

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004年4月29日 (29.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/035088 A1

(51) 国際特許分類: A61K 45/00,  
31/7088, 39/395, 48/00, A61P 35/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013191

(22) 国際出願日: 2003年10月15日 (15.10.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-300415  
2002年10月15日 (15.10.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人慶應義塾 (KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒108-8345 東京都港区三田二丁目15番45号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 戸田 正博 (TODA, Masahiro) [JP/JP]; 〒160-8582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 河上 裕 (KAWAKAMI, Yutaka) [JP/JP]; 〒160-8582 東

京都 新宿区 信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 河瀬 斌 (KAWASE, Takeshi) [JP/JP]; 〒160-8582 東京都 新宿区 信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 岡部 尚文 (OKABE, Naofumi) [JP/JP]; 〒247-0022 神奈川県 横浜市 栄区 庄戸 5-4-3 Kanagawa (JP). 浜田 健嗣 (HAMADA, Taketsugu) [JP/JP]; 〒251-0037 神奈川県 藤沢市 鶴沼海岸 1-8-16-205 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒107-0052 東京都港区 赤坂二丁目8番5号若林ビル3階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: THERAPEUTICS/DIAGNOSTICS FOR BRAIN TUMOR

(54) 発明の名称: 脳腫瘍の治療・診断薬

(57) Abstract: It is intended to provide a therapeutic or a diagnostic for tumor, in particular brain tumor, a probe for detecting/diagnosing brain tumor, a diagnostic kit for brain tumor, a method of treating tumor, in particular brain tumor, and a method of screening an anti-brain tumor agent. Among about 11,000 genes from human patients with brain tumor, 16 genes showing remarkably accelerated expression in human brain tumor compared with other non-cancer tissues are selected by Gene Chip analysis. After further narrowing down by EST screening with the use of EST database and analyzing by RT-PCR and real time quantitative PCR, it is found out that an urokinase plasminogen activator receptor-associated protein (uPARAP) is expressed specifically in tumor, in particular brain tumor. Thus, compounds such as peptides and proteins capable of specifically binding to uPARAP (for example, an antibody specifically recognizing the extracellular domain of uPARAP) are usable as therapeutics/diagnostics for brain tumor.

(57) 要約: 腫瘍、特に脳腫瘍の治療薬や診断薬、脳腫瘍の検出・診断用プローブ、脳腫瘍の診断キット、腫瘍、特に脳腫瘍の治療方法、抗脳腫瘍剤のスクリーニング方法を提供するものである。ヒト脳腫瘍患者の約11,000遺伝子の中から、ヒト脳腫瘍において非癌部脳組織と比較し顕著に発現が亢進している16個の遺伝子をGene Chip解析により選び出し、その中からESTデータベースを用いたESTスクリーニングにより絞り込み、RT-PCRやリアルタイム定量PCRを用いた解析により、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター受容体関連タンパク質 (uPARAP) が腫瘍、特に脳腫瘍特異的に発現していることを見出した。uPARAPの細胞外ドメインを特異的に認識する抗体等のuPARAPに特異的に結合するペプチド・タンパク質等の化合物を脳腫瘍の治療・診断薬とする。

WO 2004/035088 A1

## 明 細 書

## 脳腫瘍の治療・診断薬

## 5 技術分野

本発明は、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター受容体関連タンパク質（uPARAP）の細胞外ドメインを認識する抗体等のuPARAPに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有効成分として含有する脳腫瘍の診断・治療薬やuPARAPをコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖を有効成分として含有する脳腫瘍の診断・治療薬、それらを用いた脳腫瘍の治療方法等に関する。

## 背景技術

15 近年マイクロアレイの技術が発達し、一度に多くの遺伝子及びたんぱく質の発現を解析することを可能にした。特にDNAマイクロアレイによる癌組織における遺伝子発現の解析によって癌の進行や薬剤の感受性の面で新たな知見が得られている。最近、遺伝子発見モニタリング、シーケンス解析及びジェノタイピングなどの広範な核酸解析に利用可能なジーンチップ（Gene Chip）が、米国アフィメトリクス（Affymetrix）  
20 社から販売されている。

他方、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター受容体関連タンパク質（uPARAP）は、KIAA0709あるいはEndo180としても報告され、また、uPARAPを特異的に認識する抗体も知られている。KIAA0709は、50kDa以上の分子量を持つタン  
25 パク質をコードするヒト脳から得られた100個の新規なcDNAクロー

ーン (K I A A 0 6 1 1 ~ K I A A 0 7 1 0 遺伝子と名付けられた) の  
うちの K I A A 0 7 0 9 遺伝子 (アクセッションナンバー A B 0 1 4 6  
0 9) がコードするタンパク質として報告されている (DNA Res. 5(3),  
169-176, 1998)。また、抗 E n d o 1 8 0 モノクローナル抗体とポリク  
5 ローナル抗血清を用いて、E n d o 1 8 0 の完全 c D N A をクローニン  
グし、マクロファージのマンノース受容体と関連するエンドサイトーシ  
スリサイクリングタンパク質である E n d o 1 8 0 が、繊維芽細胞、内  
皮細胞、マクロファージで発現し、レクチン受容体として機能すること  
も報告されている (J. Cell Sci., 113, 6, 1021-1032, 2000)。u P A R A  
10 P は、マクロファージ・マンノース受容体タンパク質の一種で、8 C タ  
イプ炭水化物認識領域に加えて、コラーゲン結合型 (フィブロネクチン  
タイプ II) 領域を含み、コラーゲン及びコラーゲン V と強く結合するこ  
とが報告されている (J Biol Chem 2000 Jan 21;275(3):1993-2002)。

また、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (u P A) 及  
15 び u P A 受容体 (u P A R) は、プラスミノゲン活性化システムにおい  
て重要な要素であり、組織の再構築及び癌浸潤を促進する働きをし、か  
かる u P A と u P A R との複合体のクリアランスに関与する内在性受容  
体としての u P A R A P や、u P A R A P を特異的に認識する抗 u P A  
R A P ポリクローナル抗体についての報告もなされている (Int J Cancer  
20 1; 98:656-64, 2002)。この報告によると、良性胸部障害及び悪性胸部障  
害において u P A R A P の発現を調べたところ、健常な胸部組織では陰  
性であったものの、すべての良性障害及び非浸潤乳管癌では障害に関連  
する繊維芽様細胞及び筋上皮細胞中で免疫反応性を示し、浸潤癌では、  
u P A R A P の免疫反応性は腫瘍に関連する間葉系細胞に限定され、u  
25 P A R A P が筋線維芽細胞及びマクロファージ中に局在化しているとさ  
れている。

本発明の課題は、腫瘍、特に脳腫瘍の治療薬や診断薬、脳腫瘍の検出・診断用プローブ、脳腫瘍の診断キット、腫瘍、特に脳腫瘍の治療方法、抗脳腫瘍剤のスクリーニング方法を提供することにある。

本発明者らは、ヒト脳腫瘍患者の約11,000遺伝子の中から、ヒト脳腫瘍において非癌部脳組織と比較し顕著に発現が亢進している16個の遺伝子をGene Chip解析により選び出し、その中からESTデータベースを用いたスクリーニングにより絞り込み、RT-PCRやリアルタイム定量PCRを用いた解析により、uPARAPが腫瘍、特に脳腫瘍で高発現していることを見出し、本発明を完成するに至った。

