(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6806671号

(P6806671)

(45) 発行日 令和3年1月6日(2021.1.6)

(24)登録日 令和2年12月8日 (2020.12.8)

(51) Int.Cl.			FI				
A61K 3	1/713	(2006.01)	A 6 1 K	31/713			
A61P 35	5/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00			
A61P 33	5/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/04			
A61P 17	7/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00			
A61P 13	3/08	(2006.01)	A 6 1 P	13/08			
					請求項の数 11	(全 38 頁)	最終頁に続く
(21) 出願番号		特願2017-516587	(P2017-516587)	(73)特許権者	皆 503360115		
(86) (22) 出願日		平成28年4月22日	(2016. 4. 22)		国立研究開発	备法人科学技術执	辰興機構
(86) 国際出願番	号	PCT/JP2016/06275	57		埼玉県川口市	5本町四丁目11	昏8号
(87) 国際公開番	号	W02016/178374		(74)代理人	100149548		
(87) 国際公開日		平成28年11月10日	(2016.11.10)		弁理士 松沼	1 泰史	
審査請求日		平成31年1月17日	(2019.1.17)	(74)代理人	100163496		
(31) 優先権主張	番号	特願2015-93980(F	2015-93980)		弁理士 荒	則彦	
(32)優先日		平成27年5月1日(2	2015.5.1)	(74)代理人	100161207		
(33)優先権主張[国・地	地域又は機関			弁理士 西澤	闄 和純	
		日本国(JP)		(74)代理人	100147267		
					弁理士 大槻	11 真紀子	
				(74)代理人	100064908		
					弁理士 志賀	[正武	
				(74)代理人	100094400		
					弁理士 鈴木	、 三義	
						Ę	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】腫瘍細胞の悪性化抑制剤及び抗腫瘍剤

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

Zic5遺伝子の<u>発現を</u>阻害する物質を有効成分とし、腫瘍細胞の転移性能獲得又はア ポトーシス抵抗性獲得を抑制又は阻害し、

前記Zic5遺伝子の<u>発現を</u>阻害する物質が、<u>Zic5遺伝子を標的とし、RNA干渉</u>によりその発現自体を抑制させる核酸であり、

前記腫瘍細胞がメラノーマ細胞又は前立腺がん細胞である、腫瘍細胞の悪性化抑制剤。 【請求項2】

前記Zic5遺伝子の<u>発現を</u>阻害する物質が、Zic5遺伝子を標的とするsiRNA である、請求項1に記載の腫瘍細胞の悪性化抑制剤。

【請求項3】

前記腫瘍細胞が、BRAF阻害剤耐性を有する、請求項1<u>又は2</u>に記載の腫瘍細胞の悪 性化抑制剤。

【請求項4】

ヒト以外の動物の腫瘍細胞の悪性化を抑制する方法であって、

Zic5遺伝子の発現を阻害することにより、腫瘍細胞の転移性能獲得又はアポトーシス抵抗性獲得を抑制又は阻害し、前記腫瘍細胞がメラノーマ細胞又は前立腺がん細胞である、腫瘍細胞の悪性化抑制方法。

【請求項5】

Zic5遺伝子の<u>発現の</u>阻害を、RNA干渉により、Zic5遺伝子の発現を阻害する ²⁰

ことにより行う、請求項4に記載の腫瘍細胞の悪性化抑制方法。

【請求項6】

Zic5遺伝子の発現を阻害する物質であって、Zic5遺伝子を標的とし、RNA干 <u>渉によりその発現自体を抑制させる核酸分子</u>を有効成分とし、メラノーマの治療に用いられる、抗腫瘍剤。

【請求項7】

BRAF阻害剤耐性を有するメラノーマ、又はBRAF阻害剤への治療適性のないメラ ノーマの治療に用いられる、請求項6に記載の抗腫瘍剤。

【請求項8】

Zic5遺伝子の発現を阻害する物質<u>であって、Zic5遺伝子を標的とし、RNA干</u>¹⁰ <u>渉によりその発現自体を抑制させる核酸</u>を有効成分とし、前立腺がんの治療に用いられる 、抗腫瘍剤。

【請求項9】

前記 Z i c 5 遺伝子の<u>発現を</u>阻害する物質が、 Z i c 5 遺伝子を標的とする s i R N A である、請求項6~8のNずれか一項に記載の抗腫瘍剤。

【請求項10】

被検腫瘍細胞のZiC5遺伝子の発現量をマーカーとし、<u>前記被検腫瘍細胞がメラノー</u> マ細胞又は前立腺がん細胞であり、

被検腫瘍細胞のZic5遺伝子の発現量が多いほど、悪性度が高いと評価する、腫瘍細胞の悪性度の評価方法。

【請求項11】

前記被検腫瘍細胞が原発性腫瘍細胞であり、前記被検腫瘍細胞のZiC5遺伝子の発現量が、所定の閾値以上である場合に、前記被検腫瘍細胞が転移性能又はアポトーシス抵抗性を獲得したリスクが高いと評価する、請求項10に記載の腫瘍細胞の悪性度の評価方法

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

[0001]

本発明は、腫瘍細胞の転移性能獲得又はアポトーシス抵抗性獲得といった悪性化を抑制するための抑制剤及び抗腫瘍剤に関する。

本願は、2015年5月1日に、日本に出願された特願2015-93980号に基づ き優先権を主張し、その内容をここに援用する。

【背景技術】

[0002]

悪性黒色腫(メラノーマ)は、メラニン産生細胞であるメラノサイトががん化した悪性 腫瘍である。早期発見により治癒が可能であるが、遠隔性転移を起こした症例における5 年生存率は約10%と低く、有効な治療法が確立されていない(例えば、非特許文献1及 び2参照。)。また、症例の約60~70%以上でBRAF^{V60o} ^E 遺伝子変異が確認 されている。BRAF(MAPK経路のMAPKKK)が下流のMEK(MAPK経路の MAPKK)をリン酸化して活性化し、活性化されたMEKによりさらに下流のERK(MAPK経路のMAPK)がリン酸化されて活性化することにより、増殖、生存、浸潤、 転移に関わる多くのタンパク質が活性化される(例えば、非特許文献3参照。)。BRA F^{V600 E} の変異によりBRAFが恒常的かつ強力に活性化していることが、メラノー マの原因の1つであり、現在では、変異型BRAFに対する選択的な阻害剤(PLX40 32、vemurafenib)を用いた臨床試験が行われ、高い奏効率が確認されてい る。しかし、BRAF遺伝子のスプライシングバリアントの発現や、間質細胞から分泌さ れる肝細胞増殖因子(HGF)の発現など、様々な機構により、BRAF阻害剤に対する 薬剤耐性が生じ、その効果は限定的であることが報告されている(例えば、非特許文献4 ~6参照。)。

[0003]

20

30

10

30

40

上皮性のがんが転移能を獲得する原因の1つとして、上皮間葉形質転換(Epithelial M esenchymal Transition; EMT)が知られている。EMTは、上皮系の細胞が間葉系細胞の形質を獲得する現象であり、EMTを生じると、上皮細胞間接着分子であるE-カドヘリンの発現量が減少することが知られている。また、EMTは、Snail、Slug、Twistなどの転写因子によって制御されていることが明らかになっており、これらの因子がE-カドヘリンなどの発現を制御し、EMTを引き起こすことが知られている(例えば、非特許文献7参照。)。

[0004]

メラノーマにおいても、転移のある症例で多くのEMT関連遺伝子の発現が変化してお り、EMTプログラムの亢進が転移の原因の一つであることが示唆されている(例えば、 非特許文献 8 参照。)。また、BRAF変異をもつメラノーマにおいて、BRAFの恒常 的活性化によりZeb1、Twist1などの転写因子が発現誘導され、これらの因子に よるE‐カドヘリンの発現抑制が生じ、メラノーマの増悪が引き起こされるというEMT 様の現象が確認されている(例えば、非特許文献 9 参照。)。E‐カドヘリンの発現レベ ルは多くのメラノーマにおいて低下しており、E‐カドヘリンの発現が低下している症例 において再発率が有意に上昇することが報告されている(例えば、非特許文献 1 0 参照。)。これらの知見から、E‐カドヘリンの発現低下とメラノーマの増悪との関連が示唆さ れている。

[0005]

一方で、EMTはがんだけでなく、初期胚発生時にも必須の現象であり、原腸陥入や神 20 経冠細胞の分化に関与している。神経冠細胞は、背側神経管の一部でEMTを起こし、上 皮組織から乖離することで移動能を獲得し、末梢神経系、グリア細胞、衛星細胞、メラノ サイト、象牙芽細胞、頭蓋顔面軟骨などに分化する。神経冠細胞のEMTにおいても、S nail、Slug、Twistなどの転写因子によりE-カドへリンの発現低下が引き 起こされている(例えば、非特許文献7及び11参照。)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

[0006]

【非特許文献1】Aamdal et al., European Journal of Cancer, 2011, vol.47, Suppl 3, p.S336-S337.

【非特許文献 2】Blank et al. , Cancer Immunology, Immunotherapy, 2011, vol.60, p .1359–1371.

【非特許文献 3】Cangol et al., FEBS Journal, 2009, vol.277(1), p.2-27.

【非特許文献4】Poulikakos et al., Nature, 2011, vol.480, p.387-390.

【非特許文献 5】Price et al., Journal of Clinical Oncology 2011, vol.29(19), p. 2675-2682.

【非特許文献 6】Villanueva et al., Cancer Research, 2011, vol.71, p.7137.

【非特許文献 7】Thiery et al., Cell, 2009, vol.139, p.871-890.

【非特許文献 8】Alonso et al., Cancer Research, 2007, vol.67(7), p.3450-3460.

【非特許文献 9】Caramel et al., Cancer Cell, 2013, vol.24, p.466-480.

【非特許文献10】Andersen et al., Modern Pathology, 2004, vol.17, p.990-997.

【非特許文献11】Acloque et al., Journal of Clinical Investigation,2009,vol.1 19, p.1438–1449.

【非特許文献 1 2】Satow et al., Gastroenterology, 2012, vol.142(3), p.572-581. 【非特許文献 1 3】Kanemaru et al., Nature Communications, 2012, vol.3, p.963.

【非特許文献14】Arozarena et al., Cancer Cell, 2011, vol.19, p.45-57.

【非特許文献15】Sanz-Moreno et al., Cancer Cell, 2011, vol.20, p.229-245.

【非特許文献16】Hirano et al., Biochemical Pharmacology, 2013, vol.86(10), p.1 419–1429.

【非特許文献17】Ishigro et al., Biochemical and Biophysical Research Communica 50

tions, 2004, vol.324, p.302-307. 【非特許文献18】Dennis et al., Genome Biology, 2003, vol.4(5), p.P3. 【非特許文献19】Hess et al., Cancer Research, 2005, vol.65, p.9851-9860. 【発明の概要】 【発明が解決しようとする課題】 【0007】

本発明は、腫瘍細胞の転移性能獲得又はアポトーシス抵抗性獲得といった悪性化を抑制 するための抑制剤及び抗腫瘍剤を提供することを主たる目的とする。

【課題を解決するための手段】

[0008]

10

本発明者らは、鋭意研究した結果、腫瘍細胞においてZic5(Zic family member 5 (odd-paired homolog, Drosophila))遺伝子の発現を抑制することにより、E-カドヘリンの発現量低下が抑制されること、Zic5タンパク質がE-カドヘリンの転写因子として機能することを見出し、本発明を完成させた。

【 0 0 0 9 】

すなわち、本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤、腫瘍細胞の悪性化抑制方法、抗腫瘍 剤、及び腫瘍細胞の悪性度の評価方法は、下記 [1]~[11]である。

 [1] Zic5遺伝子の発現を阻害する物質を有効成分とし、腫瘍細胞の転移性能獲得 又はアポトーシス抵抗性獲得を抑制又は阻害し、前記Zic5遺伝子の発現を阻害する物 質がZic5遺伝子を標的とし、RNA干渉によりその発現自体を抑制させる核酸であり 、前記腫瘍細胞がメラノーマ細胞又は前立腺がん細胞である、腫瘍細胞の悪性化抑制剤。
 [2] 前記Zic5遺伝子の発現を阻害する物質が、Zic5遺伝子を標的とするsi RNAである、前記[1]の腫瘍細胞の悪性化抑制剤。

20

[3] 前記腫瘍細胞が、BRAF阻害剤耐性を有する、前記[1]又は[2]の腫瘍細胞の悪性化抑制剤。

「4] ヒト以外の動物の腫瘍細胞の悪性化を抑制する方法であって、

Zic5遺伝子の発現を阻害することにより、腫瘍細胞の転移性能獲得又はアポトーシス抵抗性獲得を抑制又は阻害し、前記腫瘍細胞がメラノーマ細胞又は前立腺がん細胞である、腫瘍細胞の悪性化抑制方法。

[5] Zic5遺伝子の発現の阻害を、RNA干渉により、Zic5遺伝子の発現を阻 ³⁰ 害することにより行う、前記「4]の腫瘍細胞の悪性化抑制方法。

[6] Zic5遺伝子の発現を阻害する物質<u>であって、Zic5遺伝子を標的とし、R</u> <u>NA干渉によりその発現自体を抑制させる核酸</u>を有効成分とし、メラノーマの治療に用い られる、抗腫瘍剤。

[7] BRAF阻害剤耐性を有するメラノーマ、又はBRAF阻害剤への治療適性のな いメラノーマの治療に用いられる、前記[6]の抗腫瘍剤。

[8] Zic5遺伝子の発現を阻害する物質<u>であって、Zic5遺伝子を標的とし、R</u> <u>NA干渉によりその発現自体を抑制させる核酸</u>を有効成分とし、前立腺がんの治療に用い られる、抗腫瘍剤。

[9] 前記Zic5遺伝子の発現を阻害する物質が、Zic5遺伝子を標的とするsi ⁴⁰ RNAである、前記[6]~[8]のいずれかの抗腫瘍剤。

[10] 被検腫瘍細胞のZiC5遺伝子の発現量をマーカーとし、前記被検腫瘍細胞が メラノーマ細胞又は前立腺がん細胞であり、

被検腫瘍細胞のZic5遺伝子の発現量が多いほど、悪性度が高いと評価する、腫瘍細胞の悪性度の評価方法。

[11] 前記被検腫瘍細胞が原発性腫瘍細胞であり、前記被検腫瘍細胞のZic5遺伝子の発現量が、所定の閾値以上である場合に、前記被検腫瘍細胞が転移性能又はアポトーシス抵抗性を獲得したリスクが高いと評価する、前記[10]の腫瘍細胞の悪性度の評価方法。

