

## 明 細 書

発明の名称：

### D C T N 1 タンパク質と R E T タンパク質との融合タンパク質

#### 技術分野

[0001] 本発明は、D C T N 1 タンパク質と R E T タンパク質との融合タンパク質であるポリペプチド、当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、当該ポリペプチド又はポリヌクレオチドの検出方法、当該ポリペプチド又はポリヌクレオチドを標的とした化合物、当該化合物をスクリーニングする方法に関する。

#### 背景技術

[0002] がんは日本における死因第一位の疾患であり、その治療法の改善が求められている。甲状腺がんの罹患者数は増加しているが、多くの症例で進行が遅く初期段階に適切な治療をすることで高い生存率を示す。一方で自覚症状がほとんど無いため適切な治療には早期の診断が不可欠である。

[0003] 甲状腺がんは組織型により乳頭がん、濾胞がん、髄様がん、未分化がん、悪性リンパ腫に分けられる。乳頭がんは甲状腺がんの 80% 程度を占めており、また未分化がんは低頻度であるが予後が非常に悪いことが知られている（非特許文献 1）。

[0004] 乳頭がんにおいて、大部分ががん遺伝子の活性化によって発生することが知られており B R A F 変異遺伝子（50～60%）、R A S 変異遺伝子（10～20%）、R E T 融合遺伝子（5～10%）等の遺伝子異常が相互排他的に生じることが明らかとなってきた。また非小細胞肺癌においても、R E T 融合遺伝子が 1～2% の頻度で E G F R 変異遺伝子等の他のドライバー変異遺伝子と相互排他的に存在することが報告されている（非特許文献 2～5）。

[0005] 進行した甲状腺がんにおいては薬物治療が主体となり、種々のマルチキナーゼ阻害剤が承認されているが、ドライバー変異遺伝子特異的に効果を示す

薬剤は未だ承認されていない。一方、肺がんにおいてはRET融合遺伝子陽性の患者でのRETを阻害することで効果を示すことが報告されており（非特許文献6）、甲状腺がんにおいても変異遺伝子や融合遺伝子といった薬剤効果の指標となりうる遺伝子異常を同定する必要がある。

[0006] がんにおいて、ドライバーとなる変異遺伝子（変異タンパク質）や融合遺伝子（融合タンパク質）などを同定することは、がんの性質を明らかにするとともに、これら変異遺伝子や融合遺伝子を標的とした新しいがん治療薬や検査方法の開発に大きく寄与するため、強く望まれている。

しかしながら、がんの発生のドライバーとなり得る変異遺伝子や融合遺伝子等は十分に解明されておらず、薬剤の治療効果に関連し得る遺伝子異常を同定することは非常に有意義である。

## 先行技術文献

### 非特許文献

- [0007] 非特許文献1: *Cancer*, 115 (16), pp3801-7 (2009)
- 非特許文献2: *Oncogene*, 22 (29), pp4578-80 (2003)
- 非特許文献3: *Cell*, 159 (3), pp676-90 (2014)
- 非特許文献4: *Cancer Discov.*, 3 (6), pp630-5 (2013)
- 非特許文献5: *Nature*, 511 (7511), pp543-50 (2014)
- 非特許文献6: *Lancet Respir Med.*, 5 (1), pp42-50 (2017)

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明は、RETタンパク質の少なくとも一部を含む融合タンパク質であ

る新規なポリペプチド、又は当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、当該ポリペプチド又はポリヌクレオチドの検出方法、当該ポリペプチド又はポリヌクレオチドを標的とした化合物、当該化合物をスクリーニングする方法を提供することを課題とする。

#### 課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意検討した結果、甲状腺がん患者由来の細胞において、DCTN1タンパク質の一部とRETタンパク質の一部とが融合した新規なポリペプチド及び当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを同定した。また、がん細胞における本発明のポリヌクレオチド又はポリペプチドの検出方法、前記ポリヌクレオチドの発現又はポリペプチドの発現及び／又は活性を抑制する化合物をスクリーニングする方法を見出した。多種多様にあるタンパク質のうち、DCTN1タンパク質のN末端部分と、RETタンパク質のC末端部分との組合せを有する融合タンパク質が細胞内で自然に発生すること、さらにDCTN1とRETとの融合遺伝子が癌ドライバーとして働くため、上記融合タンパク質が、がん診断に有効であることは新規の知見でありかつ従来技術から予想し得ない事項である。さらに当該ポリペプチド及び／又はポリヌクレオチドを発現している癌患者を治療するためのRETを阻害する化合物を有効成分とする医薬組成物を見出し、本発明を完成するに至った。

[0010] すなわち、本発明は、以下の態様を提供するものである。

[0011] 項1. DCTN1タンパク質のN末端部分と、RETタンパク質のC末端部分とが融合しているポリペプチド。

[0012] 項2. 以下の(a)～(c)から選択される項1記載のポリペプチド。

[0013] (a) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、又は配列番号24で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

[0014] (b) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10

、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 2、又は配列番号 2 4 で示されるアミノ酸配列において、1 個若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド。

[0015] (c) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 2、又は配列番号 2 4 で示されるアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド。

[0016] 項 3. 項 1 又は 2 記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

[0017] 項 4. 以下の (d) ~ (f) から選択される項 3 記載のポリヌクレオチド。

[0018] (d) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 2、又は配列番号 2 4 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

[0019] (e) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 2、又は配列番号 2 4 で示されるアミノ酸配列において、1 個若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

[0020] (f) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 2、又は配列番号 2 4 で示されるアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

[0021] 項 5. 以下の (g) ~ (i) から選択される項 3 記載のポリヌクレオチド。

[0022] (g) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、

配列番号 1 1、配列番号 1 3、配列番号 1 5、配列番号 1 7、配列番号 1 9、配列番号 2 1、又は配列番号 2 3 で示される塩基配列からなるポリヌクレオチド。

[0023] (h) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 1 1、配列番号 1 3、配列番号 1 5、配列番号 1 7、配列番号 1 9、配列番号 2 1、又は配列番号 2 3 で示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

[0024] (i) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 1 1、配列番号 1 3、配列番号 1 5、配列番号 1 7、配列番号 1 9、配列番号 2 1、又は配列番号 2 3 で示される塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有するポリヌクレオチド。

[0025] 項 6. 項 3 から 5 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[0026] 項 7. 項 3 から 5 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを導入した細胞。

[0027] 項 8. 項 1 又は 2 記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体。

[0028] 項 9. 試料中の、項 1 又は 2 記載のポリペプチドの存在を検出する方法。

[0029] 項 1 0. 試料中の、項 3 から 5 のいずれかに記載のポリヌクレオチドの存在を検出するためのプライマー又はプローブであって、当該プライマー又はプローブが以下の (j) ~ (l) から選択されるポリヌクレオチド。

[0030] (j) D C T N 1 タンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプローブ及び R E T タンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプローブからなる群から選択される少なくとも 1 つのプローブであるポリヌクレオチド。

[0031] (k) D C T N 1 タンパク質をコードするポリヌクレオチドと R E T タンパク質をコードするポリヌクレオチドとの融合点にハイブリダイズするプローブであるポリヌクレオチド。

[0032] (l) D C T N 1 タンパク質をコードするポリヌクレオチドと R E T タン

パク質をコードするポリヌクレオチドとの融合点を挟み込むように設計されたセンスプライマーとアンチセンスプライマーのセットであるポリヌクレオチド。

[0033] 項 1 1. 試料中の、項 3 から 5 のいずれかに記載のポリヌクレオチドの存在を検出する方法。

[0034] 項 1 2. 項 9 又は 1 1 記載の検出方法において、試料中の、項 1 若しくは 2 記載のポリペプチド又は項 3 から 5 のいずれかに記載のポリヌクレオチドの存在を検出した場合に、試料の由来となる患者が癌であると判定する方法。

[0035] 項 1 3. RET を阻害する化合物を有効成分とする、DCTN1 遺伝子と RET 遺伝子との融合遺伝子陽性及び／又は DCTN1 タンパク質と RET タンパク質との融合タンパク質陽性の癌治療用医薬組成物。

[0036] 項 1 4. 以下の (1) 及び (2) の工程を含む項 1 又は 2 記載のポリペプチドの発現及び／又は活性、又は項 3 から 5 のいずれかに記載のポリヌクレオチドの発現を抑制する化合物をスクリーニングする方法。

