(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3750945号
(P3750945)
(45)発行日　平成18年3月1日(2006.3.1)　(24)登録日　平成17年12月16日(2005.12.16)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C07K 14/82	(2006.01)	C07K	14/82	
C07K 16/32	(2006.01)	C07K	16/32	
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02	
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	D

請求項の数 22　(全 46 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2003-584305 (P2003-584305)
(86)(22)出願日　平成15年4月14日 (2003.4.14)
(86)国際出願番号　PCT/JP2003/004699
(87)国際公開番号　WO2003/087363
(87)国際公開日　平成15年10月23日 (2003.10.23)
審査請求日　平成17年5月11日 (2005.5.11)
(31)優先権主張番号　特願2002-111377 (P2002-111377)
(32)優先日　平成14年4月12日 (2002.4.12)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

早期審査対象出願

(73)特許権者　599045903
学校法人　久留米大学
福岡県久留米市旭町６７番地
(74)代理人　100080791
弁理士　高島　一
(72)発明者　常岡　誠
福岡県久留米市南薫西町２０２４
(72)発明者　木村　博司
福岡県久留米市小頭町１１－３－９０２

審査官　左海　匡子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】がん関連遺伝子ｍｉｎａ５３、タンパク質Ｍｉｎａ５３およびそのモノクローナル抗体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号１で示される塩基配列を有するヒトがん関連遺伝子ｍｉｎａ５３を含有してなるがんの診断マーカー。
【請求項２】
配列番号２で示される塩基配列を有するマウスがん関連遺伝子ｍｉｎａ５３。
【請求項３】
配列番号３で示される塩基配列を有するラットがん関連遺伝子ｍｉｎａ５３。
【請求項４】
配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するヒトタンパク質Ｍｉｎａ５３を含有してなるがんの診断マーカー。
【請求項５】
配列番号２で示されるアミノ酸配列を有する、細胞増殖作用を有するマウスタンパク質Ｍｉｎａ５３。
【請求項６】
配列番号３で示されるアミノ酸配列を有する、細胞増殖作用を有するラットタンパク質Ｍｉｎａ５３。
【請求項７】
請求項２または３に記載のがん関連遺伝子ｍｉｎａ５３を含有していることを特徴とするベクター。

【請求項８】
請求項７に記載するベクターを含有する形質転換体。
【請求項９】
配列番号１で示される塩基配列からなるヌクレオチドに対応するｍＲＮＡに特異的に作用する、２１ヌクレオチドからなるｓｉＲＮＡを含有してなる細胞増殖抑制剤。
【請求項１０】
配列番号１で示されるアミノ酸配列からなるペプチドまたはその一部に対する抗体を含有する、がんの検出試薬。
【請求項１１】
抗体がモノクローナル抗体である請求項１０に記載の検出試薬。
【請求項１２】
請求項１１に記載する検出試薬に含まれるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。
【請求項１３】
ハイブリドーマがＦＥＲＭ　Ｐ－１９２９８である請求項１２に記載するハイブリドーマ。
【請求項１４】
請求項５に記載するマウスタンパク質Ｍｉｎａ５３を特異的に認識する抗体。
【請求項１５】
請求項６に記載するラットタンパク質Ｍｉｎａ５３を特異的に認識する抗体。
【請求項１６】
請求項１１に記載するモノクローナル抗体を用いてタンパク質Ｍｉｎａ５３をがん細胞またはがん組織中に検出することを特徴とするタンパク質Ｍｉｎａ５３の検出方法。
【請求項１７】
前記がんが大腸がんまたは食道がんである、請求項１６に記載するタンパク質Ｍｉｎａ５３の検出方法。
【請求項１８】
請求項１６または１７に記載するタンパク質Ｍｉｎａ５３の検出方法によってがんを識別することを特徴とするがんの識別方法。
【請求項１９】
前記がんが大腸がんまたは食道がんである、請求項１８に記載するがんの識別方法。
【請求項２０】
がんの予後を識別することを特徴とする、請求項１８または１９に記載する識別方法。
【請求項２１】
配列番号１で示される塩基配列からなる核酸またはそのフラグメントを含有してなるがんの検出試薬。
【請求項２２】
請求項２１に記載するがんの検出試薬を用いてｍＲＮＡを検出することを特徴とするがんの識別方法。
【発明の詳細な説明】
技術分野
この発明は、がん関連遺伝子ｍｉｎａ５３、タンパク質Ｍｉｎａ５３およびそのモノクローナル抗体に関する。
背景技術
がんは、致命的な自然経過をたどる細胞性腫瘍であり、ヒトの死亡原因の大きな割合を占めていて、それも増加する傾向がある。がん細胞は、元来は正常細胞であり、その正常細胞の遺伝子が、例えば、化学物質や放射線、またはウイルスの感染などの何らかの原因によって、その遺伝子のＤＮＡが傷つき、修復されずに蓄積されると、その正常細胞ががん化すると考えられている。細胞には、傷ついた遺伝子を修復する機構が備わっているが、この仕組みが正常に機能しなければ、異常な遺伝子が蓄積することになる。がんに関係す

る遺伝子も数多く見つかっていて、かかる遺伝子の中には、がんを促進するがん遺伝子と、がんを抑制するがん抑制遺伝子とがある。
かかるがん関連遺伝の１つのファミリーである前がん遺伝子ｍｙｃファミリーは、特にがんとの関連が古くから知られていて、がんや、個体発生などにおいて重要な役割を果たしている細胞増殖関連の遺伝子であり、この遺伝子の異常がヒトがんにおいて非常に高い割合で見つかっている。
このがん遺伝子ｃ－ｍｙｃファミリーは、主に３つの遺伝子、ｃ－ｍｙｃと、Ｎ－ｍｙｃと、Ｌ－ｍｙｃとから構成されているが、これら３つの遺伝子は、発現する場所とタイミングは異なっているが、基本的には同じ生物学的活性を持つと考えられている。このがん遺伝子ｃ－ｍｙｃの発現は、転写レベルと転写後レベルなどのレベルで高度に調節されている。一般的には、ｃ－ｍｙｃの発現は、細胞増殖に関連していて、静止期にある細胞あるいは分化細胞中においてその発現が低下する。遺伝子増殖、ウイルスプロモーター挿入、染色体の転座もしくはプロモーター突然変異などによって、ｍｙｃファミリー遺伝子が脱調節されて異常に発現することは、ヒトなどの広い範囲の脊椎動物における新形成疾患（いわゆる腫瘍形成等）に関連している（DePinho,R.A.,et al.:(1991)Adv.Cancer Res.57,1-46;Marcu,K.B.,et al.:(1992)Annu.Rev.Biochem.61,809-860;Morgenbesser,S.D.,et al.:(1994)Semin.Cancer Biol.5,21-36;Henriksson,M.,et al.(1996)Adv.Cancer Res.68,109-182;Grandori,C.,et al.:(2000)Annu.Rev.Cell.Dev.Biol.16,653-99）。ｃ－ｍｙｃもしくはＮ－ｍｙｃをノックアウトしたマウス胎児は、胚発生中期の間に多臓器発育不全を誘発し死亡する（Stanton,B.R.,et al.:(1992)Genes Dev 6,2235-2247;Sawai,S.,et al.(1993)Development 117,1445-1455;Davis,A.C.,et al.:(1993)Genes Dev.7.671-682）。これらの結果は、ｍｙｃが細胞発育の中心的調節因子であることを示している（Hanriksson,M.,Luscher,B.:(1996)Adv.Cancer Res.68,109-182;Grandori,C.,et al.:(2000)Annu.Rev.Cell.Dev.Biol.16,653-99;Luscher,B.:(2001)Gene 277,1-14）。
このがん遺伝子ｍｙｃファミリーの遺伝子は、種々の遺伝子の発現を調節する転写因子（Ｍｙｃタンパク質）をコードしている（Grandori,C.,et al.:(2000)Annu.Rev.Cell.Dev.Biol.16,653-99;Luscher,B.:(2001)Gene 277(Oct 17;(1-2):),1-14）。ｍｙｃファミリー遺伝子がコードしているタンパク質は、ベーシック-ヘリックス-ループ-ヘリックス-ロイシンジッパー（ｂＨＬＨＬＺ）クラスの転写因子の１員である。Ｍｙｃタンパク質とその必須相手のＭａｘとの２量体は、配列特異的ＤＮＡ結合活性を有するヘテロ２量体を形成する。この２量体は、ベーシック部分を介してＥ－ボックス部位（主にＣＡＣＧＴＧエレメント）に結合する。ｍｙｃにはその他に転写活性化（transactivation）ドメインがあり、これらのドメインの働きを通して遺伝子の転写を活性化する。例えば、ＯＤＣ（Bello-Fernandez,C.,et al.:(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90,7804-7808）、cdc25A（Galaktionov,K.,et al.:(1996)Nature 382,511-517）、ＲＣＣ１（Tsuneoka,M.,et al.:(1997)Oncogene 14,2301-2311）、cyclin D2（Bouchard,C.,et al.:(2000)Genes & Dev 15,2042-2047）、Id2（Lasorella,A.,et al.:(2000)Nature 407,592-598）などのＭｙｃ標的遺伝子が同定されている（Dang,C.V.:(1999)Mol.Cell.Biol.1-11）。機能を持つｃ－ｍｙｃ遺伝子を完全に欠損した細胞に、発現遺伝子ライブラリーを導入して正常な増殖を再確立する遺伝子を同定しようとしても、ｃ－ｍｙｃならびにＮ－ｍｙｃが繰り返えされるだけで別の遺伝子は同定することができなかった。これらの結果は、ｍｙｃが単一の遺伝子ではなく複数の遺伝子を制御して細胞増殖を調節していることを示唆している。しかし、がん遺伝子ｍｙｃの機能を解明するのに十分なＭｙｃ標的遺伝子が未だ同定されておらず、ｍｙｃの機能発揮のメカニズムは十分には明らかにされていない。従って、ｍｙｃによって発現調節される新規な遺伝子を同定することは、がん遺伝子ｍｙｃの機能を解明するのに役立つ。
がんのうちでも、大腸がんは、西洋において最も頻繁に発生している。現在では、ある種の大腸がんは全く新しく発生するけれども、ほとんどの大腸がんは既存の腺腫から発生するものと考えられている（Fearon,E.R.,Vogelstein,B.:Cell 1990,61:759-767;Kuramoto,S.,Oohara,T.:Cancer 1989,64:950-955;Bedenne,L.,et al.:Cancer 1992,69:883-888;Wad

a,R.,et al.:Cancer 1996,77:44-50）。すなわち、ほとんどの大腸がんは、正常状態から前がん状態（腺腫）、がん状態へという一連の組織学的変化を徐々にしながら発生することが知られている（Fearon,E.R.,Vogelstein,B.:ibid,;Vogelstein,B.,Kinzler,K.W.:Trends Genet 1993,9:138-141;Kinzler,K.W.,Vogelstein,B.:Cell,1996,87:159-170）。がんが進行する過程では、一般的には、あまり分化していない（以下、「低分化」ともいう）腫瘍が、中程度に分化した（以下、「中分化」ともいう）腫瘍もしくはそれ以上分化した、つまり高度に分化した（以下「高分化」ともいう）腫瘍よりも速い速度で進行するものと考えられている。

大腸がんに関連した遺伝子を解明する研究によって、腫瘍サプレッサー遺伝子の機能損失ならびに腫瘍遺伝子の活性化や発現異常が発がんに関与していることが示されている。前がん遺伝子ｍｙｃファミリーｃ－ｍｙｃは、ヒト大腸がんのほとんどで過剰発現されるとの報告があり（Stewart,J,et al.:Br J Cancer 1986,53:1-6;Sikora,K.,et al.:Cancer 1987,59:1289-1295）、そのほとんどが腫瘍サプレッサー腺腫様結腸ポリープ症（ＡＰＣ）遺伝子突然変異を有していると報告されている（Cottrell,S.,et al.:Lancet 1992,340:626-630;Miyoshi,Y.,et al.:Hum Mol Genet 1992,1:229-233;Powell,S.M.,et al.;Nature 1992,359:235-237）。

近年、ＡＰＣ経路の標的としてｃ－ｍｙｃが特定され、大腸がんにおいてｃ－ｍｙｃを過剰発現する機構を理解するための分子フレームワークが提供されている（He,T.C.,et al.:Science 1998,281:1509-1512）。ｃ－ｍｙｃ発現がＡＰＣ遺伝子の機能損失によって惹起されたりまたは機能的なＡＰＣ遺伝子産生物によって抑制されたりすることはこのフレームワークを指示している。

大腸発がん発生におけるｃ－ｍｙｃの役割が鋭意調べられているけれども、ｃ－ｍｙｃ遺伝子の異常発現が発がんに関与する機構は未だ十分には解明されてなく、多くの側面が未だ謎のままである（LutzW,et al.:Biochim Biophys Acta 2002,1602:61-71）。ｃ－ｍｙｃ遺伝子は、多機能性遺伝子であり、細胞分裂、細胞生育、アポトーシスなどの機能に関連している。ｃ－ｍｙｃ遺伝子はまたいくつかの遺伝子の発現を調節するとともに、そのいくつかは発がんに関連している上記機能を仲介する働きをしている。したがって、ｃ－ｍｙｃ遺伝子によって調節される新規遺伝子の機能的情報ならびに発現パターンを解析することは、ｃ－ｍｙｃ遺伝子によって生起される大腸発がんをより一層理解することに役立つものと考えれる。

大腸がんに加えて、我が国では食道がんも多いがんのひとつである。その患者数は加齢と共に急激に増加する。現在では、食道がんで亡くなる患者数はがんで亡くなる総患者数の約３％に達している。これから迎えつつある高齢化社会において食道がんが更に増えることが危惧され、食道がんも国民の健康を考える上で重要な病気である。

食道がんに関連した遺伝子を解明する研究によって、腫瘍サプレッサー遺伝子の機能損失ならびに腫瘍遺伝子の活性化や発現異常が発がんに関与していることが示されているが、ｃ－ｍｙｃもその発現異常が報告されている（Kennedy AR:Cancer Res.1994,54(7 Suppl):1999s-2005s）.

本発明者らはｃ－ｍｙｃによって発現が上昇する遺伝子をcDNAマイクロアレイによって探索した。その結果、本特許事項で扱っている新規がん関連遺伝子を同定した。ｃ－Ｍｙｃ蛋白質はこの遺伝子の発現を調節するプロモーター部分に結合し、この遺伝子の発現を直接上昇することがわかった（Tsuneoka,M.,et al.:J Biol Chem 2002,277:35450-35459）。白血病細胞株ＨＬ６０はＴＰＡ（ホルボール２－ミリステート１３-アセテート（phorbol 2-myristate 13-acetate））で処理することにより、ｃ－ｍｙｃ発現が減少し増殖しなくなることが分かっている。そこで、未処理あるいは、ＴＰＡで処理した白血病細胞株ＨＬ６０の細胞抽出液を、かかるがん関連遺伝子がコードするタンパク質に特異性を有するポリクローナル抗体を作製し検討したところ、このタンパク質の発現がTPAにより減少することがわかった（Tsuneoka,M.,et al.:J Biol Chem 2002,277:35450-35459）。

なお、このタンパク質は、後で説明するように、特異的な抗体で間接免疫蛍光染色することによって可視化したところ、細胞内の核中に局在していることが見出されたことから、

分子量５３ｋＤａを有するmyc-induced nuclear antigenに因んで、このタンパク質をＭｉｎａ５３と命名するとともに、この遺伝子をｍｉｎａ５３と指称する。
したがって、上記先行技術による知見に基づいて、タンパク質Ｍｉｎａ５３に対する抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を利用して、ｃ－ｍｙｃ遺伝子によって調節されるこのがん関連遺伝子ｍｉｎａ５３ならびにそのタンパク質Ｍｉｎａ５３の機能的情報ならびに発現パターンを調べることは、ｃ－ｍｙｃ遺伝子による発がん機構を解明するのに大いに役立つものと、本発明者らは考えている。
そこで、本発明者は、がん遺伝子ｍｙｃの機能を説明するために、Ｍｙｃ標的遺伝子を同定すべく鋭意検討・研究した結果、そのタンパク質Ｍｉｎａ５３に対する抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体（以下、「抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体」ともいう）を作製することに成功した。また、本発明者は、その抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を利用して、正常な大腸組織に比べて、大腸がん細胞においてタンパク質Ｍｉｎａ５３の発現が増加することを見出すとともに、このタンパク質Ｍｉｎａ５３の発現が、大腸がんにおける初期事象であり、特異的な特性であることを示した。更に、Ｍｉｎａ５３が大腸がん発生においてある種の役割を果たしている蓋然性を示唆していることも見出した。これらの結果から、ヒトタンパク質Ｍｉｎａ５３が、特に大腸がんに対するマーカーとして使用することができ、かつ大腸がん疾患を処置するための標的として開発できる可能性があることを見出した。さらに、食道がんに対してもマーカーとして使用することができ、かつ食道がん疾患を処置するための標的として開発できる可能性があることを見出してこの発明を完成した。

発明の開示

この発明は、がん遺伝子ｍｙｃの機能を説明することができるＭｙｃ標的遺伝子であるヒト、マウスならびにラットｍｉｎａ５３遺伝子およびヒト、マウスならびにラットのタンパク質Ｍｉｎａ５３を提供することを目的としている。
この発明は、ｍｉｎａ５３遺伝子をコードしているプラスミドならびにレポータープラスミドを提供することを別の目的としている。
この発明の更に別の目的は、かかる新規なＭｙｃ標的遺伝子によってがん細胞の増殖抑制をする方法を提供することである。
また、この発明は、ｍｉｎａ５３遺伝子またはヒトタンパク質Ｍｉｎａ５３もしくはそのフラグメントを抗原として得られる抗体を提供することを更に別の目的としている。
更に、この発明は、タンパク質Ｍｉｎａ５３に対して特異性を有するモノクローナル抗体（以下、「抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体」ともいう）を提供することを目的としている。
この発明のまた別の目的は、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を用いてタンパク質Ｍｉｎａ５３をがん細胞またはがん組織中で検出することからなるタンパク質Ｍｉｎａ５３の検出方法提供することである。
この発明は、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を用いて、がん細胞またはがん組織中に発現したタンパク質Ｍｉｎａ５３を染色することからなるタンパク質Ｍｉｎａ５３の染色方法を提供することを更に別の目的としている。
それらに加えて、この発明は、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を用いて、がん細胞またはがん組織中に発現したタンパク質Ｍｉｎａ５３を染色することによってがんを診断することからなるがんの診断方法を提供することを別の目的としている。
これらの上記目的を達成するために、この発明は、新規なＭｙｃ標的遺伝子であるがん関連遺伝子を提供する。
この発明の態様の１つとして、この発明は、がん遺伝子ｍｙｃによって直接発現調節を受けるとともに、配列表の配列番号１に示す塩基配列ならびにアミノ酸配列を有し、かつ、分子量５万３千（５３ｋＤａ）の核タンパク質をコードしているがん関連遺伝子ｍｉｎａ５３を提供する。また、この発明は、その１つの好ましい態様として、がん細胞の増殖に関連していて、かつ、がん組織において特異的に発現が上昇するがん関連遺伝子ｍｉｎａ５３を提供する。この発明の別の好ましい態様として、分子量５３ｋＤａを有するタンパ

ク質をコードしているがん関連遺伝子ｍｉｎａ５３が提供される。更に、この発明は、その好ましい別の態様として、核酸および核小体に局在していて、かつ、その発現がｃ－ｍｙｃ遺伝子によって誘発されるところのがん関連遺伝子ｍｉｎａ５３を提供している。
更に、この発明は、配列番号１で示されるアミノ酸配列を有する細胞増殖作用を有するヒトタンパク質Ｍｉｎａ５３を提供する。
したがって、これらの諸機能を利用して、この発明に係るｍｉｎａ５３遺伝子ならびにそのタンパク質であるＭｉｎａ５３タンパク質は後述するように様々な有用な応用ができる。
この発明はまた、配列番号２で示される塩基配列を有するマウスがん関連遺伝子ｍｉｎａ５３または配列番号３で示される塩基配列を有するラットがん関連遺伝子ｍｉｎａ５３を提供する。この発明による配列番号２で示される塩基配列を有するマウスがん関連遺伝子ｍｉｎａ５３および配列番号３で示される塩基配列を有するラットがん関連遺伝子ｍｉｎａ５３は、その細胞増殖作用を調べるのに有用である。
この発明の別の態様として、この発明に係るがん関連遺伝子ｍｉｎａ５３をコードしているプラスミドが提供される。この発明はまた、その更に別の態様として、ｍｉｎａ５３ゲノミックＤＮＡフラグメントを有するレポータープラスミドを提供している。
また、この発明は、その更に別の態様として、がん関連遺伝子ｍｉｎａ５３の発現を調節する方法を提供している。
更に、この発明の別の態様として、Ｍｉｎａ５３タンパク質に対する抗体が提供される。この発明に係る抗体は、例えば、がんの診断やがんの治療に利用することができるとともに、がん細胞などの正常でない細胞の診断や、細胞の状態の診断などにも利用することができる。
つまり、この発明は、タンパク質Ｍｉｎａ５３、特にヒトタンパク質Ｍｉｎａ５３に対して特異性を有する抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を提供している。
この発明はまた、その更に別の態様として、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を用いてタンパク質Ｍｉｎａ５３をがん細胞またはがん組織中に検出することからなるタンパク質Ｍｉｎａ５３の検出方法（を提供している。
この発明のより好ましい態様として、タンパク質Ｍｉｎａ５３を、大腸がん細胞または大腸がん組織中に検出することからなるタンパク質Ｍｉｎａ５３の検出方法が提供される。
また、この発明は、その更に別の態様として、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を用いて、がん細胞またはがん組織中に発現したタンパク質Ｍｉｎａ５３を染色することからなるタンパク質Ｍｉｎａ５３の染色方法を提供する。更に、この発明は、より好ましい態様として、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を用いて、大腸がん細胞または大腸がん組織中、食道がん細胞または食道がん組織中に発現したタンパク質Ｍｉｎａ５３を染色するタンパク質Ｍｉｎａ５３の染色方法を提供している。
この発明の更に別の態様として、この発明は、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を用いて、がん細胞またはがん組織中に発現したタンパク質Ｍｉｎａ５３を染色することによってがんを診断することからなるがんの診断方法を提供している。この発明はまた、その好ましい態様として、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を用いてタンパク質Ｍｉｎａ５３を染色することによって大腸がん、食道がんの診断をする方法を提供している。
この発明のその他の目的、特長ならびに利点は、本明細書の下記の記載から明白となるものと理解できる。
【図面の簡単な説明】
図１は、この発明に係るヒトｍｉｎａ５３遺伝子の構造を示す図である。図１Ａはヒトｍｉｎａ５３遺伝子のゲノミック構成を示す図であり、図１Ｂはレポータープラスミドを示す図であり、図１ＣはT98Gmycer-2細胞を使用したトランジエント発現アッセイの結果を示す図である。
図２はｍｉｎａ５３ｍＲＮＡの発現レベルを示す図である。図２Ａはｍｉｎａ５３ｍＲＮＡの発現レベルがＴ９８Ｇ細胞中のｃ－ｍｙｃ発現レベルと関連していることを示す図であり、図２Ｂはヒト前骨髄性白血病ＨＬ６０細胞におけるｍｉｎａ５３ｍＲＮＡの発現レ

ベルの低下とｃ－ｍｙｃｍＲＮＡの消滅との関係を示す図であり、図２ＣはＭｙｃＥＲタンパク質を発現するＴ９８Ｇ細胞（T98Gmycer-2細胞）におけるｍｉｎａ５３ｍＲＮＡの発現誘導を示す図である。