10

#### 発明の開示

すなわち本発明は、uPARAPに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有効成分として含有することを特徴とする腫瘍の治療薬（請求項1）や、uPARAPに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物が、uPARAPの細胞外ドメインを特異的に認識する抗体であることを特徴とする請求項1記載の腫瘍の治療薬（請求項2）や、uPAR及び／又はPro-uPAに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有効成分として含有することを特徴とする腫瘍の治療薬（請求項3）や、uPARAP、uPAR及び／又はPro-uPAをコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部を有効成分として含有することを特徴とする腫瘍の治療薬（請求項4）や、腫瘍が脳腫瘍であることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の腫瘍の治療薬（請求項5）に関する。

25 また本発明は、uPARAPに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を腫瘍患者に投与することを特徴とする腫

瘍の治療方法（請求項6）や、uPARAPに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物が、uPARAPの細胞外ドメインを特異的に認識する抗体であることを特徴とする請求項6記載の腫瘍の治療方法（請求項7）や、uPAR及び／又はPro-uPAに

5 特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を腫瘍患者に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法（請求項8）や、uPARAP、uPAR及び／又はPro-uPAをコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部を腫瘍患者に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法（請求項9）や、腫瘍が脳腫瘍であることを

10 特徴とする請求項6～9のいずれか記載の腫瘍の治療方法（請求項10）に関する。

さらに本発明は、uPARAPに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有することを特徴とする腫瘍の診断薬（請求項11）や、uPARAPに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物が、uPARAPの細胞外ドメインを特異的に認識する抗体であることを特徴とする請求項11記載の腫瘍の診断薬（請求項12）や、uPAR及び／又はPro-uPAに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有することを特徴とする腫瘍の診断薬（請求項13）や、uPARAP、uPAR

15 及び／又はPro-uPAをコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部を有することを特徴とする腫瘍の診断薬（請求項14）や、腫瘍が脳腫瘍であることを特徴とする請求項11～14のいずれか記載の腫瘍の診断薬（請求項15）や、RNA抽出液、cDNA及びcRNA合成酵素、DNAチップ若しくはオリゴヌクレオチドチップ

20 又はタンパク質チップ、プローブ及びuPARAP増幅用プライマー、抗uPARAP抗体を備えたことを特徴とする脳腫瘍の診断キット（請

求項 16) や、腫瘍が脳腫瘍であることを特徴とする請求項 16 記載の腫瘍の診断キット (請求項 17) や、uPARAP 遺伝子を含む発現ベクターを導入した細胞を被検物質の存在下で培養し、uPARAP の発現及び/又は機能低下の程度を測定評価することを特徴とする抗腫瘍剤  
5 のスクリーニング方法 (請求項 18) や、uPARAP と uPAR を膜表面に共発現した細胞に、被検物質の存在下、Pro-uPA を接触せしめ、Pro-uPA と uPAR の結合の程度を測定評価することを特徴とする抗腫瘍剤のスクリーニング方法 (請求項 19) や、uPARAP 又はその一部分を被検物質と接触させ、被検物質の uPARAP に対  
10 する結合の強さの程度を測定評価することを特徴とする抗腫瘍剤のスクリーニング方法 (請求項 20) や、抗腫瘍剤が抗脳腫瘍剤であることを特徴とする請求項 18 ~ 20 のいずれか記載の抗腫瘍剤のスクリーニング方法 (請求項 21) に関する。

## 15 図面の簡単な説明

第 1 図は、ヒト脳腫瘍に発現する遺伝子群の Gene Chip 解析の結果を示す図である。

第 2 図は、ヒト脳腫瘍に高発現する 16 個の遺伝子の EST スクリーニングの結果を示す図である。

20 第 3 図は、uPARAP の発現を検出するための RT-PCR の結果を示す図である。

第 4 図は、uPARAP の定量的 PCR 解析の結果を示す図である。

第 5 図は、uPARAP の定量的 PCR 解析の結果を示す図である。

## 25 発明を実施するための最良の形態

脳腫瘍患者から摘出した脳腫瘍組織において非癌部と発現レベルが異

なる遺伝子やタンパク質は、脳腫瘍組織と脳非癌部組織との比較から得ることができる。まず複数の患者より提供された脳非癌部組織における各遺伝子やタンパク質発現レベルの平均を得る。次に、各遺伝子やタンパク質発現レベルの平均をそれぞれの患者の脳腫瘍組織中の各伝子又は

5 タンパク質の発現レベルと比較し、多くの患者で非癌部の平均よりも発現が亢進している遺伝子又はタンパク質を選択する。また、正常組織との発現の違いの程度によって、脳腫瘍組織において発現が亢進している遺伝子をランク付けすることもできる。脳腫瘍組織及び非癌部組織における遺伝子の発現は、RNAの発現レベル又はタンパク質の発現レベル

10 で解析することができ、多くの場合、RNAやタンパク質の発現レベルは、DNAマイクロアレイ、RT-PCR、ノーザンブロットィング、Rnase プロテクションアッセイ、ウエスタンブロットィング、ELISA法、タンパク質アレイといった一般によく知られた方法で測定することができ、フルオロセインやロダミン、ルミノールによる化学蛍光又は

15  $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{125}\text{I}$  といった放射性同位体による放射線、光学的密度を測定することにより行われる。かかる方法により得られた脳腫瘍組織で特に発現が亢進した遺伝子やタンパク質に関する知見から、本発明の脳腫瘍等の腫瘍の治療・診断薬は導かれる。

本発明の脳腫瘍等の腫瘍の治療薬としては、uPARAPに特異的に

20 結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有効成分として含有するものであれば特に制限されるものではなく、uPARAPに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物としては、uPARAPの細胞外ドメインを特異的に認識する抗体の他、

25 コラーゲンV、レクチン、N-アセチルグルコサミン、グリコプロテイン、マトリックスメタロプロテアーゼ、放線菌やカビの生産する天然物化合物、合成化合物、及びこれらの誘導体等を挙げることもできる。ま

た、本発明の脳腫瘍等の腫瘍の治療薬としては、uPAR及び／又はProuroPAに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有効成分として含有するものであれば特に制限されるものではなく、uPAR及び／又はProuroPAに特異的に結合するペ  
5 5 チド・タンパク質、低分子化合物等の化合物としては、uPARやProuroPAを特異的に認識する抗体を挙げるができる。さらに、本発明の脳腫瘍等の腫瘍の治療薬としては、uPARAP、uPAR及び／又はProuroPAをコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部を有効成分として含有するものであれば特に制限される  
10 10 ものではなく、これらアンチセンス鎖の全部又は一部はベクター等に組み込んだ形態で用いることもできる。

上記uPARAPの細胞外ドメインを特異的に認識する抗体や、uPARやProuroPAを特異的に認識する抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、  
15 15 2つのエピトープを同時に認識することができる二機能性抗体等を例示することができる。これら抗体は、慣用のプロトコルを用いて、動物（好ましくはヒト以外）にuPARAP等のタンパク質又はエピトープを含む断片、類似体若しくはuPARAP等を膜表面に発現している細胞を投与することにより産生され、例えばモノクローナル抗体の調製に  
20 20 は、連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたらす、ハイブリドーマ法（Nature 256, 495-497, 1975）、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法（Immunology Today 4, 72, 1983）及びEBV-ハイブリドーマ法（MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp.77-96, Alan R.Liss, Inc., 1985）など任意の方法を用いることができ  
25 25 る。