[0037] (1) 項 1 又は 2 記載のポリペプチド、項 1 若しくは 2 記載のポリペプチド又は項 3 から 5 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを発現している細胞、又は項 7 記載の細胞に試験化合物を接触する工程。

[0038] (2) 上記工程 (1) において、項 1 又は 2 記載のポリペプチドの発現及び／又は活性、又は項 3 から 5 のいずれかに記載のポリヌクレオチドの発現が抑制されるか測定する工程、又は上記工程 (1) 記載の細胞の増殖が抑制されるか測定する工程。

[0039] 項 1 5. 項 1 若しくは 2 記載のポリペプチド又は項 3 から 5 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを、RET を阻害する化合物を用いた化学療法が有効であるか否かの指標とする方法であって、項 9 記載の検出方法により、試料中から、項 1 若しくは 2 記載のポリペプチドを検出した場合、及び／又は項 1 1 記載の検出方法により、試料中から、項 3 から 5 のいずれかに記載のポリヌクレオチドの存在を検出した場合に、RET を阻害する化合物を用い

た化学療法が有効であると判定する方法。

- [0040] 項 16. DCTN1 タンパク質の N 末端部分と、RET タンパク質の C 末端部分とが融合しているポリペプチド、及び当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドからなる群より選択される少なくとも 1 種からなる癌を検出するためのバイオマーカー。
- [0041] 項 17. DCTN1 遺伝子と RET 遺伝子との融合遺伝子陽性及び／又は DCTN1 タンパク質と RET タンパク質との融合タンパク質陽性の癌患者に、RET を阻害する化合物を用いた化学療法を行う工程を含む、癌の治療方法。
- [0042] 項 18. 被験者由来の試料中から、項 1 又は 2 記載のポリペプチドの存在を検出すること及び／又は項 3 から 5 のいずれかに記載のポリヌクレオチドの存在を検出することを行う工程、ならびに  
項 1 又は 2 記載のポリペプチドの存在が検出されるか、かつ／又は項 3 から 5 のいずれかに記載のポリヌクレオチドの存在が検出された場合に、当該被験者に対し、RET を阻害する化合物を用いた化学療法を行う工程を含む、癌の治療方法。
- [0043] 項 19. DCTN1 遺伝子と RET 遺伝子との融合遺伝子陽性及び／又は DCTN1 タンパク質と RET タンパク質との融合タンパク質陽性の癌患者を治療するための、RET を阻害する化合物。
- [0044] 項 20. DCTN1 遺伝子と RET 遺伝子との融合遺伝子陽性及び／又は DCTN1 タンパク質と RET タンパク質との融合タンパク質陽性の癌患者を治療するための癌治療用医薬組成物を製造するための、RET を阻害する化合物の使用。
- [0045] 項 21. 試料中の項 1 又は 2 記載のポリペプチドの存在を検出するための手段及び／又は試料中の項 3 から 5 のいずれかに記載のポリヌクレオチドの存在を検出するための手段の、RET を阻害する化合物を用いた化学療法が有効であるか否かの判定薬の製造方法。
- [0046] 項 22. 項 3 から 5 のいずれかに記載のポリヌクレオチドの存在を検出す

るための抗DCTN1抗体及び抗RET抗体の組み合わせ。

- [0047] 項23、項1若しくは2記載のポリペプチド又は項3から5のいずれかに記載のポリヌクレオチドの存在を検出するための検出薬を製造するための、項8記載の抗体、項22記載の抗体の組み合わせ又は項10記載のプライマー若しくはプローブの使用。

### 発明の効果

- [0048] 本発明によれば、本発明のポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドはがん細胞で特異的に発現していることが示された。また、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド及び当該ポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドを発現している細胞は、本発明のポリヌクレオチドの発現又はポリペプチドの発現及び／又は活性を抑制する化合物をスクリーニングする方法に用いることができる。また、本発明のポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドの存在を指標にすることにより、DCTN1遺伝子とRET遺伝子との融合遺伝子陽性対象及び／又はDCTN1タンパク質とRETタンパク質との融合タンパク質陽性対象の検出を行うことが可能である。また、RETを阻害する化合物は、DCTN1遺伝子とRET遺伝子との融合遺伝子陽性及び／又はDCTN1タンパク質とRETタンパク質との融合タンパク質陽性の癌治療用医薬組成物として有用である。

### 図面の簡単な説明

- [0049] [図1] Droplet Digital PCR (ddPCR) を用いた甲状腺がん組織中のDCTN1-RET融合遺伝子及びGAPDHの発現確認  
[図2] Droplet Digital PCR (ddPCR) を用いた正常甲状腺組織中のDCTN1-RET融合遺伝子及びGAPDHの発現確認  
[図3] 正常甲状腺組織及び甲状腺がん組織中のDCTN1-RET融合遺伝子全長の発現確認  
[図4] DCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞におけるDCTN1-RET融合タンパク質の発現確認。a) 抗リン酸化RET抗体を用いたDCTN1-RET融合タンパク質の検出、b) 抗RET抗体を用いたD

CTN1-RET融合タンパク質の検出、c) 抗DCTN1抗体を用いたDCTN1-RET融合タンパク質の検出。

[図5] DCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞の3次元培養における増殖確認。N=3、平均+SD。

[図6] *in vivo*におけるDCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞の造腫瘍性確認

[図7] DCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞におけるRET siRNAによるリン酸化RETの発現抑制の確認

[図8] RET siRNAによるDCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞の増殖抑制効果の確認

[図9] DCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞におけるRETを阻害する化合物によるリン酸化RETの発現抑制の確認

#### 発明を実施するための形態

[0050] 本発明は、新規なポリヌクレオチド又はポリペプチド、当該ポリヌクレオチド又はポリペプチドの検出方法、当該ポリヌクレオチド又はポリペプチドを標的とした化合物、当該化合物をスクリーニングする方法に関する。

[0051] 本発明は、DCTN1タンパク質のN末端部分と、RETタンパク質のC末端部分とが融合しているポリペプチド（以下、「本発明のポリペプチド」とも称する）を提供する。また、本発明は、当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（以下、「本発明のポリヌクレオチド」とも称する）を提供する。

[0052] 本発明にかかる「DCTN1 (Dynactin Subunit 1) タンパク質」は、150 kDa Dynein-associated polypeptideタンパク質、又はDAP-150タンパク質とも称されるタンパク質であり、ヒト又は非ヒト哺乳動物のDCTN1タンパク質を含み、好ましくはヒトDCTN1タンパク質である。ヒトにおいて2p13.1に座乗している遺伝子にコードされているタンパク質である。本発明において、「DCTN1タンパク質」は、そのスプライスバリエントである

アイソフォームを含み、ヒト由来のものであれば、例えば、GenPept  
アクセッション番号NP\_\_004073、NP\_\_075408、NP\_\_00  
1128512、NP\_\_001128513、NP\_\_001177765、  
又はNP\_\_001177766で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチ  
ドが挙げられる。また、より具体的には、例えば、配列番号25、配列番号  
26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、又は配列番号30で示  
されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。さらに、本発明に  
おいて、「DCTN1タンパク質のN末端部分」とは、前記DCTN1タン  
パク質のN末端側にあるコイルドコイルドメインの一部又は全部を含むポリ  
ペプチドであり、好ましくはDCTN1タンパク質のN末端側にあるコイル  
ドコイルドメインの全部を含むポリペプチドである。

[0053] 本発明にかかる「RETタンパク質」は、Ret Proto-Onco  
geneタンパク質、RET Receptor Tyrosine ki  
naseタンパク質、又はRearranged During Tran  
sfectionタンパク質とも称されるタンパク質であり、ヒト又は非ヒ  
ト哺乳動物のRETタンパク質を含み、好ましくはヒトRETタンパク質で  
ある。ヒトにおいて10q11.2に座乗している遺伝子にコードされてい  
るタンパク質である。本発明において、「RETタンパク質」は、そのスプ  
ライズバリエーションであるアイソフォームを含み、ヒト由来のものであれば、  
例えば、GenPeptアクセッション番号NP\_\_066124、又はNP  
\_\_065681で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。  
また、より具体的には、例えば、配列番号31、又は配列番号32で示さ  
れるアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。さらに、本発明にお  
いて、「RETタンパク質のC末端部分」とは、前記RETタンパク質のC  
末端側にあるキナーゼドメインを含むポリペプチドである。