【発明の効果】

[0010]

本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤及び抗腫瘍剤は、腫瘍細胞における E - カドヘリ ンの発現量低下を抑制し、転移性能獲得又はアポトーシス抵抗性獲得といった悪性化を抑 制することができる。本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤等は、 B R A F ^{V 6 0 0 E} 変 異を有する腫瘍細胞や、 B R A F 阻害剤 V e m u r a f e n i b に対する薬剤耐性を獲得 した腫瘍細胞に対しても悪性化抑制作用及び抗腫瘍作用を有することから、腫瘍治療に非 常に有効な新規薬剤である。

また、腫瘍細胞のZic5遺伝子の発現量は、腫瘍細胞の悪性度マーカーとして有用で あり、よって本発明に係る腫瘍細胞の悪性度の評価方法は、転移性腫瘍の早期発見や、薬 剤耐性獲得のリスク評価に有用である。

【図面の簡単な説明】

[0011]

【図1】実施例1において、各細胞のGAPDHを内部標準としたZic5遺伝子の発現 量の定量結果を示した図である。

【図2】実施例1において、ヒトメラノーマ臨床検体を、抗ZIC5抗体を用いて免疫組 織染色した染色像である。

【図3】実施例1において、図3の染色像について、染色強度に基づいてZic5遺伝子の発現量をスコア化した結果を示した図である。

【図4】実施例2において、Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株のウェスタンプロット像である。

20

10

【図5】実施例2において、Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株のGAPD Hを内部標準としたCDH1遺伝子(E-カドヘリンをコードする遺伝子)のmRNAの 相対発現量の測定結果を示した図である。

【図6】実施例2において、RNA干渉によるZic5遺伝子発現を抑制した場合の、Z ic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株のGAPDHを内部標準としたCDH1遺 伝子のmRNAの相対発現量の測定結果を示した図である。

【図7】実施例2において、siZIC5#1、siZIC5#2、siNeg#1、又 はsiNeg#2を導入したSK-MEL-28細胞とA375細胞のGAPDHを内部 標準としたZic5遺伝子及びCDH1遺伝子のmRNAの相対発現量の測定結果を示し た図である。

【図8】実施例3において、Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株の、Tra nswell Migrationアッセイの移動細胞数の計数結果(上段)と、ウェス タンブロット像(下段)である。

【図9】実施例3において、siZIC5#1、siZIC5#2、siNeg#1、又 はsiNeg#2を導入したSK-MEL-28細胞とA375細胞の、Transwe 11 Migrationアッセイの移動細胞数の計数結果(上段)と、ウェスタンブロ ット像(下段)である。

【図10】実施例3において、siZIC5#1、siZIC5#2、siNeg#1、 又はsiNeg#2を導入したA375細胞の、Transwell Invasion アッセイの浸潤細胞数の計数結果を示した図である。

【図11】実施例3において、Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株の、RO CK阻害剤(Y27632)処理下又は未処理下の、Transwell Migrat ionアッセイの移動細胞数の計数結果を示した図である。

【図12】実施例3において、siZIC5#1、siZIC5#2、siNeg#1、 又はsiNeg#2を導入したA375細胞とSK-MEL-28細胞の細胞数を経時的 に測定した結果を示した図である。

【図13】実施例3において、MTTアッセイによってZic5遺伝子安定発現株とF1 ag安定発現株の生存細胞の相対数の測定結果を示した図である。

【図14】実施例3において、各細胞のsubG1期にある細胞の割合(%)を示した図である。

30

【図15】実施例4において、各細胞を皮下移植されたヌードマウスの腫瘍組織の大きさ (A)及び重量(B)の経時的変化を示した図である。 【図16】実施例4において、shNeg株、shZic5-1株又はshZic5-2 株を注入したヌードマウスにおける肺転移能を測定した結果を示した図である。 【図17】実施例5において、EMSAにおいて用いた3種のプローブの塩基配列のアラ インメント図である。 【図18】実施例5において、EMSAの電気泳動したゲルをHRP標識ストレプトアビ ジンで染色した染色像である。 【図19】実施例5において、クロマチン免疫沈降法において、マウスIgG又は抗HA 10 抗体で沈降させたDNAの相対量の測定結果を示した図である。 【図20】実施例5において、ルシフェラーゼレポーターアッセイの結果を示した図であ る。 【図21】実施例5において、変異導入前のE-カドヘリンプロモーター領域(pCDH 1)と一塩基置換変異を導入した変異体GBSmut及びM5mutの塩基配列のアライ ンメント図である。 【図22】実施例5において、変異導入前のpCDH1と、変異体GBSmut及びM5 mutとのルシフェラーゼレポーターアッセイの結果を示した図である。 【図23】実施例6において、siZIC5又はsiNegを導入したA375細胞及び HT144細胞におけるPDGFD遺伝子の相対mRNA発現量の測定結果を示した図で 20 ある。 【図24】実施例6において、Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株のPDG FD遺伝子の相対mRNA発現量の測定結果を示した図である。 【図25】実施例6において、siPDGFD#1、siPDGFD#2、又はsiNe g # 1を導入したA375細胞の細胞数を経時的に測定した結果を示した図である。 【図26】実施例6において、siZIC5又はsiNegを導入したA375細胞及び H T 1 4 4 細胞における I T G A 6 遺伝子の相対 m R N A 発現量の測定結果を示した図で ある。 【図27】実施例6において、Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株のITG A 6 遺伝子の相対mRNA発現量の測定結果を示した図である。 30 【図28】実施例6において、ラットIgG又は抗ITGA6抗体で処理したA375細 胞の相対細胞数の測定結果を示した図である。 【図29】実施例6において、Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株の細胞に 、siPDGFD#1又はsiNeg#1を導入した細胞のTranswell Mig rationアッセイの相対移動細胞数の測定結果を示した図である。 【図30】実施例7において、PLX4032処理後又はDMSO処理のZic5遺伝子 安定発現株及びF1ag安定発現株の相対細胞数の測定結果を示した図である。 【 図 3 1 】 実施例 7 において、 B R A F 阻害剤 P L X 4 0 3 2 処理後又は D M S O 処理の Zic5遺伝子安定発現株及びFlag安定発現株のAnnexin Vポジティブ細胞 の割合(%)の測定結果を示した図である。 40 【図32】実施例7において、siNeg、siZIC5、siPDGFD、又はsiI TGA6を導入したA375細胞のPLX4032処理後又はDMSO処理におけるAn nexin Vポジティブ細胞の割合(%)の測定結果を示した図である。 【図33】実施例7において、siNeg、siZIC5、siPDGFD、又はsiI TGA6を導入したA375細胞をPLX4032処理後又はDMSO処理における相対 細胞数の測定結果を示した図である。 【図34】実施例7において、ラットIgG又は抗ITGA6抗体で処理したA375細 胞のPLX4032処理後又はDMSO処理におけるAnnexin Vポジティブ細胞

(6)

の割合(%)の測定結果を示した図である。

【図35】実施例7において、siNeg又はsiPDGFDを導入したZic5遺伝子 安定発現株とF1ag安定発現株(左図)、及びラットIgG又は抗ITGA6抗体で処 50

理した Z i c 5 遺伝子安定発現株と F l a g 安定発現株(右図)の、 P L X 4 0 3 2 処理 における A n n e x i n V ポジティブ細胞の割合(%)の測定結果を示した図である。 【図 3 6】実施例 7 において、 s i N e g 又は s i Z I C 5 を導入した A 3 7 5 細胞のM E K 阻害剤 U O 1 2 6 処理後、若しくはオキサリプラチン処理後又は D M S O 処理におけ る、 A n n e x i n V ポジティブ細胞の割合(%)の測定結果を示した図である。

【図37】実施例8において、5種類のVemurafenib耐性株(vemR-1~ 5)とA375細胞を、各濃度のPLX4032で48時間処理した後の相対細胞数の測 定結果を示した図である。

【図38】実施例8において、PLX4032処理後又はDMSO処理した後のvemR - 1 ~ 5細胞及びA375細胞のウェスタンブロット像である。

【図39】実施例8において、siNeg、siZIC5、又はsiPDGFDを導入したvemR-1~5細胞及びA375細胞の相対細胞数の測定結果を示した図である。

【図40】実施例9において、3種類のVemurafenib耐性株(vemR-1~3)とHT144細胞を、各濃度のPLX4032で48時間処理した後の相対細胞数の測定結果を示した図である。

【図41】実施例9において、PLX4032処理後又はDMSO処理した後のvemR -1~3細胞及びHT144細胞のウェスタンブロット像である。

【図42】実施例9において、siNeg、siZIC5、siPDGFD、又はsiI TGA6を導入したvemR-1~3細胞及びHT144細胞の相対細胞数の測定結果を 示した図である。

20

10

【図43】実施例10において、ヒト前立腺がん臨床検体を、抗ZIC5抗体を用いて免 疫組織染色した染色像を、染色強度に基づいてZic5遺伝子の発現量をスコア化した結 果を示した図である。

【 図 4 4 】 実施例 1 0 において、 s i Z I C 5 # 1 、 s i Z I C 5 # 2 、 s i N e g # 1 、 又は s i N e g # 2 を導入した D U 1 4 5 細胞の相対細胞数の測定結果を示した図であ る。

【図45】実施例10において、siZIC5#1又はsiNeg#1を導入したDU1 45細胞又はPC細胞におけるAnnexin Vポジティブ細胞の割合(%)の測定結 果を示した図である。

【図46】実施例10において、siZIC5#1又はsiNeg#1を導入したDU1 ³⁰
 45細胞におけるZic5遺伝子、PDGFD遺伝子、及びITGA6遺伝子の相対mR
 NA発現量の測定結果を示した図である。

 【図47】実施例10において、siPDGFD#1、siPDGFD#2、又はsiI TGA6#1を導入したDU145細胞の相対細胞数の測定結果を示した図である。

【図48】実施例10において、siPDGFD#1、siPDGFD#2、又はsiI TGA6#1を導入した後、docetaxel処理後又はDMSO処理したDU145 細胞におけるAnnexin Vポジティブ細胞の割合(%)の測定結果を示した図であ る。

【図49】実施例11において、siPDGFD又はsiNegを導入したA375細胞のウェスタンプロット像である。

40

50

【図50】実施例11において、 h P D G F D 過剰発現株とp c D N A 株のウェスタンブ ロット像である。

【図 5 1】実施例 1 1 において、 F A K 阻害剤処理後の A 3 7 5 細胞のウェスタンブロット像である。

【図52】実施例11において、STAT3阻害剤処理後のA375細胞のウェスタンブロット像である。

【図53】実施例11において、IL-6処理後のA375細胞のウェスタンブロット像である。

【 図 5 4 】実施例 1 2 において、 s i N e g # 1 、 s i N e g # 2 、 s i Z I C 5 # 1 、 又は s i P D G F D # 1 を導入した v e m R - 3 細胞の A n n e x i n V ポジティブ細

(7)

胞の割合(%)の測定結果を示した図である。

【図55】実施例12において、siZIC5#1又はsiPDGFD#1を導入し、さ らに В R A F 阻害剤 P L X 4 0 3 2 処理した v e m R - 3 細胞のウェスタンブロット像で ある。

(8)

【発明を実施するための形態】

[0012]

本発明及び本願明細書において、「腫瘍細胞の悪性化」は、腫瘍細胞が、転移性能を獲 得したり、アポトーシス抵抗性等の薬剤耐性を獲得する現象を意味する。

[0013]

10 本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤は、Ζic5遺伝子の機能を抑制又は阻害する物 質を有効成分とし、腫瘍細胞の転移性能獲得又はアポトーシス抵抗性獲得を抑制又は阻害 することを特徴とする。Zic5遺伝子がコードするZic5タンパク質は、E‐カドヘ リンをコードする遺伝子(CDH1遺伝子)のプロモーター領域中の配列GGGCGGT に結合することにより、 E - カドヘリンの発現を制御する。 Z i c 5 遺伝子の発現量が多 くなるほど、E-カドヘリンの発現が抑制され、EMTが生じ、転移性能やアポトーシス 抵抗性を獲得しやすくなる。逆に、Zic5遺伝子の発現を抑制することにより、E-カ ドヘリンの発現量の低下が抑制され、EMTが生じにくくなる。このため、本発明に係る 腫瘍細胞の悪性化抑制剤を腫瘍細胞内に導入することによって、EMTを抑制し、悪性化 を抑制できる。Ζic5タンパク質がCDH1遺伝子の転写因子としての機能を有するこ とは、本願発明者らによって初めて見出された知見である。なお、Zic5タンパクは、 E - カドヘリン以外のタンパク質をコードする遺伝子の転写因子としても機能する可能性 があり、当該タンパク質の発現を制御することによっても腫瘍細胞の悪性化が抑制されて いる可能性がある。

[0014]

Zic5遺伝子の機能の抑制又は阻害は、Zic5遺伝子の発現を阻害することによっ て達成できる。すなわち、本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤の有効成分であるZic 5遺伝子の機能を抑制又は阻害する物質としては、RNA干渉等により、Ζic5遺伝子 の発現自体を抑制させる作用を有する物質が挙げられる。当該物質としては、例えば、乙 i c 5 遺伝子の c D N A の部分領域 (R N A i (R N A 干渉) 標的領域)のセンス鎖とア ンチセンス鎖からなる二本鎖構造を有するsiRNA(small interferi RNA)、shRNA(short hairpin RNA)又はmiRNA(ng micro RNA)が挙げられる。また、標的である腫瘍細胞内において、siRNA 等を生産させることができるRNAi誘導ベクターであってもよい。siRNA、shR NA、miRNA、及びRNAi誘導ベクターの作製は、標的とするZic5遺伝子のc DNAの塩基配列情報から、常法により設計し製造することができる。また、RNA i 誘 導ベクターは、市販の各種RNAiベクターの塩基配列に、RNAi標的領域の塩基配列 を挿入することによって作製することもできる。

[0015]