また、一本鎖抗体をつくるために、一本鎖抗体の調製法（米国特許第



4,946,778号、米国特許第5,260,203号、米国特許第5,091,513号、米国特許第5,455,030号)を用いることができ、ヒト化抗体をつくるために、ヒト化抗体の調製法(米国特許第5,585,089号、Nature, 321, 522-525, 1986、Protein Engineering, 4, 773-783, 1991)を用いることができ、

5 キメラ抗体をつくるために、キメラ抗体の調製法(米国特許第4,816,567号、Science, 229, 1202-1207, 1985、BioTechniques, 4, 214, 1986、Nature, 312, 643-646, 1984、Nature, 314, 268.270, 1985)を用いることができる。二機能性抗体は、2つの関連した抗体を産生する2つのモノクローナル細胞系同士のハイブリッド、又は2つの抗体の断片の化学結合によって産生することができ、例えば、uPARAPとuPAR

10 とに同時に結合しうる二機能性抗体を挙げるすることができる。

また、上記抗体のFab断片やF(ab')<sub>2</sub>断片等も、上記抗体と同様に、uPARAP等に特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物として例示することができる。例えば、Fab断片

15 は抗体をパイン等で処理することにより、またF(ab')<sub>2</sub>断片はペプシン等で処理することにより調製することができる。

本発明の脳腫瘍等の腫瘍の治療方法としては、上述のuPARAPに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を脳腫瘍患者に投与する方法であれば特に制限されるものではなく、uPARAPに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物としては、上述のuPARAPの細胞外ドメインを特異的に認識する抗体を好適に例示することができる。また、本発明の脳腫瘍等の腫瘍の治療方法としては、上述のuPAR及び/又はPro-uPAに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を脳腫瘍

20 患者に投与する方法であれば特に制限されない。さらに、本発明の脳腫瘍等の腫瘍の治療薬としては、uPARAP、uPAR及び/又はPr

o-uPAをコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部を有効成分として含有するものであれば特に制限されるものではなく、これらアンチセンス鎖の全部又は一部はそのまま投与してもよいが、ベクター等に組み込んだ形態で投与することもできる。

- 5 上記本発明の脳腫瘍等の腫瘍の治療薬や、後述する本発明のスクリーニング方法により得られる抗脳腫瘍剤等の抗腫瘍剤を医薬品として用いる場合は、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を添加することができる。またこれら治療薬や抗脳腫瘍剤は、経口的又は非経口的に投与することができる。すなわち通常用いられる投与形態、例えば粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口投与することができる他、スプレー剤の型で鼻孔内投与することもできる。
- 10 本発明の脳腫瘍等の腫瘍の診断薬としては、上述のuPARAPの細胞外ドメインを特異的に認識する抗体などのuPARAPに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有するものを挙げることができ、また、本発明の脳腫瘍等の腫瘍の診断薬としては、
- 15 上述のuPAR及び／又はPro-uPAに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有するものや、上述のuPARAP、uPAR及び／又はPro-uPAをコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部を有するものであれば特に制限
- 20 されるものではなく、かかるアンチセンス鎖は脳腫瘍等の腫瘍の検出・診断用プローブとして有利に用いることができる。上記抗体などの化合物やアンチセンス鎖は、通常標識されているものを用いることが好ましい。
- 25 標識物質としては、単独で又は他の物質と反応することにより検出

可能なシグナルをもたらすことができる物質、例えば、酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジンあるいは放射性同位体等を挙げることができる。具体的には、ペルオキシダーゼ（例えば、horseradish peroxidase）、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、  
5 グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-フォスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、ペニシリナーゼ、カタラーゼ、アポグルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ルシフェラーゼ若しくはアセチルコリンエステラーゼ等の酵素、フルオレスセインイソチオシアネート、フィコビリタンパク、希土類金属キレート、ダンシルクロライド若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート等の  
10 蛍光物質、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$ 若しくは $^{131}\text{I}$ 等の放射性同位体、ビオチン、アビジン、又は化学発光物質を挙げることができる。上記の放射性同位体及び蛍光物質は、単独で検出可能なシグナルをもたらすことができる。一方、酵素、化学発光物質、ビオチン及びアビジンは、単独で  
15 は検出可能なシグナルをもたらすことができないため、さらに1種以上の他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる。例えば、酵素の場合には少なくとも基質が必要であり、酵素活性を測定する方法（比色法、蛍光法、生物発光法あるいは化学発光法等）に依存して種々の基質が用いられる。また、ビオチンの場合には少なくともアビジンあるいは酵素修飾アビジン（例えば、ストレプトアビジン- $\beta$ -ガラクトシダーゼ (Streptoavidin- $\beta$ -galactosidase)) を基質として反応させるのが一般的である。

本発明の脳腫瘍等の腫瘍の診断キットとしては、ノーザン・ブロット、  
in situ ハイブリダイゼーション、RNase プロテクションアッセイ、ウ  
25 エスタンプロットティング、ELISA法、RT-PCRといった選択した遺伝子やタンパク質の発現を評価するのに必要な、RNA 抽出液、c

- DNA 及び cRNA 合成酵素、DNA チップ若しくはオリゴヌクレオチドチップ又は蛋白質チップ、プローブ及び uPARAP 増幅用プライマー、抗 uPARAP 抗体を備えたものであれば特に制限されないが、GAPDH (グリセルアルデヒド-3-フォスフェートデヒドロゲナーゼ) 遺伝子等のコントロール遺伝子増幅用プライマー、GAPDH 等に対する抗体などをも有するものが好ましい。かかる本発明の脳腫瘍の診断キットを用いて、脳組織、血液あるいは他の組織において uPARAP 遺伝子や uPARAP の発現レベルを調べることによって脳腫瘍の診断を行うことが可能となる。
- 5
- 10 本発明の抗脳腫瘍剤のスクリーニング方法としては、uPARAP 遺伝子を含む発現ベクターを導入した細胞を被検物質の存在下で培養し、uPARAP の発現及び/又は機能低下の程度、例えば、プラスミノーゲンアクチベーター等の uPARAP 活性化シグナルにより増幅される遺伝子を測定評価する方法や、uPARAP と uPAR を膜表面に共発
- 15 現した細胞に、被検物質の存在下、Pro-uPA を接触せしめ、Pro-uPA と uPAR の結合の程度、例えば、プラスミノーゲンアクチベーター等の uPARAP 活性化シグナルにより増幅される遺伝子を測定評価する方法や、uPARAP 又は uPARAP の細胞外ドメイン等その一部分を被検物質と接触させ、被検物質の uPARAP に対する結
- 20 合の強さの程度、例えば、被検物質の uPARAP に対する結合の強さを測定評価するであれば特に制限されるものではなく、上記細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等の細菌原核細胞や、酵母、アスペルギルス等の真核細胞や、ドロソフィラ S2、スポドプテラ Sf9 等の昆虫細胞や、L 細胞、
- 25 CHO 細胞、COS 細胞、HeLa 細胞、C127 細胞、BALB/c 3T3 細胞 (ジヒドロ葉酸レダクターゼやチミジンキナーゼなどを欠損

した変異株を含む)、BHK 2 1細胞、HEK 2 9 3細胞、Bowesメラノーマ細胞、卵母細胞等の動植物細胞などを挙げることができ、上記uPARAP等を発現することができる発現ベクターの細胞への導入は、Davisら(BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986)及び  
5 Sambrookら(MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション(transvection)、  
10 マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープローディング(scrape loading)、弾丸導入(ballistic introduction)、感染等を例示することができる。