図３はＭｉｎａ５３のウエスタンブロッテイング分析結果を示す図である。図３Ａ左はＭｙｃの活性化によるＭｉｎａ５３タンパク質の発現上昇を説明する図であり、図３Ａ右はＴＰＡによりＭｙｃ発現を減少させたときのｃ－Ｍｙｃタンパク質およびＭｉｎａ５３タンパク質の発現減少を説明する図であり、図３Ｂはラット細胞にヒトｃ－Ｍｙｃあるいは遺伝子発現上昇能を失った変異体ｃ－Ｍｙｃを発現させたときのＭｉｎａ５３タンパク質の発現変化（Ｍｙｃによる発現上昇）を示す図である。

図４はＨＬ６０細胞を使用したクロマチン免疫沈降実験結果を示す図である。

図５はＲＮＡ干渉によるＭｉｎａ５３タンパク質発現の減少とその細胞増殖に及ぼす効果を示す図である。図５ＡはＲＮＡ干渉によるＭｉｎａ５３タンパク質発現の減少を示す図であり、図５ＢはＲＮＡ干渉によりＭｉｎａ５３タンパク質発現が減少した細胞の細胞増殖を示す図である。図中、黒丸印はヒトｍｉｎａ５３に特異的なｓｉＲＮＡ二本鎖を導入した細胞の様子を示す。黒三角印はラットｍｉｎａ５３に特異的なｓｉＲＮＡ二本鎖を導入した細胞の様子を示す。白丸印はコントロールｓｉＲＮＡ二本鎖を導入した細胞の様子を示す。

図６Ａは、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を用いたタンパク質Ｍｉｎａ５３のウエスタンブロツテイング分析結果を示す図であり、図６Ｂは細胞内局在の状態を示す図である。図７は、大腸がん組織におけるタンパク質Ｍｉｎａ５３とＫｉ－６７との免疫組織化学的染色血かを示す図である。図７Ａは中分化腫瘍を含む切片のＨＥ染色を示す図である。図７Ｂは、図７Ａでの連続切片を示す図であり、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体によって染色することにより、がん領域におけるＭｉｎａ５３の発現上昇を示している。また、隣接非腫瘍組織はほとんど染色されなかったことを示している。図７Ｃは抗Ｋｉ－６７抗体によって染色した図７Ａでの連続切片を示す図である。図７Ｄは一次抗体を使用していない図７Ａにおけるコントロールとしての切片を示す図である。図７ＥはＭｉｎａ５３の特徴的核局在を示している図７Ｂに示す切片の拡大図である。図７Ｆは抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体による低分化腫瘍の染色を示す図である。図中、スケールは、300μｍ（図７Ａ－Ｄ）、50μｍ（図７Ｅ）および75μｍ（図７Ｆ）である。

図８は、浸潤および転移している腫瘍におけるＭｉｎａ５３の免疫組織化学的発現を示す図である。図８Ａは、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体によって染色した上皮下のリンパ管に侵入したがん細胞を示している。図８Ｂは、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体で染色した大腸深層にあるリンパ管中のがん細胞を示している。図８Ｃは深部に浸潤している腫瘍細胞を染色した図である。図８Ｄは、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体によって染色した繊維性基質中の腫瘍細胞を示している。スケールは、75μｍ（図８Ａおよび図８Ｄ）、150μｍ（図８Ｂ）、300μｍ（図８Ｃ）である。

図９は、がん性、腺腫様ならびに非腫瘍性大腸組織の連続切片を抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体（左側）と抗Ｋｉ－６７クロナール抗体（右側）で染色した場合の染色パターンの比較を示す図である。図９Ａは、高分化腫瘍におけるＭｉｎａ５３の染色をＫｉ－６７の染色（図９Ｂ）と比較した図を示す。図９Ｃは、腺腫におけるＭｉｎａ５３の染色を、Ｋｉ－６７を染色した図９Ｄと比較した図を示す。図９Ｅは、正常腺窩における上皮細胞のＭｉｎａ５３に対する染色を、Ｋｉ－６７を染色した図９Ｆと比較した図を示す。図９Ｇは、リンパ濾胞の胚中心におけるＭｉｎａ５３の染色を、Ｋｉ－６７を染色した図９Ｈと比較した図を示す。スケールは、75μｍ（図９Ａ－Ｆ）と、150μｍ（図９Ｇと図９Ｈ）である。

図１０は、リコンビナントタンパク質Ｍｉｎａ５３の定量線を示すグラフである。

図１１は、ヒト血液中のタンパク質Ｍｉｎａ５３の定量を示すグラフである。

図１２は、Ｍｉｎａ５３またはＫｉ－６７の発現と累積生存率を示すグラフである。（Ａ）はＭｉｎａ５３の発現と累積生存率との関係を示し、（Ｂ）はＫｉ－６７の発現と累積生存率との関係を示す。

図１３は、食道がん組織に対するｍｉｎａ５３とＫｉ－６７との発現度合いの比較を示すプロット図である。

発明を実施するための最良の形態

この発明に係るがん関連遺伝子ｍｉｎａ５３のｃＤＮＡ配列を含むヒトゲノミックＤＮＡ配列はＨＴＧＳ（GenBankAcc:AC026100,AC073245,AC024892）で検索することができる。なお、イントロン２（エクソン２とエクソン３との間）の長さはＧｅｎＢａｎｋのデータ中で異なっているので、エクソン２とエクソン３の配列に対応するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてＰＣＲで増幅し、その長さを５．２ｋｂであることを決定した。

この発明に係るがん関連遺伝子ｍｉｎａ５３は配列表の配列番号１で示される塩基配列ならびにアミノ酸配列を有する。更に詳細には、図１に示すように、この発明のがん関連遺伝子ｍｉｎａ５３のうち、ヒトｍｉｎａ５３遺伝子は１２個のエクソンから構成され、最上流側に２個のエクソン１ａとエクソン１ｂとは２個の転写開始部位として存在し、エクソン２に翻訳開始部位が存在するとともに、最後のエクソン１０に停止コドン（ＴＡＧ）が存在している。また、エクソン１ｂは、エクソン１ａの０．２５ｋｂ下流に存在する。更に、主ｃＤＮＡの中央部、すなわちエクソン５とエクソン６との間に挿入された１０１ｂｐの配列がエクソン５’として存在しているｃＤＮＡもある。４６４個のアミノ酸（２９７Ｑを欠失している）をコードするｃＤＮＡは、エクソン７の最初の３ｂｐを欠失している。UCSCGenomeBrowserのマッピングデータは、ｍｉｎａ５３遺伝子が第３番染色体（３ｑ１２．１）にマップされている。

また、この発明に係るがん関連遺伝子ｍｉｎａ５３は、その発現ががん遺伝子ｃ－ｍｙｃによって直接誘発され、また分子量５３ｋＤａを有するタンパク質をコードしていて、そのタンパク質は核質および核小体に存在している。更に、ｍｉｎａ５３の発現を特異的に阻害すると、細胞増殖が著しく抑制される。

この発明に係る新規な遺伝子ｍｉｎａ５３はｃＤＮＡマイクロアレイ手法を使用して同定することができる。使用できるｃＤＮＡマイクロアレイ法としては、ＤＮＡチップ（ｃＤＮＡマイクロアレイ）などの当該技術分野において慣用されている種々の手法を使用することができる。例えば、未処理のT98Gmycer-2細胞（後述する）と、エストロゲンの誘導体４－ヒドロキシタモキシフェン（ＯＨＴ）で２０時間処理した同細胞から全ＲＮＡを単離することができる。ポリ（Ａ＋）ＲＮＡは回収し、市販のＤＮＡチップを用いて示差ディスプレイに付することができる。ＤＮＡチップには、発現配列タグ（ＥＳＴ：Expression Sequence Tagged）クローンを含む約９千種類もしくはそれ以上のｃＤＮＡをプレートすることができる。当然ながら、この発明はかかる技術に一切限定されるものではなく、当該技術において使用できる技術であればいずれの技術であっても使用することができる。

この発明において使用するｃ－ｍｙｃをコードするプラスミドは、当該分野においては慣用されている手法によって作製することができる。使用するプラスミドにしても種々のプラスミドが市販されていて、目的に応じて適宜選択することができる。この発明において使用するｃ－ｍｙｃをコードするプラスミドとしては、例えば、ヒトｃ－ｍｙｃをＣＭＶプロモーターによって発現誘導するPc-myc/CDM8（Tsuneoka,M.et al.(1997)Oncogene 14, 2301-2311）あるいはそれを、PstIで消化し、自己ライゲートして作製された活性化ドメインが欠如している変異型ｃ－Ｍｙｃタンパク質をコードするpc-myc（d41-178）/CDM8,pTc-mycer/BSのBstXI-KpnIフラグメントを、ｐＣＡＧＧＳ哺乳動物発現ベクターのEcoRIフラグメント中に挿入し、c-mycerをチキン－アクチンとＣＭＶプロモーターとから構成されたキメラプロモーター下に挿入して作製されたpc-mycer/CAGGSなどを使用することができる。

この発明に係るｍｉｎａ５３をコードするプラスミドも同様に当該分野においては慣用されている手法によって作製することができる。使用するプラスミドにしても同様に種々のプラスミドが市販されていて、目的に応じて適宜選択することができる。

例えば、ヒトｍｉｎａ５３に対するｃＤＮＡを、ヒト赤血球白血病細胞（ＨＥＬ）ライブラリーからの５’－ＧＡＡＧＣＴＴＡＴＧＣＣＡＡＡＧＡＡＡＧＣＡＡＡＧＣＣＴＡＣＡ

ＧＧ－３’（開始コドンのメチオニンの直前にHindIII部位を追加）と、５’－ＴＧＡＡＴＴＣＡＴＣＣＴＣＴＣＣＴＣＧＧＣＴＣＡＧＧＴＣＴＴ－３’をプライマーとして使用してＰＣＲによって増幅し、増幅したフラグメントを特定のベクター中にクローン化して、それぞれ４６５個ならびに４６４個のアミノ酸からなるタンパク質をコードするpT/hmina53（465）ならびにpT/hmina53（464）とを作製することができる。このpT/hmina53（465）のHindIII-SaIIフラグメントからpEGGFP/hmina53（465）（GFP-Mina53融合タンパク質を合成する）を作製することができる。また、HindIIIとNotIとで消化したpT/hmina53（465）のHindIII-NotIフラグメントからphmina53/Rc/CMVを作製することができる。更に、ヒトｍｉｎａ５３をコードするＤＮＡフラグメントを、pEGFP/hmina53（465）からの５′－ＧＣＣＡＴＧＣＣＡＴＧＧＣＡＡＡＧＡＡＡＧＣＡＡＡＧＣＣＴＡＣ－３′（NcoI部位を追加）と、５′－ＧＧＣＡＴＧＣＣＡＴＧＧＣＴＡＧＡＣＴＡＣＴＴＧＡＡＴＴＡＡＡＣ－３′（NcoI部位を追加）とをプライマーとして用いてＰＣＲで増幅し、増幅したフラグメントを、NcoIで消化したE.coli発現ベクターpETに挿入して、pET/hmina53を作製することができる。更に、pEGFP/hmina53（465）のxhoI-SalIフラグメントをベクター）中に挿入して、pGEX-hmina53（GST-Mina53融合タンパク質）を作製することもできる。

また、この発明では、ｍｉｎａ５３遺伝子のプロモータ活性を調べるために、その特定部位を含むヒトｍｉｎａ５３ゲノミックＤＮＡフラグメントをルシフェレース（luciferase）ｃＤＮＡに結合して、常法によりレポータープラスミドを構築することができる。ＤＮＡフラグメントがプロモータ活性を有していることはＴ９８Ｇ細胞中でのトランジエント発現アッセイによって調べることができる。

この発明によって、ｃ－Ｍｙｃがｍｉｎａ５３の発現を直接調節していることは明らかである。血清飢餓状態におかれたＴ９８Ｇ細胞が血清で活性化されたとき、ｃ－ｍｙｃｍＲＮＡのレベルが上昇し、その後続いてｍｉｎａ５３が上昇する。ＨＬ６０細胞中でＴＰＡによるｃ－ｍｙｃの発現が低下すると、ｍｉｎａ５３ｍＲＮＡならびにタンパク質の発現も低下する。ラット繊維芽細胞株３Ｙ１中で、転写活性化ドメインを欠損した変異型ｃ－Ｍｙｃではなく、野生型ｃ－Ｍｙｃが高発現すると、ｍｉｎａ５３の発現が上昇する。ｃ－Ｍｙｃタンパク質がｃ－ＭｙｃＥＲキメラタンパク質中で活性化されたときに、ｍｉｎａ５３ｍＲＮＡとタンパク質の発現が活性化される。ｃ－ＭｙｃＥＲの活性化によるｍｉｎａ５３ｍＲＮＡの誘導はタンパク質合成インヒビターであるシクロヘキサミドの存在下でも維持される。トランジェント発現アッセイにおいて、ヒトｍｉｎａ５３ゲノミックＤＮＡフラグメントから構築されたレポータープラスミドからの発現は、ｃ－ＭｙｃＥＲの活性化によって上昇した。レポータープラスミド中の予測Ｍｙｃ結合部位（Ｅ－ボックス１：ＣＡＣＧＴＧエレメント）が破壊されたときには、ｃ－ｍｙｃによるレポーター遺伝子発現の刺激上昇は起こらない。一方のＣＡＣＧＴＧエレメント（Ｅ－ボックス１）が突然変異してもほとんど効果を有していないのに対して、他方のＣＡＣＧＴＧエレメント（Ｅ－ボックス２）が突然変異するとｃ－Ｍｙｃによるプロモーター活性上昇が著しく低下することは、ｃ－Ｍｙｃが特異的なＣＡＣＧＴＧエレメントを介してｍｉｎａ５３の発現を活性化させることを示唆している。ｃ－Ｍｙｃタンパク質は、増殖期のＨＬ６０において、インビボでｍｉｎａ５３遺伝子の上記ＣＡＣＧＴＧエレメントが存在するｍｉｎａ５３ゲノミックＤＮＡに結合する。ただし、ＴＰＡによって処理されたＨＬ６０細胞では、ｃ－Ｍｙｃタンパク質は、ｍｉｎａ５３ゲノミックＤＮＡに結合しない。これらの結果はｃ－Ｍｙｃがｍｉｎａ５３の発現を直接誘発していることを示している。

この発明に係る新規遺伝子ｍｉｎａ５３は細胞増殖の調節を行う機能を有している。ヒトと嚙歯動物との間にＭｉｎａ５３のアミノ酸配列が高率に保存されていることは、このタンパク質が哺乳動物において重要な役割を果たしていることを示唆している。ｍｉｎａ５３の発現は細胞増殖と深く関係していて、細胞増殖に対するｍｉｎａ５３の役割を示している。Ｍｉｎａ５３の生物学的機能を調べるために、新しい手法、つまりスモール・インターフェアランスＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）手法を、ｍｉｎａ５３の発現を特異的に阻止するために適用したところ、ヒトならびにラットの細胞中でＭｉｎａ５３タンパク質の発現がヒトならびにラットｍｉｎａ５３各々に特異的なｓｉＲＮＡ二本鎖によってだけ特異的に

減少することによって特異的な阻害が明白に示された。他方、Ｍｉｎａ５３タンパク質の発現は、コントロールｓｉＲＮＡ（ヒトｍｉｎａ５３に対する反転配列）または使用した細胞とは異なる動物のｍｉｎａ５３に対する二本鎖によっては、特異的に減少しなかった。Ｍｉｎａ５３タンパク質の発現が減少したとき、細胞増殖が著しく阻害されることが、ヒトならびにラットの細胞において観察された。これらの結果は哺乳動物の細胞増殖におけるｍｉｎａ５３の重要性を示している。

ｃ－ｍｙｃ遺伝子の発現を段階的にゼロまで低下させたマウスを使用したインビボでの研究によって、ｃ－ｍｙｃ遺伝子は、そのｃ－Ｍｙｃレベルが低下すると多臓器形成不全（細胞数を減少する）による体重低下を引き起こすという働きを有していることが示されている。Ｍｙｃ活性は、マウスにおける細胞周期を再開する活性化Ｔ細胞と繊維芽細胞の細胞分裂する細胞との割合を決定する。最近のタイム－ラプス（time-lapse）顕微鏡によるインビボでの研究によっても、ｍｙｃ遺伝子は、細胞分裂を調節して、細胞周期に入るかもしくは細胞周期から出るかを調節していることが示されている。また、細胞周期の進行に直接関与しているいくつかの遺伝子、例えば、サイクリンＤ１、サイクリンＤ２、Ｉｄ２などがＭｙｃ標的遺伝子として同定され、これらと一致した結果を示している。これらの遺伝子の一つを欠失したマウスは、ｃ－ｍｙｃを欠失したマウスと比較して、より緩やかな結果を示すのに対して、その機能を有するｃ－ｍｙｃ遺伝子を完全に欠損した細胞に、発現遺伝子ライブラリーを導入しても、ｃ－ｍｙｃとＮ－ｍｙｃとを繰り返し同定するだけで、正常な増殖を再確立する遺伝子を同定することはできなかった。これらの結果は、ｍｙｃ遺伝子が、単一の遺伝子ではなく複数の遺伝子を制御して細胞周期を調節していることを示唆している。更に、この発明によって、ｍｉｎａ５３がｃ－Ｍｙｃ標的遺伝子の一つであり、細胞増殖を調節していることが示されている。したがって、Ｍｉｎａ５３タンパク質は、サイクリンＤ１、サイクリンＤ、Ｉｄ２などのように細胞周期調節因子と直接相互作用することにより機能している可能性が考えられる。最近の研究では、核小体は真核生物細胞周期の調節に関与しているある種のタンパク質にとっては監獄の様なものとして機能していることが示唆されている。また、タンパク質が核小体中に封鎖封入されることは、そのタンパク質が細胞の別の領域にある標的に到達することを防止しているものと考えられる。

Ｍｉｎａ５３タンパク質は、核に存在し、そのなかでも核小体中に集中している。核小体中にＭｉｎａ５３が局在していることはＭｉｎａ５３タンパク質の活性調節の１つの形態を示しているのかもしれない。

ショウジョウバエ（Drosophila）において、そのＭｙｃ（ｄＭｙｃ）の欠失が細胞生育（細胞質量の蓄積）を低下させ、細胞サイズを縮小するのに対し、ｄＭｙｃの過剰産生が生育割合ならびに細胞サイズを増加することが示されている。このことは、ｄＭｙｃが細胞生育に関与する遺伝子を調節することを示唆している。Ｍｙｃの発現が増加し細胞サイズが大きくなることは哺乳類においても観察されている。例えば、免疫グロブリン重鎖エンハンサーのコントロール下でｃ－ｍｙｃを発現するトランスジェニックマウスでは、Ｂリンパ球細胞の発達の全ての段階において正常なＢリンパ球の細胞サイズを増加させる。この増加はタンパク質合成の増加と関連している。また、リボソーム生合成は、細胞増殖にとって必須であることから、核小体は１９６０年代から「リボソームファクトリー」であるといわれている。最近の報告では、ｍｙｃが、リボソーム生合成の機能を有する大きなセット多数の遺伝子の発現を促進することが示唆されていることもあわせて考えると、Ｍｉｎａ５３が核小体中に局在しているということは、ｍｉｎａ５３がリボソーム生合成において必須の役割を果たしている可能性を示唆している。

また、核小体がある種のｍＲＮＡの加工もしくは核外への移送、シグナル認識粒子ＲＮＡやテロメレースＲＮＡの生合成、スプライセオソームの小さな核ＲＮＡの１種の加工などを含む多くの他の側面に関与していることが示されている。これらの機能はまた細胞増殖にとって必須であると思われる。したがって、Ｍｉｎａ５３はこれらの機能の一つに対して役割を果たしているのかも知れない。

しかしながら、Ｍｉｎａ５３においては、その機能が実験的に示された既知のドメインは

見出されていない。ところが、Ｍｉｎａ５３のアミノ酸配列１２８－２７１番は、配列類似性に基づいて最近同定されたドメインＪｍｊＣのアミノ酸配列に良く整合している。ＪｍｊＣドメインはクッピンフォールド（cupinfold）と呼ばれる構造を有する金属含有酵素に見られるが、ＤＮＡ－もしくはクロマチン－結合ドメインと一緒にしばしば見出される。このことから、ＪｍｊＣドメイン含有タンパク質は、クロマチンの構築を調節する酵素ではないかと考えられている。また、このドメインにおけるヒト、ラット、マウスのＭｉｎａ５３の８７％は同じであり、全体の配列でも７２％～７５％が同じである。このことはこのドメインの機能的重要性を示唆している。したがって、Ｍｉｎａ５３はクロマチン再構築を調節し、種々の遺伝子発現のパターンに著しく影響を及ぼす可能性を持っているものと考えられる。

以上述べたように、ｍｉｎａ５３と細胞増殖との関係が明らかであることから、ｍｉｎａ５３はｍｙｃの重要な標的であると考えられる。

次ぎに、この発明の別の態様に係るタンパク質Ｍｉｎａ５３に対する抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体（抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体）について更に詳細に説明する。

この発明に係る抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体は、大腸がん、肉腫、舌がん、脳腫瘍などのがん細胞中のタンパク質Ｍｉｎａ５３を検出することができ、かつ、高感度で染色することができる。従って、この発明に係る抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体などの特異的抗体や、ｍｉｎａ５３遺伝子を含む配列を有するＲＮＡ、ＤＮＡなどを利用することによって、Ｍｉｎａ５３タンパク質や、Ｍｉｎａ５３をコードするｍＲＮＡを組織中で検出し、がん細胞などの正常でない細胞を検出することもできる。Ｍｉｎａ５３タンパク質の発現量は、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体などのＭｉｎａ５３タンパク質に結合する物質を利用して、例えば、ＥＬＩＳＡ法、ウェスタンブロッテイング法などの手法によって測定することができる。また、細胞の状態は、例えば、ｍｉｎａ５３遺伝子を含む配列を有するＲＮＡ、ＤＮＡなどを利用して、ノーザンブロッテイング法、ＲＮａｓｅプロテクション法、ＲＴ－ＰＣＲ法、ｃＤＮＡマイクロアレイ法などの各種測定法によって測定することもできる。更に、Ｍｉｎａ５３タンパク質に対するポリクローナル抗体やモノクローナル抗体などの抗体を利用することにより、当該技術分野において慣用されているＥＬＩＳＡ法などの手法により体内に存在するがん細胞などの正常状態にない細胞の存在の有無やその量を推定もしくは測定して診断を下すことも可能である。

ここに、この発明に係る抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体は、当該技術分野に慣用されている常法に従って作製することができる。つまり、本発明に係る抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体は、ポリエチレングリコールを用いた細胞融合法や電気的融合法などの融合方法、センダイウイルスやエプシュタイン－バール（Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒ）ウイルス等を用いた方法、遺伝子組み換えによる組み換え体や発がんプロモーター等による形質転換体を用いた方法などによっても調製することができる（Koehler,G.,Milstein,C.:Nature 256,495(1975)）。特に、ポリエチレングリコールを用いた細胞融合法によるハイブリドーマの樹立が好適である。

ここで、この発明において好適に使用することができるポリエチレングリコールを例にして細胞融合法によるハイブリドーマの樹立についてより詳細に説明する。

この発明において、抗原は、公知の方法により調製することができ、例えば、免疫原となるリコンビナントヒトタンパク質Ｍｉｎａ５３を、大腸菌などを利用して作製し、得られた精製タンパク質を必要に応じてアジュバントなどと混合することにより調製することができる。