本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤の有効成分としては、乙ic5タンパク質に直接 40 又は間接的に結合することによって、Zic5タンパク質がCDH1遺伝子のプロモータ - 配列に結合することを抑制又は阻害する物質であってもよい。当該物質としては、特に 限定されるものではなく、核酸、ペプチド、タンパク質、低分子化合物のいずれであって もよい。

[0016]

Zic5タンパク質に結合してZic5タンパク質とCDH1遺伝子のプロモーター配 列との相互作用を阻害する核酸としては、例えば、CDH1遺伝子のプロモーター配列中 のZic5タンパク質との結合領域(GGGCGGT)と同一又は相同性の高い塩基配列 を有する核酸分子(いわゆる、デコイ核酸)が挙げられる。デコイ核酸としては、DNA であってもよく、RNAであってもよい、また、1本鎖核酸であってもよく、2本鎖核酸 であってもよい。生体内での安定性に優れることから、デコイ核酸としては、2本鎖DN 20

30

Aが好ましい。

【 0 0 1 7 】

Zic5タンパク質に結合してZic5タンパク質とCDH1遺伝子のプロモーター配列との相互作用を阻害するタンパク質としては、例えば、抗ZIC5抗体が挙げられる。 当該抗体としては、モノクローナル抗体でもよく、ポリクローナル抗体でもよい。また、 キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等の人工的に合成された抗体であってもよい。これ らの抗体は、常法により製造することができる。

(9)

[0018]

また、本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤の有効成分としては、Zic5タンパク質 の核内局在を阻害する物質であってもよい。Zic5タンパク質の核内局在が阻害される と、Zic5タンパク質はCDH1遺伝子のプロモーター配列と結合できず、CDH1遺 伝子の転写因子としての機能が阻害される。Zic5タンパク質の核内局在を阻害する物 質としては、Zic5タンパク質の核内への移行を阻害する物質であってもよく、核外へ の排出を促進する物質であってもよい。核内移行を阻害する物質としては、例えば、Zi c5タンパク質と、Zic5タンパク質の核内移行シグナルを被覆するように結合する物 質が挙げられる。当該物質としては、タンパク質やペプチドであってもよく、低分子化合 物であってもよい。

【0019】

本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤の有効成分としては、Zic5タンパク質を分解 する物質であってもよい。Zic5タンパク質自体が分解されることにより、その機能は ²⁰ 阻害される。Zic5タンパク質を分解する物質としては、Zic5タンパク質を直接分 解する分解酵素であってもよく、タンパク質分解酵素の基質になるようにポリユビキチン 等の各種標識を行う物質であってもよい。

[0020]

本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤は、経口投与、静注、鼻腔又は口腔への直接投与 、経皮投与等の各種投与形態に適した剤型に、常法により製剤化できる。当該剤型として は、錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、チュアブル剤、シロップ剤、液剤、懸濁剤、注射 剤、含嗽剤、噴霧剤、貼付剤、軟膏剤等が挙げられる。

【0021】

本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤は、有効成分であるZic5遺伝子の機能を抑制 30 又は阻害する物質に加えて、各種添加剤を含有していてもよい。当該添加剤としては、賦 形剤、結合剤、滑沢剤、湿潤剤、溶剤、崩壊剤、溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、等張化 剤、安定化剤、緩衝剤、防腐剤、抗酸化剤、矯味矯臭剤、着色剤等が挙げられる。これら の添加剤としては、薬学上許容される物質であって、医薬の製剤化に使用されているもの の中から適宜選択して使用することができる。

【0022】

本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤をヒトやヒト以外の動物に投与し、Zic5遺伝 子の機能を抑制又は阻害することにより、腫瘍細胞の転移性能獲得又はアポトーシス抵抗 性獲得を抑制又は阻害し、これらの動物の腫瘍細胞の悪性化を抑制することができる。当 該動物としては、特に限定されるものではなく、ヒトであってもよく、ヒト以外の動物で あってもよい。非ヒト動物としては、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、サル、イヌ、ネ コ、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等の哺乳動物や、ニワトリ、ウズ ラ、カモ等の鳥類等が挙げられる。

本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤は、様々な腫瘍細胞に対して悪性化を抑制できる。標的とされる腫瘍細胞は、転移性がん由来の腫瘍細胞であってもよいが、悪性化抑制効果が充分に発揮できることから、原発性がん由来の腫瘍細胞であることが好ましい。 【0024】

本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤により標的とされる腫瘍細胞の種類は特に限定されるものではなく、皮膚がん、前立腺がん、甲状腺がん、肺がん、乳がん、肝臓がん、膵 50

臓がん、胆管がん、副腎がん、胃がん、大腸がん、腎臓がん、子宮頸がん、子宮体がん、 卵巣がん、膀胱がん、脂肪肉腫、線維肉腫、平滑筋肉腫、黄紋筋肉腫、滑膜肉腫、悪性末 梢神経腫瘍、骨肉腫、軟骨肉腫、白血病、リンパ腫、骨髄腫等の細胞が挙げられる。本発 明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤が治療剤として用いられる腫瘍細胞としては、元々E-カドヘリンの発現量の多い上皮性細胞に由来する腫瘍細胞であることが好ましく、Zic 5遺伝子の発現量も多いことから皮膚がん細胞又は前立腺がん細胞が好ましく、メラノー マ細胞又は前立腺がん細胞がより好ましい。特に、本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤 は、vemurafenib等のBRAF阻害剤に対する耐性を有する腫瘍細胞やBRA F阻害剤への治療適性のない(すなわち、BRAF^{v600 E}変異を有さない)腫瘍細胞 に対しても悪性化抑制作用を奏することから、これらの腫瘍細胞を有する腫瘍の治療に好 適に用いられる。

【0025】

メラノーマ等の皮膚がんや前立腺がんにおいては、Zic5遺伝子の機能を抑制又は阻 害することにより、悪性化が抑制できるだけではなく、腫瘍細胞の増殖も抑制できる。こ のため、Zic5遺伝子の機能を抑制又は阻害する物質は、メラノーマ等の皮膚がんや前 立腺がんの治療に用いられる抗腫瘍剤の有効成分として用いることもできる。当該Zic 5遺伝子の機能を抑制又は阻害する物質としては、本発明に係る腫瘍細胞の悪性化抑制剤 の有効成分と同様のものが使用できる。特に、本発明に係る抗腫瘍剤は、従来、有効な治 療剤がなかったBRAF阻害剤耐性を有するメラノーマや、BRAF阻害剤への治療適性 のないメラノーマに対し、非常に有効な治療剤である。

[0026]

Zic5遺伝子の発現量が多い腫瘍細胞ほど、E-カドヘリンの発現が抑制され、EM Tが生じ、悪性化しやすくなる。逆に、Zic5遺伝子の発現量が少ない腫瘍細胞ほど、 E-カドヘリンの発現量が低下せず、EMTが生じ難く、悪性化し難い。このため、腫瘍 細胞のZic5遺伝子の発現量は、悪性度マーカーとして有用である。すなわち、被検腫 瘍細胞のZic5遺伝子の発現量をマーカーとし、Zic5遺伝子の発現量に基づいて、 当該被検腫瘍細胞の悪性度を評価することができる。

【 0 0 2 7 】

例えば、被検腫瘍細胞のZic5遺伝子の発現量が多いほど、悪性度が高いと評価する ことができる。逆に、被検腫瘍細胞のZic5遺伝子の発現量が少ないほど、悪性度が低 いと評価することができる。また、被検腫瘍細胞のZic5遺伝子の発現量を、予め設定 された閾値と比較し、当該被検腫瘍細胞の悪性度を評価してもよい。Zic5遺伝子の発 現量が、予め設定された閾値よりも多い場合には被検腫瘍細胞の悪性度は高いと評価し、 予め設定された閾値よりも少ない場合には被検腫瘍細胞の悪性度は低いと評価する。例え ば、被検腫瘍細胞が原発性腫瘍細胞であり、当該被検腫瘍細胞のZic5遺伝子の発現量 が、所定の閾値以上である場合に、当該被検腫瘍細胞が転移性能又はアポトーシス抵抗性 を獲得したリスクが高いと評価することができる。

【0028】

当該閾値は、Zic5遺伝子の発現量の測定方法の種類等を考慮して、また必要な予備 検査等を行うことにより、適宜設定することができる。例えば、その他の検査方法の結果 から、悪性化していないことが確認されている腫瘍細胞や非腫瘍細胞の細胞群(非悪性化 群)のZic5遺伝子の発現量の測定値と、転移性能又はアポトーシス抵抗性を獲得して いることが確認されている腫瘍細胞の細胞群(悪性化群)のZic5遺伝子の発現量の測 定値とを比較することにより、両群を識別するための閾値を適宜設定することができる。 【0029】

被検腫瘍細胞のZic5遺伝子の発現量は、mRNAレベルで測定してもよく、タンパク質レベルで測定してもよい。Zic5遺伝子の発現量の測定方法としては、細胞中の標的タンパク質量又は標的のmRNA量を定量的又は半定量的に測定可能な方法であれば特に限定されるものではなく、検体中のmRNAやタンパク質の検出に用いられる公知の方法の中から、適宜選択して用いることができる。各方法は常法により行うことができる。

20

10

 $\begin{bmatrix} 0 & 0 & 3 & 0 \end{bmatrix}$

Zic5遺伝子のmRNA量は、Zic5遺伝子のmRNAとハイブリダイズし得るプ ローブを用いたハイブリダイゼーション法により検出してもよく、Zic5遺伝子のmR NAとハイブリダイズし得るプライマーとポリメラーゼとを用いた核酸増幅反応を利用し た方法により検出してもよい。その他、市販されている検出用キット等を利用することも できる。例えば、被検腫瘍細胞から抽出した総RNAを鋳型として逆転写反応を行うこと によりcDNAを合成した後、得られたcDNAを鋳型としてPCR(Polymera se Chain Reaction)等を行い、得られた増幅産物量を測定することに よって、Zic5遺伝子のmRNA量を定量できる。増幅産物量は、ゲルやキャピラリー 電気泳動等で特異的に分離した後、それを検出することにより定量的に測定することがで きる。また、PCRに代えてリアルタイムPCR等の半定量的PCRを行うことにより、 Zic5遺伝子のmRNAの検出と同時にその定量を簡便に行うことができる。 【0031】

Zic5タンパク質量は、Zic5タンパク質と特異的に結合する抗体(抗ZIC5抗体)を用いて測定することができる。例えば、抗ZIC5抗体を一次抗体とした免疫染色を行い、染色の有無や染色強度に基づいて、被検腫瘍細胞中におけるZic5の発現の有無や発現強度を調べる。当該免疫染色は、酵素標識した抗体を用いる酵素抗体染色法であってもよく、蛍光標識した抗体を用いる蛍光抗体染色法であってもよい。また、被検腫瘍細胞のZic5タンパク質量は、被検腫瘍細胞から調製された細胞抽出液中のタンパク質を、SDS-PAGE等により分離させた後、ウェスタンブロット法等により定量的に測定することができる。

【0032】

メラノーマ細胞や前立腺がん細胞は、がん化する前の細胞に比べてZic5遺伝子の発 現量が多い。このため、Zic5遺伝子の発現量は、メラノーマ又は前立腺がんを検出す ることを特徴とする腫瘍マーカーとしても有用である。例えば、Zic5遺伝子の発現量 が、予め設定された閾値よりも多い場合には被検細胞はメラノーマ細胞又は前立腺がん細 胞であると評価し、予め設定された閾値よりも少ない場合には被検細胞はがん化していな い細胞であると評価する。例えば、その他の検査方法の結果から、がん化していないこと が確認されている細胞の細胞群(正常細胞群)のZic5遺伝子の発現量の測定値と、メ ラノーマ細胞であることが確認されている細胞の細胞群(メラノーマ細胞群)のZic5 遺伝子の発現量の測定値とを比較することにより、両群を識別するための閾値を適宜設定 することができる。

30

10

20

【実施例】

【0033】

次に実施例等を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定 されるものではない。なお、動物実験は、学校法人東京薬科大学において、倫理委員会の 承認の下、動物実験の研究ガイドラインを遵守して行われた。

[0034]

<細胞培養>

以下の実施例において、使用した細胞の培養は以下の通りにして行った。

40

メラノーマ細胞株である4種類の細胞株(SK-MEL-28細胞、Colo829細胞、HT144細胞、及びA375細胞)、及び前立腺がん細胞株であるDU145細胞は、ATCC(American Type Culture Collection)より分譲されたものを用いた。前立腺がん細胞株であるPC3細胞は、JCRB細胞バンク(独立行政法人医薬基盤研究所)より分譲されたものを用いた。HEK293細胞とHeLa細胞は、非特許文献12に記載のものを用いた。これらの細胞は、37 、5%CO₂存在下、10%ウシ胎児血清を含有させたRPMI 1640培地(インビトロジェン社製)中で培養した。

【 0 0 3 5 】

[実施例1]

がん細胞の悪性化と個体発生時に重要な役割を果たすEMTの共通性に着目し、神経冠 50

の発生に関与する遺伝子群に対するヒト型siRNAライブラリーを作製し、RNA干渉 法を利用して、BRAF^{V600E}変異を有するメラノーマ細胞株におけるE-カドへリ ンの発現抑制作用を有する遺伝子を探索した。

【 0 0 3 6 】

< R N A 干渉による、 E - カドヘリン発現量に対する影響の測定 >

まず、神経冠細胞の形成・分化に必須であり、かつ、がん細胞における詳細な分子機構 が解明されていない遺伝子を26個選別し、各遺伝子についてそれぞれRNA干渉を行い 、E-カドヘリンの発現量に対する影響を調べた。具体的には、各遺伝子に対して2種類 のsiRNA(キアゲン社製)をそれぞれ導入した細胞のE-カドヘリンを、蛍光免疫染 色法により検出し、その発現量を定量した。この結果、26個の遺伝子のうち、Zic5 、BMPER、TES、SULF1、SULF2、及びSOX10の6個の遺伝子が、s iRNA導入により発現を抑制した細胞において、SK-MEL-28細胞及びCo10 829細胞の両方において、E-カドヘリンの発現量が、ネガティブコントロールsiR NAを導入した細胞に比べて1.5倍以上に上昇した。