[0054] また、本発明の「DCTN1タンパク質のN末端部分と、RETタンパク  
質のC末端部分とが融合しているポリペプチド」としては、前記DCTN1  
タンパク質のN末端側にあるコイルドコイルドメインの一部又は全部を含む

ポリペプチドと、前記RETタンパク質のC末端側にあるキナーゼドメインを含むポリペプチドとが融合しているポリペプチドであり、好ましくは前記DCTN1タンパク質のN末端側にあるコイルドコイルドメインの全部を含むポリペプチドと、前記RETタンパク質のC末端側にあるキナーゼドメインを含むポリペプチドとが融合しているポリペプチドであり、より好ましくは以下の(a)～(c)から選択されるポリペプチドである。これらのポリペプチドはキナーゼ活性及び／又は細胞増殖効果を有することが好ましい。

[0055] (a) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、又は配列番号24で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

[0056] (b) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、又は配列番号24で示されるアミノ酸配列において、1個若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド。

[0057] (c) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、又は配列番号24で示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド。

[0058] より好ましくは以下の(a)～(c)から選択されるポリペプチドである。これらのポリペプチドはキナーゼ活性又は細胞増殖効果を有することが好ましい。

[0059] (a) 配列番号18で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

[0060] (b) 配列番号18で示されるアミノ酸配列において、1個若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド。

[0061] (c) 配列番号18で示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有す

るアミノ酸配列からなるポリペプチド。

[0062] 本発明の「D C T N 1 タンパク質のN末端部分と、R E T タンパク質のC末端部分とが融合しているポリペプチド」には、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、又は配列番号24で示されるアミノ酸配列において、1個若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド（前記（b））が含まれる。このようなアミノ酸配列からなるD C T N 1 タンパク質のN末端部分と、R E T タンパク質のC末端部分とが融合しているポリペプチドとしては、例えば配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、又は配列番号24で示されるアミノ酸配列を有するD C T N 1 タンパク質のN末端部分と、R E T タンパク質のC末端部分とが融合しているポリペプチドのアイソフォームが挙げられる。これらのポリペプチドはキナーゼ活性又は細胞増殖効果を有することが好ましい。ここで、欠失、置換又は付加される数個のアミノ酸とは、例えば1～10個が好ましく、より好ましくは1～5個のアミノ酸である。また、上記の付加には、N末端若しくはC末端への1～数個のアミノ酸の付加、又は両末端への1～数個のアミノ酸の付加が含まれる。

[0063] 前記ポリペプチドのアミノ酸が置換したポリペプチドとしては、例えば、G e n P e p t アクセション番号：N P \_ 0 6 6 1 2 4（配列番号31）又はN P \_ 0 6 5 6 8 1（配列番号32）で示されるアミノ酸配列を有するR E T タンパク質のゲートキーパー部位である804番目（配列番号2及び配列番号4では1325番目、配列番号6及び配列番号8では1191番目、配列番号10及び配列番号12では1300番目、配列番号14及び配列番号16では1186番目、配列番号18及び配列番号20では1283番目、配列番号22及び配列番号24では1318番目）のバリンがロイシン、メチオニン、若しくはグルタミン酸に置換したポリペプチド、又は806

番目（配列番号2及び配列番号4では1327番目、配列番号6及び配列番号8では1193番目、配列番号10及び配列番号12では1302番目、配列番号14及び配列番号16では1188番目、配列番号18及び配列番号20では1285番目、配列番号22及び配列番号24では1320番目）のチロシンがシステイン、グルタミン酸、セリン、ヒスチジン、若しくはアスパラギンに置換したポリペプチドが挙げられる。

[0064] また、ゲートキーパー部位以外のアミノ酸である768番目（配列番号2及び配列番号4では1289番目、配列番号6及び配列番号8では1155番目、配列番号10及び配列番号12では1264番目、配列番号14及び配列番号16では1150番目、配列番号18及び配列番号20では1247番目、配列番号22及び配列番号24では1282番目）のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換したポリペプチド、883番目（配列番号2及び配列番号4では1404番目、配列番号6及び配列番号8では1270番目、配列番号10及び配列番号12では1379番目、配列番号14及び配列番号16では1265番目、配列番号18及び配列番号20では1362番目、配列番号22及び配列番号24では1397番目）のアラニンがフェニルアラニン、若しくはセリンに置換したポリペプチド、884番目（配列番号2及び配列番号4では1405番目、配列番号6及び配列番号8では1271番目、配列番号10及び配列番号12では1380番目、配列番号14及び配列番号16では1266番目、配列番号18及び配列番号20では1363番目、配列番号22及び配列番号24では1398番目）のグルタミン酸がバリンに置換したポリペプチド、891番目（配列番号2及び配列番号4では1412番目、配列番号6及び配列番号8では1278番目、配列番号10及び配列番号12では1387番目、配列番号14及び配列番号16では1273番目、配列番号18及び配列番号20では1370番目、配列番号22及び配列番号24では1405番目）のセリンがアラニン、若しくはロイシンに置換したポリペプチド、又は918番目（配列番号2及び配列番号4では1439番目、配列番号6及び配列番号8では1305番目、配

列番号 10 及び配列番号 12 では 1414 番目、配列番号 14 及び配列番号 16 では 1300 番目、配列番号 18 及び配列番号 20 では 1397 番目、配列番号 22 及び配列番号 24 では 1432 番目) のメチオニンがスレオニンに置換したポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。

[0065] また、本発明の DCTN1 タンパク質の N 末端部分と、RET タンパク質の C 末端部分とが融合しているポリペプチドには、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、又は配列番号 24 で示されるアミノ酸配列において相当する配列を適切にアライメントした時、前記配列番号のいずれかで示されるアミノ酸配列の 1 つと 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド（前記 (c)）が包含される。これらのポリペプチドはキナーゼ活性又は細胞増殖効果を有することが好ましい。

[0066] ここで、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、又は配列番号 24 で示されるアミノ酸配列との同一性は、好ましくは 90% 以上であり、より好ましくは 95% 以上であり、さらに好ましくは 98% 以上である。当該アミノ酸配列の同一性は、通常慣用の方法で計算することができる。

[0067] 本発明のポリペプチドは、本発明にかかるポリペプチドを構成するアミノ酸配列以外に、タンパク質タグを構成するアミノ酸を有していてもよい。タグの例としては、発現効率を向上させるタグや、精製効率を向上させるタグ等、当業者に周知のタグを使用することができ、His タグ、Myc タグ、FLAG タグ等が挙げられる。

[0068] 本発明のポリヌクレオチドは、前記 DCTN1 タンパク質の N 末端部分と、RET タンパク質の C 末端部分とが融合しているポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであり、好ましくは以下の (d) ~ (i) から選択されるポリヌクレオチドである。これらのポリヌクレオチドは、キナーゼ活性又

は細胞増殖効果を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであることが好ましい。

[0069] (d) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、又は配列番号 24 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

[0070] (e) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、又は配列番号 24 で示されるアミノ酸配列において、1 個若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

[0071] (f) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、又は配列番号 24 で示されるアミノ酸配列と 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

[0072] (g) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、又は配列番号 23 で示される塩基配列からなるポリヌクレオチド。

[0073] (h) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、又は配列番号 23 で示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

[0074] (i) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、又は配列番号 23 で示される塩基配列と 90% 以上の同一

性を有するポリヌクレオチド。

- [0075] より好ましくは以下の (d) ~ (i) から選択されるポリヌクレオチドである。これらのポリヌクレオチドは、キナーゼ活性又は細胞増殖効果を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであることが好ましい。
- [0076] (d) 配列番号 18 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。
- [0077] (e) 配列番号 18 で示されるアミノ酸配列において、1 個若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。
- [0078] (f) 配列番号 18 で示されるアミノ酸配列と 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。
- [0079] (g) 配列番号 17 で示される塩基配列からなるポリヌクレオチド。
- [0080] (h) 配列番号 17 で示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。
- [0081] (i) 配列番号 17 で示される塩基配列と 90% 以上の同一性を有するポリヌクレオチド。
- [0082] 本発明のポリヌクレオチドは、2 本鎖 DNA のみならず、それを構成するセンス鎖及びアンチセンス鎖といった各種 1 本鎖 DNA や RNA をも包含する。アンチセンス鎖は、プローブ等として利用可能である。DNA には、例えばクローニングや化学合成技術又はそれらの組み合わせで得られるような cDNA やゲノム DNA が含まれる。さらに、本発明にかかるポリヌクレオチドに対し、本発明にかかるポリペプチドをコードする塩基配列以外に、非翻訳領域 (UTR) の配列などの塩基配列が付加していてもよい。
- [0083] ここで、ストリンジントな条件とは、例えば *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition, J. Sambrook et. al, 1989)* に記載の条件が挙げられる。すなわち、6×SSC (1×SSC の組成: 0.15