次に、調製した抗原を免疫動物に対して免疫する。抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を作製するためには、融合を用いる骨髄腫細胞との相性の問題により、免疫動物としては、近交系動物が確立しているマウスやラットを用いるのが好ましいが、例えば、牛、馬、ヤギ、ヒツジ、ニワトリなども使用することができる。免疫動物への免疫方法としては、一般的には、皮下注射、筋肉注射、腹腔内注射などの注射によって行うことができる。抗原の投与量は、所望の抗体価が得られ、かつ免疫動物に対して悪影響を与えない量であれば、適宜選択して決定することができる。なお、免疫に際しては、免疫応答を促進するため

に、免疫原を、必要に応じて、例えば、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、水酸化アルミニウム等のアジュバントと併用することもできる。特に、合成ペプチドを免疫原として使用する場合には、ＢＳＡ（Bovine Serum Albumin）、ＫＬＨ（Keyhole Limpet Hemocyanine）等のキャリアタンパク質と架橋剤で結合したものを使用することもできる。

この発明に係る抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製は、常法に従って行うことができる。すなわち、免疫動物に対する最終免疫後、抗体価の上昇を確認して、免疫動物から脾臓を取り出して脾細胞を得る。この脾細胞を、免疫に用いた同種動物由来の継代培養した骨髄種細胞と、融合促進剤の存在下において緩衝液中で融合させてハイブリドーマを作製する。使用できる骨髄腫細胞としては、公知の骨髄腫細胞、例えば、マウス由来のＳＰ２／０－Ａｇ１４，Ｐ３－ＮＳ１－１－Ａｇ４－１，ＭＰＣ11－４５，６．ＴＧ１．７など、ラット由来の２１０．ＲＣＹ．Ａｇ１．２．３など；ヒト由来のＳＫＯ－００７,ＧＭ１５００６ＴＧ－Ａ１２などが挙げられ、適宜選択して使用することができる。また、脾細胞と骨髄種細胞との細胞数の割合は、通常約１０対１～約１対１の範囲内、好ましくは約４対１～約１．５対１の範囲内となるような割合がよい。融合促進剤としては、ポリエチレングリコールや、センダイウイルス（ＨＶＪ）などが使用できるが、取り扱い易さ、融合効率などの観点から、ポリエチレングリコールを使用するのが好ましく、ポリエチレングリコールのうちでも平均分子量が約１、０００～５、０００の範囲内にあるものが好ましい。また、このポリエチレングリコールの緩衝液中での濃度は、約４０～６０重量％の範囲内にあるのが好ましい。また、融合効率を向上させるために、培地には、ジメチルスルホキシド等の補助剤を必要に応じて添加することもできる。

この発明による上記した脾細胞と骨髄種細胞との細胞融合は、電気融合法などの常法に従って行うことができ、通常、両細胞を、細胞融合剤を添加した動物細胞用培地または平衡塩類溶液を、例えば、３７℃の温度で約２分間攪拌下で培養するなどの方法によって行うことができる。使用する動物細胞用培地としては、例えば、ＲＰＭＩ－１６４０培地、ハンクスＭＥＭ培地（Hanks' MinimumEssentialMedium）、イーグルＭＥＭ培地（Eagle's Minimum Essential Medium）などが挙げられ、平衡塩類溶液としては、例えば、ハンクス液（Hanks' balanced salts solution）、アール液（Earle's balanced salts solution）などが挙げられる。

上記のようにして得られた細胞混合物から、タンパク質Ｍｉｎａ５３に特異性を有する抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を産生する能力を有するハイブリドーマは、常法に従って、次のようにして選別することができる。つまり、かかるハイブリドーマの選別は、まず、細胞融合操作終了後、得られた細胞混合物から脾細胞と骨髄種細胞とを細胞融合したハイブリドーマを分離し、続いてその分離したハイブリドーマから、タンパク質Ｍｉｎａ５３に対して特異性を有する抗体を産生する能力を有するハイブリドーマを選別することによって行うことができる。

更に具体的には、上記細胞融合操作により得られた細胞混合物からハイブリドーマの分離は、かかる細胞混合物を融合細胞のみが増殖できる培養条件下で培養することによって、所望のハイブリドーマを選択的に増殖させることによって行うことができる。一般的には、該細胞混合物を、例えば、ＨＡＴ培地（ヒポキサンチン－アミノプテリン－チミジン培地）などの選別用培地で培養することによって、目的とするハイブリドーマを選択的に増殖することができる。ＨＡＴ培地中での細胞混合物の濃度は、通常、約1×10^{6}～1×10^{7}個／mlの範囲となるように調整するのがよい。このＨＡＴ培地の培養は、通常、二酸化炭素を約５～８％含む空気中において約３７℃の温度で約１～４週間静置下にて行うのがよい。

次ぎに、上記のようにして分離したハイブリドーマから、そのハイブリドーマがＭｉｎａ５３に特異性を有する抗体を産生する能力を有するかどうかを判定して、ヒトタンパク質Ｍｉｎａ５３に対して特異性を有する抗体を産生する能力を有するハイブリドーマを選別することができる。この判定は、例えば、ＲＩＡ法、ＥＬＩＳＡ法、プラーク法，スポッ

ト法、凝集反応法、オクタロニー法などによって行うことができる。このようにして選別されたハイブリドーマを、例えば、限界希釈法によってクローニングすることにより、Ｍｉｎａ５３に特異性を有する抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を産生する能力を有する増殖可能なハイブリドーマ株を作製することができる。

このようにして作製された抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、ヒトタンパク質Ｍｉｎａ５３を認識することができ、通常の培地で継代培養することが可能であり、かつ、液体窒素中で長時間保存することもできる。

本発明に係る抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体をかかるハイブリドーマから採取するには、このハイブリドーマを常法に従って培養して、その培養上清として得る方法や、ハイブリドーマをこのハイブリドーマに適合性が認められる動物、例えば、骨髄腫細胞が由来する動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法等を用いて得ることができる。

また、本発明に係る抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体の精製は、上記のようにして得た免疫動物の抗血清や、ハイブリドーマの培養上清ならびに腹水より得られた抗体を、例えば、硫安塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の当該分野で通常行われている既知の精製方法によって行うことができる。

なお、インビトロで免疫細胞をヒトタンパク質Ｍｉｎａ５３またはその一部の存在下で培養し、一定期間後に上記細胞融合手法を用いて、この免疫細胞と骨髄腫細胞とのハイブリドーマを調製し、抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングすることによって、本発明に係る抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を得ることもできる（Reading,C.L.:J.Immunol.Meth.,53,261(1982);Pardue,R.L.,et al.:J.Cell Biol.,96,1149(1983)）。

この発明に係る抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体はがん細胞およびがん組織内においてヒトタンパク質Ｍｉｎａ５３を発現することができる。

この発明に係る抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体は、白血病細胞株ＨＬ６０を用いたウェスタンブロッテングによって、分子質量５３ｋＤａの単一バンドを認識することができる。また、この抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を用いた免疫ブロッテング分析によって、ＴＰＡで細胞処理をすると、５３ｋＤａのバンドのシグナルが減少するが、これに対して、ＴＰＡ処理によってはβ-アクチンの発現は実質的には減少されないという特異的な減少が確認されている。

なお、本発明者らは、ＨＬ６０細胞を、抗Ｍｉｎａ５３ポリクローナル抗体を用いてＴＰＡで処理することによって、Ｍｉｎａ５３の発現を減少させたことをすでに報告している（Tsuneoka,M.,et al.:J Biol Chem 2002,277:35450-35459）。また、ＨＬ６０細胞は、ｃ－ｍｙｃの発現レベルが減少されるＴＰＡによって最終的に分化されることが報告されている（Hozumi,M.:AdvCancer Res,1983,38:121-169;Hickstein,D.D.,et al.:J Biol Chem 1989,264:21812-21817)）。

更に、ＨｅＬａ細胞中に発現させたグリーン蛍光タンパク質（ＧＦＰ）に細胞融合させたタンパク質を用いた別の実験においても、この抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体が、内在性タンパク質Ｍｉｎａ５３に加えて、新たな単一バンドを発生したことを確認している。

これらの結果は、この発明に係る抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体がタンパク質Ｍｉｎａ５３を特異的に認識することを示している。

この発明に係る抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体は、大腸がん細胞株におけるヒトタンパク質Ｍｉｎａ５３を検出することができる。例えば、３種類の増殖期の大腸がん細胞株、ＨＴ－２９、ＷｉＤｒおよびＳＷ－６２０を用いた抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体による免疫ブロッテング分析の結果、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体は、３種類すべての細胞株において５３ｋＤａの単一バンドを認識することができた。このことは、これらの細胞株がタンパク質Ｍｉｎａ５３を発現し、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体が、他のタンパク質と交差反応をせず、大腸がん細胞中のタンパク質Ｍｉｎａ５３を特異的に認識していることを示している。

これらの細胞株におけるタンパク質Ｍｉｎａ５３の発現レベルは、ＴＰＡによって実験的に減少させたＨＬ６０細胞中のタンパク質Ｍｉｎａ５３の発現レベルよりもより一層高か

った。他方、上記３種類の大腸がん細胞株におけるアクチンレベルは、ＴＰＡ処理したＨＬ６０細胞のアクチンレベルよりも高くはなかった。これらの結果は、上記３種類の大腸がん細胞株が最終的に分化したＨＬ６０細胞よりも比較的高いレベルのタンパク質Ｍｉｎａ５３を含んでいることを示唆している。
また、この発明に係る抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体と抗ヌクレオリンラビット抗体とを用いた二重細胞免疫蛍光染色によって、タンパク質Ｍｉｎａ５３は、大腸がん細胞内に局在していることが確認されている。抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体は、細胞ＳＷ－６２０内の核を特異的に染色するとともに、その核質内の核小体に、ヌクレオリンに対するシグナルと重複する強力な点状の染色を施している。その他の２種類の細胞株も同一の免疫蛍光染色パターンを示した。これらの結果は、タンパク質Ｍｉｎａ５３が、本発明者らがＨｅＬａ細胞についてすでに示したものと同様に（Tsuneoka,M.,et al.,ibid）、核小体内核質中に凝縮した状態で核内に局在していることを示唆している。
更に、この発明に係る抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体は、がん細胞に加えて、がん組織、例えば、大腸がん組織内のタンパク質Ｍｉｎａ５３を検出することができるとともに、大腸がんのいずれの組織病理学的等級において、つまり、十分に分化した腫瘍、中程度に分化した腫瘍およびあまり分化していない腫瘍においてもタンパク質Ｍｉｎａ５３を検出することができる。
以下に、この発明を実施例によって更に説明をするが、下記実施例は、この発明を説明する目的のために例示的に記載するものであって、この発明を一切限定する意図で記載するものではない。
実施例１：
（ｃ－ｍｙｃをコードするプラスミド）
ヒトｃ－ｍｙｃをＣＭＶプロモーター下に導入したPc-myc/CDM8（Tsuneoka,M.et al.(1997)Oncogene 14,2301-2311）を用いた。またこのプラスミドを、PstIで消化し、自己ライゲートして、活性化ドメインが欠如している変異型ｃ－Ｍｙｃタンパク質をコードするpc-myc（d41-178）/CDM8を作製した。pTc-mycer/BSの２ｋｂのBstXI-KpnIフラグメント（Klenow Enzymeで平滑化した）を、pCAGGS哺乳動物発現ベクターの５ｋｂのEcoRIフラグメント（Klenow Enzymeで平滑化し、E.coliアルカリホスファターゼによって脱リン酸化した）中に挿入して、ｃ－ｍｙｃｅｒがチキン－アクチンプロモーターとＣＭＶプロモーターとから構成されたキメラプロモーター下に挿入したｐｃ－ｍｙｃｅｒ/ＣＡＧＧＳを作製した。
実施例２：
（ｍｉｎａ５３をコードするプラスミド）
ヒトｍｉｎａ５３に対するｃＤＮＡを、ヒト赤血球白血病（ＨＥＬ）ライブラリからの５′－ＧＡＡＧＣＴＴＡＴＧＣＣＡＡＡＧＡＡＡＧＣＡＡＡＧＣＣＴＡＣＡＧＧ－３′（開始コドンのメチオニンの直前にHindIII部位を追加）と、５′－ＴＧＡＡＴＴＣＡＴＣＣＴＣＴＣＣＴＣＧＧＣＴＣＡＧＧＴＣＴＴ－３′をプライマーとして使用してヒト赤白血病細胞（ＨＥＬ）ライブラリーからＰＣＲによって増幅した。増幅した１．４ｋｂのフラグメントをpGEM-Tベクター（プロメガ社製）中にクローン化して、それぞれ４６５個ならびに４６４個のアミノ酸からなるタンパク質をコードするpT/hmina53（465）ならびにpT/hmina53（464）とを作製した。pT/hmina53（465）の１．４ｋｂのHindIII-SalIフラグメントを、HindIIIとSalIとで切断したpGEFP-CS（クロンテック社製）を用いて伸長してクローン化し、pEGFP/hmina53（465）を作製した。HindIIIとNotIとで消化したpT/hmina53（465）の１．４ｋｂのHindIII-NotIフラグメントを、pRc/CMV（Invitrogen）中に挿入して、pmina53/Rc/CMVを作製した。ヒトｍｉｎａ５３をコードするＤＮＡフラグメントを、pEGFP/hmina53（465）からの５′－ＧＣＣＡＴＧＣＣＡＴＧＧＣＡＡＡＧＡＡＡＧＣＡＡＡＧＣＣＴＡＣ－３′（NcoI部位を追加）と、５′－ＧＧＣＡＴＧＣＣＡＴＧＧＣＴＡＧＡＣＴＡＣＴＴＧＡＡＴＴＡＡＡＣ－３′（NcoI部位を追加）とをプライマーとして用いて、ヒトｍｉｎａ５３をコードするＤＮＡフラグメントを、pEGFP/hmina53（465）からＰＣＲで増幅し、増幅した１．４ｋｂフラグメントを、E.coli発現ベクターpETlld（Novage

n）（NcoIで切断し、E.coliアルカリホスファターゼで脱リン酸化した）を用いて伸長に挿入し、pET/hmina53を作製した。pEGFT/hmina53（465）の１．４ｋｂのXhoI-SalIフラグメント（Klenow Enzymeで平滑化した）を、pGEX-3X（Pharmacia）（EcoRIで消化して、Kelenow Enzymeで平滑化し、E.coliアルカリホスファターゼで脱リン酸化した）中に挿入して、pGEX-hmina53を作製した。

実施例３：

（ｍｉｎａ５３のゲノミックＤＮＡフラグメントを有するレポータープラスミド）

そのプロモーター領域からイントロン１に伸長しているヒトｍｉｎａ５３遺伝子のゲノミックＤＮＡフラグメントを、プライマーとして５′－ＣＧＧＧＡＴＣＣＴＧＡＡＣＧＣＧＧＡＡＣＡＣＣＧＣＣＧＧＧＴＡＧＣ－３′（BamHI部位を追加）と、５′－ＣＣＣＡＡＧＣＴＴＣＣＴＣＴＴＣＣＴＣＣＣＡＧＴＣＴＡＴＣＣＴＴＣ－３′（HindIII部位を追加）とを用いて、ヒトｍｉｎａ５３遺伝子のプロモーター領域からイントロン１の一部までのゲノムＤＮＡ断片を、ヒト末梢血由来のＤＮＡを鋳型としＰＣＲで増幅した。その増幅した０．８ｋｂのフラグメントを、BamHIとHindIIIとで切断した後、BglIIとHindIIIとで切断したｐＧＬ３（プロメガ社製）の４．８ｋｂフラグメント中に挿入して、pMina（w）luciを作製した。pMina（w）luciをHindIIIとPmaCIで切断し、Klenow Enzymeで平滑化し、自己連結して-pMina（dE）luciを作製した。つぎに、Gene Editorインビトロ（in vitro）部位指向突然変異システム（プロメガ社製）を用いて、pMina（w）luciのＥ－ボックス部位に突然変異を導入し、その２個のＥ－ボックス（ＣＡＣＧＴＧエレメント）の一方もしくは両方をＣＡＣＣＴＧに変異したpMina（mE1）luciと、pMina（mE2）luciと、pMina（mE1/2）luciとを作製した。

参考例１：

（その他のプラスミド）

アクチンプロモーターのコントロール下においてハイグロマイシン抵抗遺伝子を含有するpActHyg ｐＡｃｔＨｙｇプラスミドはDr.M.Nakanishiから贈与されたものである（Tsuneoka,M.et al.(1997)Oncogene 14,2301-2311）。ＣＭＶプロモーターのコントロール下でRenilla reniformis luciferase遺伝子を含有するｐＲＬ－ＣＭＶプラスミドは市販されているもの（プロメガ社製）を入手した。

実施例４：

（ＲＮＡの調製とノーザンブロット分析）

ＲＮＡは、ＤＥＰＣで処理した市販のＲＮＡ調製液セット（ナカライテスク社製）を用いて、酸グアニジウム・チオシアネート・フェノール・クロロホルム抽出法によって細胞から単離した。抽出したＲＮＡは、ホルムアルデヒド含有アガロースゲルを用いて電気泳動をし、ハイボンドＮ（アマシャム社製）に転写し、^{32}Ｐで標識したｃＤＮＡプローブで検出した。プローブは、市販のMultiprimeラベリングキット（アマシャム社製）を用いて[■－^{32}Ｐ]ｄＣＴＰで標識した。結果はＢＡＳ２００イメージ分析（富士フィルム社製）を用いて定量した。

実施例５：

（プローブＤＮＡの調製）

ｃ－ｍｙｃと、ｍｉｎａ５３と、ＣＤ１８とのＤＮＡプローブは次のようにして調製した。

ｃ－ｍｙｃの調製：

ヒトｃ－ｍｙｃｃＤＮＡを含有するｐｃ－ｍｙｃ／ＣＤＭ８からの１．６ｋｂのHindIII-XbaIフラグメントを調製した（Tsuneoka,M.,et al.:(1997)Oncogene 14,2301-2311）。

ｍｉｎａ５３の調製：

上記ｐＥＧＦＰ／ｈｍｉｎａ５３（４６５）からの５’－ＣＡＧＡＧＣＴＧＴＣＡＡＣＡＣＣＡＧＧＴＧＧＡＡＡＧＴＴＡＣ－３’と、５’－ＴＧＡＡＴＴＣＡＴＣＣＴＣＴＣＣＴＣＧＧＣＴＣＡＧＧＴＣＴＴ－３’とをプライマーとして使用して、ＰＣＲ法にて増幅して得られた４４２ｂｐのフラグメントを使用した。

ＣＤ１８の調製：

ＴＰＡ10nM中で２４時間培養したＨＬ６０細胞から単離した全ＲＮＡからの５’－ＧＴＴＴＧＣＣＡＣＴＧＡＴＧＡＣＧＧＣＴＴＣＣＡＴＴＣ－３’と、５’－ＡＡＣＡＣＧＣＡＣＣＴＡＡＣＣＴＣＡＣＣＡＡＣＣＴＣＡＡ－３’とをプライマーとして使用して、ＲＴ－ＰＣＲ法にて増幅して得られた１．８ｋｂのフラグメント。ＣＤ１８ｃＤＮＡの配列は直接シーケンス法によって確認した。

実施例６：

５’－ＲＡＣＥおよびＲＴ－ＰＣＲプロトコルについて説明する。

（ポリメラーゼ・チェイン・リアクション（ＰＣＲ））

各プライマー10pmoleと、EX Taq DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）1.2Uと、dNTP 200■Mとを含むEX Taqバッファ50■lを用いて増幅を行った。

（５’－ＲＡＣＥ（Rapid Amplification of 5′ cDNA Ends）分析）

ＨＥＬ細胞のポリ（Ａ）＋ＲＮＡ（1■ｇ）から、逆転写反応、２重鎖ｃＤＮＡ合成およびアダプターライゲーションを、マラソン（Marathon）ｃＤＮＡ増幅キット（クロンテック社製）を用いて行った（Koda,Y.et al.:(1997)J.Biol.Chem.272,7501-7505）。第１ＰＣＲは、プライマーとして、ｍｉｎａ５３－ＲＡＣＥ－１（５’－ＧＣＡＧＴＡＣＴＧＴＧＡＧＧＡＣＡＡＴＧＴＧＧＴＣＴＴ－３’）と、ＡＰ１プライマーとを使用して行った。温度プロファイルは、９４℃で１分間の初期熱変性後、９６℃での１５秒間の熱変性工程、６８℃での３分間のアニーリング工程と伸張工程とを１サイクルとして２５サイクルの処理をした。上記第１ＲＡＣＥ－ＰＣＲ生産物を１０００倍希釈した液1■lをネストＲＡＣＥ－ＰＣＲのためのテンプレートとして使用した。ネストＲＡＣＥ－ＰＣＲは、ｍｉｎａ５３－ＲＡＣＥ－２（５’－ＣＡＡＣＣＡＡＧＧＡＧＣＣＡＡＡＧＴＡＡＣＡＴＴＣ－３’）と、ＡＰ２プライマーとを使用して行った。温度プロファイルは、９４℃で１分間の初期熱変性後、９６℃での１５秒間の熱変性工程、６８℃での４分間のアニーリング工程と伸張工程とを１サイクルとして２５サイクルの処理をした。

（ＲＴ－ＰＣＲ（Reverse Transcriptase-PCR））

ＨＥＬもしくはＲＣＮ－９細胞もしくはマウスの胃の細胞の一本鎖ｃＤＮＡを、市販のスーパースクリプト（Superscript）一本鎖ｃＤＮＡ合成キット（Invitrogen）を用いて全ＲＮＡ（1■ｇ）に対して合成した。得られた１重鎖ｃＤＮＡ1■l（全量20■l）をＰＣＲの鋳型として使用した。増幅用のＲＴ－ＰＣＲ用プライマーとしては、ヒトに対しては、ｍｉｎａ５３ＲＴ－Ｆ（５’－ＡＣＡＣＣＧＧＴＧＡＣＧＡＧＣＧＣＡＣＧＧＡＡＡＧ－３’）と、ｍｉｎａ５３ＲＴ－Ｒ（５’－ＧＣＣＴＣＴＣＡＴＣＴＧＴＧＧＧＧＡＡＧＴＡＴＴＡ－３’）とを、ラットとマウスに対しては、ラットｍｉｎａ５３ＲＴ－Ｆ（５’－ＴＴＴＣＣＴＣＣＣＴＡＣＴＴＧＴＧＡＡＣＡＡＴＧＣ－３’）と、ラットｍｉｎａ５３ＲＴ－Ｒ（５’－ＡＡＴＧＡＴＧＣＴＣＴＴＴＡＡＡＧＧＡＧＴＴＡＴＴＴ－３’）とを使用した。温度プロファイルは、９８℃での１５秒間の熱変性工程と、６５℃での１分間のアニーリング工程と、７２℃での２分３０秒間の伸張工程を１サイクルとして３５サイクルの処理をした。

実施例７：

（細胞培養）

ヒト膠芽腫細胞株Ｔ９８Ｇ細胞を非必須アミノ酸と10%ウシ胎児血清（ＦＣＳ）含有イーグル培地中で培養した。ＨｅＬａ細胞、ラット繊維芽細胞株３Ｙ１およびその誘導体を、10%ＦＣＳ添加ダルベッコ補正イーグル培地中で培養した。ヒト前骨髄性白血病細胞ＨＬ６０を、20%ＦＣＳ添加ＲＰＭＩ１６４０培地中で培養した。ラット結腸がん細胞株ＲＣＮ－９を、ＲＩＫＥＮ細胞バンクから入手して、10%ＦＣＳ添加ＲＰＭＩ１６４０培地中で培養した。Ｍｙｃまたは活性化ドメインを欠損したｃ－Ｍｙｃを発現する３Ｙ１細胞を確立するために、20■ｇのpc-myc/CDM8もしくはpc-myc（d41-178）/CDM9と、0.4■ｇのpActHygとを用いて、カルシウムーリン酸方法によって、細胞に遺伝子導入した（Chen,C.A.,et al.:(1988)Biotechniques 6,632-638）。得られた細胞は200■ｇ/mlのハイグロマイシンを含有する培地中で２週間培養した。個々のクローンを単離し、ｃ－Ｍｙｃもしくは変異型ｃ－Ｍｙｃタンパク質の発現を、抗ｃ－Ｍｙｃ抗体を使用してウェスタンブロット