【0037】

<ウェスタンブロット法によるZic5遺伝子の発現確認>

メラノーマ及びメラノサイトにおけるZic5遺伝子の発現量をタンパク質レベルで確 認するため、メラノーマ細胞株であるA375細胞、HT144細胞、COLO829細 胞、及びSK-MEL-28細胞、並びにヒト正常メラノサイト(NHM)におけるZi c5遺伝子の発現量を、ウェスタンブロット法によって調べた。GAPDH(glyce raldehyde-3-phosphate dehydrogenase)を内部コ ントロールとして使用した。ウェスタンブロット法は、抗ZIC5抗体(Aviva s ystems biology社製)及び抗GAPDH抗体(Cell Signali ng社製)を用いて、カネマルらの方法(非特許文献13参照。)に準じて行った。 【0038】

各細胞のGAPDHを内部標準としたZic5タンパク質の発現量の定量結果を図1に 示す。図1中、下段が各細胞のウェスタンブロットの結果であり、上段がウェスタンブロ ットで検出された各バンドの染色強度に基づいて算出されたZic5タンパク質の発現量 (相対値)である。その結果、Zic5遺伝子の発現量は、ヒト正常メラノサイトに比べ て、全てのメラノーマ細胞株において高いことが確認できた。

【0039】

< ヒトメラノーマ組織切片の Z I C 5 染色 >

また、ヒトメラノーマの患者組織切片であって、良性母斑(Benign nevus)の組織切片18枚、がん組織部位(Melanoma)の組織切片56枚、及び転移部 位(Metastasis)の組織切片26枚が含まれている組織マイクロアレイ(US Biomax社から購入)に対して、抗乙IC5抗体(Aviva systems biology社製)を用いて免疫組織染色を行い、ヒトメラノーマ臨床検体における乙 ic5タンパク質の発現を調べた。免疫染色像を、図2の上段に示す。この結果、良性母 斑に比べて、がん組織部位や転移部位では、乙ic5遺伝子の発現レベルが有意に亢進し ていることがわかった。

[0040]

また、各組織切片の染色像を、染色強度に基づいて4段階(0~3)にスコア化した。 各スコアの染色強度を図2下段に示し、各スコアの結果を図3に示す。図3の左図は、良 性母斑、がん組織部位、及び転移部位の染色像のZic5発現量スコアであり、図3の右 図は、ステージごとのZic5発現量スコアである。この結果、Zic5遺伝子の発現は 、メラノーマのステージが進行するほど高くなる傾向がみられた。

【0041】

これらの結果から、スクリーニングにより得た候補遺伝子 Zic 5は、E-カドヘリンの発現を制御し、メラノーマの進行に関与する可能性が示唆された。 【0042】 10

20

30

[実施例2]

メラノーマ細胞におけるZic5遺伝子の役割を解明するため、メラノーマ細胞株SK - M E L - 2 8 細胞を用いて、Z i c 5 遺伝子安定過剰発現株を作製し、転移関連遺伝子 について調べた。

(13)

[0043]

< Z i c 5 遺伝子安定発現株の作製 >

まず、ヒトZic5遺伝子のORFのcDNAをPCRにより増幅し、得られた増幅産 物を発現用プラスミドベクターpFlag-CMV-4(Sigma社製)にサブクロー ニングし、F1ag標識されたZIC5(F1ag-ZIC5)を発現するための発現べ クター(F1ag-ΖIC5発現ベクター)を調製した。得られたF1ag-ΖIC5発 現ベクターを、リポフェクタミン試薬「リポフェクタミン2000」(インビトロジェン 社製)を用い、製品添付のプロトコールに従ってSK-MEL-28細胞にトランスフェ クションした。トランスフェクション後の細胞を薄く播き、800µg/mLのG418 (インビトロジェン社製)を含有する培地中で10日間培養し、Zic5遺伝子安定発現 株を選抜した。

対照として、F1ag-ΖIС5発現ベクターに代えてF1agペプチドのみを発現さ せる空ベクター(pFlag-CMV-4)を用いた以外は同様にしてトランスフェクシ ョン及びG418選抜を行い、Flag安定発現株を得た。

[0044]

20 Z i c 5 遺伝子安定発現株とF1 a g 安定発現株 (コントロール細胞)の細胞の形態を 、顕微鏡観察により調べたところ、Zic5遺伝子安定発現株は、コントロール細胞と比 較して樹状突起の数が減少していることが観察された(図示せず。)。

[0045]

<ウェスタンブロット法による E - カドヘリン発現量の測定>

Zic5遺伝子安定発現株とF1ag安定発現株のE-カドヘリンのタンパク質量を、 GAPDHを内部標準としたウェスタンブロット法により測定した。ウェスタンブロット 法は、抗F1ag抗体(Sigma社製)、抗E-カドヘリン抗体(BDバイオサイエン ス社製)、及び抗GAPDH抗体(Cell Signaling社製)を用いて、カネ マルらの方法(非特許文献13参照。)に準じて行った。測定は、2回の独立した試行に より行った。

[0046]

各抗体により染色されたバンドを図4に示す。上段(「F1ag」)が抗F1ag抗体 で染色されたバンドであり、中段(「E-cad」)が抗E-カドヘリン抗体で染色され たバンドであり、下段(「GAPDH」)が抗GAPDH抗体で染色されたバンドである 。F1ag-ZIC5が発現しているZic5遺伝子安定発現株(図中、「F1ag-Z IC5」)では、コントロール細胞(図中、「pFlag」)に比べて顕著にE-カドへ リンの発現が抑制されていた。

[0047]

< q R T - P C R による E - カドヘリン量の測定 >

40 Z i c 5 遺伝子安定発現株とFlag安定発現株のCDH1遺伝子(E-カドヘリンを コードする遺伝子)のmRNA量を、qRT-PCRにより測定した。GAPDH遺伝子 のmRNA量を内部標準とした。測定は、2回の独立した試行により行った。

まず、各細胞の総RNAを回収し、これを鋳型として逆転写反応を行い、cDNAを合 成した。総RNAの回収には市販のキット「ReliaPrep RNA Cell Miniprep System」(プ ロメガ社製)を用い、逆転写反応には市販のキット「High Capacity cDNA Reverse Trans cription kit」(アプライドバイオシステムズ社製)を用い、それぞれ製品添付のプロト コールに従って行った。

次いで、得られたcDNAを鋳型とし、リアルタイムPCRを行った。リアルタイムP CRは、市販のキット「THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix」(東洋紡社製)とサーマルサイク ラー「CFX96」(バイオ・ラッド社製)を用いて行った。使用したプライマーを表1に示

10

30

す。 【 0 0 4 8 】 【 表 1 】

プライマー	塩基配列	配列番号
<i>CDH1</i> (E-cadherin)フォワード	GGACTTTGGCGTGGGCCAGG	1
<i>CDH1</i> (E-cadherin)リバース	CCCTGTCCAGCTCAGCCCGA	2
<i>GAPDH</i> フォワード	AGCCTCCCGCTTCGCTCTCT	3
GAPDHリバース	CCAGGCGCCCAATACGACCA	4

(14)

[0049]

各細胞のCDH1遺伝子のmRNA量は、GAPDH遺伝子のmRNA量によりノーマ ライズした。Zic5遺伝子安定発現株とF1ag安定発現株のCDH1遺伝子のmRN Aの相対発現量の平均値(n=3)を図5に示す。この結果、Zic5遺伝子安定発現株 では、E-カドへリンの発現が減少することが示された。

【0050】

< Z i c 5 遺伝子発現抑制の E - カドヘリン発現量への影響 >

Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株のZic5遺伝子をRNA干渉により 抑制した場合のCDH1遺伝子のmRNA量を、qRT-PCRにより測定した。

Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株に対して、表2に記載のsiZIC5 #2又はネガティブコントロールsiRNA(siNeg#1)を実施例1と同様にして 導入した。siRNA導入後の細胞のCDH1遺伝子のmRNA量を、GAPDH遺伝子 のmRNA量を内部標準とし、前記と同様にしてqRT-PCRにより測定した。

[0051**]**

【表2】

siRNA	標的配列	配列番号
siZic5 #1	AAGATTCGAGGCTGTGACAAA	5
siZic5 #2	GGCTGTGACAAATCCTACA	6
siNeg #1	AATTCTCCGAACGTGTCACGT	7
siNeg #2	ATCCGCGCGATAGTACGTA	8

30

【0052】

各細胞のCDH1遺伝子のmRNAの相対発現量の平均値(n=3)を図6に示す。この結果、Zic5遺伝子安定発現株におけるE-カドヘリンの発現減少は、RNA干渉によるZic5遺伝子発現抑制により回復することが示された。

【0053】

< 内在性のZIC 5 の機能 >

内在性のZIC5の役割を明らかにするため、メラノーマ細胞株SK-MEL-28細胞とA375細胞を用いて、RNA干渉によるZic5遺伝子の発現抑制の影響を検討した。

各細胞に対して、表2に記載のsiZIC5#1、siZIC5#2、siNeg#1
 、又はsiNeg#2を実施例1と同様にして導入した。siRNA導入後の細胞のZic5遺伝子、CDH1遺伝子、TYRP1遺伝子、TYR遺伝子、及びMMP2遺伝子のmRNA量を、GAPDH遺伝子のmRNA量を内部標準とし、前記と同様にしてqRT-PCRにより測定した。なお、Zic5遺伝子のmRNA量の定量には、表3に記載のプライマーを使用した。

【0054】

10

【表3】

プライマー	塩基配列	配列番号
<i>ZIC5</i> フォワード	CACCAGTGACAAGCCCTACT	9
<i>ZIC5</i> リバース	GAGTAACCAAGGGGTCCTGG	10

【0055】

s i Z I C 5 # 2 又は s i N e g # 2 を導入した細胞の透過光画像を比較したところ、 Z i c 5 遺伝子の発現抑制により、 A 3 7 5 細胞の形態変化が観察された(図示せず。) 。

また、各細胞のZic5遺伝子、CDH1遺伝子、TYRP1遺伝子、TYR遺伝子、 及びMMP2遺伝子のmRNAの相対発現量の平均値(n=3)を調べた(図示せず。) 。各細胞のZic5遺伝子及びCDH1遺伝子の測定結果を図7に示す。SK-MEL-28細胞とA375細胞のいずれにおいても、siZIC5#1又はsiZIC5#2を 導入した細胞ではZic5遺伝子のmRNAの相対発現量は顕著に減少していることが確 認された。また、siZIC5#1又はsiZIC5#2を導入した細胞では、CDH1 遺伝子、TYRP1遺伝子、及びTYR遺伝子の発現上昇とMMP2遺伝子の発現低下が 引き起こされていた。これらの結果から、Zic5遺伝子は、メラノーマ細胞において、 E-カドヘリンの抑制、細胞の脱分化の促進、細胞外基質分解酵素(MMP2)の発現亢 進を引き起こす因子であると考えられた。

【0056】

[実施例3]

ZIC5により引き起こされたE-カドヘリンの発現低下、脱分化、細胞外基質分解酵素 (MMP2)の発現亢進は、いずれも転移性メラノーマの特徴である。従って、次に、ZIC5がメラノーマ細胞の悪性形質である、運動能、浸潤能、増殖能に与える影響について検討を行った。

[0057]

< スクラッチアッセイ >

運動能を調べるため、無血清条件下でのスクラッチアッセイを行った。

具体的には、Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株を培養し、コンフルエン 30 トの細胞を黄色チップの先端で削った(スクラッチ)後、無血清培地中で培養した。スク ラッチから24時間経過後の細胞では、Flag安定発現株細胞と比較し、Zic5遺伝 子安定発現株では、移動細胞数が増加していた(図示せず。)。

【0058】

<Transwell Migrationアッセイ>

運動能を調べるため、血清入り条件下におけるTranswell Migration nアッセイを行った。

具体的には、Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株を、孔径8µmのインサート(BDバイオサイエンス社製)を入れた24ウェルプレートにまき、10%FBS含有RPMI1640培地中で培養し、移動した細胞数を計数した。計数結果を図8(上段)に示す。この結果、Flag安定発現株に比べて、Zic5遺伝子安定発現株では、移動細胞数が有意に増加していた。

【0059】

メラノーマの運動性の亢進に重要な因子として、Myosin light chai n 2(MLC2)が知られている。MLC2はリン酸化を受け活性化し、アクトミオシ ン収縮を促進することによって細胞運動を促進していることが知られている(非特許文献 14及び15参照。)。そこで、各細胞のリン酸化MLC2(ppMLC2)、MLC2 、及びGAPDHのタンパク質量を、ウェスタンブロット法により測定した。ウェスタン ブロット法は、抗ppMLC2抗体、抗MLC2抗体、及び抗GAPDH抗体(いずれも Cel1 Signaling社製)を用いて、カネマルらの方法(非特許文献13参照

10

20

40

【 0 0 6 0 】

各細胞のウェスタンブロットの結果を図8の下段に示す。この結果、Zic5遺伝子安 定発現株では、Flag安定発現株に比べてMLC2のリン酸化が亢進していることが明 らかになった。

[0061]

内在性のZic5遺伝子をsiRNAにより発現抑制した際のメラノーマ細胞の運動能 について、Transwell Migrationアッセイを行い検証した。具体的に は、メラノーマ細胞株SK-MEL-28細胞とA375細胞に、表2に記載のsiZI C5#1、siZIC5#2、siNeg#1、又はsiNeg#2を実施例1と同様に して導入した。各siRNAを導入した細胞に対して、前記と同様にしてTranswe 11 Migration アッセイを行い、移動した細胞数を計数した。計数結果を図9 (上段)に示す。この結果、両細胞とも、Zic5遺伝子の発現抑制により細胞移動率の 減少が観察された。また、SK-MEL-28細胞にsiRNAを導入した細胞について 、ppMLC2、MLC2、及びGAPDHのタンパク質量を、ウェスタンブロット法に より測定した。SK-MEL-28細胞のウェスタンブロットの結果を図9の下段に示す 。この結果、Zic5遺伝子の発現抑制によりppMLC2の減少も確認された。 【0062】

<Transwell Invasion アッセイ>

Transwell Invasion アッセイを、60µL(2.5mg/mL)の²⁰ BD Matrigel Basement Membrane Matrix Gro wth Factor Reduced(BDバイオサイエンス社製)が添加された細胞 培養インサートを用いて、ヒラノらの方法(非特許文献16)の方法に準じて行った。マ トリゲルに浸潤した細胞数を計数した。計数結果を図10に示す。この結果、Zic5遺 伝子の発現抑制による細胞浸潤率の低下が観察された。