M塩化ナトリウム、0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、0.5%SDS、5×デンハート及び100mg/mLニシン精子DNAを含む溶液にプローブとともに65℃で8～16時間恒温し、ハイブリダイズさせる条件等が挙げられる。

[0084] また、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、又は配列番号23で示される塩基配列との同一性は、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上である。当該塩基配列の同一性は、通常慣用の方法で計算することができる。

[0085] 本明細書中において、「キナーゼ活性又は細胞増殖効果を有する」の「キナーゼ活性を有する」とは、チロシンをリン酸化する酵素としての活性を有することを意味する。また、「キナーゼ活性又は細胞増殖効果を有する」の「細胞増殖効果を有する」とは、本発明のポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドを細胞に導入することにより、導入していない細胞に比べて、導入した細胞の増殖能が向上する効果である。このような効果は、例えば、サイトカイン依存的に増殖する細胞株にポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドを導入した際に、サイトカイン非依存的に増殖した際に、細胞増殖効果を有すると確認することができる。

[0086] 本発明のポリヌクレオチドは、例えば、DCTN1遺伝子とRET遺伝子との融合遺伝子を保持する甲状腺がん等から調整したcDNAライブラリーやゲノムDNAライブラリーを用いて、本発明のポリヌクレオチドの塩基配列の一部と特異的にハイブリダイズするプライマーを用いて、抽出することができる。このようなプライマーとしては、本発明にかかるポリヌクレオチド又はそのアンチセンス鎖の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズするプライマーであれば、いかなる配列および長さのものを用いてもよい。また人工的にポリヌクレオチドを合成する方法が挙げられる(Nat. Methods, 11:499-507, 2014)。

- [0087] 本発明の発現ベクターは、本発明のポリヌクレオチドを含み、本発明のポリペプチドを発現させる限り、特に限定されるものではない。例えば、用いる宿主に応じて適宜選択した公知の発現ベクターに、本発明のポリヌクレオチドを挿入することにより得られる発現ベクターを挙げることができる。
- [0088] 宿主としては、形質転換が可能な生細胞であれば特に限定されず、例えば、大腸菌、枯草菌等の細菌、酵母や糸状菌等の真菌類、Sf9細胞等の昆虫細胞、カイコ等の昆虫、動物細胞、植物又は植物由来細胞が挙げられる。
- [0089] 本発明のポリヌクレオチドを挿入するためのベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、導入する宿主の種類、導入方法等に応じて適宜選択できる。例えば、プラスミドDNA、ファージDNA、ウイルスベクターが挙げられる。発現ベクターの構築に用いられるベクターDNAは、広く普及した入手の容易なものが用いられる。例えば、pUC19（タカラバイオ）、pTV118N（タカラバイオ）、pMAMneo（クロンテック）、pGEX（GEヘルスケア）、pET160（Invitrogen）、pDEST（Invitrogen）、pIEx（メルクミリポア）、pBacPAK（クロンテック）が挙げられる。また、ウイルスベクターとしては、例えば、バキュロウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ヒト免疫不全症ウイルス（HIV）等のレンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター（AAVベクター）、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンプスウイルス、センダイウイルス、シミアンウイルス-40（SV-40）等のDNAウイルスやRNAウイルスが挙げられる。
- [0090] 当該発現ベクターを用いて宿主を形質転換するには、プロトプラスト法、コンピテントセル法、エレクトロポレーション法等を用いて行うことができる。得られた形質転換体は、資化しうる炭素源、窒素源、金属塩、ビタミン等を含む培地を用いて適当な条件下で培養すればよい。
- [0091] 本発明のポリヌクレオチドを導入した細胞は、例えば、前記の本発明の発現ベクターで形質転換された細胞、ゲノム編集により本発明のポリヌクレオ

チドを導入した細胞が挙げられる。ここで使用できる細胞としては、前記の宿主細胞が挙げられる。細胞が、発現ベクターで形質転換された細胞であるか確認する方法としては、例えば、本発明のポリペプチドを検出するための方法、又は本発明のポリヌクレオチドを検出するための方法が挙げられる。

[0092] 「ゲノム編集により本発明のポリヌクレオチドを導入した細胞」として、好ましくは各々単独で存在する D C T N 1 遺伝子と R E T 遺伝子をゲノム編集により融合させた遺伝子を有する細胞であり、より好ましくは各々単独で存在する D C T N 1 遺伝子と R E T 遺伝子の D C T N 1 の e x o n 2 7 と R E T の e x o n 1 2 をゲノム編集により融合させた遺伝子を有する細胞である。このような細胞は通常慣用の方法で作製可能であり、例えば、C e l l R e p . , 9 ( 4 ) , p p 1 2 1 9 - 1 2 2 7 ( 2 0 1 4 ) 、 N a t . C o m m u n . , 5 , 3 7 2 8 ( 2 0 1 4 ) に記載の方法が挙げられる。細胞が、ゲノム編集により本発明のポリヌクレオチドを導入した細胞であるか確認する方法としては、例えば、本発明のポリペプチドを検出するための方法、又は本発明のポリヌクレオチドを検出するための方法が挙げられる。

[0093] 本発明のポリペプチドは、本発明の発現ベクターで形質転換された細胞を、細胞培養に適した培地を用いて、適当な条件下で培養することにより得られた培養液及び／又は細胞から、一般的な方法によってタンパク質の採取、精製を行うことにより、得ることができる。また、本発明のポリペプチドは、本発明のポリヌクレオチドを有する発現ベクター又は、本発明のポリヌクレオチドをコードする鋳型 R N A 若しくは鋳型 D N A を無細胞タンパク質合成系（例えば、ヒト細胞株由来の細胞抽出液、ウサギ網状赤血球抽出液、小麦胚芽抽出液、大腸菌抽出液）に導入し、適当な条件下でインキュベーションすることにより得られた反応液から、一般的な方法によってタンパク質の採取、精製を行うことにより、得ることができる。

[0094] 本発明において、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体は、D C T N 1 タンパク質の N 末端部分と R E T タンパク質の C 末端部分の融合点に特異的に結合する抗体が挙げられる。当該抗体は、D C T N 1 タンパク質の

N末端部分とRETタンパク質のC末端部分の融合点に特異的に結合するが、野生型のDCTN1、又は野生型のRETタンパク質のいずれにも結合しない抗体を意味する。

[0095] 本発明において、「DCTN1タンパク質のN末端部分とRETタンパク質のC末端部分の融合点」における「融合点」とは、DCTN1タンパク質のN末端部分由来のポリペプチドとRETタンパク質のC末端部分由来のポリペプチドとが融合した点を意味する。配列番号2における融合点は、配列番号2における1-1233番目のDCTN1のN末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドと配列番号2における1234-1635番目のRETのC末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドが融合した点である。配列番号4における融合点は、配列番号4における1-1233番目のDCTN1のN末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドと配列番号4における1234-1593番目のRETのC末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドが融合した点である。配列番号6における融合点は、配列番号6における1-1099番目のDCTN1のN末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドと配列番号6における1100-1501番目のRETのC末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドが融合した点である。配列番号8における融合点は、配列番号8における1-1099番目のDCTN1のN末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドと配列番号8における1100-1459番目のRETのC末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドが融合した点である。配列番号10における融合点は、配列番号10における1-1208番目のDCTN1のN末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドと配列番号10における1209-1610番目のRETのC末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドが融合した点である。配列番号12における融合点は、配列番号12における1-1208番目のDCTN1のN末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドと配列番号12における1209-1568番目のRETのC末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドが融