分析法によって検出した。クローン3Y1MycAと3Y1MycB（ｃ－Ｍｙｃタンパク質を発現している）およびクローン3Y1Myc（dTAD）Aと3Y1Myc（dTAD）B（大部分の活性化ドメインを欠損している変異型ｃ－Ｍｙｃタンパク質を発現している）が確立された。ｃ－ＭｙｃＥＲキメラタンパク質（T98Gmycer-2）を発現するＴ９８Ｇ細胞を確立するために、20■ｇのpc-mycer/CAGGSと、０．４μｇのpActHygとを用いて、細胞を形質転換し、個々のクローン中のｃ－ＭｙｃＥＲの発現は上記のようにして検出し、T98Gmycer-2を確立した。

実施例８：

（ＤＮＡチップ（ｃＤＮＡマイクロアレイ）を用いた示差ディスプレイ）

未処理のT98Gmycer-2細胞とＯＨＴで２０時間処理した細胞から全ＲＮＡを単離した。ポリ（Ａ＋）ＲＮＡを回収し、市販のＤＮＡチップ（インサイト社製）を用いて示差ディスプレイに適用した。発現配列タグ（ＥＳＴ）クローンを含む約９千種類のｃＤＮＡをチップにプレートした（UniGEM Human VVer.2）。

実施例９：

（トランジェント発現アッセイ）

T98Gmycer-2細胞を10%ＦＣＳを追加した培地中で生育した。３ｘ１０^{4}個の細胞をデイッシュ（１２ウエルプレート；ウエルの直径：22mm）中にプレートし、２０～２４時間培養した。1■ｇのレポータープラスミドとインターナルマーカーとして20ngのｐＲＬ－ＣＭＶをFuGENE6試薬（ロッシュ・ダイアグノステイックス社製）を用いて細胞に導入した。レポーター遺伝子導入１日後、ＯＨＴ（最終濃度が0.2.■Mになるように）を添加してＭｙｃＥＲキメラタンパク質を活性化して、更に１７時間培養した。次いで、細胞を回収して、ファイアフライ・ルシフェレース（firefly luciferase）ならびにレニラ・レニホルミス・ルシフェレース（Renilla reniformois luciferase）の活性をデュアル－ルシフェレースレポーターアッセイ系（dual-luciferase reporter assay system）（プロメガ社製）を用いて定量した。Renilla reniformisルシフェレース活性値を用いて試料間の遺伝子導入程度を標準化した後、活性化ＭｙｃＥＲを有する細胞からのfireflyルシフェレース活性を、ＭｙｃＥＲ活性化していない細胞からの活性に対する比率として表した。ＭｙｃＥＲの活性化によらないＯＨＴの効果を標準化するために、T98Gmycer-2細胞からの値を、上記T98Gmycer-2細胞と同一方法で処理したＴ９８Ｇ親細胞からの値で割った値を求め、ＭｙｃＥＲキメラタンパク質の活性化に対するレポーター遺伝子の反能性反応性とした。なお、値は４回実験をしてその平均値で表している。

実施例１０：

（クロマチン免疫沈降）

クロマチン免疫沈降実験は、ｃ－Ｍｙｃに対する抗体ならびにコントロール抗体を使用して行うとともに、抗体を使用しないコントロールも行った。この実験では、ｃ－Ｍｙｃに対する抗体は２種類使用した。１つはｃ－ＭｙｃのＮ－末端側半分と反応し、もう１つはＣ－末端側半分に主に結合するものである。アッセイは基本的にはすでに発表された方法に従って行った（Boyd,K.E.,et al.:(1997)Mol.Cell.Biol 17.2529-2537）。免疫複合体は、非特異的な結合を妨げるように処理をしたプロテインＡビーズ（５０％容量／容量）２０■ｌを添加することによって回収した。上記文献記載のようにして、ビーズを洗浄し、ＤＮＡフラグメントを溶出し、溶出した溶液をフェノール／クロロホルムで抽出し、エタノールで沈降させた。免疫沈降したＤＮＡフラグメントはＰＣＲによって検出した。使用したＰＣＲプライマーは、５′－ＧＣＣＧＧＣＧＣＴＧＴＧＧＴＴＧＣＧＧＧＡＣＣＴＧ－３′と、５′－ＴＣＣＴＣＴＴＣＣＴＣＣＣＡＧＴＣＴＡＴＣＣＴＴＣ－３′であり、これらのプライマーを使用してヒトｍｉｎａ５３遺伝子の転写開始部位の近くにＥ－ボックスを含む４８３ｂｐのフラグメントを増幅する。別のプライマーとしては、５′－ＴＴＡＣＡＧＧＴＡＡＧＣＣＣＴＣＣＡＡＴＧＡＣＣ－３′と、５′－ＧＣＡＡＡＧＣＴＡＣＣＡＴＴＴＡＧＧＡＡＣＣＣ－３′とを使用して、第２２番染色体中の検出可能な遺伝子を有しない領域に位置している（Bouchard,C.,et al.:(2001)Genes & Dev 15, 2042-2047）Ｅ－ボックスにおけるゲノミック配列を増幅する。このＥ－ボックスは検出可能な遺伝子を有しないクロモソーム中に位置している（Bouchard,C.,et al.:(2001)Genes & Dev

15, 2042-2047）。
実施例１１：
（抗体）
ヒトｍｉｎａ５３のＬｙｓ３からカルボキシル基末端までの部分は、市販のE.coli BL21（DE3）（Novagen）中でpET/hmina53を用いて発現し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって単離、精製した。この組換えポリペプチドでラビットを免疫した。ＧＳＴ融合タンパク質ＧＳＴ－Ｍｉｎａ５３をE.coli JM109中でpGEX-hmina53を用いて発現し、グルタチオン・セファロース（Pharmacia）によって単離した。組換えＧＳＴ－Ｍｉｎａ５３ポリペプチドを結合したセファロース４Ｂを用いてラビットの血清から抗体を上記文献に従って精製した。１個の抗ｃ－Ｍｙｃ抗体はすでに報告したものを用いた。
参考例２：
その他の抗体は市販のものを使用した。その他の抗体としては、抗ｃ－Ｍｙｃ抗体（Ｎ２６２）（サンタクルス社製）、抗ヌクレオリンマウスモノクローナル抗体（Ｃ２３（サンタクルス社製）、ヤギ抗ラビットＩｇＧ－ＨＲＰ抗体（サンタクルス社製）、アレクサ４８８結合抗マウスＩｇＧ（モレキュラー・プローブ社）およびＣｙｓ結合抗ラビットＩｇＧ（ザイメッド・ラボラトリーズ社製）を使用した。
実施例１２：
（ウェスタンブロット分析および間接免疫蛍光染色）
ウェスタンブロッテイングは実質的には上記文献記載のとおりに行った（Tsuneoka,M.,et al.:(1988)J.Biochem.104,560-564）。細胞をトリプシン処理し、100mMトリス（pH6.8）、0.1MＤＴＴ、20%グリセロールを含む３％ＳＤＳ溶液中に回収し、４～２０％ポリアクリルアミド上で分離し、ポリビニリデンジフルオリド（ＰＶＤＦ）ミリポアメンブレン（ミリポア社製）に移行した。抗体で処理した後、シグナルをＥＣＬ強化化学発光法（アマシャム・ファルマシア社製）を用いて検出した。
間接免疫蛍光法のために、６ウエルプレートのガラスカバースリップ上で生育したＨｅＬａ細胞を－２０℃で１０分間メタノール中で固定した。抗Ｍｉｎａ５３ラビット抗体と抗ヌクレオリンマウスモノクローナル抗体を添加し、３７℃で１２０分間反応した。0.1%スキムミルクＰＢＳ懸濁液で３回洗浄した後、Ａｌｅｘａ４８８結合抗マウスＩｇＧならびにＣｙ３結合抗ラビットＩｇＧを添加し、３７℃で１２０分間反応し、0.1%スキムミルクＰＢＳ懸濁液で３回洗浄した。最後に、細胞をイムノン（Ｉｍｍｕｎｏｎ）（テルモ・シャンドン社製）中に埋設し、蛍光顕微鏡で観察した。
実施例１３：
（ＲＮＡの調製およびｓｉＲＮＡの細胞中への導入）
２１個のヌクレオチドからなるスモール・インターフェアリング（small interferring）ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）二本鎖が、ＨｅＬａ細胞を含む哺乳動物の細胞株中で遺伝子発現を特異的に抑制するとの報告が最近なされている（Elbashir,S.M.,et al.:(2001)Nature 411,494-498）。そこで、２１個のヌクレオチドからなるｓｉＲＮＡであって、ヒトｍｉｎａ５３ならびにラットｍｉｎａ５３（１９個のヌクレオチドのうち５個がヒトｍｉｎａ５３のそれとは異なる）に対して特異的なｓｉＲＮＡ二本鎖２重ラセンを常法にしたがって化学的に合成した。非特異的コントロールとして、ヒトｍｉｎａ５３ｓｉＲＮＡとは逆方向配列を有する二本鎖も同様に合成した。ヒトＭｉｎａ５３およびラットＭｉｎａ５３を標的とするｓｉＲＮＡ配列は、開始コドンの第１ヌクレオチドに対して位置４５－６３を使用し、３′末端に２つのデオキシチミジンを付加している。ｓｉＲＮＡをアニールし、実質的には文献記載の方法と同じ方法で細胞に導入した（Elbashir,S.M.,et al.:(2001)Nature 411,494-498）。ｓｉＲＮＡ導入の２４時間前に、指数関数的生育期の細胞をトリプシン処理し、１２ウエルプレートにプレートした。ｓｉＲＮＡは１ウエルあたりｓｉＲＮＡ200pmoleと、市販のオリゴフェクタミン（Oligofectamine）（ライフテクノロジー社）とを用いて細胞に導入した。ただし、ＨｅＬａ細胞は、無血清培地では２０時間以上培養し、3Y1MycB細胞では同様に１０時間培養し、ｓｉＲＮＡを導入した。
実施例１４：抗ヒトＭｉｎａ５３モノクローナル抗体の作製

（抗原）
大腸菌を利用してリコンビナントヒトＭｉｎａ５３タンパク質を作製した。精製したタンパク質をMPL+TDMアジュバントシステム（シグマ社）と混合することにより感作用抗原溶液とした。
（免疫スケジュール）
生後８週から10週のマウス（Balb/c）の後ろ足のひらに0.1ml（0.5mg/ml、Ｍｉｎａ５３タンパク質）ずつ、合計一匹当たり0.2mlの上記抗原溶液を注射し１回の感作とした。初回の注射をしてから、３日後、６日後に同様の方法で抗原を注射した。１４日後にアジュバントと混合しない抗原を上記と同量、同様の方法により注射しブースト（Boost）した。
（Ｂ細胞の回収）
最後の注射（Boost）から４日後に後ろ足付け根のリンパ節を無菌的に取り出し、滅菌したスライドグラス２枚を使ってリンパ節組織を摺り潰して壊してＢ細胞を回収した。
（細胞融合）
回収したＢ細胞をマウスミエローマ細胞株FO1細胞と１０：１の割合で混合した後、ポリエチレングリコール（PEG）4000を用いて両者を細胞融合した。
（ハイブリドーマの選択）
融合した細胞は96穴培養皿で培養した。培地は５％Briclone（大日本製薬）、20％牛胎児血清、ＨＡＴ溶液を含むＰＲＭＩ１６４０培地を用い、Ｂ細胞と融合したマウスミエローマ細胞（ハイブリドーマ）のみを選択的に生存させた。この時、ハイブリドーマ生育を助けるため融合していない胸腺細胞と共に培養した。
上記のようにして、４個のハイブリドーマを選別し、このうちの１つ（mouse-mouse hybridoma MT/HK-1）を、平成１５年４月９日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１中央第６）にＦＥＲＭ　Ｐ－１９２９８として寄託している。
実施例１５：抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体活性の測定法
精製したリコンビナントヒトタンパク質Ｍｉｎａ５３を10mM Tris（pH8.0）溶液に3～10g/mlの濃度になるように調整し、得られた溶液0.1mlをマイクロタイタープレートの各ウエル中に加え、３時間から１昼夜室温で放置した。その後、溶液を捨て、１％スキムミルクを含むＰＢＳ（phosphate buffered saline）溶液を0.2ml加えて４℃で保存した（ブロッキング操作）。プレートは２時間から１週間以内に使用した。１％スキムミルク溶液を捨てた後、ＰＢＳでウエルを２回洗浄後、測定に供する溶液0.1mlを加え、３７℃で２時間あるいは４℃で１昼夜インキュベーションした。ウエルを３回ＰＢＳにより洗浄した後、西洋ワサビパーオキシダーゼを結合した抗マウスＩｇＧ溶液を0.1ml加え、３７℃で２時間あるいは４℃で１昼夜インキュベーションした。その後、ウエルを３回ＰＢＳにより洗浄した後、パーオキシダーゼの基質であるｏ－ＰＤＡ溶液（0.4mg/ml ｏ－フェニレンジアミンの0.1Mクエン酸塩溶液、0.2M Na_2HPO_4,0.005% H_2O_2）を0.1ml加え、室温で１５分から３０分間放置した後、0.05mlのオキサレート溶液を加えて反応を停止した。450nmでの吸収を測定することにより、パーオキシダーゼ活性を測定した。
上記ハイブリドーマを培養した培地中の抗Ｍｉｎａ５３抗体活性の測定は、培養を始めてから１４日後と２１日後に培養液0.1mlをとり、上記方法により行った。
実施例１６：ウエスタンブロッティング
ＨｅＬａ細胞をＳＤＳ溶液（3% SDS、0.125M Tris（pH6.8）、20mMジチオスレイトール、20%グリセロール）により１００℃で１０分間抽出し、SDS-PAGEし、ポリビニリデンジフルオライド微孔性メンブレン（Millipore,Bedford,MA）に移した。そのメンブレンをハイブリドーマ培養液と３７℃で３０分間反応させた後、洗浄し、さらに西洋ワサビパーオキシダーゼを結合した抗マウスＩｇＧ溶液と３７℃で３０分間反応させた後、再び洗浄した。シグナルは、市販のエンハンスト・ケミルミネッセンス・テクニック（enhanced chemiluminescence technique（Amersham Bioscience））システムにより検出し、ウエスタンブロット解析をした。

実施例１７：抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体の精製
プリスタン（2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン.）を２週間程度前にあらかじめ腹腔に注射したマウス（balb/c）に、上記ハイブリドーマを腹腔に注射した（$2x10^6$/頭）。１０～２０日後、18ゲージ注射針を用いて腹水を回収した。腹水は、硫安分画し、抗体活性を示す画分を、10mM Tris（pH8.0）により透析した。あらかじめ10mM Tris（pH8.0）に平衡化したＤＥ－５２（ワットマン社）に上記画分を添加し、0－0.2Mの塩化ナトリウムの濃度勾配をもつ10mM Tris（pH8.0）により溶出し、溶出画分中の抗Ｍｉｎａ５３抗体活性を測定した。高い抗Ｍｉｎａ５３抗体活性を持つ画分を集めて精製し、精製抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を得た。
実施例１８：抗ヒトＭｉｎａ５３抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を用いた組織診断
抗ヒトＭｉｎａ５３マウス抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を用いて、大腸がんを次のようにして染色した。その結果、非がん部組織に比べて、大腸がん部分が強く染色された。
（抗ヒトＭｉｎａ５３マウス抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体による組織染色法）
先ず、ホルマリン固定し、パラフィン包埋したブロックを約3μm厚さにスライスし、スライドグラス上にマウントした。このスライドグラス上の切片をキシレンに浸けて３７℃で１５分間放置した。１５分後、新しいキシレンに変えた。このキシレン処理を全部で３回行って脱パラフィン処理を行った。このように脱パラフィン処理を行った切片を、９９％エタノールに浸け、１０分後に新しい９９％エタノールに変えた。このエタノール処理を全部で３回行った後、さらに９５％、９０％、７０％と段階的に含水率の高いエタノールに各５分間ずつ浸けた。更に、水に５分間浸けて水洗した。水洗した切片を、１０mMクエン酸緩衝液（pH6.0）中で１２１℃で２０分間オートクレーブ処理し、抗原性を回復させた。その後、室温に戻してから水洗し、ＰＢＳ溶液に浸漬した。
次ぎに、0.05%ツイーン２０を含むＰＢＳ溶液で１回洗った後、試料を3% H_2O_2のＰＢＳ溶液を用いて室温で３０分間処理することにより、内在性のパーオキシダーゼ活性を失活させた。
得られた試料を0.05%ツイーン２０を含むＰＢＳ溶液により２回洗浄し、１％スキムミルクと５％ウサギ血清を含むＰＢＳ溶液を用いて室温で３０分間処理することにより、抗体の非特異的結合を防ぐブロッキング操作を行った。
抗体を１％スキムミルクを含むＰＢＳ溶液により希釈し最終濃度を3.5μg/mlにし、上記のようにブロッキング操作をして得られたスライドグラス上の試料の上に添加し、４℃で一夜反応させた。翌日、試料を0.05%ツイーン２０を含むＰＢＳ溶液によって３回洗浄し、ビオチン化した抗マウスＩｇＧウサギ抗体と室温で３０分間反応させた。
反応後、得られた試料を0.05%ツイーン２０を含むＰＢＳ溶液により３回洗浄後、西洋ワサビパーオキシダーゼを結合させたストレプトアビジンと反応させた。得られた試料を0.05%ツイーン２０を含むＰＢＳ溶液により３回洗浄後、3,3?ジアミノベンジジン（ＤＡＢ）基質溶液を加え室温放置し、パーオキシダーゼ活性を持つ部分を茶色に発色させた。その後、４分間水洗することにより、パーオキシダーゼ反応を止めた。次いで、ヘマトキシリンで染色した後、スライドグラスを脱水し包埋した。
実施例１９：抗ヒトＭｉｎａ５３モノクローナル抗体を用いた溶液中のＭｉｎａ５３タンパク質の定量
上記で得られた抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を２つ組み合わせることによりＭｉｎａ５３タンパク質をサンドウイッチして定量をすることができた。
（マイクロタイタープレートによるＭｉｎａ５３の定量）
抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を、西洋ワサビパーオキサイド結合キット（Alpha Diagnostic International,San Antonio,Texas,USA）を用いてキットの指示に従って標識して、西洋ワサビパーオキサイドを結合した抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を調製した。
更に、0.1Mクエン酸塩/0.2M Na_2HPO_4溶液に0.4mg/mlの濃度でo-PDAを溶解し、－８０℃で保存し、使用直前に1000分の1容量の5%過酸化水素水を加えて、o-フェニレンジアミン溶

液を調製した。
他方、もう１つの抗体20μg/mlを10mM Tris（pH6.8）溶液に溶解し、この溶液をマイクロタイタープレートの各ウエルに50μlづつ加え、３７℃で２時間あるいは４℃で一昼夜インキュベーションした。続いて、抗体溶液を捨てた後、1%スキムミルクを含むＰＢＳ溶液を200μl加え、３７℃で２時間あるいは４℃で一昼夜インキュベーションした。この後、１ウエルあたり試料50μlを加え、３７℃で２時間あるいは４℃で一昼夜インキュベーションした。この際、必要に応じて、試料はウシ胎児血清を用いて希釈した。次ぎに、ＰＢＳを用いて３回洗浄した後、希釈した西洋ワサビパーオキサイドを結合した上記抗体溶液を１ウエルあたり50μl加え、３７℃で２時間あるいは４℃で一昼夜インキュベーションした。更に、ＰＢＳを用いて３回洗浄した後、o-フェニレンジアミン溶液を１ウエル当たり50μl加え、３７℃で１０－１５分間インキュベートして、その発色を定量した。
実施例２０：
（ウェスタンブロッテング）
ウェスタンブロッテング分析のために、ヒト大腸がん細胞株ＨＴ－２９、ＳＷ－６２０ならびにＷｉＤｒをそれぞれ１０％ＦＣＳ含有ダルベッコ改変イーグル培地で培養し、ヒト前骨髄細胞白血球細胞株ＨＬ６０を１０％ＦＣＳ添加ＲＰＭＩ１６４０培地で培養した。このように培養した細胞を、トリプシンおよびＥＤＴＡを含むリン酸緩衝液（ＰＢＳ）で処理して集め、ＰＢＳで洗浄した。次いで、細胞を、３％ＳＤＳ、50mMジチオスレイトールおよび２０％グリセロールを含む0.125Mトリスｈｃｌバッファ（pH6.8）溶液に懸濁し、１０分間煮沸して４～２０％勾配ＳＤＳポリアクリルアミドゲルを用いて分離した。タンパク質をポリビニリデンジフルオライドミクロボアメンブレンに移し、１％スキムミルクを含むＰＢＳ溶液で処理し非特異的結合部位をブロックした。マウス抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体およびＨＲＰ共役ヤギ抗マウスＩｇＧ抗体で処理した後、エンハンスト・ケミルミネッセンス（ＥＣＬ）ウェスタンブロッテング試薬システムを用いてシグナルを検出した。ローデイングコントロールとして、メンブレンを剥離バッファで処理した後、抗βアクチンモノクローナル抗体によって再プローブした。
図６Ａはウエスタンブロッテイング分析結果を示している。ウエスタンブロツテイング分析は、ＴＰＡの非存在下で培養したＨＬ６０細胞（レーン１）、ＴＰＡの存在下で培養したＨＬ６０細胞（レーン２）および大腸がん細胞株ＷｉＤｒ（レーン３）、ＨＴ－９０（レーン４）ならびにＳＷ－６２０（レーン５）からそれぞれ調製した細胞溶菌液を電気泳動後、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を用いて行った（上側パネル）。
（間接免疫蛍光染色）
間接免疫蛍光染色するために、上記ＨＴ－２９、ＳＷ－６２０ならびにＷｉＤｒ細胞を、６ウェルプレートのガラスカバースリップ上で生育させ、メタノール中において－２０℃で１０分間固定した。１％スキムミルクを含むＰＢＳ溶液でブロッキングした後、マウス抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体および抗ヌクレオリン（ｎｕｃｌｅｏｌｉｎ）ラビットポリクローナル抗体を添加して、３７℃で１２０分間インキュベーションした。０．１％スキムミルクを含むＰＢＳ溶液で３回洗浄した後、アレクサ（Ａｌｅｘａ）４８８共役抗マウスＩｇＧ抗体およびＣｙｓ３共役抗ラビットＩｇＧ抗体を添加し、３７℃で１２０分間インキュベーションし、０．１％スキムミルクのＰＢＳ溶液で３回洗浄した。最後に、細胞をイムノン（Ｉｍｍｕｎｏｎ）内に包埋して蛍光顕微鏡で観察した。
図６Ｂは、細胞内におけるタンパク質Ｍｉｎａ５３の局在を示している。図６において、大腸がん細胞株ＳＷ－６２０内におけるタンパク質Ｍｉｎａ５３の局在を、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体で間接免疫染色することによって目視観察した結果を示した（a）。また、抗ヌクレオリンラビットポリクローナル抗体で染色した結果を目視観察した結果を示した（b）。更に、両者を重ねた画像を示した（ｃ）。
実施例２１：
２４名の原発性大腸腫瘍患者から採取した標品をホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した試料を使用した（Fujitani N,et al.:Glycoconjugate J 2000,17:331-338）。これらの標品には、２３例の大腸腺がんが含まれていて、そのいくつかの例は高度に浸潤してい