[0063]

< MLC2リン酸化抑制下におけるTranswell Migrationアッセイ> MLC2リン酸化抑制の細胞移動性に対する影響を調べた。具体的には、Zic5遺伝 子安定発現株とFlag安定発現株に対して、ROCK阻害剤(Y27632)処理をし た状態又は未処理の状態で、前記の通りTranswell Migrationアッセ イを行い、移動した細胞数を計数した。計数結果を図11に示す。この結果、Zic5遺 伝子の過剰発現による移動細胞の増加は、ROCK阻害剤処理によるMLC2リン酸化の 抑制によって部分的に抑制できた。

[0064]

また、各細胞のppMLC2、MLC2、及びGAPDHのタンパク質を、前記と同様 にしてウェスタンプロット法により測定した。この結果、ROCK阻害剤未処理のZic 5遺伝子安定発現株で検出されたppMLC2のバンドが、ROCK阻害剤処理のZic 5遺伝子安定発現株ではほとんど検出されず、ROCK阻害剤処理により、Zic5遺伝 子安定発現株で亢進していたMLC2のリン酸化は、ROCK阻害剤処理により抑制され ていた(図示せず。)。

40

30

10

これらの結果から、 Z I C 5 はメラノーマ細胞の運動能を促進する因子であり、その一 因として M L C 2 のリン酸化の亢進があることが明らかになった。

【 0 0 6 5 】

<細胞増殖アッセイ>

細胞増殖アッセイを行い、Zic5遺伝子の細胞増殖に対する影響について検討した。
 細胞増殖アッセイは、ウェルあたり1,000~2,000個の細胞となるように96
 ウェルプレートにまいたA375細胞及びSK-MEL-28細胞に、表2に記載のsi
 ZIC5#1、siZIC5#2、siNeg#1、又はsiNeg#2を実施例1と同様にして導入した。各siRNAを導入した細胞の細胞数を、経時的に測定した。細胞数の計数は、細胞核をヘキスト33342(同仁化学研究所製)染色し、各ウェルの総細胞

数をIN Cell Analyzer 2000(GEヘルスケア社製)により計数した。各細胞の細胞数の平均値(n=3)を図12に示す。この結果、A375細胞及びSK-MEL-28細胞のいずれにおいても、ZIC5#1又はsiZIC5#2を導入した細胞では、細胞の増殖が鈍く、Zic5遺伝子の発現抑制によりメラノーマ細胞の増殖率が低下することが明らかになった。また、同じ傾向が、Colo829細胞とHT144細胞においても観察された(図示せず。)。

[0066]

また、Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株を9日間培養し、経時的にMT Tアッセイを行い、生存している細胞の相対数を測定した。測定結果を図13に示す。図 中、「」は、細胞がコンフルエントになった時点を示す。この結果、Zic5遺伝子安 ¹⁰ 定発現株では、細胞密度が高くなっても増え続ける現象が観察された。

【 0 0 6 7 】

< 細胞周期解析 >

Zic5遺伝子が、細胞周期に与える影響について、A375細胞に表2に記載のsi ZIC5#2又はsiNeg#2を実施例1と同様にして導入した細胞に対して、細胞周 期解析を行うことにより調べた。

細胞周期解析は、まず、24時間無血清培地で培養した後、10%FBS含有培地で24時間培養した。次いで、細胞を固定してPI(propidium iodide)染色した後、フローサイトメトリー解析(SH800,ソニー社製)を行った。得られたデータは、解析ソフトウェアFlowJo(トミーデジタルバイオロジー社製)により解析した。この結果、Zic5遺伝子の発現が抑制された細胞では、subG1期の細胞が増大していた。siZIC5#1又はsiNeg#1を導入した細胞でも同様の結果が得られた。subG1期の細胞数の割合(%)を図14に示す。統計学的差異は、Student's t-test(***:P<0.001、**:P<0.01、**:P<0.05)により求めた。

[0068]

これらの結果から、 Zic 5 遺伝子はメラノーマ細胞の増殖に促進的に働く因子である ことが明らかになった。

【0069】

[実施例4]

30

40

20

ここまでの結果より、Zic5遺伝子がメラノーマ細胞の細胞増殖、移動能、浸潤能を 促進することが確認されたため、生体内におけるメラノーマの増殖・転移について検討を 行った。

[0070]

<shZic5株及びshNeg株の作製>

転移能の高いA375細胞に、Zic5遺伝子に対するshRNA導入プラスミドを安 定的に組み込んだshZic5株、ネガティブコントロールshRNA導入プラスミドを 組み込んだネガティブコントロール株(shNeg株)を作製した。

ShNeg株は、A375細胞に、ShRNA発現用ベクターであるpSIREN-R etroQ-ZsGreen(クロンテック社製)を導入し、ShZic5-1株又はS hZic5-2株は、pSIREN-RetroQ-ZsGreenに下記表4に記載の 塩基配列を標的とするZic5用ShRNAを組み込んだものを導入した。ShRNAの 導入は、プラスミドの導入と同様にして行った。ShRNAを導入した細胞を限界希釈後 、GFP陽性クローンを単離し、安定発現株とした。

【0071】 【表4】

shRNA	標的配列	配列番号
shZIC5-1	GGCTGTGACAAATCCTACA	11
shZIC5-2	GATTCGAGGCTGTGACAAA	12

(17)

【0072】

< 生体内におけるZic5遺伝子の発現抑制とヒトメラノーマ細胞の増殖及び転移> 10,000,000個のshNeg株、shZic5-1株又はshZic5-2株 を0.1mLのPBSで懸濁した細胞懸濁液を、5週齢のBalb/c nu/nuヌー ドマウス(クレア社から購入)の皮下に注射した。皮下注射後、3~4日ごとに、形成された腫瘍組織の大きさ(V)を下記式に基づいて計測した。式中、「A」は腫瘍組織の最 大径であり、「B」は腫瘍組織の最小径である。

(18)

 $V = 1 / 2 (A \times B^2)$

【0073】

測定結果を図15に示す。図15(A)は計測された腫瘍組織の大きさVの結果であり (図15(B)は移植から34日目の腫瘍組織の重量である。統計学的差異は、Dunn ett's multiple comparison of means test(***: P<0.001)により求めた。この結果、shZic5-1株又はshZic 5-2株を移植した場合には、生体内腫瘍組織がほとんど大きくならず、顕著な腫瘍増殖 率の抑制が確認された。また、摘出した腫瘍の重さを測定した結果、shNeg株と比較 してshZic5-1株及びshZic5-2株において、腫瘍重量が著しく低下してい ることが明らかとなった。すなわち、Zic5遺伝子の発現を抑制することにより、生体 内においても腫瘍の増殖が抑制されることがわかった。

【0074】

<肺転移能の測定>

shNeg株、shZic5-1株又はshZic5-2株を、6週齢のBalb/c nu/nuヌードマウス(クレア社から購入)の尾静脈に注射して移植し、移植から2 .5か月目に、肺転移能を調べた。具体的には、肺に形成された結節の数を測定した。さ らに、マウス肺におけるヒトメラノーマ細胞の浸潤度を定量するため、マウス肺組織中の ヒトGAPDH遺伝子のmRNA量を測定した。なお、ヒトGAPDH遺伝子のmRNA 量は、qRT-PCRにより測定し、マウスGAPDH遺伝子のmRNA量によってノー マライズした。

[0075]

測定結果を図16に示す。図16(A)は、肺に形成された結節の数を測定した結果で あり、図16(B)は、これらの肺における、マウスGAPDH遺伝子のmRNA量によ ってノーマライズされたヒトGAPDH遺伝子のmRNA量の測定結果を示す。統計学的 差異は、Mann - Whitney's U - testにより求めた。この結果、肺にお ける腫瘍形成数は、shZic5 - 1株又はshZic5 - 2株を移植したマウスにおい て著しく減少していた。また、マウス肺に含まれるヒトGAPDH遺伝子のmRNA量は 、shNeg株と比較し、shZic5 - 1株又はshZic5 - 2株を注入したマウス で有意な減少が見られた。これらの結果から、ZIC5は、メラノーマ細胞の転移を促進 する因子であることが示唆された。

[0076]

[実施例5]

ZIC5はC2H2タイプのジンクフィンガードメインを持つZic familyに ⁴⁰ 属しており、このファミリーにはZic1-5が存在している。Zic1-3は転写因子 としての機能やターゲット遺伝子が報告されているが、Zic4とZic5については転 写因子としての機能やターゲット遺伝子に関しての報告がない。しかし、マウスZic5 ジンクフィンガードメイン(Zic5 ZF)は、他のZicと同様にGli bindi ng sequence(GBS)やいくつかのGBS変異導入配列に結合する能力があ ることが示されている(非特許文献17参照。)。

【0077】

ZIC5により発現変動する遺伝子のプロモーター領域について検討したところ、E-カドヘリンのプロモーター領域にマウスZic5 ZFが結合する配列GGGCGGTが 存在していた。そこで、ZIC5がE-カドヘリンプロモーターに結合し、転写調節する

20

可能性について、ゲルシフトアッセイ(electrophoretic mobili ty shift assay、EMSA)により検証した。 【0078】

図17に、EMSAに用いたオリゴヌクレオチドプローブの塩基配列のアラインメント 図を示す。図中、四角で囲まれた領域が推定ジンクフィンガードメイン結合配列である。 また、図中、「M5」は、GBSに一塩基置換変異をいれたもの、「pCDH1」はヒト CDH1遺伝子のプロモーター領域(E-カドヘリンプロモーター)、である。 【0079】

< E M S A >

具体的には、まず、ヒトZIC5のジンクフィンガードメインを、下記表5に記載の塩¹⁰ 基配列からなるフォワードプライマー及びリバースプライマーによってPCR増幅し、p GEX-6P(アマシャム・ファルマシア社製)にサブクローニングし、GSTと融合し たZIC5 ZF(GST-ZIC5 ZF)発現用ベクターを調製した。当該GST-ZIC5 ZFを大腸菌BL21株に導入し、発現させたGST-ZIC5 ZFをグル タチオンセファロースビーズ(GEヘルスケア社製)を用いて精製した。

[0080]

【表5】

プライマー	塩基配列	配列番号
ZIC5-ZF フォワード	CCCGGATCCGTGAATCACGTCACGGTGGAG	13
ZIC5-ZF リバース	CCCCTCGAGTTAGCAGTGAATCTTCATGTGCTTCC	14

[0081]

精製したGST-ZIC5 ZFを、図17に記載の塩基配列からなり、ビオチン標識 されたオリゴヌクレオチドからなる3種のプローブ(北海道システムサイエンス社製)(配列番号15~17)とそれぞれ結合バッファー(40mM Tris-HC1、pH8 .0、7mM MgC1₂、3mM DTT、0.1mg/mL ウシ血清アルブミン、 90mM NaC1、及び150ng poly(dI-dC))中でインキュベートし 、形成された複合体を6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動(泳動バッファー:0.5× TBEバッファー(pH8))により分離した。分離した複合体は、HRP(西洋ワサビ パーオキシダーゼ)標識したストレプトアビジンで検出した。電気泳動したゲルをHRP 標識ストレプトアビジンで染色して検出したバンドパターンを図18に示した。 【0082】

図18に示すように、ヒトZic5 ZFは、マウスZic5 ZFと同様にGBSに は結合するが変異を導入したM5には結合しないことが明らかになった。さらに、予想Z ic5 ZF結合配列を含むE-カドへリンプロモーター配列との結合も確認できた。こ の結果、ヒトZic5 ZFも、マウスZic5 ZFと同様の特性があり、E-カドへ リンプロモーター領域中の配列に結合し得ることが明らかになった。

【0083】

< クロマチン免疫沈降(C h I P) 法 >

次に、細胞内でヒトΖic5(全長)がE-カドヘリンプロモーター領域に結合するこ 40 とを確認するため、ChIP法を行った。

具体的には、HeLa細胞にHAタグ標識Zic5(Zic5-HA)を強制発現させ た後、1%ホルムアルデヒド溶液にて4 、3時間処理して細胞を固定させた後、グリシ ンを終濃度125mMとなるように添加して10分間置き、反応を終了させた。次いで、 当該細胞を2%FBS含有PBSで洗浄した後に、ライシスバッファー(5mM PIP ES(pH8.0)、85mM KC1、0.5% NP-40)で可溶化し、得られたラ イセートにMNase(タカラ社製)を添加して30分間、37 で処理した。MNas e処理後のライセートを10,000rpmで4 、10分間遠心分離処理し、上清を回 収した。

当該上清をChIP希釈用バッファー(50mM Tris-Hcl(pH8)、16 ⁵⁰

20

7 m M N a C 1、1.1% T r i t o n X - 100)で希釈した後、マウス I g G 又は抗 H A 抗体(シグマ社製)を添加し、4 で一晩、免疫沈降を行った。形成された免 疫複合体をプロテインA / G ビーズで回収し、 R I P A バッファー(100 m M T r i s - H C 1 (p H 8.0)、300 m M N a C 1、2 m M E D T A (p H 8.0)、 2% T r i t o n X - 100、0.2% S D S、0.2% デオキシコール酸ナト リウム)とL i C 1 バッファー(10 m M T r i s - H C 1 (p H 8.0)、0.25 M L i C 1、1 m M E D T A (p H 8.0)、0.5% N P - 40、0.5% デ オキシコール酸ナトリウム)で洗浄した。得られたタンパク質 - D N A 複合体は、65 で4時間加熱処理して逆クロスリンクし、次いでプロテイナーゼK処理した後、P C R 精 製キット(キアゲン社製)によりD N A を精製した。得られたD N A サンプルは、表6に 記載のプライマーを用いてP C R 増幅して定量した。ネガティブコントロールは、E - カ ドへリンと同染色体上で下流に存在する領域とした。

(20)

【表6】

プライマー	塩基配列	配列番号
pCDH1 フォワード	TAGAGGGTCACCGCGTCTAT	18
pCDH1 リバース	ATTGGCTGAGGGTTCACCTG	19
ネガティブコントロールフォワード	GCAGTGGGATAGGAGCAGAC	20
ネガティブコントロールリバース	CCGTGGCTACTGGATGTGTC	21

