する患者におけるERG、組織PSA/KLK3 ($p < 0.0001$) およびPMEPA1 ($p < 0.0001$) の発現レベルの間で顕著な同時調節が観察された。該同時調節は、TMPRSS2-ERG融合転写産物の発現レベルが中央値より高いこれらの患者のサブセット (「高融合転写産物」、図13の右パネル) において、より一層強力である。これらのデータは、ARFI遺伝子 (TMPRSS2-ERGを含む) 内の同時調節のレベルが前立腺癌細胞におけるARの全体的な機能状態を反映すること、および低下したARFI遺伝子発現が、前立腺腫瘍細胞における、低下または減少したアンドロゲン受容体シグナリングと相関することを示している。さらに、該データは、進行した前立腺癌、例えばpT3期の前立腺癌においては、ARFI遺伝子の発現レベルが減少することを示している。

【0185】

実施例9：PSA/KLK3およびTMPRSS2-ERGは前立腺癌の進行の際にin vivo AR活性の減少を示す

PSA/KLK3およびERG mRNA発現を、前立腺癌の進行とのそれらの関係に関して、より大きな患者コホートにおいて更に分析した。図14に示すとおり、pT3前立腺癌 (被膜の外側へと成長している局所浸潤性腫瘍) を有する患者は、pT2期疾患 (器官限局性) を有する患者と比べて有意 ($p = 0.0098$) に低い、PSA/KLK3転写産物レベルの発現を示した。さらに、pT3患者の前立腺癌細胞におけるTMPRSS2-ERG融合転写産物レベルの低下も明らかであった ($p = 0.0275$)。

【0186】

中間的な血清PSAレベルを有する患者を研究するために、更なる分析を、2~10ng/mLの血清PSAを有する患者 ($n = 79$) に限定した。血清PSAレベルに基づけば、これらの患者は不明確な予後判定を有する。図15は、生化学的再発を伴う前立腺癌患者の腫瘍細胞におけるPSA/KLK3 mRNA発現レベルの分布を示す。

【0187】

図15に示されている該データの統計分析は、生化学的再発を伴わない患者の腫瘍細胞における組織PSA/KLK3 mRNAの発現が、生化学的再発を伴う患者の場合より、有意に高かったことを示している ($p = 0.0062$, スチューデントt検定)。良性上皮細胞におけるPSA/KLK3 mRNA発現はそのような相関を示さなかった。この前立腺癌患者コホートを、腫瘍細胞における組織PSA/KLK3 mRNA発現レベルに基づいて五分位に分け、生化学的再発までの時間に関して比較した。図16に示されるとおり、無調整Kaplan-Meier分析は、最も高い組織PSA/KLK3 mRNA発現を示す患者に関する生化学的生存の改善を実証している (第1および第2五分位) ($p = 0.0229$)。したがって、前立腺癌患者の腫瘍細胞におけるPSA/KLK3 mRNA

10

20

30

40

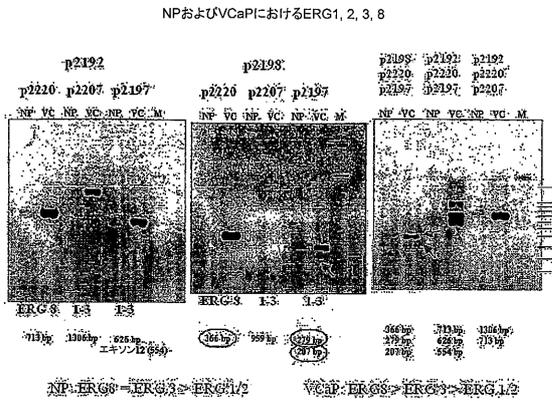
50

発現は疾患再発と逆相関する。腫瘍PSA/KLK3 mRNAの高い発現レベルは、生化学的再発を伴わない生存と相関し、一方、PSA/KLK3 mRNAの低い発現レベルは、前立腺切除後の腫瘍再発の可能性の増大を招く、腫瘍細胞微小環境中のARシグナリングの変化を反映している。

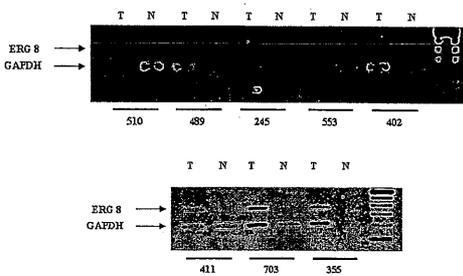
【 0 1 8 8 】

本発明は、参照により本明細書に組み入れられる本明細書中で引用されている文献の教示に照らして十分に理解される。本明細書中の実施形態は本発明の実施形態の例示であり、本発明の範囲を限定すると解釈されるべきではない。多数の他の実施形態が本発明に含まれることが当業者により容易に認識される。