て、またいくつかの例はリンパ管浸潤を示していた。また１例は腺腫であった。組織切片を、ヘマトキシリンおよびエオシン（ＨＥ）染色に基づいた組織病理学的勾配システムに従って、高分化、中分化および低分化とに分類した。組織の特徴の概要を表１に示す。

実施例２２：大腸がん細胞の免疫染色

脱パラフィン化した１０％ホルマリン固定・パラフィン包埋大腸がん組織を、ストレプトアビジン－ビオチン・コンプレックス・イムノパーオキシダーゼ法によって免疫染色した（Fujitani,N.,et al.:J Histochem Cytochem 2000,48:1649-1656）。

抗原を回復させるために、切片をマウントしたスライドを、10mMクエン酸ナトリウムバッファー（pH6.0）中で２０分間オートクレーブした。３％過酸化水素を含むＰＢＳ溶液、次いで１％スキムミルクと５％ラビット血清を含むＰＢＳ溶液で前処理した後、最終濃度3.5μg/mlの抗Ｍｉｎａ５３抗体を含む１％スキムミルク溶液または抗Ｋｉ－６７抗体を、湿ったチェンバー中において４℃で一昼夜反応させた。0.05％ツイーンのＰＢＳ溶液で３回洗浄した後、切片を、ビオチン化ラビット抗マウスＩｇＧ抗体、続いてＨＲＰ－ストレプトアビジン・コンジュゲートとインキュベーションした。次いで、３、３－ジアミノベンジジンと過酸化水素を用いて、Ｍｉｎａ５３については４分間、Ｋｉ－６７については２分間発色させた後、水で洗浄して反応を停止させた。ヘマトキシリンで対比染色した後、スライドを脱水し、カバーガラスをかけた後、顕微鏡で観察した。

（免疫組織化学的染色の評価）

下表１に示す染色強度については、各切片を目視観察することによって０から３までの点数で記録した。点数は、最高の染色強度を有する切片を３点とし、最低の染色強度を有する切片を１点とし、染色しなかった切片を０点とした。染色された細胞の割合を推定するために、画像をデジタルカメラで撮影し、表示視界内の陽性細胞の数を数えて、染色細胞の割合（％）で表した。また、下表１における染色インデックスは、染色強度に染色細胞の平均割合％を乗じた値として計算した。

実施例２３：リコンビナントヒトタンパク質Ｍｉｎａ５３の定量

大腸菌で作製したリコンビナントヒトタンパク質Ｍｉｎａ５３を0.1-1000ng/mlの濃度になるようにウシ胎児血清を用いて調整し、ELISA法により定量した。その結果、1-1,000ng/mlのリコンビナントヒトタンパク質Ｍｉｎａ５３を定量することができた（図１０）。

実施例２４：

実施例２３に示した方法により正常人からの血液中のＭｉｎａ５３の量を定量したところ、0-5ng/mlのＭｉｎａ５３を検出した。また、乳がんの患者の血液中に正常値よりも高いレベルである６４ng/mlのＭｉｎａ５３を検出した（図１１）。

上記実施例から、このELISA法は血中のＭｉｎａ５３を定量することができることがわかる。

実施例２５：食道がん細胞の染色

上記実施例で得た抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を用いて食道がん細胞を染色し、現在ヒト食道がん細胞の染色に使用されている抗Ｋｉ－６７モノクローナル抗体による食道がん細胞の染色による染色具合と比較した。

３８人の食道がん患者からの食道がん組織を、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体あるいは抗Ｋｉ－６７モノクローナル抗体により染色し、それぞれの試料における抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体あるいは抗Ｋｉ－６７モノクローナル抗体の染色インデックスを求めた。本実施例において、染色インデックスは、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体の染色インデックスを横軸に、抗Ｋｉ－６７モノクローナル抗体の染色インデックスを縦軸にとり、それぞれの食道がん組織の価をプロットした。なお、染色インデックスは、染色強度ｘ染色されている細胞の割合により求めた。その結果は図１３に示す。

また、食道がんのがん悪性度と、Ｍｉｎａ５３あるいはＫｉ－６７の染色インデックスとの関係を調べ、その結果を図１２に示す。図１２（Ａ）にはＭｉｎａ５３の染色インデックスと食道がんのがん悪性度との関係を、また図１２（Ｂ）にはＫｉ－６７の染色インデックスと食道がんのがん悪性度との関係を示している。なお、図１２（Ａ）は、Ｍｉｎａ５３の染色インデックスが０～１．８と、１．９～４との２つのグループに分け、カプラ

ン－マイヤー（Kaplan-Meier）法により解析した結果を、また、図１２（Ｂ）は、Ｋｉ－６７の染色インデックスが０～０．６と、０．７～４．０との２つのグループに分け、カプラン－マイヤー（Kaplan-Meier）法により解析した結果を示している。

結果

上記実施例では、ｃ－Ｍｙｃ活性を条件付に活性化するために、エストロゲン誘発性Ｍｙｃシステムを使用した（Eilers,M.,et al.:(1989) Nature 340,66-68）。キメラタンパク質ｃ－ＭｙｃＥＲは、ヒトｃ－Ｍｙｃと、ヒトエストロゲンレセプターのエストロゲン結合ドメインとから構成されている。ｃ－ＭｙｃＥＲは、エストロゲンの不存在下で細胞骨格成分に結合している。エストロゲンもしくはその誘導体４－ヒドロキシタモキシフェン（ＯＨＴ）がキメラタンパク質に結合したとき、細胞骨格から遊離してｃ－Ｍｙｃとして機能する。ヒト膠芽腫細胞株Ｔ９８Ｇを異所性ｃ－Ｍｙｃ活性を導入する親細胞として使用した。ｃ－ＭｙｃＥＲタンパク質（T98Gmycer-2）を発現するＴ９８Ｇ細胞株を確立した。

指数関数的に増殖する状態にある細胞を、ＯＨＴの存在下もしくは不存在下で２０時間培養し、全ＲＮＡを単離し、上記に記載したｃＤＮＡマイクロアレイ分析に付した。すでに報告されているＭｙｃ標的遺伝子、つまり、ＯＤＣと、ヌクレオリン（nucleolin）の特定のシグナルは、ｃ－ＭｙｃＥＲの活性に伴って、それぞれ２．６倍と１．６倍増加した。これらの結果は、Ｍｙｃ標的遺伝子がこれらの実験システムにより検出され得ることを示している。

上記実施例において、ｃ－Ｍｙｃの機能を調べるために、ｃ－ＭｙｃＥＲ活性化によって刺激され発現上昇した遺伝子のうちでヒト発現配列タグ（ＥＳＴ）配列について調べた。その結果、ＥＳＴクローンＷ２７６６６に対するシグナルがｃ－Ｍｙｃ活性によって１．９倍程刺激され発現上昇することが分かった。この上昇率は、ｃ－Ｍｙｃ標的遺伝子であるＯＤＣとヌクレオリンについてここで測定した値と類似していた。

Ｗ２７６６６の５′－上流部をコードするｃＤＮＡ分子を、ヒト赤血球腫瘍白血病細胞（Human Erythroid Leukemia:ＨＥＬ）ライブラリーから５′－ＲＡＣＥプロトコールを用いて単離した。また、５′－末端の配列が異なる２種のｃＤＮＡを単離した。５′－ＲＡＣＥ実験からのヌクレオチド配列とＥＳＴクローンＷ２７６６６のそれに一致するヌクレオチド配列を有するＥＳＴとを用いて、ｍＲＮＡ分子の全配列を予測した。予測分子の５′－末端の配列と３′－末端の配列とに一致するプライマーを使用して、２．３ｋｂ長ｃＤＮＡをＲＴ－ＰＣＲプロトコールによって増幅した。増幅したｃＤＮＡはベクターにクローン化してその配列を決定した。得られたｃＤＮＡの大部分は、52800.28Daの予測分子量を有する４６５個のアミノ酸からなるタンパク質をコードしている（配列表の配列番号１）。

また、このタンパク質の細胞内での局在を、特異的な抗体で間接免疫蛍光染色することによって可視化したところ、このタンパク質は核中に局在していることが判明した。更に、大きな固まり状の染色が核中に検出された。抗ヌクレオリン抗体による二重染色では、これらの点が核小体と一致していることが示された。ＧＦＰ融合ｍｉｎａ５３タンパク質を細胞に発現したときにも、この融合タンパク質が核ならびに核小体に蓄積されることが観察された。これらの結果は、Ｍｉｎａ５３が核質ならびに核小体に局在している核タンパク質であることを示している。

４６４個のアミノ酸からなるタンパク質をコードするｃＤＮＡ（52672.15Daの予測分子量を有する）もクローン化した。このタンパク質には主タンパク質の２９７Ｑが欠失している。また１０１ｂｐがｍｉｎａ５３ｃＤＮＡの中央部に挿入されたｃＤＮＡも検出された。挿入配列中に停止コドンがあり、このｃＤＮＡはＭｉｎａ５３タンパク質の１－２６２個のアミノ酸と、１８個の新規なアミノ酸とをコードしている。このｍＲＮＡの量は少ないけれども、このｍＲＮＡ分子は、ヒト赤白血病細胞株（ＨＥＬ）、卵巣ムチン様嚢胞腺がん細胞株（ＭＣＡＳ）、ならびに結腸腺がん細胞株（ＷｉＤｒ）から作成したｃＤＮＡライブラリ中に検出された。

Ｍｉｎａ５３がヒト、ラット、マウスに保存されていることについて調べた結果、ｍｉｎ

ａ５３のオルソローガス遺伝子であると思われるマウスｃＤＮＡがＢｌａｓｔサーチ（GenBankAcc:NM_025910）によって見出された。この配列を基にしてＲＴ－ＰＣＲプロトコルによってマウスｍｉｎａ５３ｃＤＮＡを単離した。この配列は（GenBankAcc:NM_025910）のものとは塩基配列が異なっており、アミノ酸配列も２つ異なっていた（配列表の配列番号２）。また、３００ｂｐ長を有し、マウスとヒトのｍｉｎａ５３の３′－非翻訳領域に相同するラットＥＳＴ（GenBankAcc:H32933）も見出された。ラットｍｉｎａ５３ｍＲＮＡを増幅すると、予測されたプライマーを使用したＲＴ－ＰＣＲプロトコルによってラットｍｉｎａ５３ｃＤＮＡを単離した（配列表の配列番号３）。ラットならびにマウスｍｉｎａ５３のオープンリーデイングフレーム（ＯＲＦ）は４６５個のアミノ酸からなるタンパク質をコードしている。ラットならびにマウスｍｉｎａ５３タンパク質のアミノ酸配列は８６％が互いに一致していて、ヒトならびにマウスＭｉｎａ５３タンパク質のそれは７２％が一致していて、ヒトとラットＭｉｎａ５３のそれとは７５％一致していた。このことは、ｍｉｎａ５３が哺乳動物に保存されていることを示している。メチオニン開始コドンの３ｂｐ上流のヌクレオチドは、３種全てのｍｉｎａ５３中いおいて“Ａ”であり、コザック・コンセンサス配列に一致している。ラットｍｉｎａ５３遺伝子やマウスｍｉｎａ５３遺伝子も、ヒトｍｉｎａ５３遺伝子と同様に細胞増殖のメカニズム解明に役立ち、がん細胞の診断法などの研究にも有用である。

上記実施例において、ｍｉｎａ５３ｍＲＮＡの発現についてノーザンブロット分析によって調べたｍｉｎａ５３ｍＲＮＡの発現状況を図２に示す。

図２Ａは、ｍｉｎａ５３ｍＲＮＡの発現レベルがＴ９８Ｇ細胞中のｃ－ｍｙｃ発現レベルと関連していることを示している。血清飢餓状態のＴ９８Ｇ細胞を最終濃度が１０％になるように血清を添加して刺激した。ＲＮＡを所定の時間に単離し、同量のＲＮＡをノーザンブロット法によって分析してｍｉｎａ５３とｃ－ｍｙｃｍＲＮＡとを検出した（図２Ａの左側の泳動図）。電気泳動した２８Ｓと１８ＳリボソームＲＮＡを電気泳動した図は、加えたＲＮＡがほぼ同じ量であることを示している。検出されたｍＲＮＡを定量しプロットした（図２Ａの右側のグラフ）。これらの結果は、ｍｉｎａ５３ｍＲＮＡの発現が５倍増加したことを示している。この増加は血清添加後６時間して検出できるようになり、１２時間後に最大になった。ｃ－ｍｙｃｍＲＮＡ発現量は、血清添加後３時間して検出できるようになり、１２時間して最大となった。これらの結果は、ｃ－ｍｙｃｍＲＮＡの発現上昇に引き続き、ｍｉｎａ５３ｍＲＮＡの発現上昇が起こることを示唆している。

図２Ｂは、ヒト前骨髄性白血病細胞ＨＬ６０において、ｍｉｎａ５３ｍＲＮＡの発現レベルの低下とｃ－ｍｙｃｍＲＮＡの消滅とが平行的な関係があることを示している。ＨＬ６０細胞をＴＰＡで分化すると、ｃ－ｍｙｃの発現レベルが減少する。この実験系を使用して、Ｍｙｃ標的遺伝子が、血球細胞分化を伴うＭｙｃの発現低下によって影響されるかどうかを調べた。この実験では、ヒト前骨髄性白血病細胞ＨＬ６０をＴＰＡ10nMに接触させて所定の時点でＲＮＡを単離し、同量のＲＮＡをノーザンブロット分析によって分析して、ｍｉｎａ５３と、ｃ－ｍｙｃと、ＣＤ１８ｍＲＮＡとを検出した（図２Ｂの左側の泳動図）。更に、それぞれのｍＲＮＡを定量してプロットした（図２Ｂの右側のグラフ）。

その結果、ＨＬ６０細胞をＴＰＡ10nMで培養後９時間して、分化マーカーＣＤ１８の発現が増加し始めて、誘発発現量が２４時間目に３倍になったことが観察され、この系中で分化が確認された。ＴＰＡ添加３時間後、ｃ－ｍｙｃｍＲＮＡレベルが低下し始めて、７時間後に５分の１になった。ｃ－ｍｙｃｍＲＮＡの低下に引き続いて、ｍｉｎａ５３ｍＲＮＡの低下が連続して起こり、ｍｉｎａ５３ｍＲＮＡレベルが１２時間後に５分の１になった。これらの実験から、ｍｉｎａ５３の発現パターンがｃ－ｍｙｃの発現と因果関係があることが示された。

次に、ｃ－Ｍｙｃ活性化のｍｉｎａ５３に対する効果を調べた。図２Ｃは、ｃ－ＭｙｃＥＲタンパク質を発現するＴ９８Ｇ細胞（T98Gmycer-2細胞）におけるｍｉｎａ５３ｍＲＮＡの誘発状態を示している。ここでは、T98Gmycer-2細胞と親Ｔ９８Ｇ細胞とを0.25%血清添加培地で４０分間４０時間培養した後、ＯＨＴ200nMで処理し、ＲＮＡを所定の時間に単離した。図中、符号＋は、ＯＨＴ添加２０分前にシクロヘキシミド（ＣＨＸ）20㎍/m

lを添加したことを示している。同量のＲＮＡをノーザンブロット法による分析によってｍｉｎａ５３ｍＲＮＡが検出された（図２Ｃの左側の泳動図）。検出されたｍＲＮＡを定量しプロットした（図２Ｃの右側のグラフ）。
図２Ｃに示すように、ＯＨＴで処理したT98Gmycer-2細胞中では、ｍｉｎａ５３ｍＲＮＡのレベルは９時間一定して上昇し、誘発発現量がほとんど３倍ほど増加した。これに対して、Ｔ９８Ｇ親細胞をＯＨＴで処理してもｍｉｎａ５３ｍＲＮＡレベルの刺激は上昇しなかった。ＯＨＴによるT98Gmycer-2細胞中でのｍｉｎａ５３ｍＲＮＡの誘発発現誘導はタンパク質合成インヒビターであるシクロヘキシミドの存在下でも維持された。一方、シクロヘキシミドで処理しても、Ｔ９８Ｇ親細胞に対してはｍｉｎａ５３ｍＲＮＡレベルに対する効果はほとんど無かった。これらの結果は、ｍｉｎａ５３遺伝子がＭｙｃの直接の標的であることを示している。
Ｍｙｃの活性化によるＭｉｎａ５３タンパク質の発現誘導を図３を参照して説明する。図３は、特異的な抗体を使用したＭｉｎａ５３タンパク質のウェスタンブロッテイング分析を示す図である。まず、図３Ａを参照して、Ｍｙｃの活性化によるＭｉｎａ５３タンパク質の発現上昇を説明する。Ｔ９８ＧおよびT98Gmycer-2細胞をＯＨＴ200nMの存在下もしくは不存在下で２０時間培養した。ヒトＭｉｎａ５３タンパク質に対する特定の特異的な抗体を使用したウェスタンブロッティングによりＭｉｎａ５３タンパク質を分析した（左側パネル）。ＨＬ６０細胞を、ＴＰＡ10nMの存在下もしくは不存在下で２０時間培養して、ヒトＭｉｎａ５３タンパク質に対する特異的な抗体と、抗ｃ－Ｍｙｃ抗体に対する特異的な抗体とを使用したウェスタンブロッテイングによりＴＰＡ10nMの存在下もしくは不存在下で２０時間培養した（右側パネル）。タンパク質の染色に対するプロファイルも示した（下側パネル）。
かかる特定の特異的抗体を使用したウェスタンブロッテイングによって、アミノ酸配列から予測されたのと同じ移動度を有するバンドをＴ９８Ｇ細胞とＨＬ６０細胞とにおいて検出した（図３Ａ）。Ｍｉｎａ５３のバンド強度は、ｃ－ＭｙｃＥＲがT98Gmycer-2細胞中でＯＨＴによって活性化されたときに増加した。ＨＬ６０細胞をＴＰＡ10nMの存在下で２０時間培養した後、ｃ－ＭｙｃとＭｉｎａ５３タンパク質との発現は減少した。
図３Ｂに示すように、ヒトｃ－Ｍｙｃと、その活性化ドメイン（ＴＡＤ）の大部分を欠失している変異ｃ－Ｍｙｃをコードする発現ベクターと、空のベクターとをラット３Ｙ１繊維芽細胞中に導入して安定して発現する細胞株を確立した。3Y1MycAと3Y1MycBとは野生型ヒトｃ－Ｍｙｃを保持発現していて、3Y1Myc(dTAD)Aと3Y1Myc(dTAD)BとはＴＡＤ欠失ｃ－Ｍｙｃを保持発現していて、３Ｙ１ベクターは空のベクターを保持している。抗Ｍｉｎａ５３抗体（上側パネル）と抗ｃ－Ｍｙｃ抗体（中間パネル）とを使用してウェスタンブロッテイングによってタンパク質を分析した。通常の染色法によるタンパク質のプロファイルも示した（下側パネル）。
ＭｙｃによるＭｉｎａ５３の発現制御は、ラット繊維芽細胞株３Ｙ１中で確認された（図３Ｂ）。ヒトｃ－Ｍｙｃを３Ｙ１細胞に安定して導入したとき、Ｍｉｎａ５３の発現は、ｃ－Ｍｙｃ発現を用量依存的に増加した（３Ｙ１、３Ｙ１ベクター、3Y1MycAおよび3Y1MycBに対するレーンを比較）。また、転写活性化ドメイン（ＴＡＤ）が欠失しているｃ－Ｍｙｃ突然変異体を３Ｙ１細胞に導入したＭｙｃ突然変異体においては、野生型ｃ－Ｍｙｃの発現に匹敵するレベルでＭｉｎａ５３を発現したときには（(3Y1MycAと3Y1Myc(dTAD)Aとを比較）、Ｍｉｎａ５３の発現は増加しなかった。Ｍｙｃ突然変異体が野生型ｃ－Ｍｙｃの発現よりも遥かに高いレベルで発現しても（３Ｙ１ベクター、3Y1MycBおよび3Y1Myc(dTAD)Bのレーンを比較）、Ｍｉｎａ５３の発現は増加しなかった。これらの結果から、ｃ－Ｍｙｃがｍｉｎａ５３の発現をｃ－Ｍｙｃの転写活性化ドメイン（ＴＡＤ）を使って活性化していることを示している。
図１Ａは、ヒトｍｉｎａ５３遺伝子の構造の概略を示している。図中、ボックスはエクソンを示し、閉鎖部はオープンリーデイングフレーム（ＯＲＦ）を示し、開放部は５’未翻訳領域と３’未翻訳領域を示す。ヒトｍｉｎａ５３遺伝子は１２個のエクソンから構成されていて、２個の転写開始部位としてエクソン１ａと１ｂが存在する。転写方向は左側か

ら右側であり、転写はエクソン１ａまたはエクソン１ｂから開始する。エクソン１ｂは、エクソン１ａの０．２５ｋｂ下流に存在する。翻訳開始部位はエクソン２に存在する。停止コドン（ＴＡＧ）はエクソン１０に存在する。４６４個のアミノ酸（２９７Ｑを欠失している）をコードするｃＤＮＡはエクソン７の最初の３ｂｐが欠失している。エクソン５とエクソン６との間に存在するエクソン５’は、主ｃＤＮＡの中央部に挿入された１０１ｂｐの配列をコードしている。

ｍｉｎａ５３ｃＤＮＡ配列を含むヒトゲノミックＤＮＡ配列はＨＴＧＳ（GenBankAcc:AC026100,AC073245,AC024892）中に見出すことができる。イントロン２（エクソン２とエクソン３との間）の長さはＧｅｎＢａｎｋのデータと異なっていたので、エクソン２とエクソン３中の配列に対応するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてＰＣＲで増幅し、その長さを５．２ｋｂであることを決定した。UCSGenomeBrowserのマッピングデータは、ｍｉｎａ５３遺伝子が第３番染色体（３ｑ１２．１）にマップされていることを示している。

図１Ｂは、エクソン１ｂが２個のＥ－ボックス（ＣＡＣＧＴＧエレメント）を有していることを示している。これら２個のＥ－ボックスの１番目と２番目とをそれぞれＥ－ボックス１とＥ－ボックス２と命名した。

ｍｉｎａ５３遺伝子のプロモータ活性を調べるために、エクソン１ａから上流の領域と、エクソン１ａと、エクソン１ｂと、イントロン１の１部とを含むヒトｍｉｎａ５３ゲノミックＤＮＡフラグメントをファイアーフライ・ルシフェレース（firefly luciferase）ｃＤＮＡに結合して、レポータープラスミド、pMina(W)luciを構築した（図１Ｂ）。図中、pMina(dE)luciは２つのＥ－ボックスを持つ部分を欠損させたレポータープラスミドを、pMina(mE1/2)luciは２個のＥ－ボックスに変異を導入したレポータープラスミドを、pMina(mE1)luciはＥ－ボックス１に変異を導入したレポータープラスミドを、pMina(mE2)luciはＥ－ボックス２に変異を導入したレポータープラスミドを示している。