上記uPARAP活性化シグナルにより増幅される遺伝子は、定量的  
15 PCRにより測定することができる。定量的PCRは、標的遺伝子及びコントロール遺伝子の増幅産物の量に基づいて、生物集団中の異種個体の存在割合を定量的に測定することを可能にするPCRである。例えば、定量的な測定を可能にするような反応条件下でPCRを行い、増幅産物を電気泳動にかけ、増幅産物に対応するバンドの強度に基づいて定量的  
20 測定を達成することができる。より簡便かつ正確に定量的測定を実施するためには、増幅産物の経時的定量的な測定を可能にするPCR用装置(リアルタイム(Real Time)PCR装置)を使用することが好ましい。このようなPCR装置として、LightCycler(ロッシュ社製)、ABI Sequence Detector PRISM 7700(パーキンエルマーバイオシステムズ社製)などが市販されている。リアル  
25 タイムPCRを行う方法としては、TaqMan法(特許第28259

76号)、ハイブリダイゼーション法あるいはサイバークリーン I などのインターカレーターを用いる方法等を挙げることができる。

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

#### 実施例 1 (ヒト脳腫瘍検体の調整)

慶応大学病院において外科的治療を受けた 11 人の患者からヒト脳腫瘍組織、及び隣接正常部を採取した。手術前にすべての患者からインフォームドコンセントを書面により得た。研究プロトコールは慶応大学医学部の IRBHU により承認された。すべての患者に対する脳腫瘍の組織学的診断は術後に行われ、グリオーマの診断を得たものをヒト脳腫瘍検体とした。採取したヒト非癌部脳組織と脳腫瘍組織は液体窒素中又はドライアイスを入れたアセトン中で凍結し、必要に応じて O. C. T. コンパウンドに埋胞し、 $-70^{\circ}\text{C}$  から  $-80^{\circ}\text{C}$  の間で保存し、ヒト脳腫瘍において非癌部脳組織と比較し顕著に発現が亢進している遺伝子又はタンパク質を同定するために用いた。

#### 実施例 2 (組織からの RNA 抽出)

組織片 (約  $1.25\text{ m}^3$ ) は TRIZOL 又は Sepasol-RNAI 中でポリトロンにより破碎された (最高速度で 5 秒間 x 2 回)。クロロホルムを添加後、 $15,000 \times g$  で 10 分間遠心し、RNA を含んだ水層を採取した。イソプロピルアルコールを用いトータル RNA を沈殿させ、70% エタノールで 1 度洗浄し、それを DEPC 処理  $\text{H}_2\text{O}$  に溶解した。トータル RNA は 1.5 ユニットの Dnase I で処理し、再度、TRIZOL/クロロホルム抽出を行った後に、エタノール沈殿し、DEPC 処理  $\text{H}_2\text{O}$  に懸濁した。その後、Rneasy Mini Kit を使い、低分子の核酸を除去した。トータル RNA の質はアガロースゲルから 28S と 18S リボソーム RNA の比

で確認した。精製したトータルRNAは70%エタノール中で-80℃に使用まで保存した。

#### 実施例3 (cDNAの合成と標識したcRNAの合成)

cDNAの合成はSuperScript Choice Systemを用いて行った。5マイクロ  
5 イクログラムの精製したトータルRNAとT7プロモーター配列を有するオリゴdTプライマーを用いて、200ユニットのSuperScriptII逆転写酵素で42℃1時間反応させ(1st StrandのcDNAを合成した後に2nd strandのcDNAを合成し)、フェノール/クロロホルムで抽出し、Phase Lock Gelにて精製した。合成したcDNAをテンプレート  
10 にし、MEGAscript T7キットを用いてcRNAを合成した。2マイクロリットルのT7ポリメラーゼを含む酵素ミックスと7.5mMのATP、GTPと5.625mMのCTP、UTP及び1.875mMのBio-11-CTP、Bio-16-UTPとcDNAを37度、6時間反応させた。未反応や短いオリゴヌクレオチドはCHROMASPINを用いて除去した。  
15 得られたcRNAはエタノール沈殿により回収した。cRNAの質は電気泳動に確認した。精製したcRNAは使用まで70%エタノール中にて-80度で保存した。

#### 実施例4 (脳腫瘍患者の癌、非癌部における遺伝子発現解析)

脳腫瘍患者の原発癌の遺伝子発現は高密度オリゴヌクレオチドマイクロ  
20 アレイを用いて試験した。チップへハイブリダイゼーションするにあたり、cRNAを40mM トリス-酢酸緩衝液(pH8.1)、100mM 酢酸カリウム、30mM 酢酸マグネシウム中で95℃、35分間反応させ、断片化を行った。ハイブリダイゼーションは200μl中、0.1M MES pH6.7(2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid)、  
25 1M NaCl、0.01% Polyoxylene(10) octylphenyl ether、20μg herring Sperm DNA、100μg アセチル化 bovine serum

albumin、10  $\mu$ g 断片化した cRNA、ビオチン化したコントロールオリゴヌクレオチド (biotin-5'-CTGAACGGTAGCATCTTGAC-3') を含むサンプルで45度、12時間行った。チップを0.1M MES pH 6.7、0.1M NaCl、0.01% Polyoxylene(10) octylphenyl ether 緩衝液で洗浄後、ビオチン化した抗streptavidin抗体とチップを反応させた後に、streptavidin R-phycoerythrinによりシグナルを増幅させるように処理した。各ピクセルの蛍光強度はHP社製レーザーキャナー (GeneArray Scanner G2500A) にて測定し、発現強度と信頼度 (Present / Absent Call) を Affymetrix のソフトウェア  
5  
10  
Microarray Suite ver.4.0により算出した。この実験により、ヒト脳腫瘍患者の約11,000遺伝子の発現を測定した。

#### 実施例5 (Gene Chip 解析)

腫瘍組織と隣接正常組織において異なる (発現をする) 遺伝子群を同定するため、Gene Chip 解析を行った。(オリゴ) DNAチップの感受性を考慮し、average difference (発現レベルに相当) が20以下のものは20に繰り上げた。遺伝子毎に3検体のヒト正常脳組織の average difference の平均を求め、求めた平均の値と各々11検体のヒト脳腫瘍組織の average difference を比較した。脳腫瘍組織の11検体の全てにおいて、正常脳組織の平均と比較して3倍以上の発現量 (average difference の比) を示した遺伝子を選び出した。その結果、第1図に示すように、glutamate pyruvate transaminase (GPT)、Homo Sapiens Clone 23933 (Human Clone 23933)、Gタンパク質結合型レセプター (EDG4)、Nucleoplasmin-3 (NPM3)、vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1)、KIAA0197 (NUP160)、DKFZp586E  
15  
20  
25  
0518 (BAZ1A)、SWI/SNF 複合体155Kda サブユニット (BAF155) (SMARCC1)、BAC クローン RG158017 (CAPRI)、



Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 (ITIH1)、GM2 activator (GM2A)、KIAA 0 7 0 9 (uPARAP)、wild-type p 5 3 activated fragment-1 (WAF1)、NFkB human nuclear factor kappa-B DNA 結合サブユニット (NF-kappa-B)、death adaptor molecule RAIDD (RAIDD)、Tenascin C の 1 6 個の遺伝子を選び出した。

実施例 6 (ESTスクリーニング)