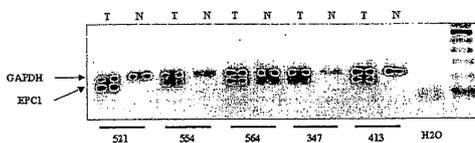
【 図 1 】



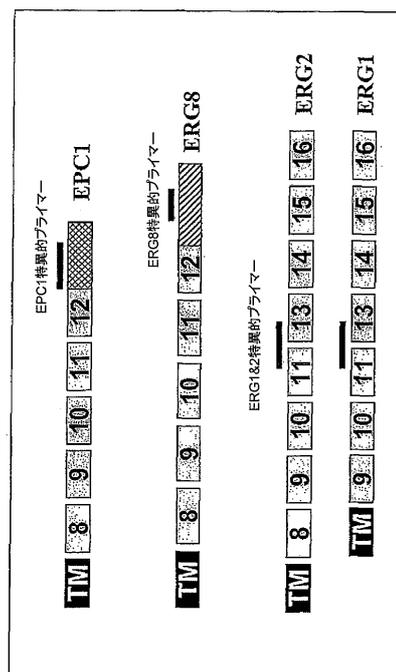
【 図 2 】



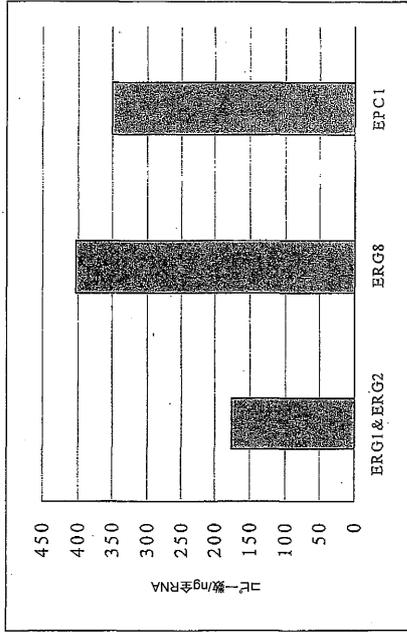
【 図 3 】



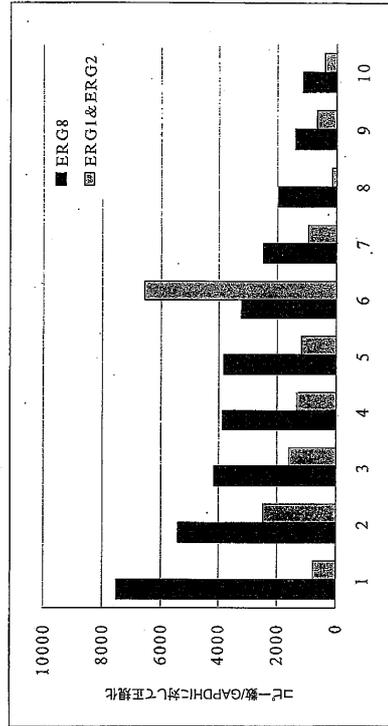
【 図 4 A 】



【図4B】

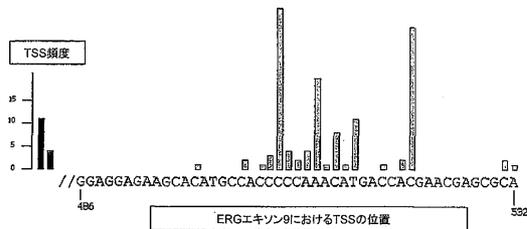


【図4C】



【図5】

癌特異的ERG選択的転写開始部位(TSS)のCaPMap



ERG-TMPRSS2融合転写産物を発現する腫瘍を有する6人の前立腺癌患者からの全RNAをオリゴキャッピングに付した。オリゴキャッピング連綿mRNA種をcDNAに変換し、pUC19ベクター内にクローニングした。DNAシークエンシングによりヌクレオチド配列を決定した。152個のクローンを配列決定した。137個のクローンにおいて、TSSがERGエキソン9中に同定された(黄色の棒グラフ)。TMPRSS2-ERG融合転写産物は15個のクローンにおいてのみ同定された(それぞれ、赤色の棒グラフおよび紫色の棒グラフ)。