【0085】

定量結果を図19(左図)に、各DNAの電気泳動図を図19(右図)に、それぞれ示 す。この結果、Zic5-HAを強制発現させた細胞に対して抗HA抗体で免疫沈降を行 ったサンプルでのみ、E-カドへリンプロモーター領域の共沈が確認できた。E-カドへ リンと同染色体上で下流に存在するネガティブコントロール領域のDNAは検出されなか ったことから、Zic5-HAとE-カドへリンプロモーター領域の共沈の特異性が確認 できた。

【0086】

<ルシフェラーゼレポーターアッセイ>

実際にZIC5がE-カドへリンプロモーターの活性を制御するかを調べるために、E-カドへリンプロモーター下にルシフェラーゼを繋いだプラスミドを作製し、ルシフェラーゼアッセイを行った。

具体的には、まず、下記表7に記載のpCDH1フォワードプライマーとpCDH1リ バースプライマーとを用いてCDH1プロモーター領域をPCR増幅し、pGL3-ba sicベクター(プロメガ社製)のXhoI-NcoI領域にサブクローニングして、ル シフェラーゼレポーターコンストラクト(pCDH1-Luc)を作製した。また、イン ターナルコントロールとして、Renilla luciferaseのphRL-TK プラスミド(プロメガ社製)を用いた。

【0087】

HEK293細胞に、 p C D H 1 - L u c と p h R L - T K を、 リポフェクタミン20 00(インビトロジェン社製)を用いてトランジェントに発現させた。ルシフェラーゼ活 性は、 D u a 1 - 1 u c i f e r a s e R e p o r t e r A s s a y S y s t e m (プロメガ社製)を用いて測定した。統計学的差異は、 S t u d e n t ' s t - t e s t (***: P < 0.001、**: P < 0.01、*: P < 0.05)により求めた。 測定結果(n = 3)を図20に示す。この結果、 E - カドへリンプロモーターの活性は Z i c 5強制発現下では低下することが示された。

[0088]

ZIC5によるE-カドヘリンプロモーター活性の抑制が図17で示した予想ZIC5 結合配列を介して行われているのかを検証するために、E-カドヘリンプロモーターの予 ⁵⁰

10

30

20

想 Z i c 5 結合配列中に一塩基置換変異を導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。図 2 1 に、導入した一塩基置換変異の塩基配列を示す。変異体 G B S - m u t は Z i c 5 Z F が結合することが確認されている変異体であり、変異体 M 5 - m u t は Z i c 5 Z F が結合しないことが確認されている変異体である。レポーターコンストラクトに、図 2 1 に示す一塩基置換変異を導入した変異体 G B S m u t 及び M 5 m u t を、表 7 に記載の プライマーを用いて作製した。

[0089]

【表7】

プライマー	塩基配列	配列番号
pCDH1 フォワード	CACACTCGAGCACCACTGCACTCCAGCTTGG	22
pCDH1 リバース	CTCCAAGGGCCCATGGCTGG	23
M5mut フォワード	CTCCGGGGCTCACCTGGCT	24
M5mut リバース	GCATCACCCCCCGTACCGCTGATTGGCTGAG	25
GBSmut フォワード	CTCCGGGGCTCACCTGGCT	26
GBSmut リバース	GCACCACCCCCGTACCGCTGATTGGCTGAG	27

[0090]

【0091】 [実施例6]

作製した変異体を用いて、前記と同様にしてルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。測定結果(n=3)を図22に示す。この結果、ZIC5の強制発現によりGBSmutを導入したプロモーターの活性は抑制されたが、M5-mutを導入したプロモー ターの活性は抑制されなかった。以上の結果より、ZIC5はE-カドへリンプロモータ ー上のGGGCGGT配列を認識して結合し、そのプロモーター活性を抑制することが明 らかとなった。

以上の結果より、ZIC5がE-カドヘリンの発現を調節する転写因子として機能する ことが明らかになったが、E-カドヘリンの発現制御だけではZIC5によるメラノーマ の形質変化を説明できない。そこで、ZIC5による遺伝子発現変化を網羅的に調べるた 20

10

30

40

<マイクロアレイ解析 >

[0092]

めに、マイクロアレイ解析を行った。

A 3 7 5 細胞又はSK - MEL - 2 8 細胞に、表 2 に記載のsiZIC 5 又はsiNe gを実施例1と同様にして導入した。siRNA導入から48時間後に細胞を回収し、R NAを抽出した。各サンプルのトータルRNA1µgを用いて、GeneChip Hu man Genome U133 Plus 2.0 Array(Affymetri x社製)に対して、製品添付のプロトコールに従ってマイクロアレイを行った。定量のノ ーマライズは、アレイデータから得られたRNA発現量に従って行った。ヒートマップ可 視化はMev(MultiExperiment Viewer)を用いて行った。経路 解析は、DAVID(非特許文献18)を用いて行った。

【0093】

A375細胞及びSK-MEL-28細胞においてZic5を発現抑制した際に、どち らの細胞においても1.5倍以上発現上昇する遺伝子は913個、半分以下に発現低下す る遺伝子は302個同定された。これらの変動遺伝子が関連する現象について調べるため 、経路解析を行ったところ、Glioma、Focal adhesion、Tight

junctionに関連する遺伝子が多く含まれていることが分かった(図示せず。)

【0094】

< Focal adhesion関連因子との関係の解析>

Focal adhesionにおいて活性化されるFocal adhesion k inase(FAK)のリン酸化はメラノーマの悪性度と関連づけられているため(非特

許文献19参照。)、ZIC5によるFAKの変化を検証した。さらに、Zic5発現抑 制による変動遺伝子の中でFocal adhesionに関連する遺伝子の中から、I TGA6(Integrin, alpha 6)とPDGFD(platelet d erived growth factor D)に着目し、細胞内における変化を調べ た。具体的には、siZIC5又はsiNegを導入したA375細胞について、ウェス タンプロットにより、リン酸化FAK(pFAK)、総FAK(FAK)、ITGA6、 pro-PDGFD、及び - アクチンの量を調べた。ウェスタンプロットは、抗pFA K抗体(Signalway Antibody社製)、抗FAK抗体(Acris社製)、抗 - アクチン抗体(シグマ社製)、抗ITGA6抗体(GeneTex社製)、及 び抗PDGFD抗体(Santa Cruz社製)を用いた以外は前記と同様にして行っ た。この結果、Zic5発現抑制細胞においては、FAKのリン酸化が著しく減少してい ることが明らかになった。また、ITGA6とpro-PDGFDの発現量も減少してい る傾向が観察された(図示せず。)。

【0095】

A 3 7 5 細胞及びH T 1 4 4 細胞に、表 2 に記載の s i Z I C 5 又は s i N e g を実施 例 1 と同様にして導入した場合の P D G F D 遺伝子の発現量を、表 1 0 に示すプライマー を用いて q R T - P C R を行うことにより調べた。各細胞の P D G F D 遺伝子のm R N A 量は、A C T B (- アクチン)遺伝子のm R N A 量によりノーマライズした。 P D G F D遺伝子の相対m R N A 発現量 (s i N e g を導入した細胞の発現量を 1 とする。) (n = 3)を算出した結果を図 2 3 に示す。統計学的差異は、S t u d e n t ' s t - t e s t (* * * : P < 0 . 0 0 1、 * * : P < 0 . 0 1、 * : P < 0 . 0 5)により求めた 。この結果、 P D G F D の遺伝子発現は、 Z i c 5 遺伝子発現抑制により著しく減少した

20

10

[0096]

また、Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株の細胞におけるPDGFD遺伝 子の発現量を同様にして調べた。PDGFD遺伝子の相対mRNA発現量(siNeg# 1を導入した細胞の発現量を1とする。)(n=3)を算出した結果を図24に示す。統 計学的差異は、Dunnett's multiple comparison of means test(***:P<0.001)により求めた。この結果、Zic5遺 伝子安定発現株におけるPDGFD遺伝子の相対mRNA発現量は、Flag安定発現株 と比較して高く、Zic5遺伝子過剰発現により、PDGFDの遺伝子発現が亢進するこ とが確認された。

[0097]

【0098】 【表8】

また、A375細胞及びSK-MEL-28細胞に、表1に記載のsiNeg#1と、 表8に記載のsiPDGFD#1及びsiPDGFD#2とを実施例1と同様にして導入 し、PDGFD遺伝子の発現抑制の影響を調べた。この結果、いずれの細胞においても、 siPDGFD#1又はsiPDGFD#2を導入した細胞では形態が変化していた(図 示せず。)。すなわち、メラノーマ細胞株におけるPDGFDの発現抑制は細胞の形態変 化を誘発することがわかった。

40

30

siRNA	標的配列	配列番号
siPDGFD #1	CAGGAATTACTCGGTCAATAT	28
siPDGFD #2	AAGGTATATCATCAACTTCTA	29
siITGA6 #1	CACGCGGATCGAGTTTGATAA	30

【0099】

また、siRNA導入後の各細胞の細胞数を経時的に計数し、siRNA導入後1日目の細胞数を1とした相対細胞数を算出し、増殖性を調べた。この結果、siPDGFGDを導入した細胞では、siZic5を導入した細胞と同様に、細胞増殖が抑制されており

 、メラノーマ細胞株におけるPDGFD遺伝子の発現抑制により、細胞増殖が抑制されることがわかった(図示せず。)。PDGFD遺伝子の発現抑制による細胞増殖の抑制は、Colo829細胞及びHT144細胞においても観察された(図示せず。)。さらに、A375細胞については、各細胞の細胞周期を調べた。各細胞のG1期、S期、及びG2M期にある細胞の割合の平均値(SD)(%)を表9に示す。統計学的差異は、Dunnett's multiple comparison of means test(***:P<0.001、**:P<0.05)により求めた。この結果、A375細胞では、PDGFD遺伝子の発現抑制により、S期とG2M期の細胞の 割合が減少していた。

【 0 1 0 0 】 【 表 9 】

	siNeg (%)	siPDGFD#1 (%)	siPDGFD#2 (%)
G1	65.9 (4.5)	71.6 (0.23)	74 (0.55) *
S	10.2 (1)	8.1 (0.38) *	6.6 (0.49) **
G2M	20.7 (1.6)	18.6 (0.25)	17.7 (0.58) *

[0101]

また、siPDGFD#1、siPDGFD#2、又はsiNeg#1を導入したA3 75細胞について、細胞数を継時的に計数した。各細胞の、siNeg#1を導入した細 胞数を1とした相対細胞数を図25に示す。統計学的差異は、Dunnett's mu ltiple comparison of means test(**:P<0.0 1、*:P<0.05)により求めた。この結果、A375細胞では、PDGFD遺伝子 の発現抑制により、細胞増殖率の低下が引き起こされた。

【0102】

A 3 7 5 細胞及びH T 1 4 4 細胞に、表 2 に記載の s i Z I C 5 又は s i N e g を実施 例 1 と同様にして導入した場合の I T G A 6 遺伝子の発現量を、表 1 0 に示すプライマー を用いて q R T - P C R を行うことにより調べた。各細胞の I T G A 6 遺伝子のm R N A 量は、A C T B (- アクチン)遺伝子のm R N A 量によりノーマライズした。 I T G A 6 遺伝子の相対m R N A 発現量 (s i N e g を導入した細胞の発現量を 1 とする。) (n = 3)を算出した結果を図 2 6 に示す。統計学的差異は、S t u d e n t ' s t - t e s t (* * * : P < 0 . 0 0 1、 * * : P < 0 . 0 1、 * : P < 0 . 0 5)により求めた 。この結果、 I T G A 6 の遺伝子発現は、 Z i c 5 遺伝子発現抑制により著しく減少した

[0103]

また、Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株の細胞におけるITGA6遺伝 子の発現量を同様にして調べた。ITGA6遺伝子の相対mRNA発現量(siNeg# 1を導入した細胞の発現量を1とする。)(n=3)を算出した結果を図27に示す。こ の結果、Zic5遺伝子安定発現株におけるITGA6遺伝子の相対mRNA発現量は、 Flag安定発現株と比較して高く、Zic5遺伝子過剰発現により、ITGA6の遺伝 子発現が亢進することが確認された。

[0104]

また、A375細胞にラットIgG又は抗ITGA6抗体の抗体溶液(20µg/mL)で72時間処理した後の細胞数を計数した。ラットIgGで処理した細胞の細胞数を1 とした相対細胞数(n=3)の結果を図28に示す。統計学的差異は、Student's t-test(***:P<0.001、**:P<0.01、*:P<0.05) により求めた。この結果、抗ITGA6抗体によりITGA6を中和した細胞では、細胞 増殖の低下が引き起こされた。また、siITGA6の導入によりITGA6遺伝子の発 現を抑制した細胞でも、細胞増殖の低下が引き起こされた(図示せず)。一方で、ITG A6遺伝子の発現抑制は、細胞移動率にはさほど影響は観察されなかった(図示せず)。 10

20

30

40

また、ヒトITGA6遺伝子のcDNAをプラスミドpcDNAに組み込んだhITG A 6 発現用ベクターをトランスフェクションし、G 4 1 8 処理により選抜した h I T G A 6過剰発現株と、空ベクターであるpcDNAをトランスフェクションし、G418処理 により選抜したpcDNA株(ネガティブコントロール)に対して、表2に記載のsiZ IC5又はsiNegを実施例1と同様にして導入した場合の細胞数を計数した。この結 果、hITGA6過剰発現株では、siZIC5導入による細胞数の低下を部分的に回復 することが示された(図示せず。)。

[0106]

また、Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株の細胞に、表1に記載のsiN eg#1と表8に記載のsiPDGFD#1を実施例1と同様にして導入した細胞につい て、実施例2と同様にしてTranswell Migrationアッセイを行い、移 動細胞数を計数した。移動細胞数は、総生存細胞数でノーマライズした。各細胞の、si Neg#1を導入した細胞の移動細胞数を1とした相対細胞数(n=3)を図29に示す 。統計学的差異は、tukey's multiple comparison of means test(**:P<0.01、*:P<0.05)により求めた。この結 果、 s i P D G F D # 1 を導入した細胞では、 Z i c 5 遺伝子の過剰発現による細胞移動 数の増加が完全に抑制されていた。この結果から、ZIC5は、PDGFDの発現を介し て細胞移動を制御していることが示唆された。

[0107]