次に、ESTデータベースを用いて、実施例 5 の Gene Chip 解析で得られた EDG4、GM2A、SMARCC1、WAF1、uPARAP、Human Clone 23933、NF-kappa-B、NPM3、CAPRI、RAIDD、NUP160、GPT、ITIH1、VCAM1、BAZ1A、Tenascin C の 1 6 個の遺伝子の各配列情報に基づいてホモロジー検索を行い、相同なESTが存在する組織・細胞を集計したスクリーニングの結果の一部を第 2 図に示す。第 2 図中、「未分化組織」は腫瘍細胞とみなすことができるから、「未分化組織/total」が大きいほど、腫瘍細胞において高発現する遺伝子ということができ、「未分化組織/Normal brain」が大きいほど、脳腫瘍において高発現する遺伝子ということが出来る。表 1 に、上記 1 6 個の遺伝子を「未分化組織/total」と「未分化組織/Normal brain」の大きさ別に表した。

(表 1)

未分化組織/total \ 未分化組織/Normal brain	>0.3	>0.2	>0.1
>3	3, 4, 5, 8, 16	7, 11, 13, 15	10
>2		2	14
>1		9	1, 6, 12

20

実施例 7 (uPARAPの発現を検出するためのRT-PCR)

次にuPARAP (Endo180) 遺伝子の各正常組織、各種細胞株、グリオーマ細胞株及び組織並びに他の腫瘍細胞株における発現特異

性をRT-PCR法により調べてみた。脳、心臓、肺、胃、小腸、結腸、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、胎盤、筋肉の各正常組織由来のRNA（全てクローンテック社製より購入）、線維芽細胞、1088EBV-B（ヒトB細胞）、1362TIL（ヒト腫瘍浸潤T細胞）、293UT（ヒト腎細胞）の4種の細胞株由来のRNA、4種のグリオーマ細胞株（U87MG、T98G、GI1、U251）及び4種のグリオーマ組織（GB13、GB17、GB16、GB4）由来のRNA、並びに、悪性黒色腫細胞株（SKme123、624me1）、腎細胞癌細胞株（RCC7、Saito）、肺癌細胞株（LU99、EBC1）、膀胱癌細胞株（KU7）、前立腺癌細胞株（PC3）及び白血病細胞株（HL60、Molt4）の各細胞株由来から、トータルRNAをTrizol(Gibco BRL社製)を使用して単離した。このトータルRNAを、各10 $\mu$ gづつ使用し、トリ骨髄芽球ウイルス逆転写酵素XL（TAKARA社製）と、プライマーとしてオリゴ（dT）を用いて、全反応量100 $\mu$ l、42 $^{\circ}$ CでRT-PCRの

5  
10  
15

鑄型となるcDNAのパネルを作製した。

uPARAP検出用には、センスプライマーとして（5'-GAGCAACAGCGGGCTATGG-3'；配列番号1）を、アンチセンスプライマーとして（5'-TCTGGCGCCTCCGGTAAA-3'；配列番号2）を、コントロールとしてのGAPDH検出用には、センスプライマーとして（5'-TGAAACGGGAAGCTCACTGG-3'；配列番号3）とアンチセンスプライマー（5'-TCCACCACCCCTGTTGCTGTAA-3'；配列番号4）を用いた。0.5 $\mu$ lのcDNAテンプレートを、2.5 $\mu$ lのPCR緩衝液を10倍希釈した25 $\mu$ lの反応液中で、2 $\mu$ lのdNTP（デオキシリボヌクレオチド3リン酸）混合物、0.15 $\mu$ lのEXTaq（TAKARA社製）、及び0.5 $\mu$ lの各プライマーを用いて増幅した。PCRは、サーマルサイクラー

20  
25

(Perkin-Elmer) を用いて、u P A R A P については、最初 9 4 . 0 ° C で 4 分間熱変性させ、以後 9 4 . 0 ° C で 1 分間熱変性させて、6 2 . 2 ° C で 1 分間アニーリングし、7 2 . 0 ° C で 1 分間伸張反応させるというサイクルで、3 0 サイクル繰り返し行い、G A P D H については、最初 9 4 . 0 ° C で 4 分間熱変性させ、以後 9 4 . 0 ° C で 1 分間熱変性させて、5 8 . 0 ° C で 1 分間アニーリングし、7 2 . 0 ° C で 1 分間伸張反応させるというサイクルで、2 5 サイクル繰り返し行った。得られた P C R 産物をアガロースゲル電気泳動 ( 2 . 0 % ) にかき、エチジウムブロマイド ( E t B r ) で染色し、紫外線照射によりバンドを検出した。R T - P C R の結果を第 3 図に示す。第 3 図に示すように、u P A R A P は、U 8 7 M G 、 T 9 8 G ( ヒトグリオーマ細胞株 ) 、 G B 1 3 、 G B 1 7 、 G B 4 ( グリオーマ組織 ) 、腎細胞癌細胞株 ( R C C 7 ) 、肺癌細胞株 ( L U 9 9 ) 、白血病細胞株 ( H L 6 0 ) 、 1 3 6 2 T I L ( ヒト腫瘍浸潤 T 細胞 ) 及び精巣、線維芽細胞、小腸及び肺において発現が認められた。なお、小腸及び肺における発現は、混在した線維芽細胞やマクロファージによるものと考えられる。これらの結果から、u P A R A P 遺伝子は、腫瘍、特に脳腫瘍の遺伝子診断薬として有用であると考えられる。

#### 実施例 8 ( u P A R A P の定量的 P C R 解析 )

リアルタイム定量 P C R を用いた解析は、標的 m R N A 量と P C R プロダクト量との間に比例関係が成立する指数関数的増幅領域での速度論的解析に基づいた定量法である。R N A 調整時に生じるサンプル間での質的差、逆転写効率の差はリアルタイム定量 P C R における変動要因の 1 つなので、これらの変動を標的 m R N A 相対量に対して標準化する方法として常に一定レベルで発現している G A P D H をスタンダードとした。合成した c D N A 1  $\mu$  l をテンプレートにし、5  $\mu$  l の SYBR Green ( 2 本鎖 D N A に特異的に結合し発光する色素 ) 、4  $\mu$  l の d N T P 混合

物、 $3 \mu\text{l}$  の  $\text{MgCl}_2$ 、 $0.5 \mu\text{l}$  の Amp Erase、 $0.25 \mu\text{l}$  の Ampli Taq Gold、各  $0.5 \mu\text{l}$  のプライマーを含んだ  $50 \mu\text{l}$  の反応系で PCR を行った。uPARAP 及び GAPDH 増幅用のプライマーとしては、RT-PCR におけると同様なプライマーを用いた。PCR は、 $50^\circ\text{C}$  2 分、 $95^\circ\text{C}$  10 分、そして  $95^\circ\text{C}$  15 秒と  $60^\circ\text{C}$  1 分を 45 サイクルの条件で行った。SYBR Green の蛍光の増大は DNA 濃度に比例することから PCR プロダクト量を測定して、サイクル数に対する増幅曲線を作成した。

uPARAP の正常脳に対する各組織及び細胞の相対的発現量を第 4 図及び第 5 図に示す。uPARAP の相対的発現量（第 4 図及び第 5 図の uPARAP Rel.）は、 $2^{-\Delta\Delta C_T}$  で求めることができる。 $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{TA} - \Delta C_{TB}$ 、A：比較サンプル；B：基準サンプル； $\Delta C_T =$ （threshold cycle for uPARAP amplification, 第 4 図及び第 5 図の uPARAP の値）－（threshold cycle for GAPDH amplification, 第 4 図及び第 5 図の GAPDH の値）。また、例えば第 4 図における testis の脳に対する uPARAP Rel. は次の計算により求めることができる。 $\Delta C_{T, \text{testis}} = 38.29 - 20.85 = 17.44$ 、 $\Delta C_{T, \text{brain}} = 41.56 - 18.61 = 22.95$ 、 $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T, \text{testis}} - \Delta C_{T, \text{brain}} = 17.44 - 22.95 = -5.51$ 、 $2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{5.51} = 45.58$