合した点である。配列番号 14 における融合点は、配列番号 14 における 1-1094 番目の DCTN1 の N 末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドと配列番号 14 における 1095-1496 番目の RET の C 末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドが融合した点である。配列番号 16 における融合点は、配列番号 16 における 1-1094 番目の DCTN1 の N 末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドと配列番号 16 における 1095-1454 番目の RET の C 末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドが融合した点である。配列番号 18 における融合点は、配列番号 18 における 1-1191 番目の DCTN1 の N 末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドと配列番号 18 における 1192-1593 番目の RET の C 末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドが融合した点である。配列番号 20 における融合点は、配列番号 20 における 1-1191 番目の DCTN1 の N 末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドと配列番号 20 における 1192-1551 番目の RET の C 末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドが融合した点である。配列番号 22 における融合点は、配列番号 22 における 1-1226 番目の DCTN1 の N 末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドと配列番号 22 における 1227-1628 番目の RET の C 末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドが融合した点である。配列番号 24 における融合点は、配列番号 24 における 1-1226 番目の DCTN1 の N 末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドと配列番号 24 における 1227-1586 番目の RET の C 末端部分由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドが融合した点である。

[0096] 前記抗体は、例えば、免疫グロブリン (IgA、IgD、IgE、IgG、IgM、IgY 等)、Fab フラグメント、F(ab')<sub>2</sub> フラグメント、一本鎖抗体フラグメント (scFv)、シングルドメイン抗体、Diabody 等 (Nat. Rev. Immunol., 6:343-357, 2006) が挙げられ、これらはヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、マウス抗体、

ラマ抗体、ニワトリ抗体等のモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体が挙げられるがこれらに限定されるものではない。

[0097] 前記抗体は、種々の公知の方法を用いて作製することができ、作製方法は特に限定されるものではない。かかる公知の手法としては、当該発明のポリペプチド、D C T N 1 タンパク質のN末端部分とR E T タンパク質のC末端部分の融合点を含むポリペプチド断片等を免疫動物に接種し、当該動物の免疫系を活性化させた後、当該動物の血清を回収し、ポリクローナル抗体として得る方法、又はハイブリドーマ法、ファージディスプレイ法等によりモノクローナル抗体を得る方法等が挙げられる。

[0098] 本発明のポリペプチドの発現及び／又は活性、又は本発明のポリヌクレオチドの発現を抑制する化合物をスクリーニングする方法は、以下の（１）及び（２）の工程を含む方法により行うことができる。

[0099] すなわち、本発明のスクリーニング方法は、

（１）本発明のポリペプチド、又は本発明のポリペプチド及び／又はポリヌクレオチドを発現している細胞に試験化合物を接触する工程。

[0100] （２）上記工程（１）において、本発明のポリペプチドの発現及び／又は活性、又は本発明のポリヌクレオチドの発現が抑制されるか測定する工程、又は上記工程（１）記載の細胞の増殖が抑制されるか測定する工程、を含む方法により行うことができる。

[0101] より好ましくは、以下の（１）及び（２）の工程を含む方法である。

[0102] （１）本発明のポリペプチド及び／又はポリヌクレオチドを発現している細胞に試験化合物を接触する工程。

[0103] （２）上記工程（１）記載の細胞の増殖が抑制されるか測定する工程。

[0104] また、本発明のポリペプチドの発現及び／又は活性、又は本発明のポリヌクレオチドの発現を抑制する化合物をスクリーニングする方法は、以下の（１）から（３）の工程を含む方法により行うことができる。

[0105] すなわち、本発明のスクリーニング方法は、

（１）本発明のポリペプチド、又は本発明のポリペプチド及び／又はポリ

ヌクレオチドを発現している細胞に試験化合物を接触する工程。

[0106] (2) 上記工程 (1) において、本発明のポリペプチドの発現及び／又は活性、又は本発明のポリヌクレオチドの発現が抑制されるか測定する工程、又は上記工程 (1) 記載の細胞の増殖が抑制されるか測定する工程。

[0107] (3) 上記工程 (2) において、本発明のポリペプチドの発現及び／又は活性、又は本発明のポリヌクレオチドの発現が抑制された場合、又は上記工程 (1) 記載の細胞の増殖が抑制された場合、試験化合物が本発明のポリペプチドの発現及び／又は活性、又は本発明のポリヌクレオチドの発現を抑制すると判定する工程。

を含む方法により行うことができる。

[0108] より好ましくは、以下の (1) から (3) の工程を含む方法である。

[0109] (1) 本発明のポリペプチド及び／又はポリヌクレオチドを発現している細胞に試験化合物を接触する工程。

[0110] (2) 上記工程 (1) 記載の細胞の増殖が抑制されるか測定する工程。

[0111] (3) 上記工程 (2) において、上記工程 (1) 記載の細胞の増殖が抑制された場合、試験化合物が本発明のポリペプチドの発現及び／又は活性、又は本発明のポリヌクレオチドの発現を抑制すると判定する工程。

[0112] 「本発明のポリペプチド及び／又はポリヌクレオチドを発現している細胞」は、本発明の発現ベクターで形質転換された細胞、ゲノム編集により本発明のポリヌクレオチドを導入した細胞、本発明のポリペプチド及び／又はポリヌクレオチドを発現している初代培養細胞、本発明のポリペプチド及び／又はポリヌクレオチドを発現している株化細胞、本発明のポリペプチド及び／又はポリヌクレオチドを発現しているがん患者由来の細胞等が挙げられる。細胞が、本発明のポリペプチド及び／又はポリヌクレオチドを発現している細胞であるか確認する方法としては、例えば、本発明のポリペプチドを検出するための方法、又は本発明のポリヌクレオチドを検出するための方法が挙げられる。

[0113] 本発明において、「本発明のポリペプチドの発現及び／又は活性、又は本

発明のポリヌクレオチドの発現が抑制される」の中で、「本発明のポリペプチドの発現、又は本発明のポリヌクレオチドの発現が抑制される」とは、例えば、本発明のポリペプチド及び／又はポリヌクレオチドを発現している細胞に試験化合物を接触させた後、当該細胞における本発明のポリペプチド又はポリヌクレオチドの発現量を、本発明のポリペプチド又はポリヌクレオチドの存在を検出する方法を用いて評価した際に、試験化合物を接触させていない細胞と比較して、試験化合物を接触させた細胞において、本発明のポリペプチド又はポリヌクレオチドの発現量が統計学上有意に低下した際に、本発明のポリペプチド又はポリヌクレオチドの発現が抑制されたと判断することができる。

[0114] また、「本発明のポリペプチドの発現及び／又は活性、又は本発明のポリヌクレオチドの発現が抑制される」の中で、「本発明のポリペプチドの活性が抑制される」とは、例えば、本発明のポリペプチド、又は本発明のポリペプチドを発現している細胞を用いて、試験化合物を接触させていない場合と比較して、試験化合物を接触させた場合に、チロシンのリン酸化の割合が統計学上有意に低下した際に、本発明のポリペプチドの活性が抑制されたと判断することができる。

[0115] また、本発明のポリペプチドを発現している細胞を用いて、試験化合物を接触させていない場合と比較して、試験化合物を接触させた場合に、細胞増殖が統計学上有意に抑制された際に、本発明のポリペプチドの活性が抑制されたと判断することができる。

[0116] 本発明において、「チロシンのリン酸化」とは、RETタンパク質（他のタンパク質と融合しているRETタンパク質も含む）のチロシンのリン酸化のみならず、RET下流シグナル上のタンパク質のチロシンのリン酸化も含まれる。RET下流シグナル上のタンパク質としては、例えば、STAT、AKT、ERKが挙げられる。好ましくは、RETタンパク質（他のタンパク質と融合しているRETタンパク質も含む）のチロシンのリン酸化である。