図１Ｃは、Ｔ９８Ｇ細胞中でのトランジエント発現アッセイによって、ＤＮＡフラグメントがプロモータ活性を有していることを示している。

ｃ－ＭｙｃＥＲをＯＨＴによって活性化すると、ルシフェレース活性は３倍まで増加した。この刺激は、ｍｉｎａ５３ｍＲＮＡに対して観察されたものに匹敵している（図２Ｃ）。

pMina(W)luciから２個のＥ－ボックスを除去したとき、ルシフェレース活性は、ｃ－ＭｙｃＥＲキメラタンパク質（図２Ｃ、pMina(W)luciのデータ）を活性化しても増加しなかった。その２個のＥ－ボックスをＣＡＣＧＴＧからＣＡＣＣＴＧに変異したpMina(mE1/2)luciからの発現はｃ－Ｍｙｃの活性化によっても増加しなかった。これらの結果は、pMina(W)luciの発現がＣＡＣＧＴＧエレメントによって刺激Ｅ－ボックスを介して活性化されることを示している。

どちらのＥ－ボックスＣＡＣＧＴＧエレメントが機能的であるかを決定するために、それぞれのＥ－ボックスの配列をＣＡＣＧＴＧからＣＡＣＣＴＧに変異した異なるＣＡＣＧＴＧエレメントを有するレポータープラスミドpMina(Em1)luciとpMina(mE2)luciとをそれぞれ構築した（図１Ｂ）。図１Ｃに示すように、Ｅ－ボックス１の変異による効果はほとんど無かった。他方、Ｅ－ボックス２を変異した場合、ｃ－Ｍｙｃによる刺激は著しく低下した。これらの結果は、ｃ－ＭｙｃがＥ－ボックス２を介して機能していることを示している。

ＨＬ６０細胞が増殖応答している間ｃ－Ｍｙｃタンパク質がインビボ（in vivo）で内因性ｍｉｎａ５３遺伝子に結合することを調べるために、文献記載の方法によってクロマチン免疫沈降（ＣｈＩＰ）を行なった（Boyd,K.E.,et al.:(1997) MOl.Cell.Biol.17,2529-2537;Boyd,K.E.,et al.:(1998) Proc.Natl.Acad.Sci.USA95,13887-13892）。抗ｃ－Ｍｙｃ抗体で免疫沈降後、各サンプル中の内因性ｍｉｎａ５３遺伝子フラグメントをＰＣＲでモニターし、ｍｉｎａ５３遺伝子中のエクソン１ｂとイントロン１の部分を特異的に増幅した。

図４に示すように、２個の異なる抗ｃ－Ｍｙｃ抗体は、増殖期のＨＬ６０細胞からｍｉｎ

ａ５３遺伝子を免疫沈降したが、ＴＰＡと共に培養すると、ＨＬ６０からはｍｉｎａ５３遺伝子断片が免疫沈降されなかった。また、ｍｉｎａ５３ゲノミックＤＮＡフラグメントを精製し検出した場合、非特異的抗体がｍｉｎａ５３ＤＮＡフラグメントを免疫沈降しなかったので、ｍｉｎａ５３遺伝子に結合するｃ－Ｍｙｃに依存していることが確認された。更に、染色体２２中の検出可能な遺伝子がいずれもない染色体領域に位置しているＥ－ボックス近傍のゲノムフラグメントは、ｃ－Ｍｙｃに対する抗体によって免疫沈降しなかったので、ｍｉｎａ５３遺伝子で検出された結合は特異的であることが確認できた。これらの結果は、増殖期のＨＬ６０細胞中において、ｃ－Ｍｙｃがｍｉｎａ５３遺伝子に特異的に結合していることを示している。

以下、Ｍｉｎａ５３がＨｅＬａ細胞の増殖と、ｃ－Ｍｙｃを著しく発現する３Ｙ１細胞との増殖に関与していることを図５を参照して説明する。

ｍｉｎａ５３の生物学的機能を調べるために、上述したように、ｓｉＲＮＡ二本鎖を使用してＭｉｎａ５３タンパク質の発現を特異的に阻害し、ｓｉＲＮＡを導入して４０時間後Ｍｉｎａ５３タンパク質をモニターした。

図５Ａで示すように、Ｍｉｎａ５３タンパク質の発現は、ヒト細胞株であるＨｅＬａ細胞中においてヒトｍｉｎａ５３に特異的なｓｉＲＮＡ二本鎖によって特異的に減少した。これに対して、非特異的なｓｉＲＮＡ、つまり、ｍｉｎａ５３とは逆方向の配列を有する二本鎖（コントロール）と、ラットｍｉｎａ５３に特異的な二本鎖によっては、Ｍｉｎａ５３タンパク質の発現は減少しなかった。つまり、Ｍｉｎａ５３タンパク質の発現は、ｃ－Ｍｙｃを著しく発現するラット３Ｙ１細胞（3Y1MycB）においてはラットｍｉｎａ５３に特異的なｓｉＲＮＡ二本鎖によって特異的に減少するのに対して、コントロールとしてのｓｉＲＮＡとヒトｍｉｎａ５３に特異的な二本鎖によっては減少しなかった。

図５Ｂに示すように、Ｍｉｎａ５３の発現が減少したときには、細胞増殖は非常に抑制される。つまり、ＨｅＬａ細胞と3Y1MycB細胞の増殖はヒトならびにラットＭｉｎａ５３それぞれに特異的なｓｉＲＮＡ二本鎖の導入によってほとんど完全に停止する。

また、この発明に係る抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体は、タンパク質Ｍｉｎａ５３の発現をウェスタンプロッティング分析で調べたところ、白血病細胞株ＨＬ６０を用いたウェスタンブロッテング分析によって、分子質量５３ｋＤａの単一バンドを認識することができることを示した（図６Ａ、レーン1）。また、上記抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を用いた免疫ブロッテング分析によって、ＴＰＡで細胞を処理しても、５３ｋＤａのバンドのシグナルが減少した（図６Ａ、レーン２）。これに対して、ＴＰＡ処理によってはβ-アクチンの発現は実質的には減少されないという特異性が確認された（図６Ａ、レーン１、２）。

他方、ＨｅＬａ細胞中に発現させたグリーン蛍光タンパク質（ＧＦＰ）に細胞融合させたタンパク質を用いた別の実験においては、この抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体が、内在性タンパク質Ｍｉｎａ５３に加えて、ＨｅＬａ細胞中に発現させたグリーン蛍光タンパク質（ＧＦＰ）に細胞融合させたタンパク質Ｍｉｎａ５３についても単一バンドを発生した。

更に、この発明に係る抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を用いた免疫ブロッテング分析によって、３種類の増殖期の大腸がん細胞株ＨＴ－２９、ＷｉＤｒおよびＳＷ－６２０を用いて、大腸がん細胞株におけるヒトタンパク質Ｍｉｎａ５３の発現を調べた結果、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体は、３種類すべての細胞株において５３ｋＤａの単一バンドを認識した（図６Ａ、レーン３-５）。このことは、これらの細胞株がタンパク質Ｍｉｎａ５３を発現し、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体が、他のタンパク質と交差反応せずに大腸がん細胞中のタンパク質Ｍｉｎａ５３を特異的に認識していることを示している。

一方、これらの細胞株におけるタンパク質Ｍｉｎａ５３の発現レベルは、ＴＰＡによって実験的に減少させたＨＬ６０細胞中のタンパク質Ｍｉｎａ５３の発現レベルよりもより一層高かった（図６Ａ、レーン２-５）。他方、上記３種類の大腸がん細胞株におけるアクチンレベルは、ＴＰＡ処理したＨＬ６０細胞のアクチンレベルよりも高くはなかった。こ

れらの結果は、上記３種類の大腸がん細胞株が最終的に分化したＨＬ６０細胞よりも比較的高いレベルのタンパク質Ｍｉｎａ５３を含んでいることを示唆している。
その上、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体と抗ヌクレオリンラビット抗体とを用いた二重細胞免疫蛍光染色法によって、大腸がん細胞内におけるタンパク質Ｍｉｎａ５３の局在状態を調べたところ、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体は、細胞ＳＷ－６２０内の核を特異的に染色するとともに、その核質内の核小体に、ヌクレオリンに対するシグナルと重複する強力な点状の染色を示した。その他の２種類の細胞株も同一の免疫蛍光染色パターンを示した。これらの結果から、タンパク質Ｍｉｎａ５３は、本発明者らがＨｅＬａ細胞についてすでに示したように（Tsuneoka,M.,et al.,ibid）、核小体に凝縮した状態で核内に局在していることを示している。

（大腸がん組織内におけるタンパク質Ｍｉｎａ５３の発現）
この発明の抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を使用して、大腸がん組織内のタンパク質Ｍｉｎａ５３を検出するとともに、ＨＥ染色法を使ってがん領域を識別した。図７Ａに示す切片には中程度に分化した大腸がん細胞が含まれていた。図７Ｂに示すように、がん領域内のタンパク質Ｍｉｎａ５３は顕著に染色されているのに対し、腫瘍周辺の非腫瘍上皮細胞はほとんど染色されていなかった。染色は、主に核内に見出され（図７ＥおよびＦ）、さらに大腸がん細胞株において得られた結果（図７Ｂ）と同様のパターンを示す点状の染色（おそらく核小体）が見出された。該抗体を使用せずに切片を培養したとき（図７Ｄ）または過剰量の組換えタンパク質Ｍｉｎａ５３の存在下で培養したときには、この核内の染色は認められなかった。がん組織の切片のいくつかでは、がん細胞が主ながん領域から離れて局在する上皮細胞の直下のリンパ管内に見出された。この発明に係る抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体は、これらのがん細胞を顕著に染色したのに対して、その周囲の非がん細胞をわずかに染色しただけであった（図８Ａ）。また、大腸の深層にあるリンパ腺中に侵入した細胞も、タンパク質Ｍｉｎａ５３に対して強い免疫反応を示していたのに対して、その周囲の非腫瘍性細胞は染色されていなかった（図８Ｂ）。更に、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体は、深部に侵入した腫瘍を染色するとともに（図８Ｃ）、繊維間質内のほとんど分化していない腫瘍細胞を識別しているのに対して（図８Ｃ）、これら腫瘍細胞周囲の非腫瘍細性胞を染色しなかった。これらの結果は、浸潤したりまたは転移した腫瘍中にもタンパク質Ｍｉｎａ５３が高発現されていていることを示している。

（大腸がんの組織病理学的等級におけるタンパク質Ｍｉｎａ５３の発現）
大腸腺がん患者と、腺腫患者からの標品中にタンパク質Ｍｉｎａ５３を免疫組織化学的染色法によって検出した。その概要は表１に示している。表１に示すように、タンパク質Ｍｉｎａ５３は、大腸がんのすべての組織病理学的等級において発現しており、つまり、十分に分化した腫瘍（図９Ａ）、中程度に分化した腫瘍（図７Ｂ）およびあまり分化していない腫瘍（図２Ｆ）のいずれにおいても顕著に染色されていた。また、それらの平均染色インデックスはそれぞれ2.28、1.78および1.85であった（表１）。これらの結果は、十分に分化した腫瘍は中程度に分化した腫瘍やあまり分化していない腫瘍に比べてより高い染色強度を示す傾向がわずかにあるけれども、腫瘍の病理学的等級と染色強度との間には因果関係がないことを示唆している。更に、タンパク質Ｍｉｎａ５３は腺腫において高発現されることから（図９Ｃ）、タンパク質Ｍｉｎａ５３の発現上昇は、大腸がん発生の一般的かつ比較的初期の事象であることを示唆している。その上、染色はすべての場合において核に限られている（図７ＥおよびＦ）。
要約すると、この発明に係る抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体を使用して大腸がん細胞株と大腸がん組織中におけるタンパク質Ｍｉｎａ５３の発現を調べたところ、調べた３種類の大腸がん細胞株でＭｉｎａ５３の顕著な発現が認められ、また、調べたほとんどすべての大腸がん組織においてＭｉｎａ５３の発現上昇が認められた。また、タンパク質Ｍｉｎａ５３は、いずれの組織病理学的等級の大腸がん、つまり、十分に分化した等級、中程度に分化した等級ならびにあまり分化していない等級の腫瘍において発現したのに対して、ほとんどの非がん細胞においてはＭｉｎａ５３に対する染色はほとんどもしくは全く認められなかった。更に、がん細胞におけるＭｉｎａ５３発現の上昇は、がん細胞の場所に

無関係に観察された。換言すれば、原発腫瘍、浸潤性腫瘍、リンパ管侵入ならびに隔離腫瘍細胞において、タンパク質Ｍｉｎａ５３に対して著しい染色が観察された。
表1：

患者 no.	組織学的等級	染色がん細胞の割合（%） Mina53	Ki-67	染色強度 Mina53	Ki67	染色インデックス Mina53	Ki-67
1	低	84.5	46.2	1	1	0.85	0.46
2	低	86.3	63.2	3	3	2.91	2.44
3	低	79.6	88.9	2	3	1.59	2.67
	*)	100.0	96.3	2	2	2.00	1.93
	**)	0	31.9	0	2	0.00	0.64
4	低	94.2	52.4	2	3	1.89	1.57
5	低	100.0	100	2	3	2.00	3.00
6	中	94.3	81.6	2	2	1.89	1.63
7	中	100.0	76.2	3	3	3.00	2.29
8	中	97.5	87.4	2	3	1.95	2.62
9	中	100.0	83.6	1	3	1.00	2.50
10	中	92.4	75.0	2	2	1.85	1.50
11	中	79.2	62.1	2	2	1.58	1.24
12	中	89.0	54.2	1	2	0.89	1.08
13	中	100.0	60.1	1	3	1.00	1.80
14	中	95.5	84.8	3	3	2.87	2.54
15	高	80.1	72.9	2	2	1.60	1.46
16	高	100.0	63.5	2	2	2.00	1.27
17	高	93.8	50.0	3	2	2.81	1.00
18	高	100.0	100.0	3	3	3.00	3.00
19	高	92.7	84.6	2	3	1.85	2.54
20	高	78.7	74.0	2	3	1.57	2.22
21	高	98.9	57.0	2	3	1.98	1.71
22	高	92.7	43.1	3	3	2.78	1.29
23	高	98.3	80.0	3	3	2.95	2.40
24	腺腫	90.0	42.6	3	2	3.00	0.85

*) ムチン様腺がん細胞が含まれていた。

**) このがんは膵臓の胞状細胞がんに類似した形態を有していた。

（がん組織中におけるタンパク質Ｍｉｎａ５３とＫｉ－６７との間の染色パターンの比較

)
連続切片を抗Ｋｉ－６７モノクローナル抗体（ＭＩＢ１）を用いて染色して、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体での染色パターンと比較した。すでに報告されているように（Cattoretti,G.,et al.:J Pathol 1992,168:357-563;Jansson,A,Sun,X.F.:APMIS 1997,105:730-734;Saarnio,J.,et al.:Am J Pathol 1998,153:279-285）、抗Ｋｉ－６７モノクローナル抗体と抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体とは大腸がん細胞を強力に染色した（図７Ｃ、９Ｂ）。ほとんどの場合において、Ｋｉ－６７とＭｉｎａ５３に対する抗体は、図７Ｂ、図８Ｃ、図９Ａならびに図９Ｂおよび表１と同様に、がん細胞を染色した。
顕微鏡視野内における染色細胞の割合をＫｉ－６７とＭｉｎａ５３について調べたところ、両者に対する抗体の間には違いが見出され、大部分の場合においては、Ｍｉｎａ５３を発現している細胞の割合は、Ｋｉ－６７を発現している細胞の割合よりも多かった（図９Ａ、Ｂ）。これに対して、２、３の場合においては、Ｍｉｎａ５３を発現している細胞の割合がＫｉ－６７を発現している細胞の割合と同様であった（表１）。
なお、一つの場合（患者番号３）においては、調べた切片は３種類の異なる形のがんを含んでいたので、複雑な染色パターンが得られた。あまり分化していない上皮がん細胞とムチン様腺がん細胞を有する２つの領域では、タンパク質Ｍｉｎａ５３とＫｉ－６７との両者に対して陽性の細胞の割合は同様に高かった（表１）。これに対して、第３の領域においては、腫瘍は、膵臓の小葉がんに類似した形態学的構造を有していて、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体によってはほんのわずかしか染色されなかったのに対して、抗Ｋｉ－６７モノクローナル抗体によっては強力に染色された。しかしながら、陽性の細胞の割合は上記２つの領域と比較して低かった（表１）。腺腫の場合には、形成異常の領域内のほとんどすべての細胞は抗Ｍｉｎａ５３抗体によって強く染色されているのに対して、抗Ｋｉ－６７抗体によっては抗Ｍｉｎａ５３抗体の場合程高率には細胞が染色されてなかった（図９Ｃ、Ｄ）。わずかな例外があるけれども、これらの結果は、Ｍｉｎａ５３を発現する細胞の割合がＫｉ－６７を発現する細胞の割合よりも特徴的に高いことを示唆している。
（非腫瘍大腸組織におけるタンパク質Ｍｉｎａ５３とＫｉ－６７との間の染色パターンの比較）
非腫瘍大腸組織のある領域においては、Ｋｉ－６７に対する抗体は細胞を強力に染色していたのに対して、Ｍｉｎａ５３に対する抗体はそれらの細胞を非常に弱くしか染色していなかった。抗Ｋｉ－６７抗体による染色は、活発に増殖をしていると思われる腺窩の下部３分の１の部分に存在する細胞の核内において観察された（図９Ｆ）。また、非腫瘍大腸組織の腺窩における染色強度は、がん領域において見出された細胞とは実質的には異なっていなかった（図９Ｂ、Ｆ）。他方、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体は、これらの細胞の核をわずかにしか染色せず、その染色強度はがん領域中に見出された細胞よりも一層弱いものであった（図９Ａ、Ｅ）。更に、高い有糸分裂活性を有する細胞を含むリンパ濾胞の胚中心は、Ｋｉ－６７に対する抗体によって強力に染色されたけれども、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体によっては非常に弱くしか染色されなかった（図９Ｇ、Ｈ）。
上記の結果から、細胞増殖マーカーとして繁用されているＫｉ－６７に比較して、がん細胞は、タンパク質Ｍｉｎａ５３をより高い割合で発現することが確認された。Ｋｉ－６７に対する抗体は、下部腺窩ならびにリンパ濾胞の胚中心の細胞を含む、がん細胞ならびにある種の十分に増殖している正常細胞を強力に染色した。他方、Ｍｉｎａ５３に対する抗体はこれらの非腫瘍領域中の細胞を稀にしか染色しなかった。
これらの結果は、Ｍｉｎａ５３の高発現を大腸がんの典型的な特長と見なすことができることを示している。したがって、Ｍｉｎａ５３の発現は大腸がんに対するマーカーとして使用することができるとともに、正常組織に浸潤したがん細胞を見出すのにも有用であると考えられる。それに加えて、タンパク質Ｍｉｎａ５３に対する染色は予後のマーカーとしても有用であると考えられる。
６０％以上の大腸がんにおいて、がん発生の初期から、ＡＰＣ遺伝子内の体性突然変異が見出される（Miyoshi,Y.,et al.:Hum Mol Genet 1992,1:229-233;Powell,S.M.,et al.:Na

ture 1992,359:235-237）。また、βカテニンの突然変異は、ＡＰＣ突然変異が欠如している大腸腫瘍中に見出されている（Morin,P.J.,et al.:Science 1997,275:1787-1790;Sparks,A.B.,et al.:Cancer Res 1998,58:1130-1134）。ＡＰＣタンパク質の主要な機能は、グリコーゲンシンテーゼキナーゼ３β（ＧＳＫ－３β）とアクシンタンパク質と連携した遊離βカテニン量の調節であると考えられている（Hinoi,T.,et al.:J Biol Chem 2000,275:34399-34406）。ＡＰＣの機能損失、アクシンの不活性化（Behrens,J.,et al.:Science 1998,280:596-599）またはβカテニンを活性化する突然変異（Polakis,P.:Curr Opin Genet Dev 1999,9:15-21）は、βカテニンの細胞内蓄積をもたらすことになり、核に転位したときには、幾種類かの特異的な標的遺伝子の発現を増加することになるＴ細胞因子（Ｔｃｆ）依存転写のアクティベーターとして有用である（Roose,J.,Clevers,H.:Biochim Biophys Acta 1999,1424:M23-M37）。

最近、ＡＰＣ経路の標的としてのｃ－ｍｙｃが同定され、ｃ－ｍｙｃがＡＰＣ遺伝子の機能損失によってまたはβカテニンの過剰発現によって惹起されることが示された（He,T.C.,et al.:ibid）。したがって、ＡＰＣもしくはアクシンの不活性化による突然変異またはβカテニンの活性化による突然変異は、ｃ－ｍｙｃの過剰発現を導くことになり、その結果Ｍｉｎａ５３の発現が高くなるものと考えられる。したがって、Ｍｉｎａ５３は、大腸がん発生に関係しているＡＰＣ／βカテニン経路の下流の間接標的であると思われる。これらの結果は、Ｍｉｎａ５３の高発現が大腸がんの典型的な特長と見なすことができることを示している。したがって、Ｍｉｎａ５３の発現は、大腸がんに対するマーカーとして使用することができるとともに、正常組織に浸潤したがん細胞を見出すのに有用であると考えられる。それに加えて、Ｍｉｎａ５３の染色は予後のマーカーとしても有用であると考えられる。

その上、タンパク質Ｍｉｎａ５３の発現パターンを、細胞増殖のバイオマーカーとして広く使用されているＫｉ－６７の発現パターンと比較すると、ほとんどのがん組織において、Ｍｉｎａ５３を発現している細胞の割合が、Ｋｉ－６７を発現している細胞の割合よりも特長的に高いことが判明した（表１）。このことは、遺伝子Ｍｉｎａ５３がＭｙｃ標的遺伝子であるという事実に基づいていると思われる。ｃ－ｍｙｃは、増殖細胞の細胞サイクルのいずれの相中においても連続的に発現している（Rabbitts,P.H.,et al.:EMBO J 1985,4:2009-2015;Waitz,W.,Loidl,P.:Oncogene 1991,6:29-35）。これに対して、Ｋｉ－６７は、後期Ｇ１相、Ｓ相、Ｍ相およびＧ２相の増殖中の細胞内で優先的に発現している（Gerdes,J.,et al.:Int J Cancer 1983,31:13-20;Gerdes,J.,et al.:J Immunol 1984,133:1710-1715）。Ｍｉｎａ５３は、ｃ－ｍｙｃによって生起されるので、Ｍｉｎａ５３ががん組織中においてＫｉ－６７よりもより広範に発現されていることは理屈に適っている。十分に生育した腺窩における細胞は、Ｋｉ－６７に対する抗体によって強く染色されたのに対して、タンパク質Ｍｉｎａ５３に対する抗体によっては弱くしか染色されなかった。また、非腫瘍性であるが増殖している細胞を含むリンパ濾胞の胚中心内の細胞は、抗Ｍｉｎａ５３抗体によって弱くしか染色されないが、抗Ｋｉ－６７抗体によって強く染色された。本発明者らは、ｃ－ｍｙｃが高度に発現している２種類の培養した細胞株、つまりヒト子宮頚がんＨｅＬａ細胞ならびにラット線維芽細胞における細胞増殖のためＭｉｎａ５３が重要な因子であることをすでに示している（Tsuneoka,M.,et al.:ibid）。従って、タンパク質Ｍｉｎａ５３は、いくつかの限られたタイプの細胞においてだけ細胞増殖のために重要な役割を果たしているのかもしれない。あるいは、腺窩ならびにリンパ濾胞の胚中心の正常細胞は、より少ない量のＭｉｎａ５３で増殖するかまたはタンパク質Ｍｉｎａ５３と同様の機能を有する別のタンパク質を発現している可能性がある。いずれの場合でも、がんでない細胞に比べてがん細胞が抗Ｍｉｎａ５３抗体によって強力に染色されるので、Ｍｉｎａ５３はがん発生との関係を有していると考えられる。

更に、食道がん組織を、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体によって染色して得られた染色インデックスを、ヒト食道がんを染色するために現在使用されている抗Ｋｉ－６７モノクローナル抗体によって染色して得られた染色インデックスと比較したところ、その染色程度には相関が見られたけれども、明らかな違いが認められた。つまり、図１３に示すよ