#### 産業上の利用可能性

本発明によると、非癌部脳組織と脳腫瘍組織の遺伝子発現を比較し、癌部において発現が著しく変化している遺伝子群を選択することができ、これらの遺伝子群を利用して脳腫瘍に対する新規治療薬剤の探索及び診断薬の創製を行うことが可能となる。

## 請 求 の 範 囲

1. uPARAPに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有効成分として含有することを特徴とする腫瘍の治療薬。  
5
2. uPARAPに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物が、uPARAPの細胞外ドメインを特異的に認識する抗体であることを特徴とする請求項1記載の腫瘍の治療薬。
3. uPAR及び/又はPro-uPAに特異的に結合するペプチド・  
10 タンパク質、低分子化合物等の化合物を有効成分として含有することを特徴とする腫瘍の治療薬。
4. uPARAP、uPAR及び/又はPro-uPAをコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部を有効成分として含有  
15 することを特徴とする腫瘍の治療薬。
5. 腫瘍が脳腫瘍であることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載  
の腫瘍の治療薬。
6. uPARAPに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を腫瘍患者に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法。
7. uPARAPに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物が、uPARAPの細胞外ドメインを特異的に認識する  
20 抗体であることを特徴とする請求項6記載の腫瘍の治療方法。
8. uPAR及び/又はPro-uPAに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を腫瘍患者に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法。
9. uPARAP、uPAR及び/又はPro-uPAをコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部を腫瘍患者に投与する  
25

ことを特徴とする腫瘍の治療方法。

10. 腫瘍が脳腫瘍であることを特徴とする請求項6～9のいずれか記載の腫瘍の治療方法。

5 11. uPARAPに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有することを特徴とする腫瘍の診断薬。

12. uPARAPに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物が、uPARAPの細胞外ドメインを特異的に認識する抗体であることを特徴とする請求項11記載の腫瘍の診断薬。

10 13. uPAR及び／又はPro-uPAに特異的に結合するペプチド・タンパク質、低分子化合物等の化合物を有することを特徴とする腫瘍の診断薬。

14. uPARAP、uPAR及び／又はPro-uPAをコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部を有することを特徴とする腫瘍の診断薬。

15 15. 腫瘍が脳腫瘍であることを特徴とする請求項11～14のいずれか記載の腫瘍の診断薬。

16. RNA抽出液、cDNA及びcRNA合成酵素、DNAチップ若しくはオリゴヌクレオチドチップ又はタンパク質チップ、プローブ及びuPARAP増幅用プライマー、抗uPARAP抗体を備えたことを特徴とする脳腫瘍の診断キット。

17. 腫瘍が脳腫瘍であることを特徴とする請求項16記載の腫瘍の診断キット。

25 18. uPARAP遺伝子を含む発現ベクターを導入した細胞を被検物質の存在下で培養し、uPARAPの発現及び／又は機能低下の程度を測定評価することを特徴とする抗腫瘍剤のスクリーニング方法。

19. uPARAPとuPARを膜表面に共発現した細胞に、被検物質

の存在下、P r o - u P Aを接触せしめ、P r o - u P Aとu P A Rの結合の程度を測定評価することを特徴とする抗腫瘍剤のスクリーニング方法。

20. u P A R A P又はその一部分を披検物質と接触させ、披検物質の  
5 u P A R A Pに対する結合の強さの程度を測定評価することを特徴とする抗腫瘍剤のスクリーニング方法。

21. 抗腫瘍剤が抗脳腫瘍剤であることを特徴とする請求項18～20のいずれか記載の抗腫瘍剤のスクリーニング方法。

第 1 頁

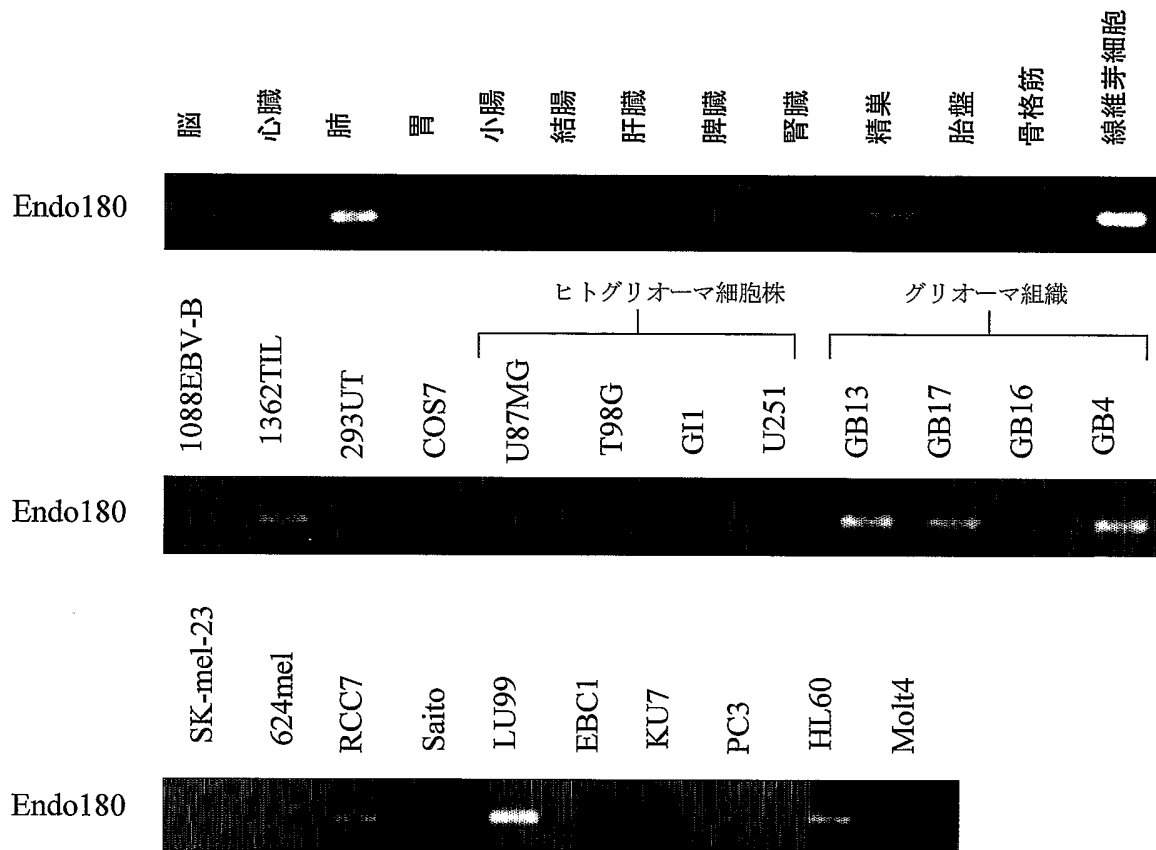
No	Name	hs number	normal 1	normal 2	normal 3	tumor 1	tumor 2	tumor 3	tumor 4	tumor 5	tumor 6	tumor 7	tumor 8	tumor 9	tumor 10	tumor 11	avg
1	EDG4	122575	-3.4	-44.3	142.2	303.1	373.8	643.8	617.8	409.9	492.2	479.9	335.1	397.4	318.8	397.9	433.6
2	GM2A	289082	71.3	-73.8	-31.4	254.4	255.4	861.9	313.7	242.7	201.2	875.1	156.7	325.9	508.0	293.5	389.9
3	SMARC O1	172280	-21.2	-48.6	91.8	314.3	261.6	318.7	521.3	425.5	560.7	401.9	109.0	568.2	218.1	333.8	366.6
4	WAF1	179665	407.6	-230.4	-62.3	761.5	2994.9	722.8	1216.9	942.3	1341.7	666.2	1103.1	170.5	319.3	246.6	953.3
5	uPARAP	7835	163.1	198.4	-3.4	626.9	710.8	829.8	702.1	1250.4	1849.6	1258.9	694.1	753.7	1027.7	922.5	966.0
6	Human clone 23933	239483	10.9	-41.1	106.3	135.4	474.8	254.7	273.9	242.6	478.4	177.6	102.5	161.5	312.0	181.6	254.1
7	NFκB	83428	34.4	29.2	-40.4	120.5	832.0	180.3	62.2	181.2	127.7	174.1	188.2	169.8	325.7	166.3	229.8
8	NPM3	90691	98.0	203.8	-262.3	324.3	131.2	181.5	293.0	197.8	168.6	151.1	282.8	276.5	187.9	64.5	205.4
9	CAPRI	184267	49.5	189.7	-174.0	304.4	133.2	86.5	407.2	134.8	134.3	127.5	168.4	153.0	146.3	286.6	189.3
10	RAIDD	155566	62.8	-27.1	-28.5	107.0	148.9	103.9	154.9	169.3	225.5	86.5	255.4	199.6	87.5	214.2	159.3
11	NUP160	22559	46.6	16.7	0.0	128.7	145.8	109.6	215.9	148.2	148.1	155.0	68.6	173.7	202.9	228.5	156.8
12	GPT	103502	116.4	26.3	-8.2	192.0	402.4	152.8	302.7	298.4	134.6	632.8	150.4	312.6	507.4	280.3	306.0
13	ITIH1	2777	53.1	-60.0	107.7	205.2	271.6	223.0	122.5	162.2	200.5	201.9	238.4	327.9	237.9	243.4	221.3
14	VCAM1	109225	59.7	2.9	-16.3	129.2	110.6	171.4	72.0	377.3	148.1	88.6	169.8	354.9	239.2	388.8	204.5
15	BAZIA	8858	46.8	18.3	-4.5	87.9	192.4	160.3	257.4	64.5	92.2	168.7	87.1	206.6	573.8	171.5	187.5
16	Tenascin C	289114	72.0	-0.2	-2.2	99.2	323.2	69.9	101.6	120.9	75.3	316.9	79.9	77.1	265.3	116.1	149.6