20 また、表1に記載のsiNeg#1、表8に記載のsiPDGFD#1、siPDGF D#2、siITGA6#1を実施例1と同様にして導入した細胞に対して、pFAK、 総FAK、及び - アクチンの量をウェスタンブロットにより調べた。この結果、PDG F D や I T G A 6 の発現抑制は、Z i c 5 の発現抑制と同様に F A K のリン酸化を低下さ せたことから、Focal adhesionへの関与が確認できた(図示せず。)。 [0108]

【表10】

プライマー	塩基配列	配列番号
<i>ACTB</i> (β-Actin)フォワード	GCCCTGGCACCCAGCACAAT	31
<i>ACTB</i> (β-Actin)リバース	GGAGGGGCCGGACTCGTCAT	32
<i>PDGFD</i> フォワード	AAGATTTCCAACCCGCAGCA	33
PDGFDリバース	TCCAGAGCATCCGCAATCAG	34
<i>ITGA6</i> フォワード	GAGCCGTGGTTTTGCTGAAG	35
ITGA6リバース	TGCCACCCATCCTTGTTGAG	36

[0109]

[実施例7]

ZIC5が、BRAF阻害剤(PLX4032, vemurafenib)(Sell eck chem 社製)に対する感受性に変化を与えるかについて、検証を行った。 [0110]

具体的には、まず、SK-MEL-28細胞を用いて、前記と同様にしてZic5遺伝 子安定発現株とF1ag安定発現株(コントロール細胞)を製造した。

Zic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株に対して、それぞれ、PLX4032 を終濃度10µMで48時間処理し、処理後の細胞数を計数した。なお、PLX4032 はDMSOに溶解させた溶液として用い、等量のDMSOを添加したもの(DMSO処理)をコントロールとした。Flag安定発現株をPLX4032処理した細胞(図中、「 PLX4032」欄が「+」、以下の実施例において同様)又はDMSO処理した細胞(図中、「PLX4032」欄が「-」、以下の実施例において同様)の細胞数を1とした 相対細胞数(n=3)の結果を図30に示す。統計学的差異は、tukey's mul tiple comparison of means test(**:P<0.01 、*:P<0.05)により求めた。この結果、PLX4032処理による細胞数の低下 30

は、Ζіс5遺伝子安定発現株では緩和された。また、これらの細胞について、ΡLΧ4 032処理後のアポトーシス細胞の割合をFITC標識Annexin V(MBL社製)を用いて検出した。各細胞におけるAnnexin Vポジティブ細胞(Annexi n Vで染色された細胞)の割合(%)(n = 3)の結果を図 3 1 に示す。この結果、 P LX4032処理によるアポトーシスの誘導は、Zic5遺伝子過剰発現により有意に減 少することが示された。

なお、Annexin Vポジティブ細胞の割合は、次のようにして測定した。まず、 各細胞にFITC標識Annexin V(MBL社製)とヘキスト33342を添加し て40分間インキュベートした。次いで、インキュベート後の細胞の染色状態を、イメー ジングサイトメーター「IN Cell Analyzer 2000」(GEヘルスケ ア社製)のDAPIフィルターとFITCフィルターを使用して解析した。DAPI染色 された全細胞(DAPIポジティブ細胞)に対するAnnexin Vで染色された細胞 (Annexin Vポジティブ細胞)の割合(%)は、IN Cell Analyz er Workstation 3.7(GEヘルスケア社製)により決定した。統計学 的差異は、tukey's multiple comparison of mean s test(**:P<0.01、*:P<0.05)により求めた。 [0112]

次に、内在性のZIC5、及び下流因子であるPDGFD及びITGA6の発現抑制が 20 、PLX4032による細胞増殖の低下やアポトーシスの誘導に及ぼす影響について検討 した。まず、A375細胞に、表1に記載のsiNeg、siZIC5、表8に記載のs i P D G F D、又はsiITGA6を実施例1と同様にして導入した後、DMSO又はP LX4032溶液(5µMにDMSOに溶解させた溶液)で48時間処理した。次いで、 処理後の細胞にFITC標識Annexin V(MBL社製)とヘキスト33342を 添加して40分間インキュベートした。インキュベート後の各細胞におけるAnnexi n Vポジティブ細胞の割合(%)(n=3)の結果を図32に示し、siNegを導入 した細胞の細胞数を1とした相対細胞数(n = 3)の結果を図33に示す。なお、Ann exin Vポジティブ細胞の割合の統計学的差異は、Dunnett's multi ple comparison of means test(***:P<0.001 、 * * : P < 0 . 0 1 、 * : P < 0 . 0 5)により求めた。この結果、 P L X 4 0 3 2 に よるアポトーシスの誘導は、Zic5、PDGFD、ITGA6の発現抑制により相乗的 に亢進されること、及びPLX4032処理による細胞数の減少は、Zic5、PDGF D、ITGA6の発現抑制により促進されること、が明らかになった。Colo829細 胞においても、同様の結果が得られた(図示せず。)。

[0 1 1 3 **]**

また、 A 3 7 5 細胞を、ラット I g G 又は抗 I T G A 6 抗体の抗体溶液(2 0 μ g / m L)と共に、DMSO又はPLX4032溶液(10µMに溶解させた溶液)で48時間 処理した。処理後の各細胞におけるAnnexin Vポジティブ細胞の割合(%)(n = 3)の結果を図 3 4 に示す。統計学的差異は、 S t u d e n t 's t - t e s t (* **: P<0.001)により求めた。この結果、抗ITGA6抗体によりITGA6を 中和した細胞において、PLX4032と相乗的にアポトーシスを誘導できることが明ら かになった。また、siZIC5及びsiPDGFDをそれぞれ導入した細胞においても 、PLX4032と相乗的にアポトーシスを誘導できた(図示せず。)。

[0114]

また、実施例6で作製したZic5遺伝子安定発現株とF1ag安定発現株に、表1に 記載のsiNeg又は表8に記載のsiPDGFDを実施例1と同様にして導入した細胞 と、

ラットIgG又は抗ITGA6抗体の抗体溶液(20µg/mL)を添加した細胞を 、それぞれPLX4032溶液(5μMにDMSOに溶解させた溶液)で48時間処理し た。これらの細胞のAnnexin Vポジティブ細胞の割合(%)(n=3)の結果を 図35に示す。統計学的差異は、tukey's multiple comparis

10

30

40

on of means test(**: P<0.01、*: P<0.05)により求めた。この結果、Zic5遺伝子の過剰発現によるアポトーシスの抑制作用は、PDGF Dを発現抑制することによって完全になくなること(図35(左図)、ITGA6の中和 抗体処理により部分的になくなること(図35(右図)が明らかになった。 【0115】

(26)

また、A375細胞に、表2に記載のsiNeg又はsiZIC5を実施例1と同様に して導入した後、DMSO、UO126(Cell Signaling社製)溶液(1 0µMにDMSOに溶解させた溶液)、又はオキサリプラチン(シグマアルドリッチ社製)溶液(20µMにDMSOに溶解させた溶液)で48時間処理した。処理後の各細胞に おけるAnnexin Vポジティブ細胞の割合(%)(n=3)の結果を図36に示す 。統計学的差異は、tukey's multiple comparison of means test(**: P<0.01、*: P<0.05)により求めた。この結 果、Zic5によるアポトーシスの抑制作用は、MEK阻害剤であるUO126や白金製 剤であるオキサリプラチンで処理した細胞でも、PLX4032処理の場合と同様の結果 が得られた。

【0116】

また、A375細胞に、表1に記載のsiNeg、siZIC5、表8に記載のsiP DGFD、siITGA6を実施例1と同様にして導入した後、DMSO又はPLX40 32溶液(5µMに溶解させた溶液)で24時間処理した後における、リン酸化Stat 3(pStat3)、総Stat3(Stat3)、及び - アクチンの量をウェスタン プロットにより調べた。この結果、PLX4032処理の有無にかかわらず、ZIC5又 はITGA6のノックダウンによってStat3のリン酸化が抑制されたが、PDGFD がノックダウンされた細胞では、PLX4032処理の場合のみStat3のリン酸化が 抑制された(図示せず。)。

【0117】

実施例6で作製したZic5遺伝子安定発現株とFlag安定発現株を、DMSO、又はStat3阻害剤WP1066(サンタクルズ社製)溶液(10µMに溶解させた溶液)で24時間処理したところ、Zic5によるアポトーシスの抑制作用は、Stat3阻害剤処理により完全に抑制された(図示せず。)。

【0118】

これらの結果から、ZIC5は、下流因子PDGFDやITGA6によるStat3の 活性化を介して、メラノーマ細胞のアポトーシスを抑制し、薬剤耐性に寄与すると考えら れ、これらの分子の抑制が治療効果の向上につながることが期待できる。

[0119]

[実施例8]

次に、生じてしまった V e m u r a f e n i b 耐性株に対して、 Z i c 5 遺伝子及び下 流因子 P D G F D 、 I T G A 6 が治療標的になる可能性を検討した。

【0120】

まず、A375細胞を用いてVemurafenib耐性株を5種類(vemR-1~ 5)作製した。各細胞株を、Vemurafenib(PLX4032)0、2、又は4 µMで48時間処理した後の細胞数を計数し、PLX4032未処理(PLX4032濃 度が0µM)の場合の細胞数を1とする相対細胞数を算出した。結果を図37に示す。v emR-1~5では、A375細胞よりも、PLX4032処理による細胞の減少幅が小 さく、Vemurafenib耐性を有することが確認された。

【0121】

vemR-1~5細胞及びA375細胞に対して、DMSO又はPLX4032溶液(5µMに溶解させた溶液)で48時間処理した後における、リン酸化AKT(Ser47 3)(pAKT)、総AKT(AKT)、リン酸化ERK1/2(Thr202/204)(pERK)、総ERK1/2(ERK)、及び - アクチンの量をウェスタンブロッ トにより調べた。ウェスタンプロットは、抗pAKT抗体(Cell Signalin 10

20

30

g社製)、抗AKT抗体(Cell Signaling社製)、抗pERK抗体(Ce ll Signaling社製)、抗ERK抗体(Cell Signaling社製) 、及び抗 - アクチン抗体(シグマ社製)を用いた以外は前記と同様にして行った。結果 を図38に示す。この結果、vemR-1~5細胞では、ERKの再活性化が観察された

【0122】

vemR-1~5細胞及びA375細胞に対して、表1に記載のsiNeg、siZI C5、又は表8に記載のsiPDGFDを実施例1と同様にして導入した。siRNA導 入から3日後の各細胞の細胞数を計数し、A375細胞にsiNegを導入した細胞の細 胞数を1とした場合の相対細胞数(n=3)を算出した。統計学的差異は、Studen t's t-test(***:P<0.001、**:P<0.01、*:P<0.0 5)により求めた。結果を図39に示す。いずれの細胞においても、siRNA導入によ りZIC5又はPDGFDの発現を抑制すると、細胞数が減少し、増殖率が低下した。 【0123】

[実施例9]

HT144細胞を用いて、同様にしてVemurafenib耐性株を3種類(vem R-1~3)作製した。各細胞株を、Vemurafenib(PLX4032)0、4 、又は8µMで48時間処理した後の細胞数を計数し、PLX4032未処理(PLX4 032濃度が0µM)の場合の細胞数を1とする相対細胞数を算出した。結果を図40に 示す。

[0124]

vemR-1~3細胞及びHT144細胞に対して、DMSO又はPLX4032溶液 (5µMにDMSOに溶解させた溶液)で48時間処理した後における、pAKT、AK T、pERK、ERK、及び - アクチンの量を実施例8と同様にしてウェスタンブロッ トにより調べた。結果を図41に示す。この結果、vemR-1~3細胞では、AKTと ERKの両方の再活性化が観察された。

[0125**]**

vemR-1~3細胞及びHT144細胞に対して、表1に記載のsiNeg、siZ IC5、表8に記載のsiPDGFD、siITGA6を実施例1と同様にして導入した。 siRNA導入から3日後の各細胞の細胞数を計数し、HT144細胞にsiNegを 導入した細胞の細胞数を1とした場合の相対細胞数(n=3)を算出した。統計学的差異 は、Dunnett's multiple comparison of means test(***:P<0.001)により求めた。結果を図42に示す。いずれの細 胞においても、siRNA導入によりZIC5、PDGFD、又はITGA6の発現を抑 制すると、細胞数が減少し、増殖率が低下した。

【0126】

実施例8及び実施例9の結果から、メラノーマ治療において生じてしまったBRAF阻 害剤耐性細胞に対しても、Zic5、PDGFD、ITGA6の抑制が治療に有効である ことが示唆された。

【0127】

[実施例10]

< ヒト前立腺がんにおける Z i c 5 遺伝子の発現 >

データベース検索により、Zic5遺伝子の発現が転移性前立腺がんにおいて亢進して いることが示唆されていた(GDS2546)。そのため、ヒト前立腺がんの臨床組織にお けるZic5遺伝子の発現について、免疫組織染色法により検討した。具体的には、ヒト 前立腺がんの組織切片73枚、非前立腺がんの組織切片7枚(いずれも、US Biom ax社から購入)に対して、抗ZIC5抗体(Aviva systems biolo gy社製)を用いて免疫組織染色を行った。各臨床組織切片の抗Zic5抗体による染色 像を、染色強度に基づいて4段階(0~3)にスコア化した。図43に、非がん切片とが ん切片のスコア(左図)、グリーソン分類によるグレード3、4、又は5の切片のスコア 10

20

(中図)、グレード2又は3の切片のスコア(右図)を示す。統計学的差異は、非がん切 片とがん切片のスコアはMann - Whitney 's U - testにより、グリーソ ン分類及びグレードにより分類した切片のスコアはFisher 's exact te stにより、それぞれ求めた。この結果、非がん部とがん部ではその発現に有意な差が見 られなかったが、グレードの進行した前立腺がんにおいてZic5遺伝子の発現が亢進し ていることが示唆された。

【0128】

<ヒト前立腺がんにおけるZic5遺伝子の発現抑制の影響>

ヒト前立腺がん細胞株DU145細胞を用いてZic5発現抑制の影響を調べた。

まず、DU145細胞に、表2に記載のsiZIC5#1、siZIC5#2、siN eg#1、又はsiNeg#2を実施例1と同様にして導入し、導入後0、2、又は3日 後の細胞数を計数した。各細胞の相対細胞数(導入後0日目(導入前)の細胞の細胞数を 1とする。)(n=3)を算出した結果を図44に示す。統計学的差異は、tukey' s multiple comparison of means test(***: P<0.001、**:P<0.01、*:P<0.05)により求めた。この結果、D U145細胞では、siRNA導入によるZic5遺伝子発現抑制により、細胞増殖率が 低下することが明らかになった。