- [0117] また、「チロシンのリン酸化の割合」は、例えば、リン酸化 R E T 特異的抗体を用いて、ウエスタンブロッティング、免疫沈降、免疫組織化学、E L I S A、フローサイトメトリーにより測定可能である。
- [0118] 本発明において「試料」とは、生体試料（例えば、細胞、組織、臓器、体液（血液、リンパ液等）、消化液、尿）のみならず、これらの生体試料から得られる核酸抽出物（ゲノム D N A 抽出物、m R N A 抽出物、m R N A 抽出物から調製された c D N A 調製物や c R N A 調製物等）やタンパク質抽出物も含む。また、前記試料は、ホルマリン固定処理、アルコール固定処理、凍結処理又はパラフィン包埋処理が施してあるものでもよい。前記生体試料としては、生体から採取したものを使用することができる。好ましくはがん患者由来の試料であり、より好ましくは腫瘍細胞を含む試料である。また、生体試料の採取方法は、生体試料の種類に応じて適宜選択することができる。
- [0119] 本発明には、試料中の、本発明のポリペプチドの存在を検出する方法が含まれる。
- [0120] 本発明において、試料中の、本発明のポリペプチドの存在を検出する方法は、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体を用いた E L I S A 法、ウエスタンブロッティング法、若しくは免疫組織化学染色法、又は D C T N 1 タンパク質に特異的に結合する抗体及び R E T タンパク質に特異的に結合する抗体を用いた F R E T ( F l u o r e s c e n c e R e a s o n a n c e E n e r g y T r a n s f e r ) 法など、通常慣用の検出法により検出する方法が挙げられる。好ましくは、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体を用いた E L I S A 法、ウエスタンブロッティング法、又は免疫組織化学染色法である。
- [0121] D C T N 1 タンパク質に特異的に結合する抗体及び R E T タンパク質に特異的に結合する抗体としては、D C T N 1 タンパク質の前記融合点より N 末端部分に結合する抗体及び R E T タンパク質の前記融合点より C 末端部分に結合する抗体が好ましく、これらの抗体は、市販品を使用すること、又は通常公知の方法で作製することが可能である。

- [0122] 本発明において、試料中の、本発明のポリペプチドの存在を検出する方法として、好ましくは本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体又はDCTN1タンパク質に特異的に結合する抗体及びRETタンパク質に特異的に結合する抗体を用いて本発明のポリペプチドを検出する工程を含むことを特徴とする、本発明のポリペプチドの存在を検出する方法であり、より好ましくは本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体を用いて本発明のポリペプチドを検出する工程を含むことを特徴とする、本発明のポリペプチドの存在を検出する方法である。従って、本発明のポリペプチドの存在を検出するための手段としては、特に限定されないが、例えば、DCTN1タンパク質に特異的に結合する抗体及びRETタンパク質に特異的に結合する抗体の組合せ；本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体等が挙げられる。
- [0123] 本発明には、試料中の、本発明のポリヌクレオチドの存在を検出するためのプライマー又はプローブが含まれる。本発明において、本発明のポリペプチドの存在を検出するための手段としては、特に限定されないが、例えば、本発明のポリヌクレオチドの存在を検出するためのプライマー又はプローブ等が挙げられる。
- [0124] 当該プライマー又はプローブとしては、(j)～(l)から選択されるポリヌクレオチド；
- (j) DCTN1タンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプローブ及びRETタンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプローブからなる群から選択される少なくとも1つのプローブであるポリヌクレオチド。
- [0125] (k) DCTN1タンパク質をコードするポリヌクレオチドとRETタンパク質をコードするポリヌクレオチドとの融合点にハイブリダイズするプローブであるポリヌクレオチド。
- [0126] (l) DCTN1タンパク質をコードするポリヌクレオチドとRETタンパク質をコードするポリヌクレオチドとの融合点を挟み込むように設計されたセンスプライマーとアンチセンスプライマーのセットであるポリヌクレオ

チド。

が挙げられる。

[0127] 本発明において、「D C T N 1 タンパク質をコードするポリヌクレオチドと R E T タンパク質をコードするポリヌクレオチドとの融合点」における「融合点」とは、D C T N 1 タンパク質をコードするポリヌクレオチドと R E T タンパク質をコードするポリヌクレオチドとが融合した点を意味する。配列番号 1 における融合点は、配列番号 1 における 1 - 3 6 9 9 番目の D C T N 1 をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配列を有するポリヌクレオチドと配列番号 1 における 3 7 0 0 - 4 9 0 5 番目の R E T をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配列を有するポリヌクレオチドが融合した点である。配列番号 3 における融合点は、配列番号 3 における 1 - 3 6 9 9 番目の D C T N 1 をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配列を有するポリヌクレオチドと配列番号 3 における 3 7 0 0 - 4 7 7 9 番目の R E T をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配列を有するポリヌクレオチドが融合した点である。配列番号 5 における融合点は、配列番号 5 における 1 - 3 2 9 7 番目の D C T N 1 をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配列を有するポリヌクレオチドと配列番号 5 における 3 2 9 8 - 4 5 0 3 番目の R E T をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配列を有するポリヌクレオチドが融合した点である。配列番号 7 における融合点は、配列番号 7 における 1 - 3 2 9 7 番目の D C T N 1 をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配列を有するポリヌクレオチドと配列番号 7 における 3 2 9 8 - 4 3 7 7 番目の R E T をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配列を有するポリヌクレオチドが融合した点である。配列番号 9 における融合点は、配列番号 9 における 1 - 3 6 2 4 番目の D C T N 1 をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配列を有するポリヌクレオチドと配列番号 9 における 3 6 2 5 - 4 8 3 0 番目の R E T をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配列を有するポリヌクレオチドが融合した点である。配列番号 1 1 における融合点は、配列番号 1 1 における 1 - 3 6 2 4 番目の D C T N 1 をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配

列を有するポリヌクレオチドと配列番号 11 における 3625-4704 番目の R E T をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配列を有するポリヌクレオチドが融合した点である。配列番号 13 における融合点は、配列番号 13 における 1-3282 番目の D C T N 1 をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配列を有するポリヌクレオチドと配列番号 13 における 3283-4488 番目の R E T をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配列を有するポリヌクレオチドが融合した点である。配列番号 15 における融合点は、配列番号 15 における 1-3282 番目の D C T N 1 をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配列を有するポリヌクレオチドと配列番号 15 における 3283-4362 番目の R E T をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配列を有するポリヌクレオチドが融合した点である。配列番号 17 における融合点は、配列番号 17 における 1-3573 番目の D C T N 1 をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配列を有するポリヌクレオチドと配列番号 17 における 3574-4779 番目の R E T をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配列を有するポリヌクレオチドが融合した点である。配列番号 19 における融合点は、配列番号 19 における 1-3573 番目の D C T N 1 をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配列を有するポリヌクレオチドと配列番号 19 における 3574-4653 番目の R E T をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配列を有するポリヌクレオチドが融合した点である。配列番号 21 における融合点は、配列番号 21 における 1-3678 番目の D C T N 1 をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配列を有するポリヌクレオチドと配列番号 21 における 3679-4884 番目の R E T をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配列を有するポリヌクレオチドが融合した点である。配列番号 23 における融合点は、配列番号 23 における 1-3678 番目の D C T N 1 をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配列を有するポリヌクレオチドと配列番号 23 における 3679-4758 番目の R E T をコードするポリヌクレオチド由来の塩基配列を有するポリヌクレオチドが融合した点である。

- [0128] 本発明において、プライマー又はプローブは、本発明のポリヌクレオチドの配列情報に基づき、本発明のポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドとして、通常公知の手法により作製される。当該プライマー又はプローブの塩基数は、10～50塩基、好ましくは15～50塩基、より好ましくは18～35塩基である。
- [0129] 当該プライマー又はプローブは、本発明のポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするものであれば、完全に相補的である必要は無い。かかるプライマー又はプローブは、対応する塩基配列と比較して、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上の同一性を有するポリヌクレオチドである。
- [0130] 本発明のプライマー又はプローブとしては、好ましくは(i)配列番号69、(ii)配列番号70、又は(iii)配列番号71で表されるポリヌクレオチドであり、より好ましくは(iv)配列番号69と配列番号70で表されるセンスプライマーとアンチセンスプライマーのセットであるポリヌクレオチドであり、より好ましくは(v)配列番号69、配列番号70及び配列番号71で表されるセンスプライマー、アンチセンスプライマー及びプローブのセットであるポリヌクレオチドである。
- [0131] 本発明には、試料中の、本発明のポリヌクレオチドの存在を検出する方法が含まれる。
- [0132] 本発明において、試料中の、本発明のポリヌクレオチドの存在を検出する方法は、ノーザンブロットィング法、サザンブロットィング法、RT-PCR法、リアルタイムPCR法、デジタルPCR法、DNAマイクロアレイ法、*in situ*ハイブリダイゼーション法、シーケンス解析法など、通常慣用の検出法により検出する方法である。
- [0133] 本発明において、試料中の、本発明のポリヌクレオチドの存在を検出する方法には、本発明のポリヌクレオチドを含むRET融合遺伝子のポリヌクレオチドの存在を検出するための方法も含まれる。当該方法としては、RETタンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプライマー

(例えば、RETキナーゼドメイン以降の3'側の配列にハイブリダイズするプライマー)を用いて、5'RACE法により増幅させたPCR産物をシーケンス解析する方法等が挙げられる。

[0134] 本発明において、試料中の、本発明のポリヌクレオチドの存在を検出する方法として、好ましくは本発明のプライマー又はプローブを用いて本発明のポリヌクレオチドを検出する工程を含むことを特徴とする、本発明のポリヌクレオチドの存在を検出する方法である。

[0135] 本発明には、RETを阻害する化合物を有効成分とする、DCTN1遺伝子とRET遺伝子との融合遺伝子陽性又はDCTN1タンパク質とRETタンパク質との融合タンパク質陽性の癌治療用医薬組成物が包含される。

[0136] より好ましくは、本発明のポリペプチドの発現及び／又は活性、又は本発明のポリヌクレオチドの発現を抑制する化合物を有効成分とする、DCTN1遺伝子とRET遺伝子との融合遺伝子陽性又はDCTN1タンパク質とRETタンパク質との融合タンパク質陽性の癌治療用医薬組成物が包含される。

[0137] 本発明において、「DCTN1遺伝子とRET遺伝子との融合遺伝子陽性及び／又はDCTN1タンパク質とRETタンパク質との融合タンパク質陽性の癌」における「DCTN1遺伝子とRET遺伝子との融合遺伝子陽性の癌」とは、本発明のポリヌクレオチドが発現している癌であり、好ましくは本発明のポリヌクレオチドの存在を検出する方法を用いて、本発明のポリヌクレオチドが検出された癌である。

[0138] また、本発明において、「DCTN1遺伝子とRET遺伝子との融合遺伝子陽性又はDCTN1タンパク質とRETタンパク質との融合タンパク質陽性の癌」における「DCTN1タンパク質とRETタンパク質との融合タンパク質陽性の癌」とは、本発明のポリペプチドが発現している癌であり、好ましくは本発明のポリペプチドの存在を検出する方法を用いて、本発明のポリペプチドが検出された癌である。

[0139] 本発明の癌治療用医薬組成物における有効成分としては、RETを阻害す

る化合物であり、より好ましくは本発明のポリペプチドの発現及び／又は活性、又は本発明のポリヌクレオチドの発現を抑制する化合物である。また、本発明のスクリーニング方法により選択した化合物を有効成分として用いることができる。例えば、公知のRETを阻害する化合物を本発明の医薬組成物における有効成分として用いることができる。RETを阻害する化合物としては、RETの発現及び／又は活性を阻害できる化合物であれば、他のチロシンキナーゼの発現及び／又は活性を阻害する化合物であってもよく、より好ましくはRETの活性を阻害できる化合物であり、他のチロシンキナーゼの発現及び／又は活性を阻害する化合物であってもよい。このような化合物として、例えば、バンデタニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、モテサニブ、カボザンチニブ、レンバチニブ、国際公開第2016/127074号パンフレット、国際公開第2017/043550号パンフレット、国際公開第2017/011776号パンフレット、国際公開第2017/146116号パンフレットに記載の化合物が挙げられる。

DCTN1遺伝子とRET遺伝子との融合遺伝子陽性及び／又はDCTN1タンパク質とRETタンパク質との融合タンパク質陽性の癌治療用医薬組成物の有効成分としては、RETを阻害する化合物であり、より好ましくはバンデタニブ、カボザンチニブ、レンバチニブ、国際公開第2017/043550号パンフレットに記載の一般式(1)で示される縮合ピリミジン化合物又は国際公開第2017/146116号パンフレットに記載の一般式(1)で示される縮合ピリミジン化合物であり、より好ましくは、バンデタニブ、カボザンチニブ、レンバチニブ、国際公開第2017/043550号パンフレットに記載の実施例化合物1から90又は国際公開第2017/146116号パンフレットに記載の実施例化合物1から207であり、さらに好ましくはバンデタニブ、カボザンチニブ、レンバチニブ、4-アミノ-1-(tert-ブチル)-N-(5-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-3-カルボキサミド、4-アミノ-7-(tert-ブチル)-N-(5-メチル-1H-ピラゾ-

ル-3-イル)-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-カルボキサミド、4-アミノ-7-(1-フルオロ-2-メチルプロパン-2-イル)-N-(5-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-カルボキサミド、4-アミノ-N-(5-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-7-(1-メチルシクロプロピル)-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-カルボキサミド、4-アミノ-7-(2-シクロプロピルプロパン-2-イル)-N-(5-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-カルボキサミド、4-アミノ-N-[4-(メトキシメチル)フェニル]-7-(1-メチルシクロプロピル)-6-(3-モルホリノプロ-1-ピン-1-イル)-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-カルボキサミド、4-アミノ-N-[4-(メトキシメチル)フェニル]-7-(1-メチルシクロプロピル)-6-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)エチニル)-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-カルボキサミド、(R)-4-アミノ-N-[4-(メトキシメチル)フェニル]-7-(1-メチルシクロプロピル)-6-(テトラヒドロフラン-2-イル)メトキシ)-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-カルボキサミド又は4-アミノ-N-[4-(メトキシメチル)フェニル]-6-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)エチニル)-7-(1-メチルシクロプロピル)-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-カルボキサミドであり、特に好ましくは4-アミノ-1-(tert-ブチル)-N-(5-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-1H-ピラゾロ[3, 4-d]ピリミジン-3-カルボキサミド、4-アミノ-7-(tert-ブチル)-N-(5-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-カルボキサミド、4-アミノ-7-(1-フルオロ-2-メチルプロパン-2-イル)-N-(5-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-カルボキサミド、4-アミノ-N-(5-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-7

- (1-メチルシクロプロピル) - 7 H-ピロロ [2, 3-d] ピリミジン  
 - 5-カルボキサミド、4-アミノ-7- (2-シクロプロピルプロパン-  
 2-イル) - N- (5-メチル-1 H-ピラゾール-3-イル) - 7 H-ピ  
 ロロ [2, 3-d] ピリミジン-5-カルボキサミド、4-アミノ-N- [4-  
 (メトキシメチル) フェニル] - 7- (1-メチルシクロプロピル) -  
 6- (3-モルホリノプロ-1-ピン-1-イル) - 7 H-ピロロ [2, 3-  
 d] ピリミジン-5-カルボキサミド、4-アミノ-N- [4- (メトキ  
 シメチル) フェニル] - 7- (1-メチルシクロプロピル) - 6- ( (テ  
 ラヒドロ-2 H-ピラン-4-イル) エチニル) - 7 H-ピロロ [2, 3-  
 d] ピリミジン-5-カルボキサミド、(R) - 4-アミノ-N- [4- (メ  
 トキシメチル) フェニル] - 7- (1-メチルシクロプロピル) - 6- ( (テ  
 ラヒドロフラン-2-イル) メトキシ) - 7 H-ピロロ [2, 3-d]  
 ] ピリミジン-5-カルボキサミド又は4-アミノ-N- [4- (メトキシ  
 メチル) フェニル] - 6- ( (1-メチル-1 H-ピラゾール-4-イル)  
 エチニル) - 7- (1-メチルシクロプロピル) - 7 H-ピロロ [2, 3-  
 d] ピリミジン-5-カルボキサミドである。

[0140] 本発明において、「RETの発現及び／又は活性を阻害できる化合物」の  
 中で、「RETの発現を阻害できる」とは、例えば、RETのポリペプチド  
 及び／又はポリヌクレオチドを発現している細胞に試験化合物を接触させた  
 後、当該細胞におけるRETのポリペプチド又はポリヌクレオチドの発現量  
 を検出した際に、試験化合物を接触させていない細胞と比較して、試験化合  
 物を接触させた細胞において、RETのポリペプチド又はポリヌクレオチド  
 の発現量が低下した際に、RETの発現が抑制されたと判断することができる。  
 このような化合物としては、前記のような化合物、siRNA、miR  
 NA、核酸 (DNA、RNA) アプタマーなどが挙げられる。siRNAと  
 しては、例えば、CAC AUGUCAUCAAUUGUATT (配列番号  
 74)、GGAUUGAAAACAAACUCUATT (配列番号75)、  
 GCUUGUCCCGAGAUGUUUATT (配列番号76) が挙げられ

、好ましくは、C A C A U G U C A U C A A A U U G U A T T（配列番号74）又はG G A U U G A A A A C A A A C U C U A T T（配列番号75）である。