第 2 頁

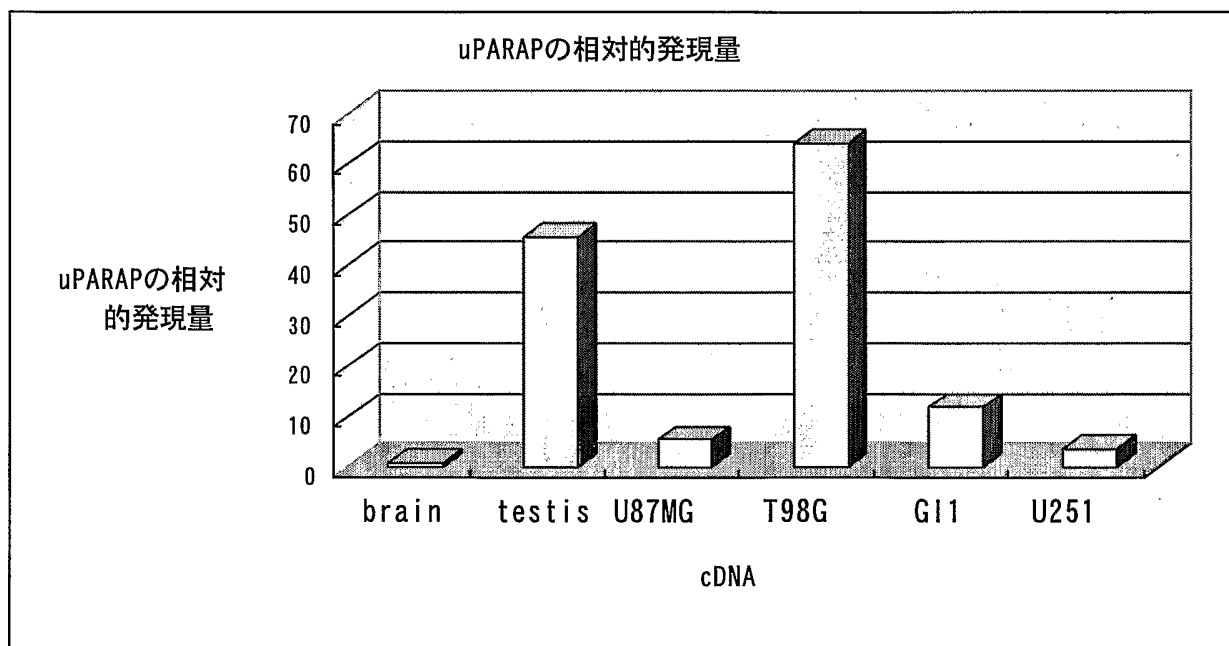
No	Name	1.Normal brain	2.cancer	3.testis	4.embrio	5.germ cell	total	未分化組織	未分化組織/total	未分化組織/Normal brain
1	EDG4	5	3	0	1	4	48	8	0.167	1.600
2	GM2A	26	59	8	1	0	244	68	0.279	2.615
3	SMARC C1	14	98	11	14	11	348	134	0.385	9.571
4	WAF1	24	228	7	2	5	602	242	0.402	10.083
5	uPARAP	8	39	2	8	9	174	58	0.333	7.250
6	Human clone 23933	3	2	0	1	0	19	3	0.158	1.000
7	NFκB	3	32	5	2	8	163	47	0.288	15.667
8	NPM3	0	16	2	6	7	50	31	0.620	∞
9	CAPRI	32	32	5	3	4	208	44	0.212	1.375
10	RAIDD	3	5	2	2	0	63	9	0.143	3.000
11	NUP160	3	18	3	2	3	110	26	0.236	8.667
12	GPT	3	2	1	1	0	21	4	0.190	1.333
13	ITIH1	0	23	0	1	0	114	24	0.211	∞
14	VCAM1	7	13	0	1	0	105	14	0.133	2.000
15	BAZIA	2	34	9	0	4	199	47	0.236	23.500
16	Tenascin C	19	109	1	12	5	381	127	0.333	6.684