うに、抗Ｋｉ－６７モノクローナル抗体による染色程度が高いものでは、ほとんど抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体の染色程度が高かった。これに対して、抗Ｋｉ－６７モノクローナル抗体による染色程度がほとんど見られないものでも、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体の染色程度が高いものがあった。このことは、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体が抗Ｋｉ－６７モノクローナル抗体よりも食道がん組織をよく染色することを示している。

次に、食道がんの手術後の生存月数とＭｉｎａ５３の染色インデックスとＫｉ－６７の染色インデックスとの間に相関関係が見られるかを、生存月数が確認できる３３例について調べたところ、図１２に示すように、生存月数とＭｉｎａ５３の染色インデックスの間には明らかな相関関係が認められた($p<0.011$)。これに対して、Ｋｉ－６７ではそのような相関関係は認められなかった。

そこで、食道がん患者をＭｉｎａ５３発現が高いグループと低いグループの２つに分け、それぞれのグループをカプラン－マイヤー法により解析したところ、図１２（Ａ）の結果に示すように、２つのグループでは累積生存率に明らかな相違が認められた。これに対して、Ｋｉ－６７についても同様の解析を行ったところ、図１２（Ｂ）に示すように、Ｍｉｎａ５３のようなハッキリとした違いは認められなかった。そこで、食道がん患者の手術後の生存月数とＭｉｎａ５３の染色インデックスあるいはＫｉ－６７の染色インデックスとの関係を表２に示す。

表2：

	例　数	相　関	p値
Mina53	33	−0.436	0.0104
Ki−67	33	−0.83	0.6499

上記の結果から、Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体による染色程度は食道がんの悪性度と関係することが示唆しているものと考えられる。

また、タンパク質Ｍｉｎａ５３のアミノ酸配列の１２８から２７１の領域にＪｍｊＣドメインという部分がある（Tsuneoka,M.,et al.:ibid）。このドメインは、多くの遺伝子の間での配列の類似性に基づいて最近同定されたものであり、ＪｍｊＣドメインを持つ蛋白質はほとんどの場合ＤＮＡ結合もしくはクロマチン結合ドメインを持っている（Clissold,P.M.,Ponting,C.P.:Trends Biochem Sci 2001,26:7-9）。このＪｍｊＣドメインは、クピンフォールド（cupin fold）を採用しているものと予測され、クロマチン再構築を規制する金属酵素の候補である（Clissold,P.M.,Ponting,C.P.:ibid）。各腫瘍は、そのいずれもが腫瘍を進行させる一連の遺伝子的ならびに遺伝子配列の変化を伴わない変化による独立したプロセスの結果である（Fearnhead,N.S.,et al.:Br Med Bull 2002,64:27-43）。遺伝子配列の変化を伴わない変化の一つであるクロマチン再構築は、遺伝子の発現に影響を及ぼし、がん発生の一因となりうる。Ｍｉｎａ５３が核内に局在していることは、タンパク質Ｍｉｎａ５３がクロマチン再構築により腫瘍の進行に関わっている可能性を支持しているように思われる。しかしながら、このことを明らかにするには、クロマチン再構築がＭｉｎａ５３の真の機能であるかどうかを決定する必要がある。

がん遺伝子が活性化することが発がんと関連していることはあきらかであるから、かかるがん遺伝子の不活性化を目標としたヒトのがんに対する処置についての薬理学的戦略も重要となってくる。かかる戦略に基づいてがん遺伝子を不活性にするように設計された医薬品が開発されがんの処置も一段と発展することが期待される。しかしながら、かかる医薬品を長期間使用すると、その医薬品はまた正常細胞に対しても致命的なシグナル経路を切断することになり、重篤な毒性を及ぼすことも考えられる（Jain,M,et al.: Science 2002,297:102-104）。また、最近の研究によって、ｍｙｃファミリーのがん遺伝子は、細胞生育の中心的な調節因子と考えられ、それらのがん遺伝子が臓器発達ならびに再生を含む正常な生物学的プロセスにおいても決定的に必要であることが明らかにされてきている（Henriksson,M,Luscher,B.:Adv Cancer Res 1996:109-182;Grandori,C,et al.:Annu Rev C

ell Dev Biol 2000,16:653-699;Luscher,B.:Gene 2001,277:1-14;Stanton,B.R.,et al.:Genes Dev 1992,6:2235-2247;Sawai,S,et al.:Development 1993,117:1445-1455）。上述したように、ｃ－ｍｙｃは様々な遺伝子の発現を調節し、特異的なＭｙｃ標的遺伝子はＭｙｃのそれぞれの機能において実質的な役割を果たしているものと考えられる。

産業上の利用可能性

この発明によって同定したｃ－Ｍｙｃによって調節される新規ながん関連遺伝子ｍｉｎａ５３は、がん遺伝子ｍｙｃによって直接発現調節されていること、核に存在する分子量５万３千のタンパク質Ｍｉｎａ５３をコードしていること、細胞増殖に関連していること、がん組織において特異的に発現が上昇していること、などによってがん関連分野において種々の応用が可能である。つまり、この発明に係る新規な遺伝子ｍｉｎａ５３は、がん細胞において特異的に発現が上昇することからがんの診断に応用が可能である。また、がん細胞の増殖抑制がＭｉｎａ５３タンパク質の発現を抑制することにより観察されることから、遺伝子治療などによりｍｉｎａ５３遺伝子の発現を抑制したり、またはＭｉｎａ５３活性を特異的に抑制することができる新薬の開発にも応用できることになる。

また、この発明に係るｍｉｎａ５３遺伝子ならびにその産物は、がん細胞などの正常でない細胞の診断およびかかる細胞の増殖を制御することも可能である。

更に、この発明に係る抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体によって、ヒト大腸がん細胞においてタンパク質Ｍｉｎａ５３が高発現していること、またヒト大腸がん組織においては正常上皮に比べて原発のがん組織や筋層やリンパ管に侵入していたがん細胞でタンパク質Ｍｉｎａ５３が高発現していることを確認することができる。Ｍｉｎａ５３タンパク質の発現は、細胞増殖マーカーとして繁用されているＫｉ－６７タンパク質の発現と良く似ていて、細胞増殖マーカーとして有効に利用することができるが、がん細胞におけるＭｉｎａ５３タンパク質発現に対する陽性細胞の比率はＫｉ－６７タンパク質のものに比べて高いことが確認された。更に、大腸正常上皮の細胞分裂が盛んな領域では、Ｋｉ－６７の強い発現が見られたのに対し、Ｍｉｎａ５３の発現は高くはなかった。その上、リンパ濾胞の胚中心（正常組織）に強いＫｉ－６７発現が見られたが、Ｍｉｎａ５３発現は高くなかった。これらのことから、Ｍｉｎａ５３タンパク質はＫｉ－６７よりもがん特異性が高いと思われる。

これらの結果から、Ｍｉｎａ５３の発現が大腸がんの初期事象であるとともに、Ｍｉｎａ５３の高発現を大腸がんの典型的な特長と見なすことができることが示されているので、Ｍｉｎａ５３の発現を大腸がんに対するマーカーとして利用することができる。また、Ｍｉｎａ５３の発現を正常組織に浸潤したがん細胞を検出するのにも利用することができるものと考えられる。更に、Ｍｉｎａ５３が染色できることは予後のマーカーとしても有用であると考えられる。

同様に、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体は、食道がん細胞を、現在ヒト食道がん細胞の染色に使用されている抗Ｋｉ－６７モノクローナル抗体よりもよく染色することを確認した。さらに、抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体による食道がん細胞の染色具合によって食道がんの悪性度を診断することも可能である。

この発明に係る抗Ｍｉｎａ５３モノクローナル抗体は、大腸がん、食道がん、舌がん、乳がん、肉腫、脳腫瘍などのがん細胞を良く染色することができることから、Ｍｉｎａ５３を各種がんの診断に利用することも可能である。一方、Ｍｉｎａ５３タンパク質の発現を抑制すると、細胞増殖を強く抑制することができることから、Ｍｉｎａ５３活性を抑えることによってがん治療への応用も可能である。

一方、Ｍｉｎａ５３タンパク質やＭｉｎａ５３をコードするｍＲＮＡを組織中で検出し、がん細胞などの正常でない細胞を検出して診断に利用することができる。このような場合には、特異的抗体、例えば、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体などのＭｉｎａ５３タンパク質に結合する物質や、ｍｉｎａ５３遺伝子を含む配列を有するＲＮＡ、ＤＮＡなどを利用することもできる。

また、この発明においては、組織片に含まれるＭｉｎａ５３の発現量を、例えば、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体などのＭｉｎａ５３タンパク質に結合する物質を利用

して、ＥＬＩＳＡ法、ウェスターンブロット法もしくは関連手法によって測定することにより、細胞の状態を測定することもできる。更に、ｍｉｎａ５３遺伝子を含む配列を有するＲＮＡ、ＤＮＡなどを利用しても、ノーザンブロッテイング法、ＲＮａｓｅプロテクション法、ＲＴ－ＰＣＲ法、ｃＤＮＡマイクロアレイ法などの各種測定法によって細胞の状態を診断することもできる。この発明においてはまた血中、尿中などのＭｉｎａ５３タンパク質の量を測定することによってもがん細胞を診断をすることが可能である。

更に、Ｍｉｎａ５３タンパク質に対するポリクローナル抗体やモノクローナル抗体などの抗体を利用することにより、当該技術分野において慣用されているＥＬＩＳＡ法などの手法により体内に存在するがん細胞などの正常状態にない細胞の存在の有無やその量を推定もしくは測定して診断することも可能である。

その上、この発明では、がん細胞などの正常状態にない細胞の増殖を制御することも可能である。Ｍｉｎａ５３活性を抑制するためには、例えば、siＲＮＡ（small RNA interference RNA）法、アンチセンス核酸法、プロモーターの相同配列の核酸導入法、プロモーターのデコイ法、リボザイム法などを利用することができるとともに、Ｍｉｎａ５３に結合する物資（例えば、抗体などのタンパク質やより低分子の化合物など）も利用することができる。また、Ｍｉｎａ５３のタンパク質や核酸配列に利用しうる物質、例えば、特異的抗体やｍｉｎａ５３発現を抑制するsiＲＮＡなどや、上記物質を選択するためのスクリーニングなどの方法も利用することができる。

【配列表】

Sequence Listing

<100> Kurume University

<120> Gene mina53 involved in cancer, Protein Mina53 and
Monoclonal Antibody Thereof

<130> JFH15228-PCT

<160> 3

<210> 1
<211> 464
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400>1

```
atg cca aag aaa gca aag cct aca ggg agt ggg aag gaa gag ggg ccg gct ccc
Met Pro Lys Lys Ala Lys Pro Thr Gly Ser Gly Lys Glu Glu Gly Pro Ala Pro
                5                  10                  15

tgt aag cag atg aag tta gaa gca gct ggg ggg cct tca gct tta aac ttt gac
Cys Lys Gln Met Lys leu Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Ala Leu Asn Phe Asp
    20                  25                  30                  35

agt ccc agt agt ctc ttt gaa agt tta atc tcg ccc atc aag aca gag act ttt
Ser Pro Ser Ser Leu Phe Glu Ser Leu Ile Ser Pro Ile Lys Thr Glu Thr Phe
            40                  45                  50

ttc aag gaa ttc tgg gag cag aag ccc ctt ctc att cag aga gat gac cct gca
Phe Lys Glu Phe Trp Glu Gln Lys Pro Leu Leu Ile Gln Arg Asp Asp Pro Ala
55                  60                  65                  70

ctg gcc aca tac tat ggg tcc ctg ttc aag cta aca gat ctg aag agt ctg tgc
Leu Ala Thr Tyr Tyr Gly Ser Leu Phe Lys Leu Thr Asp Leu Lys Ser Leu Cys
        75                  80                  85                  90

agc cgg ggg atg tac tat gga aga gat gtg aat gtc tgc cgg tgt gtc aat ggg
Ser Arg Gly Met Tyr Tyr Gly Arg Asp Val Asn Val Cys Arg Cys Val Asn Gly
                95                  100                 105

aag aag aag gtt tta aat aaa gat ggc aaa gca cac ttt ctt cag ctg aga aaa
Lys Lys Lys Val Leu Asn Lys Asp Gly Lys Ala His Phe Leu Gln Leu Arg Lys
    110                 115                 120                 125
```

```
gat ttt gat cag aaa agg gca acg att cag ttt cac caa cct cag aga ttt aag
Asp Phe Asp Gln Lys Arg Ala Thr Ile Gln Phe His Gln Pro Gln Arg Phe Lys
            130                 135                 140

gat gag ctt tgg agg atc cag gag aag ctg gaa tgt tac ttt ggc tcc ttg gtt
Asp Glu Leu Trp Arg Ile Gln Glu Lys Leu Glu Cys Tyr Phe Gly Ser Leu Val
145                 150                 155                 160

ggc tcg aat gtg tac ata act ccc gca gga tct cag ggc ctg ccg ccc cat tat
Gly Ser Asn Val Tyr Ile Thr Pro Ala Gly Ser Gln Gly Leu Pro Pro His Tyr
        165                 170                 175                 180

gat gat gtc gag gtt ttc atc ctg cag ctg gag gga gag aaa cac tgg cgc ctc
Asp Asp Val Glu Val Phe Ile Leu Gln Leu Glu Gly Glu Lys His Trp Arg Leu
                185                 190                 195

tac cac ccc act gtg ccc ctg gca cga gag tac agc gtg gag gcc gag gaa agg
Tyr His Pro Thr Val Pro Leu Ala Arg Glu Tyr Ser Val Glu Ala Glu Glu Arg
    200                 205                 210                 215

atc ggc agg ccg gtg cat gag ttt atg ctg aag ccg ggt gat ttg ttg tac ttt
Ile Gly Arg Pro Val His Glu Phe Met Leu Lys Pro Gly Asp Leu Leu Tyr Phe
            220                 225                 230

ccc aga gga acc att cat caa gcg gac act cct gcg ggg ctg gcc cac tcg act
Pro Arg Gly Thr Ile His Gln Ala Asp Thr Pro Ala Gly Leu Ala His Ser Thr
235                 240                 245                 250

cac gtg acc atc agc acc tac cag aac aat tca tgg gga gat ttc ctt ttg gat
His Val Thr Ile Ser Thr Tyr Gln Asn Asn Ser Trp Gly Asp Phe Leu Leu Asp
        255                 260                 265                 270

acc atc tcg ggg ctt gta ttt gat act gca aag gaa gac gtg gag tta cgg acc
Thr Ile Ser Gly Leu Val Phe Asp Thr Ala Lys Glu Asp Val Glu Leu Arg Thr
                275                 280                 285

ggc ata ccc cgg cag ctg ctc ctg gtg gaa tcc aca act gtt gct aca aga cga
Gly Ile Pro Arg Gln Leu Leu Leu Val Glu Ser Thr Thr Val Ala Thr Arg Arg
    290                 295                 300                 305

tta agt ggc ttc ctg agg aca ctt gca gac cgg ctg gag ggc acc aaa gaa ctg
Leu Ser Gly Phe Leu Arg Thr Leu Ala Asp Arg Leu Glu Gly Thr Lys Glu Leu
            310                 315                 320

ctt tcc tca gac atg aag aag gat ttt att atg cac aga ctc ccc cct tac tct
Leu Ser Ser Asp Met Lys Lys Asp Phe Ile Met His Arg Leu Pro Pro Tyr Ser
325                 330                 335                 340

gcg gga gat ggg gca gag ctg tca aca cca ggt gga aag tta ccg agg ctg gac
Ala Gly Asp Gly Ala Glu Leu Ser Thr Pro Gly Gly Lys Leu Pro Arg Leu Asp
        345                 350                 355                 360
```

```
agt gta gtg aga ctg cag ttt aaa gac cac att gtc ctc aca gta ctg ccg gat
Ser Val Val Arg Leu Gln Phe Lys Asp His Ile Val Leu Thr Val Leu Pro Asp
                365                 370                 375

caa gat caa tct gat gaa gct caa gaa aag atg gtg tac atc tat cat tcc tta
Gln Asp Gln Ser Asp Glu Ala Gln Glu Lys Met Val Tyr Ile Tyr His Ser Leu
    380                 385                 390                 395

aag aat agt aga gag aca cac atg atg gga aat gag gag gaa aca gag ttt cat
Lys Asn Ser Arg Glu Thr His Met Met Gly Asn Glu Glu Glu Thr Glu Phe His
            400                 405                 410

gga ctt cgc ttc cct ttg tca cat ttg gat gca ctg aag caa att tgg aat agt
Gly Leu Arg Phe Pro Leu Ser His Leu Asp Ala Leu Lys Gln Ile Trp Asn Ser
415                 420                 425                 430

cca gct att tct gtc aag gac ctg aaa ctt act aca gat gag gaa aag gaa agc
Pro Ala Ile Ser Val Lys Asp Leu Lys Leu Thr Thr Asp Glu Glu Lys Glu Ser
        435                 440                 445                 450

ctg gta tta tcc ctc tgg aca gaa tgt tta att caa gta gtc tag
Leu Val Leu Ser Leu Trp Thr Glu Cys Leu Ile Gln Val Val ***
                455                 460             464
```

<210> 2

<211> 465

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

```
atg cca aag aaa gtg cag ccc aca ggg gat gag aac gaa gaa gag tct gtt cct
Met Pro Lys Lys Val Gln Pro Thr Gly Asp Glu Asn Glu Glu Glu Ser Val Pro
                5                   10                  15

tgc aag cgg gtg aag gag gag ctg cct gaa acg ctt tct gta tta aac ttt gac
Cys Lys Arg Val Lys Glu Glu Leu Pro Glu Thr Leu Ser Val Leu Asn Phe Asp
    20                  25                  30                  35

agc ccc agt agt ttc ttc gaa agt tta atc tca ccc atc aaa gta gag act ttt
Ser Pro Ser Ser Phe Phe Glu Ser Leu Ile Ser Pro Ile Lys Val Glu Thr Phe
            40                  45                  50

ttc aag gaa ttc tgg gaa caa aag ccc ctt ctc att cag agg gat gac cct gta
Phe Lys Glu Phe Trp Glu Gln Lys Pro Leu Leu Ile Gln Arg Asp Asp Pro Val
55                  60                  65                  70

ctg gcc aaa tat tac cag tct ctg ttc agc ctc tca gat ctg aag aga ctc tgc
Leu Ala Lys Tyr Tyr Gln Ser Leu Phe Ser Leu Ser Asp Leu Lys Arg Leu Cys
```

```
        75                  80                  85                  90

aag aaa gga gtg tac tat gga aga gac gtg aat gtc tgc cgg agc atc agt ggg
Lys Lys Gly Val Tyr Tyr Gly Arg Asp Val Asn Val Cys Arg Ser Ile Ser Gly
                95                  100                 105

aag aag aag gtt tta aat aag gat ggc aga gca cat ttt ctt cag ctg aga aaa
Lys Lys Lys Val Leu Asn Lys Asp Gly Arg Ala His Phe Leu Gln Leu Arg Lys
    110                 115                 120                 125

gat ttt gat cag aag agg gca aca att cag ttt cac caa cct cag aga tat aag
Asp Phe Asp Gln Lys Arg Ala Thr Ile Gln Phe His Gln Pro Gln Arg Tyr Lys
            130                 135                 140

gat gag ctg tgg cgg atc cag gaa aag ctg gaa tgt tac ttt ggg tcc tta gta
Asp Glu Leu Trp Arg Ile Gln Glu Lys Leu Glu Cys Tyr Phe Gly Ser Leu Val
145                 150                 155                 160

ggc tcg aat gtg tac atg act cct gca gga tct cag ggc ctc cct cca cat tat
Gly Ser Asn Val Tyr Met Thr Pro Ala Gly Ser Gln Gly Leu Pro Pro His Tyr
        165                 170                 175                 180

gat gat gtt gag gtt ttt atc ctg cag ctg gag gga acg aaa cac tgg cgc ctg
Asp Asp Val Glu Val Phe Ile Leu Gln Leu Glu Gly Thr Lys His Trp Arg Leu
                185                 190                 195

tac tcc cca act gtg ccc ctg gca cac gag tac agt gtg gaa tct gag gac cgg
Tyr Ser Pro Thr Val Pro Leu Ala His Glu Tyr Ser Val Glu Ser Glu Asp Arg
    200                 205                 210                 215

atc ggc aca ccg aca cac gac ttc ctg ctg aag cct gga gat ttg ttg tac ttt
Ile Gly Thr Pro Thr His Asp Phe Leu Leu Lys Pro Gly Asp Leu Leu Tyr Phe
            220                 225                 230

ccc aga ggg acc att cat cag gca gaa act cct tca ggc ctg gcc tac tct att
Pro Arg Gly Thr Ile His Gln Ala Glu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Tyr Ser Ile
235                 240                 245                 250

cac ctg act att agc acc tac cag aac aat tca tgg gga gac tgc ctt ttg gat
His Leu Thr Ile Ser Thr Tyr Gln Asn Asn Ser Trp Gly Asp Cys Leu Leu Asp
        255                 260                 265                 270

tcc att tcg ggg ttc gta ttt gac att gca aag gaa gat gtg gca tta agg agt
Ser Ile Ser Gly Phe Val Phe Asp Ile Ala Lys Glu Asp Val Ala Leu Arg Ser
                275                 280                 285

gga atg ccc cgg cgg atg ctc ctg aat gtg gaa acc cca gct gat gta aca agg
Gly Met Pro Arg Arg Met Leu Leu Asn Val Glu Thr Pro Ala Asp Val Thr Arg
    290                 295                 300                 305

aag ttg agt ggc ttt ctg agg act ctt gca gac cag ctc gag ggc aga gaa gag
Lys Leu Ser Gly Phe Leu Arg Thr Leu Ala Asp Gln Leu Glu Gly Arg Glu Glu
```

```
            310                 315                 320

ctg ctg tca tca gat atg aag aag gac ttc gtc aag cac aga ctc cct cct ttc
Leu Leu Ser Ser Asp Met Lys Lys Asp Phe Val Lys His Arg Leu Pro Pro Phe
325                 330                 335                 340

ttc gag gga aat gga acg gag acg atg gac cca ggt aaa cag ttg cca agg ttg
Phe Glu Gly Asn Gly Thr Glu Thr Met Asp Pro Gly Lys Gln Leu Pro Arg Leu
        345                 350                 355                 360

gac aac ata ata aga ctg cag ttc aaa gat cac att gtc ctc aca gta ggg cca
Asp Asn Ile Ile Arg Leu Gln Phe Lys Asp His Ile Val Leu Thr Val Gly Pro
                365                 370                 375

gat aag aat cca ttt gat gaa gct caa caa aag gtg gtt tac atc tat cat tct
Asp Lys Asn Pro Phe Asp Glu Ala Gln Gln Lys Val Val Tyr Ile Tyr His Ser
    380                 385                 390                 395

ctg aag aat gtg agg cag atg cac atg ata gga gaa gag gag gaa tcc gag att
Leu Lys Asn Val Arg Gln Met His Met Ile Gly Glu Glu Glu Glu Ser Glu Ile
            400                 405                 410

ttc ggt ctt cgc ttt cct tta tca cat gtg gat gct ctg aag caa atc tgg tgc
Phe Gly Leu Arg Phe Pro Leu Ser His Val Asp Ala Leu Lys Gln Ile Trp Cys
415                 420                 425                 430

ggg tca cca att cgt gtt aag gaa ctg aaa ctt gac aca gat gaa gaa aag gag
Gly Ser Pro Ile Arg Val Lys Glu Leu Lys Leu Asp Thr Asp Glu Glu Lys Glu
        435                 440                 445                 450

aac ctg gca ctg tct ctc tgg tcg gag tct tta atc caa gta ctc tag
Asn Leu Ala Leu Ser Leu Trp Ser Glu Ser Leu Ile Gln Val Leu ***
                455                 460                 465
```