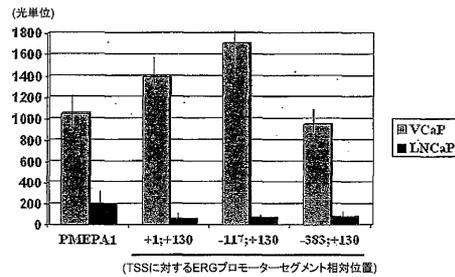
【図7】

相関	検出された融合体数			ERG融合体A			高ERG融合体A* (平均=0.61)			低ERG融合体A* (平均=-4.64)			
	N	R	P値	N	R	P値	N	R	P値	N	R	P値	
ERG融合体	ERG1	-	-	59	0.49	<.0001	30	0.49	0.0055	29	0.33	0.079	
	AR	-	-	61	0.22	0.0862	30	0.4	0.0303	31	0.08	0.672	
	PSA	-	-	58	0.48	0.0001	31	0.56	0.0011	27	0.25	0.2037	
	PMEPA1	-	-	50	0.55	<.0001	24	0.59	0.0026	26	0.36	0.0718	
	LTF	-	-	45	0.12	0.439	20	0.56	0.1203	25	-0.11	0.6048	
ERG1	AR	26	0.48	0.0126	56	0.38	0.0039	27	0.57	0.002	29	0.06	0.7669
	PSA	27	-0.01	0.9428	52	0.59	<.0001	28	0.67	0.0001	24	0.09	0.6807
	PMEPA1	22	0.28	0.1993	48	0.68	<.0001	23	0.78	<.0001	25	0.46	0.0211
	LTF	20	0.36	0.1125	43	0.01	0.9391	19	-0.07	0.7717	24	0.01	0.9556

*中央値分割 (中央値=2.635), N=65

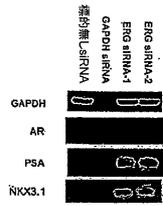
【図6】

TMPRSS2-ERG融合体を発現するVCaP前立腺癌細胞におけるルシフェラーゼレポーターアッセイにより確定されたERG癌特異的プロモーター活性

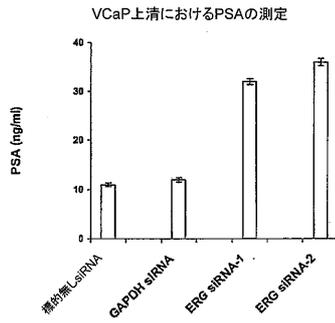


【 図 8 】

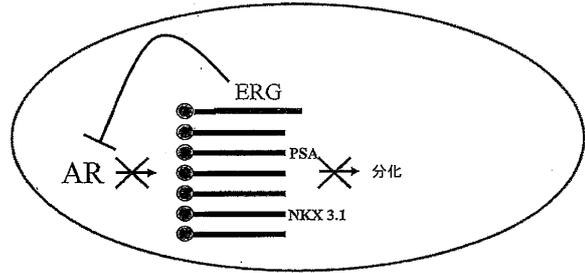
A. 前立腺分化マーカー(PSA)およびCaP腫瘍抑制遺伝子(NKX3.1)であるAR調節型遺伝子に対するERG抑制の効果



B. VCaP細胞系上清におけるPSAレベル

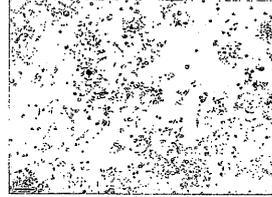


【 図 9 】

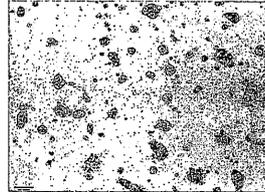


【 図 10 】

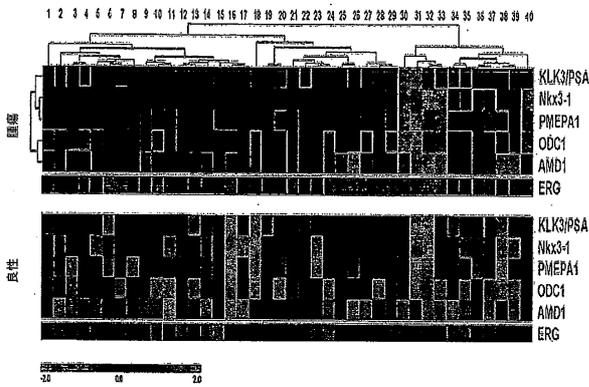
A.