【0129】

DU145細胞又はPC細胞に、表2に記載のsiZIC5#1又はsiNeg#1を
 実施例1と同様にして導入し、導入後の細胞について実施例7と同様にしてFITC標識
 Annexin V(MBL社製)を用いて染色し、各細胞におけるAnnexin Vポジティブ細胞の割合(%)(n=3)を算出した。統計学的差異は、Student's
 t - test(***:P<0.001、**:P<0.01、*:P<0.05)に
 より求めた。結果を図45に示す。この結果、siZIC5#1導入細胞ではAnnex
 in Vポジティブ細胞の割合が増大しており、Zic5遺伝子発現抑制によりアポトーシスが誘導されることも明らかになった。

[0130**]**

DU145細胞に、表2に記載のsiZIC5#1又はsiNeg#1を実施例1と同様にして導入し、導入後の各細胞のZic5遺伝子、PDGFD遺伝子、及びITGA6 遺伝子のmRNA発現量を、実施例6と同様にしてqRT-PCRを行うことにより調べた。各細胞のZic5遺伝子等のmRNA発現量は、ACTB(- アクチン)遺伝子のmRNA発現量によりノーマライズした。各遺伝子の相対mRNA発現量(siNeg# 1を導入した細胞の発現量を1とする。)(n=3)を算出した結果を図46に示す。統計学的差異は、Student's t-test(***:P<0.001、**:P<<0.001、**:P<<0.001、*:P
< 0.01、*:P<0.05)により求めた。この結果、PDGFD遺伝子及びITGA6の遺伝子発現は、Zic5遺伝子発現抑制により著しく減少した。

 DU145細胞に、表8に記載のsiPDGFD#1、siPDGFD#2、又はsi ITGA6#1を実施例1と同様にして導入し、導入後0、2、又は3日後の細胞数を計 数した。各細胞の相対細胞数(導入後0日目(導入前)の細胞の細胞数を1とする。)(
 n=3)を算出した結果を図47に示す。統計学的差異は、tukey's multi ple comparison of means test(***:P<0.001 、**:P<0.01、*:P<0.05)により求めた。この結果、DU145細胞の 細胞増殖率は、siRNA導入によるPDGFD遺伝子発現抑制によって低下したが、I TGA6遺伝子発現抑制によってはほとんど影響しなかった。

[0132]

さらに、DU145細胞に、表8に記載のsiPDGFD#1、siPDGFD#2、
 又はsiITGA6#1を実施例1と同様にして導入した後、DMSO、又はdocetaxel(シグマアルドリッチ社製)溶液(5nMに溶解させた溶液)で24時間処理した。処理後の各細胞におけるAnnexin Vポジティブ細胞の割合(%)(n=3)

10

20



の結果を図48に示す。統計学的差異は、tukey's multiple comp arison of means test(***:P<0.001、**:P<0. 01、*:P<0.05)により求めた。この結果、Zic5及びPDGFDのノックダ ウンでは、docetaxelにより誘導されるアポトーシスが顕著に増大していた。I TGA6のノックダウンでは、さほどの影響は観察されなかった。

【0133】

これらの結果から、前立腺がん細胞において、Zic5遺伝子の下流でPDGFD遺伝 子やITGA6遺伝子の発現が制御されていること、PDGFD遺伝子の発現抑制は細胞 増殖率を低下させること、Zic5遺伝子及びPDGFD遺伝子の発現抑制は、Doce taxelによるアポトーシス誘導を亢進すること、が明らかになった。これらのことか ら、Zic5遺伝子及びPDGFD遺伝子の抑制は、前立腺がんの治療に対しても有効で あることが示唆された。

10

【0134】 [実施例11]

PDHFD遺伝子の発現やその下流のシグナル因子であるFAK及びSTAT3等の活性が、Zic5遺伝子の発現に与える影響を調べた。

【0135】

< P D G F D 遺伝子の発現抑制のZ i c 5 遺伝子に対する影響>

A 3 7 5 細胞に、表1に記載のsiNegと表8に記載のsiPDGFDを実施例1と 同様にして導入してRNA干渉を行い、得られた細胞ついて、PDGFD遺伝子とZic ²⁰ 5遺伝子の発現量を、GAPDHを内部標準としたウェスタンプロット法により測定した 。ウェスタンプロット法は、抗ZIC5抗体(Aviva systems biolo gy社製)、抗PDGFD抗体(Santa Cruz社製)、及び抗GAPDH抗体(Cell Signaling社製)を用いて、カネマルらの方法(非特許文献13参照 。)に準じて行った。

[0136]

各抗体により染色されたバンドを図49に示す。上段(「ZIC5」)が抗ZIC5抗体で染色されたバンドであり、中段(「pro-PDGFD」)が抗PDGFD抗体で染色されたバンドであり、下段(「GAPDH」)が抗GAPDH抗体で染色されたバンドである。siPDGFD導入によりpro-PDGFDの発現が抑制された細胞では、ZIC5の発現も抑制されていた。

30

【0137】

< P D G F D 遺伝子の過剰発現のZ i c 5 遺伝子に対する影響>

ヒトPDGFD遺伝子のcDNAをプラスミドpcDNAに組み込んだhPDGFD発 現用ベクターをトランスフェクションし、G418処理により選抜したhPDGFD過剰 発現株と、空ベクターであるpcDNAをトランスフェクションし、G418処理により 選抜したpcDNA株(ネガティブコントロール)について、ウェスタンブロットにより 、リン酸化FAK(pFAK)、リン酸化STAT3(pSTAT3)、総STAT3(STAT3)、ZIC5、pro-PDGFD、及び - アクチンの量を調べた。ウェス タンブロットは、抗pFAK抗体(Signalway Antibody社製)、抗p STAT3抗体(Ce11 Signaling社製)、STAT3抗体(BD Bio sciences社製)、抗ZIC5抗体(Aviva systems biolog y社製)、抗PDGFD抗体(Santa Cruz社製)、及び抗 - アクチン抗体(シグマ社製)を用いた以外は前記と同様にして行った。

[0138]

各抗体により染色されたバンドを図50に示す。この結果、hPDGFD過剰発現株に おいては、pro-PDGFDのみならずΖIC5の発現も著しく亢進していることが明 らかになった。

【0139】

< F A K 阻害剤処理のZic5遺伝子に対する影響>

50

A 3 7 5 細胞を、FAK阻害剤I(Calbiochem社製)濃度が0、1、2.5 、又は5µMである培地中で24時間処理した後、ウェスタンブロットにより、ZIC5 、pro-PDGFD、pERK、及び - アクチンの量を調べた。ウェスタンブロット は、抗ZIC5抗体(Aviva systems biology社製)、抗PDGF D抗体(Santa Cruz社製)、抗pERK抗体(Cell Signaling 社製)、及び抗 - アクチン抗体(シグマ社製)を用いた以外は前記と同様にして行った

【0140】

各抗体により染色されたバンドを図51に示す。この結果、FAK阻害剤処理により、 PERK量には変化が見られなかったが、ΖIC5とPro-PDGFDは、FAK阻害 ¹⁰ 剤の濃度依存的に発現量の低下が確認された。

【0141】

< S t a t 3 阻害剤処理のZ i c 5 遺伝子に対する影響>

A 3 7 5 細胞を、S t a t 3 阻害剤WP1066(サンタクルズ社製)濃度が0、1、 1.5、2、2.5、3、又は4µMである培地中で24時間処理した後、ウェスタンプ ロットにより、ZIC5、pro-PDGFD、pSTAT3、STAT3、及びGAP DHの量を調べた。ウェスタンプロットは、抗ZIC5抗体(Aviva system s biology社製)、抗PDGFD抗体(Santa Cruz社製)、抗pST AT3抗体(Cell Signaling社製)、STAT3抗体(BD Biosc iences社製)、及び抗GAPDH抗体(Cell Signaling社製)を用 いた以外は前記と同様にして行った。

【0142】

各抗体により染色されたバンドを図52に示す。この結果、Stat3阻害剤処理によ リ、STAT3量は変化せず、pSTAT3量は、Stat3阻害剤の濃度依存的に発現 量の低下が確認された。さらに、pro-PDGFD量とZIC5量も、pSTAT3と 同様に、Stat3阻害剤の濃度依存的に発現量が低下した。

【0143】

< IL - 6 処理のZic 5 遺伝子に対する影響 >

A 3 7 5 細胞を、インターロイキン - 6 (IL - 6) (Novus Biologic als社製)濃度が0、10、又は20ng/mLである培地中で24時間処理した後、 ウェスタンブロットにより、ZIC5、pro - PDGFD、pSTAT3、STAT3 、及びGAPDHの量を調べた。ウェスタンブロットは、抗ZIC5抗体(Aviva systems biology社製)、抗pERK抗体(Cell Signalin g社製)、抗pSTAT3抗体(Cell Signaling社製)、STAT3抗体 (BD Biosciences社製)、及び抗GAPDH抗体(Cell Signa ling社製)を用いた以外は前記と同様にして行った。

(0 1 4 4 **)**

各抗体により染色されたバンドを図53に示す。この結果、IL-6処理により、ST AT3量及びpERK量は変化せず、pSTAT3量は、IL-6の濃度依存的に発現量 の増大が確認された。さらに、ZIC5量も、pSTAT3と同様に、IL-6の濃度依 ⁴⁰ 存的に発現量が増大した。

【0145】

これらの結果から、 Z I C 5 により正に制御される P D G F D、 F A K、 S T A T 3 の シグナルは、 Z I C 5 の発現を正に制御していることが示唆され、これらの因子が、ポジ ティブフィードバックループを形成していることが示唆された。

【0146】

[実施例12]

実施例 8 で作製した V e m u r a f e n i b 耐性株 (v e m R - 3 細胞) について、 Z I C 5 及び P D G F D の発現抑制の影響を調べた。

[0147**]**

20

< Z I C 5 及び P D G F D の発現抑制のアポトーシスへの影響 >

vemR-3細胞に、表1に記載のsiNeg#1、siNeg#2、表2に記載のs iZIC5#1、又は表8に記載のsiPDGFD#1を、それぞれ実施例1と同様にし て導入してRNA干渉を行い、得られた細胞ついて、実施例7と同様にしてアポトーシス 細胞の割合をFITC標識Annexin V(MBL社製)を用いて検出した。各細胞 におけるAnnexin Vポジティブ細胞の割合(%)(n=3)の結果を図54に示 す。この結果、siZIC5#1を導入した細胞とsiPDGFD#1を導入した細胞の 両方とも、Annexin Vポジティブ細胞の割合が顕著に増大しており、vemR-3細胞では、ZIC5の発現を抑制したり、PDGFDの発現を抑制することによってア ポトーシスが誘導されることがわかった。

(31)

【0148】

< Z I C 5 及び P D G F D の発現抑制と E R K の活性化への影響 >

vemR - 3細胞に、表1に記載のsiNeg#1、siNeg#2、表2に記載のs iZIC5#1、又は表8に記載のsiPDGFD#1を、それぞれ実施例1と同様にし て導入してRNA干渉を行い、得られた細胞ついて、実施例7と同様にしてBRAF阻害 剤PLX4032処理又はDMSO処理を行った後に、ウェスタンブロット法によりPE RKの量を調べた。ウェスタンブロット法は、抗ZIC5抗体(Aviva syste ms biology社製)、抗PDGFD抗体(Santa Cruz社製)、抗PE RK抗体(Cell Signaling社製)、抗ERK抗体(Cell Signa ling社製)、及び抗GAPDH抗体(Cell Signaling社製)を用いて 、カネマルらの方法(非特許文献13参照。)に準じて行った。

【0149】

各抗体により染色されたバンドを図55に示す。図中、「PLX4032処理」が、「 +」はPLX4032処理を行った細胞の結果を、「-」はDMSO処理を行った細胞の 結果を、それぞれ示す。また、「siΖIC5」が、「+」はsiΖIC5#1を導入し た細胞の結果を、「-」はsiNeg#1を導入した細胞の結果をそれぞれ示す。「si PDGFD」が、「+」はsiPDGFD#1を導入した細胞の結果を、「-」はsiN eg#2を導入した細胞の結果をそれぞれ示す。vemR-3細胞では、PLX4032 処理によるERKの不活性化(pERK量の減少)は引き起こされなかったが、ZIC5 の発現を抑制したり、PDGFDの発現を抑制すると、pERK量が低下した。 【0150】

これらの結果から、 Z I C 5 / P D G F D が形成するポジティブフィードバックシグナ ルが、 V e m u r a f e n i b 耐性株における M E K / E R K シグナルの異常活性化に寄 与していると考えられた。 10

20





【図2】







【図4】



【図5】





【図7】







【図10】



【図11】





【図13】



【図14】



【図18】



















【図20】



【図21】



【図22】













【図29】











【図26】



【図27】



【図28】



【図32】



【図33】









【図36】



(35)

【図37】



【図38】







【図40】



【図41】









【図43】







【図45】



【図46】



【図47】





【図48】















【図51】









vemR-3

siNeg#1 siZIC5#1 siNeg#2 siPDGFD#1

フロントページの続き

(51)Int.CI.			FΙ		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	111
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
C 1 2 Q	1/6851	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6851	Z N A Z

(72)発明者 深見 希代子東京都八王子市堀之内1432-1 学校法人東京薬科大学内

(72)発明者 佐藤 礼子 東京都八王子市堀之内1432-1 学校法人東京薬科大学内

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 特表2009-502115(JP,A) 国際公開第2014/062845(WO,A1) BMC Cancer, 2010, Vol.10, No.79, pp.1-10

(58)調査した分野(Int.CI., DB名)

A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8 A 6 1 K 4 1 / 0 0 - 4 5 / 0 8 A 6 1 K 4 8 / 0 0 A 6 1 K 3 1 / 3 3 - 3 3 / 4 4 JSTPlus / JMEDPlus / JST7 5 8 0 (JDreamIII) CAplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPIDS (STN) UniProt / GeneSeq Japio - GPG / FX CiNii