第 3 図



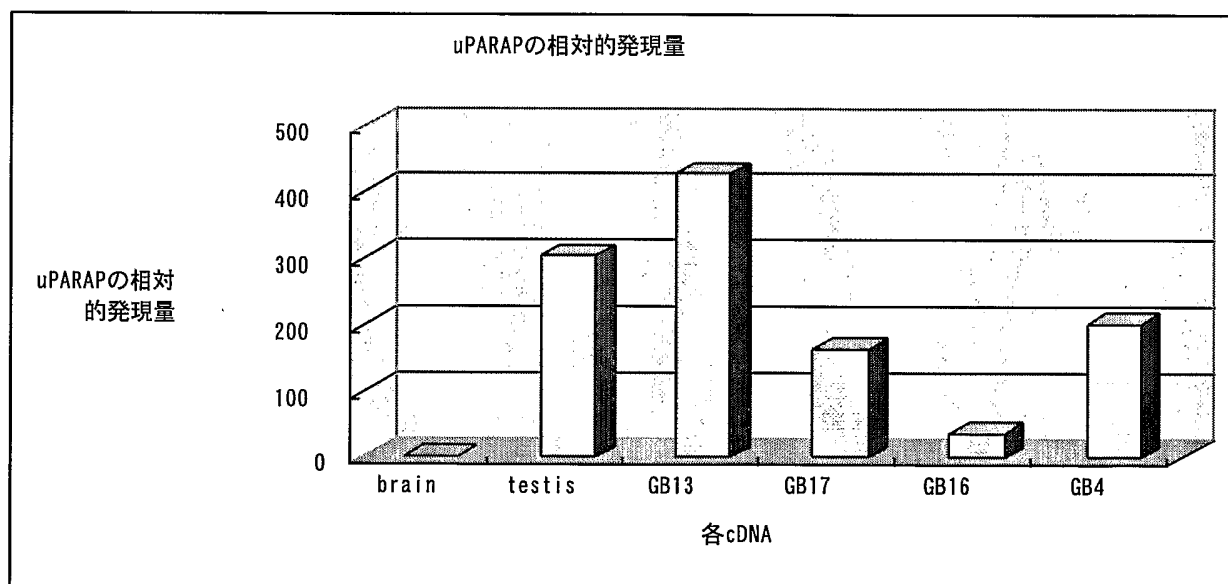
第 4 図

	uPARAP	GAPDH	uPARAP Rel.
brain	41.56	18.61	1.00
testis	38.29	20.85	45.58
U87MG	37.97	17.48	5.50
T98G	35.16	18.21	64.38
G11	38.48	19.12	12.05
U251	40.04	19.02	3.83



第 5 図

	uPARAP	GAPDH	uPARAP Rel.
brain	35.43	16.04	1.00
testis	31.63	20.49	304.46
GB13	28.12	17.48	429.16
GB17	30.24	18.21	164.32
GB16	33.29	19.12	37.33
GB4	30.75	19.02	201.93



SEQUENCE LISTING

<110> KEIO UNIVERSITY

<120> Diagnostic and therapeutic pharmaceutical for brain cancer

<130> P10000367

<140>

<141>

<150> JP P2002-300415

<151> 2002-10-15

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: uPARAP sense primer

<400> 1

gagcaacagc gggctatgg

19

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: uPARAP antisense primer

<400> 2

tctggcgctt ccggtaaa

18

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: GAPDH sense primer

<400> 3

tgaacgggaa gctcactgg

19

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: GAPDH antisense primer

<400> 4

tccaccaccc tgttgctgta

20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13191

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 31/7088, 39/395, 48/00, A61P35/00

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 31/7088, 39/395, 48/00, A61P35/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1992	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-1996
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-1992	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

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

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	L.H., Engelholm et al., The urokinase receptor associated protein (uPARAP/Endo180): A novel internalization receptor connected to the plasminogen activation system, Trends in Cardiovascular Medicine, 2001, Vol.11, No.1, pages 7 to 13	1, 2, 4, 5, 11, 12, 14-21
Y	RANK, Fritz et al., Urokinase receptor-associated protein (uPARAP) is expressed in connection with malignant as well as benign lesions of the human breast and occurs in specific populations of stromal cells, International Journal of Cancer, 2002, Vol.98, No.5, pages 656 to 664	1, 2, 4, 5, 11, 12, 14-21

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

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

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

Date of the actual completion of the international search  
 18 November, 2003 (18.11.03)

Date of mailing of the international search report  
 02 December, 2003 (02.12.03)

Name and mailing address of the ISA/  
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13191

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JULIENNE, Gladu et al., Urokinase receptor antibody can reduce tumor volume and detect the presence of occult tumor metastases in vivo, CANCER RESEARCH, 15 April, 2002 (15.04.02), Vol.62, No.8, pages 2390 to 2397	3,5,13,15 1,2,4,11,12, 14,16-21
X Y	WO 92/7083 A1 (CANCERFORSKNINGSFONDET AF 1989), 30 April, 1992 (30.04.92), Full text & JP 7-500486 A & JP 2003-21632 A	3,5,13,15 1,2,4,11,12, 14,16-21
X Y	WO 90/12091 A1 (CANCERFORSKNINGSFONDET AF 1989), 18 October, 1990 (18.10.90), Full text & JP 4-506148 A & JP 2002-62295 A	3,5,13-15 1,2,4,11,12, 16-21
X Y	WO 98/21230 A1 (ANGSTROM PHARM. INC.), 22 May, 1998 (22.05.98), Full text & JP 2001-504819 A	3,5,13,15 1,2,4,11,12, 14,16-21
X Y A	WO 97/31645 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH.), 04 September, 1997 (04.09.97), Full text & JP 2001-505528 A	3,5 1,2,4 11-21

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/13191

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 6 to 10  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 6 to 10 involve methods for treatment of the human body by surgery or therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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

**Remark on Protest**  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
 Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 31/7088, 39/395, 48/00, A61P35/00

B. 調査を行った分野  
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
 Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 31/7088, 39/395, 48/00, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

- 日本国実用新案公報 1926-1992
- 日本国公開実用新案公報 1971-1992
- 日本国登録実用新案公報 1994-1996
- 日本国実用新案登録公報 1996-2003

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
 CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	L. H., Engelholm et al, The urokinase receptor associated protein (uPARAP/Endo180): A novel internalization receptor connected to the plasminogen activation system, Trends in Cardiovascular Medicine, 2001, Vol.11, No.1, pages 7-13	1, 2, 4, 5, 11, 12, 14-21
Y	RANK, Fritz et al, Urokinase receptor-associated protein (uPARAP) is expressed in connection with malignant as well as benign lesions of the human breast and occurs in specific populations of stromal cells, International Journal of Cancer, 2002, Vol.98, No.5, pages 656-664	1, 2, 4, 5, 11, 12, 14-21

C欄の続きにも文献が列挙されている。  パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

<p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」 同一パテントファミリー文献</p>
--	---

国際調査を完了した日 18. 11. 03      国際調査報告の発送日 **02.12.03**

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 岩下 直人 電話番号 03-3581-1101 内線 3451
--	--



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JULIENNE, Gladu et al, Urokinase receptor antibody can reduce tumor volume and detect the presence of occult tumor metastases in vivo, CANCER RESEARCH, 2002 Apr 15, Vol.62, No.8, pages 2390-2397	3, 5, 13, 15
Y		1, 2, 4, 11, 12, 14, 16-21
X	WO 92/7083 A1 (CANCERFORSKNINGSFONDET AF 1989) 1992.04.30	3, 5, 13, 15
Y	全文 & JP 7-500486 A & JP 2003-21632 A	1, 2, 4, 11, 12, 14, 16-21
X	WO 90/12091 A1 (CANCERFORSKNINGSFONDET AF 1989) 1990.10.18	3, 5, 13-15
Y	全文 & JP 4-506148 A & JP 2002-62295 A	1, 2, 4, 11, 12, 16-21
X	WO 98/21230 A1 (ANGSTROM PHARM. INC.) 1998.05.22	3, 5, 13, 15
Y	全文 & JP 2001-504819 A	1, 2, 4, 11, 12, 14, 16-21
X	WO 97/31645 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) 1997.09.04	3, 5
Y	全文 & JP 2001-505528 A	1, 2, 4
A		11-21