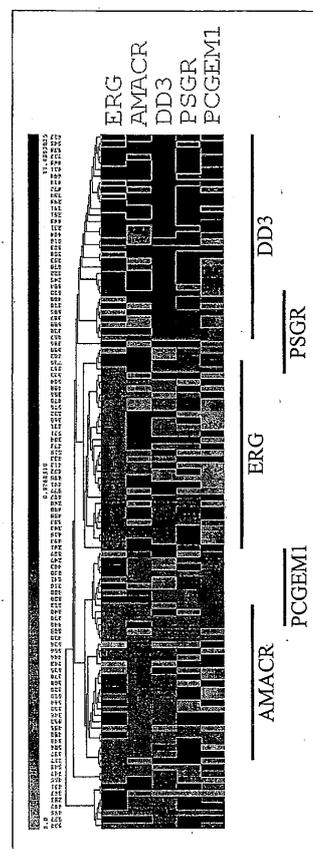
B.



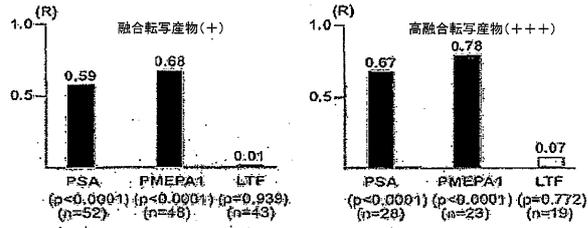
【 図 11 】



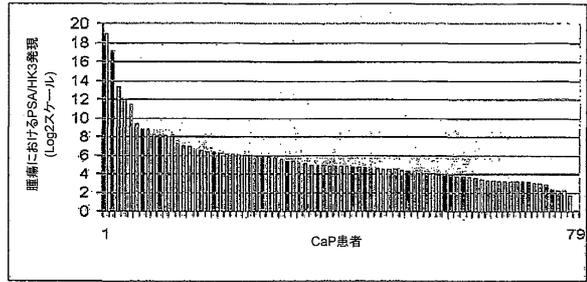
【 図 12 】



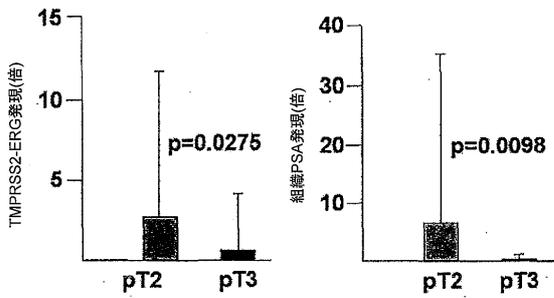
【 図 1 3 】



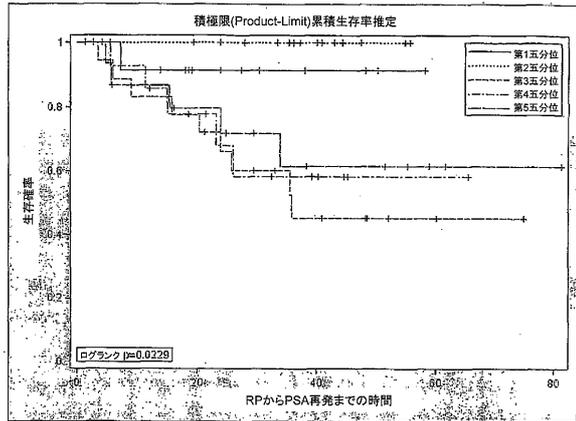
【 図 1 5 】



【 図 1 4 】



【 図 1 6 】



フロントページの続き

- (74)代理人 100122389
弁理士 新井 栄一
- (74)代理人 100111741
弁理士 田中 夏夫
- (72)発明者 スリヴァスタヴァ, シヴ
アメリカ合衆国 20854 メリーランド州, ポトマック, メープルクレスト ドライブ 13
216
- (72)発明者 ドビ, アルバート
アメリカ合衆国 21046 メリーランド州, コロンビア, ナンバー1011 エデン ブルッ
ク ドライブ 7332
- (72)発明者 スリーナス, タドゥール
アメリカ合衆国 20874 メリーランド州, ジャーマンタウン, サンダーリング ブレイス
13519
- (72)発明者 ペトロヴィクス, ジョージ
アメリカ合衆国 20817 メリーランド州, ベセスダ, フライアーズ ロード 9103
- (72)発明者 サン, チェン
アメリカ合衆国 20814 メリーランド州, ベセスダ, ナンバー203 バッテリー レーン
4901