<210> 3

<211> 475

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

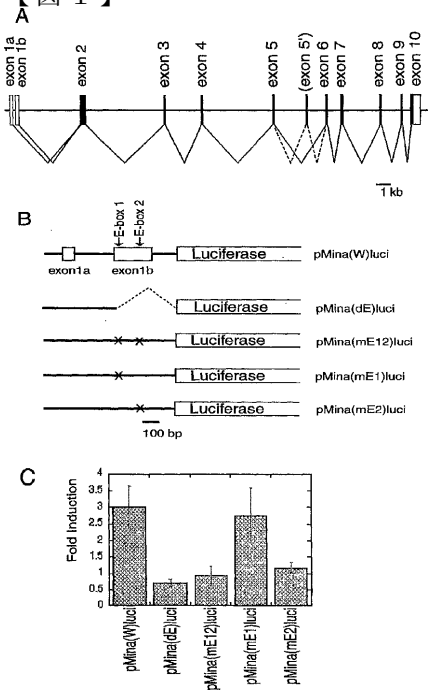
<400> 3

```
atg cca aag aaa gtg aag ccc aca ggg gat gag aat gaa gaa gag tct  gtt  cct
Met Pro Lys Lys Val Lys Pro Thr Gly Asp Glu Asn Glu Glu Glu Ser  Val  Pro
                5                   10                  15

tgc aag cag gtg aaa gag gag cta cct aat acg ctt tct gta tta aac  ttt  gac
Cys Lys Gln Val Lys Glu Glu Leu Pro Asn Thr Leu Ser Val Leu Asn  Phe  Asp
    20                  25                  30                  35

agc ccc agt agt ttc ttt gaa agt tta ata tca ccc atc aaa gta gag  aca  ttt
```

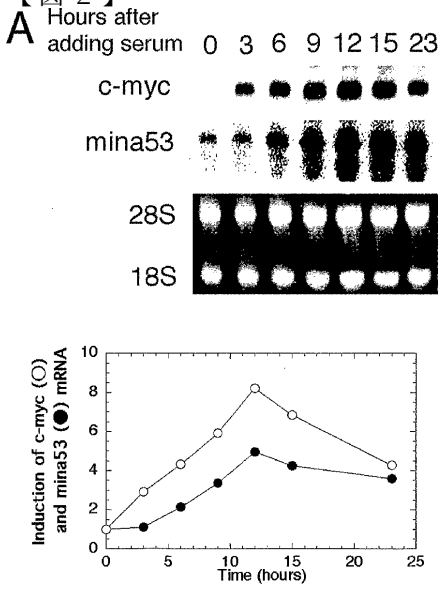
```
Ser Pro Ser Ser Phe Phe Glu Ser Leu Ile Ser Pro Ile Lys Val Glu  Thr Phe
            40                  45                  50

ttc aag gaa ttc tgg gaa cag aag ccc ctt ctc att cag aga gat gac  cct tcg
Phe Lys Glu Phe Trp Glu Gln Lys Pro Leu Leu Ile Gln Arg Asp Asp  Pro Ser
55                  60                  65                  70

ctg gcc gca tat tac cag tct ctg ttc agc ctc tca gat ctg agg agt  ctc tgc
Leu Ala Ala Tyr Tyr Gln Ser Leu Phe Ser Leu Ser Asp Leu Arg Ser  Leu Cys
        75                  80                  85                  90

agc caa ggg ctg tac tat gga aga gat gtc aat gtc tgc cgg tgc atc  ggt ggg
Ser Gln Gly Leu Tyr Tyr Gly Arg Asp Val Asn Val Cys Arg Cys Ile  Gly Gly
                95                  100                 105

aag aag aag gtt tta aat aag gat ggc aaa gca cag ttt ctt cag ctg  aga aaa
Lys Lys Lys Val Leu Asn Lys Asp Gly Lys Ala Gln Phe Leu Gln Leu  Arg Lys
    110                 115                 120                 125

gat ttt gat cag aag agg gca aca att cag ttt cat cag cca cag aga  ttt aag
Asp Phe Asp Gln Lys Arg Ala Thr Ile Gln Phe His Gln Pro Gln Arg  Phe Lys
            130                 135                 140

gat gag ctc tgg agg atc cag gaa aag ctg gaa tgt tac ttt ggc tcc  tta gta
Asp Glu Leu Trp Arg Ile Gln Glu Lys Leu Glu Cys Tyr Phe Gly Ser  Leu Val
145                 150                 155                 160

ggc tca aat gtg tac atg act ccc gca gga tct cag ggc ctt cct cca  cat tac
Gly Ser Asn Val Tyr Met Thr Pro Ala Gly Ser Gln Gly Leu Pro Pro  His Tyr
        165                 170                 175                 180

gac gat gtt gag gtt ttt atc ctg cag ctg gag gga agg aaa cgt tgg  cgc ctg
Asp Asp Val Glu Val Phe Ile Leu Gln Leu Glu Gly Arg Lys Arg Trp  Arg Leu
                185                 190                 195

tac tcc cca act gtg ccc ctg gcg cgt gag tac agt gtg gag cct gag  gac cgg
Tyr Ser Pro Thr Val Pro Leu Ala Arg Glu Tyr Ser Val Glu Pro Glu  Asp Arg
    200                 205                 210                 215

att ggc aca cca aca cat gac ttc ctg ctg aag cct ggc gat ttg ttg  tac ttc
Ile Gly Thr Pro Thr His Asp Phe Leu Leu Lys Pro Gly Asp Leu Leu  Tyr Phe
            220                 225                 230

ccc aga ggg acc att cac cag gca gaa act cct tca ggc ctg gcc cac  tct att
Pro Arg Gly Thr Ile His Gln Ala Glu Thr Pro Ser Gly Leu Ala His  Ser Ile
235                 240                 245                 250

cac ctg act att agc acc tac cag aac aat tca tgg gga gat tac ctt  ttg gac
His Leu Thr Ile Ser Thr Tyr Gln Asn Asn Ser Trp Gly Asp Tyr Leu  Leu Asp
        255                 260                 265                 270

tcc att tcg ggg ctt gta ttt gac att gca aag gaa gat gtg gca tta  agg act
```

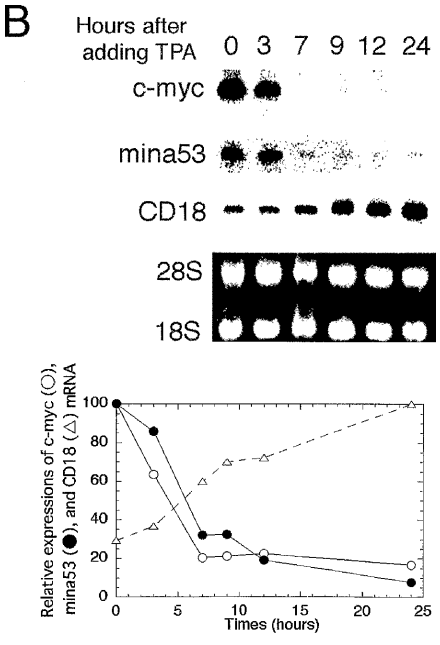
```
Ser Ile Ser Gly Leu Val Phe Asp Ile Ala Lys Glu Asp Val Ala Leu  Arg Thr
                275                 280                 285

gga atg ccc agg cgg atg ctc atg aat gtg gaa acc cca gct gac gta  aca agg
Gly Met Pro Arg Arg Met Leu Met Asn Val Glu Thr Pro Ala Asp Val  Thr Arg
    290                 295                 300                 305

aag ttg agt ggc ttt ctg agg act ctg gca gac cag ctc gag ggc aga  aaa gaa
Lys Leu Ser Gly Phe Leu Arg Thr Leu Ala Asp Gln Leu Glu Gly Arg  Lys Glu
            310                 315                 320

ctg ctc tca tca gat atg aag aag gac ttc gtc atg cac aga ctt ccc  cct ttc
Leu Leu Ser Ser Asp Met Lys Lys Asp Phe Val Met His Arg Leu Pro  Pro Phe
325                 330                 335                 340

tgt gtg gga aat gga aca gag tca atg aac cca ggt gga aag ttg cca  agg ttg
Cys Val Gly Asn Gly Thr Glu Ser Met Asn Pro Gly Gly Lys Leu Pro  Arg Leu
        345                 350                 355                 360

aac agc ata gta aga ctg cag ttt aaa gac cac att gtc ctc aca gta  ggg ccc
Asn Ser Ile Val Arg Leu Gln Phe Lys Asp His Ile Val Leu Thr Val  Gly Pro
                365                 370                 375

gat cag aat caa tct gat gaa gct caa caa aag gtg gtt tac atc tac  cat tct
Asp Gln Asn Gln Ser Asp Glu Ala Gln Gln Lys Val Val Tyr Ile Tyr  His Ser
    380                 385                 390                 395

cta aag aat gag aga cag acg cac atg atg ggg aaa gag gtg gaa aca  gag att
Leu Lys Asn Glu Arg Gln Thr His Met Met Gly Lys Glu Val Glu Thr  Glu Ile
            400                 405                 410

tat gga ctt cgc ttt cct tta tcc tat gtg gac gct ctg aag caa atc  tgg tgc
Tyr Gly Leu Arg Phe Pro Leu Ser Tyr Val Asp Ala Leu Lys Gln Ile  Trp Cys
415                 420                 425                 430

ggg tca cca gtt cgt gtt aag gac ctg aaa ctt ggc aca gat gaa gag  aag gag
Gly Ser Pro Val Arg Val Lys Asp Leu Lys Leu Gly Thr Asp Glu Glu  Lys Glu
        435                 440                 445                 450

aac ctg gca gtg tct ctc tgg aca gag tgt cta gtc cac gtg ctc tag
Asn Leu Ala Val Ser Leu Trp Thr Glu Cys Leu Val His Val Leu ***
                455                 460                 465
```

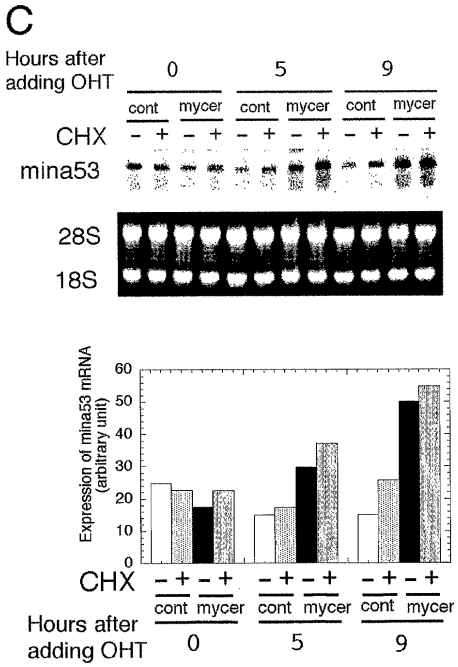
【図１】


A
exon 1a
exon 1b
exon 2
exon 3
exon 4
exon 5
(exon 5')
exon 6
exon 7
exon 8
exon 9
exon 10
1kb
B
E-box 1
E-box 2
Luciferase
exon1a
exon1b
pMina(W)luci
pMina(dE)luci
pMina(mE12)luci
pMina(mE1)luci
pMina(mE2)luci
100 bp
C
Fold Induction
pMina(W)luc
pMina(dE)luc
pMina(mE12)luc
pMina(mE1)luc
pMina(mE2)luc

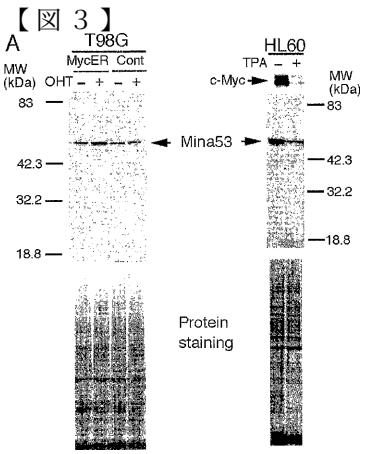
【図２】

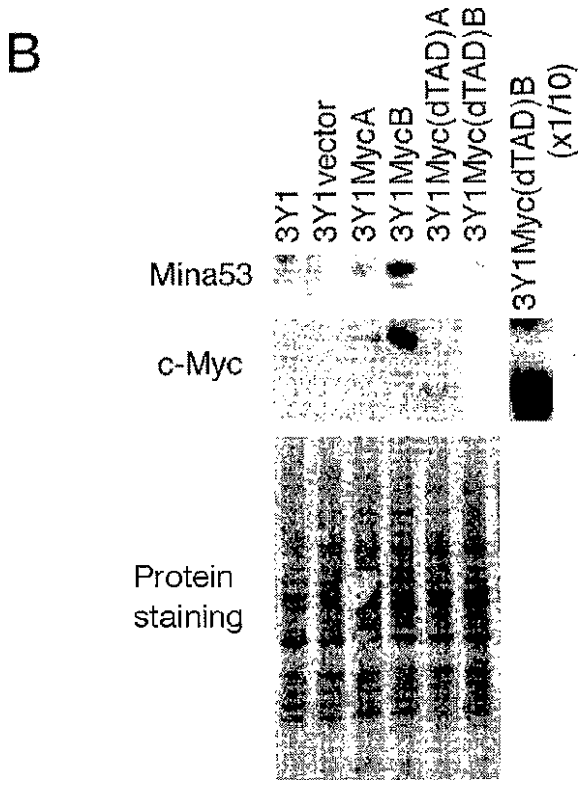

A
Hours after adding serum
0 3 6 9 12 15 23
c-myc
mina53
28S
18S
Induction of c-myc (○) and mina53 (●) mRNA
Time (hours)


B
Hours after adding TPA
0 3 7 9 12 24
c-myc
mina53
CD18
28S
18S
Relative expressions of c-myc (○), mina53 (●), and CD18 (△) mRNA
Times (hours)

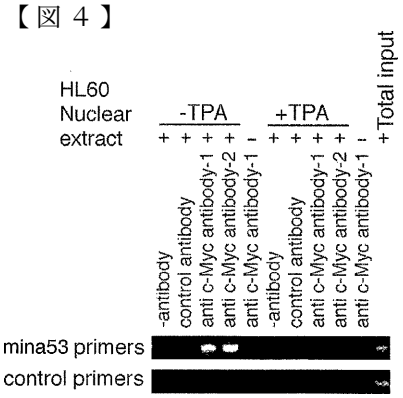

C
Hours after adding OHT
0
5
9
cont
mycer
CHX
mina53
28S
18S
Expression of mina53 mRNA (arbitrary unit)
Hours after adding OHT

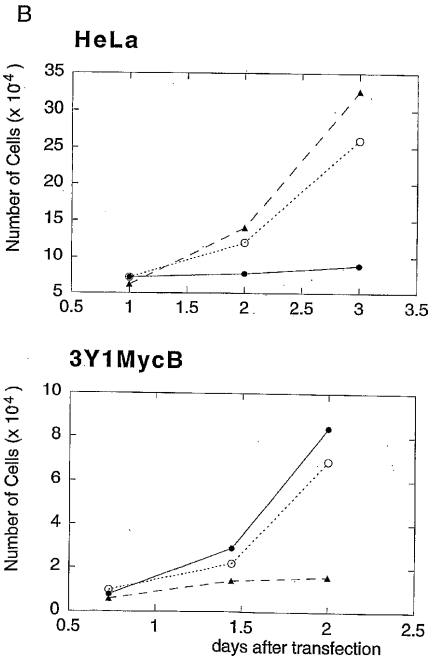
【図３】


A
T98G
MycER Cont
MW (kDa) OHT – + – +
83
42.3
32.2
18.8
Mina53
Protein staining
HL60
TPA – +
c-Myc
MW (kDa)
83
42.3
32.2
18.8


B
3Y1
3Y1vector
3Y1MycA
3Y1MycB
3Y1Myc(dTAD)A
3Y1Myc(dTAD)B
3Y1Myc(dTAD)B (x1/10)
Mina53
c-Myc
Protein staining

【図４】

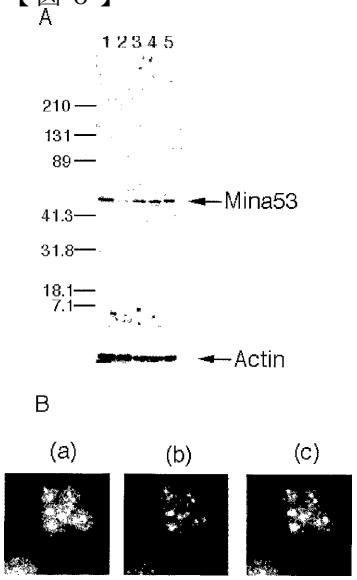

HL60 Nuclear extract
-TPA
+TPA
+Total input
-antibody
control antibody
anti c-Myc antibody-1
anti c-Myc antibody-2
anti c-Myc antibody-1
mina53 primers
control primers


B
HeLa
Number of Cells (x 10⁴)
35
30
25
20
15
10
5
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
3Y1MycB
Number of Cells (x 10⁴)
10
8
6
4
2
0
0.5
1
1.5
2
2.5
days after transfection

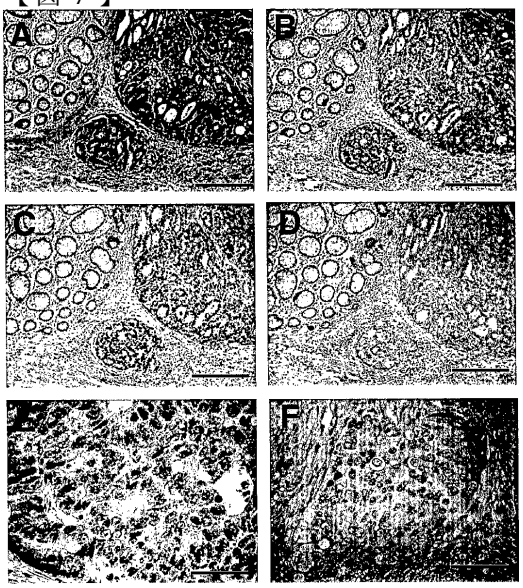
【図５】

A
HeLa
3Y1MycB
cont siRNA
human siRNA
rat siRNA
cont siRNA
human siRNA
rat siRNA
Mina53

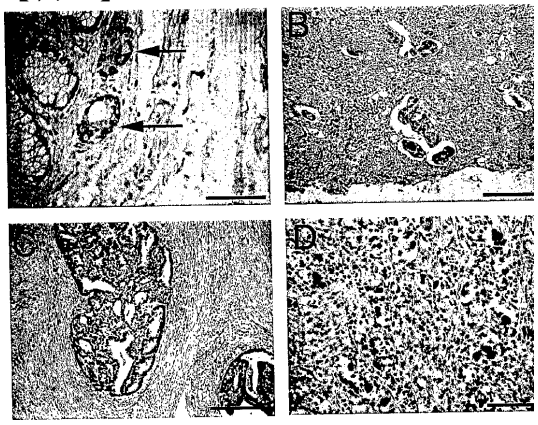
【図６】


A
1 2 3 4 5
210
131
89
41.3
31.8
18.1
7.1
Mina53
Actin
B
(a)
(b)
(c)

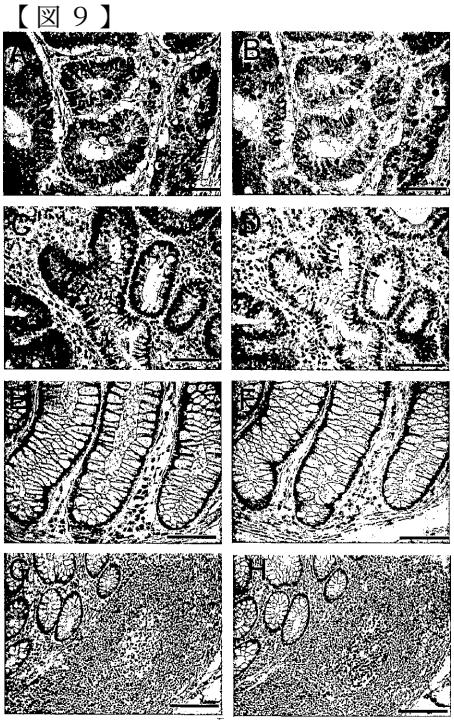
【図７】


A
B
C
D
E
F

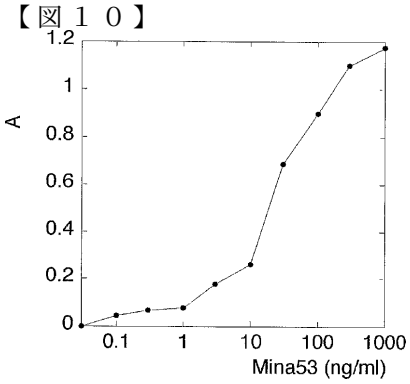
【図８】


B
C
D

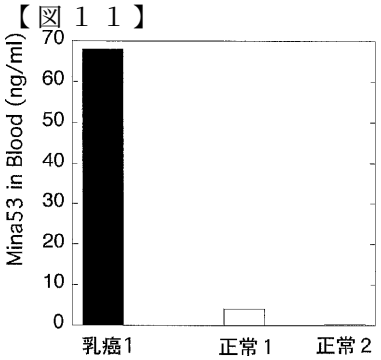
【図９】


A
B
C
D
E
F
G
H

【図１０】

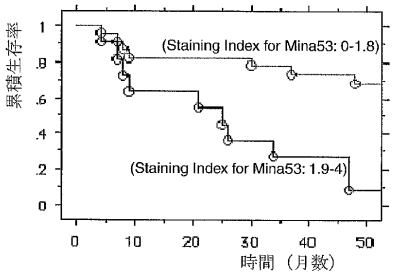


【図１１】

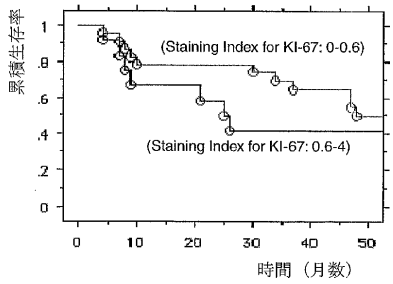


【図１２】

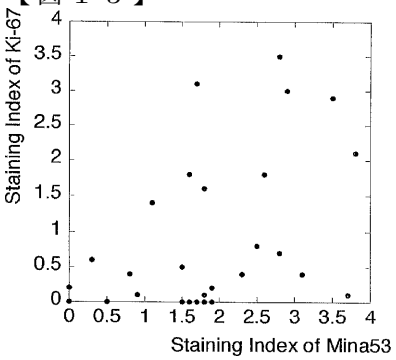
A, Mina53と食道癌累積生存率との関係



B, Ki-67と食道癌累積生存率との関係



【図１３】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
G01N	***33/574***	***(2006.01)***	G01N	33/574	A
G01N	***33/577***	***(2006.01)***	G01N	33/574	D
C12P	*21/08*	*(2006.01)*	G01N	33/577	B
			C12P	21/08	

(56)参考文献 欧州特許出願公開第０１０７４６１７（ＥＰ，Ａ１）
Anal Biochem., ２００２年 3月 1日, Vol.302, No.1,, p.38-51.

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/00-90 ZNA
C07K 14/82
C07K 16/32
EUROPAT(QUESTEL)
BIOSIS/WPI(DIALOG)
MEDLINE(STN)
SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
JSTPlus(JOIS)