審査官 飯室 里美

- (56)参考文献 国際公開第2005/113816(WO, A1)
Gene, 2004年, Vol.324, p.65-77

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/09
C12Q 1/68
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/WPIX(STN)

专利名称(译)	基于前列腺癌特异性ERG基因表达变化及其变化的检测和治疗方法		
公开(公告)号	JP5470041B2	公开(公告)日	2014-04-16
申请号	JP2009532537	申请日	2007-10-09
[标]申请(专利权)人(译)	军事医学公司的亨利·杰克逊基金会福扎进步		
申请(专利权)人(译)	亨利中号..杰克逊基金会军事医学, Inc.的进步		
当前申请(专利权)人(译)	亨利中号..杰克逊基金会军事医学, Inc.的进步		
[标]发明人	スリヴァスタヴァシヴ ドビアルバート スリーナスタドゥール ペトロヴィクスジョージ サンチェン		
发明人	スリヴァスタヴァ,シヴ ドビ,アルバート スリーナス,タドゥール ペトロヴィクス,ジョージ サン,チェン		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	A61P13/08 A61P31/00 A61P35/00 A61P43/00 C12Q1/6886 C12Q2600/118 C12Q2600/16 C12Q2600/158 C12N15/1135 C12N2310/11 C12N2310/14 C12N2320/30		
FI分类号	C12N15/00.ZNAA C12Q1/68.A G01N33/50.P G01N33/53.D		
代理人(译)	荒井英一		
优先权	60/850254 2006-10-10 US 60/929505 2007-06-29 US		
其他公开文献	JP2010505446A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开描述了ERG基因表达的变化。提供与前列腺癌有关或与之相关的ERG同种型和ERG基因的启动子序列。本公开进一步涉及用于治疗前列腺癌的组合物,其包含用于检测以下两种或更多种基因的表达的生物标志物:PSA/CLK3,PMIPA1,NKX3.1,ODC1,AMD1和ERG以及前列腺癌。疾病或病症的诊断,预后和治疗。

FP	ERG融合体A	ERG融合体A	EPC1	ERG8	ERG1	組合せシグナル
FP347	0.885	有り	T	T		有り
FP411	8.07	有り	T	T		有り
FP413	2.52	有り	T	T		有り
FP473	5.105	有り	T	T	T	有り
FP480	12.005	有り	T	無し		有り
FP519	1.44	有り	T	T		有り
FP521	1.07	有り	T	T	T	有り
FP554	3.9	有り	T	無し		有り
FP564	2.24	有り	Tお上CFN	T		有り
FP703	2.66	有り	Tお上CFN	T		有り
FP245	-3.305	有り	Tお上CFN	T		有り
FP349	1.315	有り	T	T		有り
FP355	2.12	有り	T	T	T	有り
FP391	2.16	有り	T	T		有り
FP402	3.595	有り	T	T	T(お上CFN)	有り
FP430	2.77	有り	T	T		有り
FP441	6.2	有り	Tお上CFN	無し		有り
FP459	3.6	有り	T	T		有り
FP604	5.435	有り	T	T		有り
FP510	4.47	有り	T	無し		有り
FP553	2.94	有り	T	無し		有り
FP320	無し	無し	無し	無し		
FP326	無し	無し	無し	無し		
FP345	無し	無し	無し	無し		
FP393	無し	無し	無し	無し		
FP513	無し	無し	無し	無し		
FP535	無し	無し	無し	無し		
FP673	無し	無し	無し	無し		
FP590	無し	無し	無し	無し		
FP598	無し	無し	無し	無し		
FP620	無し	無し	無し	無し		
FP257	無し	無し	Tお上CFN	無し		有り
FP260	無し	無し	無し	無し		
FP318	無し	無し	無し	無し		
FP394	無し	無し	無し	無し		
FP445	無し	無し	無し	無し		
FP488	無し,融合体Cを有する	無し	Tお上CFN	T		有り
FP491	無し	無し	無し	無し		
FP493	無し	無し	無し	無し		
FP495	無し	無し	無し	無し		
FP508	無し	無し	無し	無し		
FP623	無し	無し	無し	無し		
FP575	無し,融合体Cを有する	無し	T	T		有り