[0141] また、「R E Tの発現及び／又は活性を阻害できる化合物」の中で、「R E Tの活性を阻害できる」とは、例えば、チロシンのリン酸化を指標に判断することができる。チロシンのリン酸化を測定する方法としては、例えば、国際公開第2017/043550号パンフレットの試験例1に記載の方法が挙げられる。

[0142] また、R E Tのポリペプチド及び／又はポリヌクレオチドを発現している細胞を用いて、細胞増殖抑制効果を指標として、「R E Tの活性を阻害できる」と判断することができる。細胞増殖抑制効果は、例えば、国際公開第2017/043550号パンフレットの試験例3及び試験例4に記載の方法が挙げられる。

[0143] 本発明の医薬組成物の対象となる癌は、本発明のポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドを発現している限り特に制限されないが、例えば、頭頸部癌、甲状腺癌、消化器癌（食道癌、胃癌、十二指腸癌、肝臓癌、胆道癌（胆嚢・胆管癌など）、膵臓癌、小腸癌、大腸癌（結腸直腸癌、結腸癌、直腸癌など）、消化管間質腫瘍など）、肺癌（非小細胞肺癌、小細胞肺癌）、乳癌、卵巣癌、子宮癌（子宮頸癌、子宮体癌など）、腎癌、膀胱癌、前立腺癌、皮膚癌等が挙げられ、好ましくは甲状腺癌、又は肺癌（非小細胞肺癌、小細胞肺癌）である。なお、ここで癌には、原発巣のみならず、他の臓器（肝臓など）に転移した癌をも含む。

[0144] 本発明のポリペプチドの発現及び／又は活性、又は本発明のポリヌクレオチドの発現を抑制する化合物を有効成分とする製剤は、薬学的担体を配合し、種々の投与形態に応じた医薬組成物として製造することができる。当該形態としては、例えば、経口剤、注射剤、坐剤、軟膏剤、貼付剤が挙げられる。これらの投与形態は、各々当業者に公知慣用の製剤方法により製造できる。

- [0145] 薬学的担体としては、製剤素材として慣用の各種有機或いは無機担体物質が用いられ、固形製剤における賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、コーティング剤等、液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、pH調節剤・緩衝剤、無痛化剤等として配合される。また、必要に応じて防腐剤、抗酸化剤、着色剤、矯味・矯臭剤、安定化剤等の製剤添加物を用いることもできる。
- [0146] 経口用固形製剤を調製する場合は、本発明化合物に賦形剤、必要に応じて賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味・矯臭剤等を加えた後、常法により錠剤、被覆錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等を製造することができる。
- [0147] 経口用液体製剤を調製する場合は、本発明化合物にpH調節剤・緩衝剤、安定化剤、矯味・矯臭剤等を加えて常法により内服液剤、シロップ剤、エリキシル剤等を製造することができる。
- [0148] 注射剤を調製する場合は、本発明化合物にpH調節剤・緩衝剤、安定化剤、等張化剤、局所麻酔剤等を添加し、常法により皮下、筋肉内及び静脈内用注射剤を製造することができる。
- [0149] 本発明には、本発明のポリペプチドを検出するための方法又は本発明のポリヌクレオチドを検出するための方法において、試料中の、本発明のポリペプチド又は本発明のポリヌクレオチドの存在を検出した場合に、癌であると判定する方法が包含される。本発明により判定し得る癌としては、本発明の医薬組成物の対象となる癌として列挙したもの等が挙げられる。上記のように、本発明のポリペプチド又はポリヌクレオチドを用いることにより、癌の判定をすることができる。従って、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドは、癌を検出するためのバイオマーカーとして用いることもできる。
- [0150] 本発明のポリペプチド又は本発明のポリヌクレオチドを、RETを阻害する化合物を用いた化学療法が有効であるか否かの指標とする方法であって、本発明の検出方法により、試料中から、本発明のポリペプチドを検出した場合、及び／又は本発明の検出方法により、試料中から、本発明のポリヌクレ

オチドの存在を検出した場合に、RETを阻害する化合物を用いた化学療法が有効であると判定する方法が包含される。

[0151] より好ましくは、本発明のポリペプチド又は本発明のポリヌクレオチドを、本発明のポリペプチドの発現及び／又は活性、又は本発明のポリヌクレオチドの発現を抑制する化合物を用いた化学療法が有効であるか否かの指標とする方法であって、本発明の検出方法により、試料中から、本発明のポリペプチドを検出した場合、及び／又は本発明の検出方法により、試料中から、本発明のポリヌクレオチドの存在を検出した場合に、本発明のポリペプチドの発現及び／又は活性、又は本発明のポリヌクレオチドの発現を抑制する化合物を用いた化学療法が有効であると判定する方法が包含される。

[0152] より好ましくは、本発明のポリペプチド又は本発明のポリヌクレオチドを、本発明のスクリーニング方法で得られた化合物を用いた化学療法が有効であるか否かの指標とする方法であって、本発明の検出方法により、試料中から、本発明のポリペプチドを検出した場合、及び／又は本発明の検出方法により、試料中から、本発明のポリヌクレオチドの存在を検出した場合に、本発明のスクリーニング方法で得られた化合物を用いた化学療法が有効であると判定する方法が包含される。

[0153] 以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

## 実施例

[0154] 実施例1 DCTN1遺伝子とRET遺伝子との融合遺伝子(DCTN1-RET融合遺伝子)の取得

### <1-1 臨床検体由来RNAの抽出>

Asterand Bioscienceより購入したヒト甲状腺がん組織から、RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて以下の方法によりRNAを抽出した。甲状腺がん組織にBuffer RLTを600μL加え、QIAshredderスピンカラムにアプライした後遠心し(16,000 rpm、2分、室温)、濾液を回収した。回収した濾

液に同量の70%エタノール水溶液を加え混和した後に、RNeasy Miniカラムにアプライし遠心した(10,000 rpm、15秒、室温)。RNeasy Miniカラムに700 $\mu$ LのBuffer RW1を添加し遠心した(10,000 rpm、15秒、室温)。さらに500 $\mu$ Lのbuffer RPEを加え遠心した(10,000 rpm、15秒、室温)。同様に再度500 $\mu$ Lのbuffer RPEを加え遠心した(10,000 rpm、2分、室温)。再度RNeasy Miniカラムを遠心(16,000 rpm、1分、室温)し、持ち越したbufferを取り除いた。RNeasy MiniカラムにRNase free waterを40 $\mu$ Lアプライした後、遠心(10,000 rpm、1分、室温)し、濾液をtotal RNAとして回収した。

[0155] <1-2 臨床検体由来cDNAの作製>

上記1-1で得られたtotal RNAから、SuperScript VIL0 cDNA Synthesis Kit (invitorgen)を用いて、以下の方法によりcDNAを合成した。500ngのtotal RNAを容量が14 $\mu$ LになるようにRNase free waterで調製し、4 $\mu$ Lの5 $\times$  VIL0 Reaction Mix及び2 $\mu$ Lの10 $\times$  SuperScript Enzyme Mixを加え混和した。25℃で10分間保温しその後42℃で60分保温した。反応を停止させるために最後に85℃で5分間インキュベートし、cDNAを得た。

[0156] <1-3 クローニングベクターの作製及び精製>

DCTN1-RET融合遺伝子を増幅させるため、表1に示すように、センスプライマーとしてPrimer1(配列番号33)とアンチセンスプライマーとしてPrimer2(配列番号34)、さらにnested PCRに用いるセンスプライマーとしてPrimer3(配列番号35)とアンチセンスプライマーとしてPrimer4(配列番号36)を設計した。

[0157]

[表1]

|          |                                        |        |
|----------|----------------------------------------|--------|
| Primer 1 | 5'-TGTCCAGCTTTGTGCCTGATTGATGT-3'       | 配列番号33 |
| Primer 2 | 5'-GCTGGGCACTGAAGAGAAAGGAATGC-3'       | 配列番号34 |
| Primer 3 | 5'-AGCAGGATGAGTGGGAGGCAAGC-3'          | 配列番号35 |
| Primer 4 | 5'-TTAACTATCAAACGTGTCCATTAATTTGCCGC-3' | 配列番号36 |

- [0158] これらのプライマーを用いて上記1-2で合成したcDNAをテンプレートとして、KOD-Plus-Neo (TOYOBO) を使用し以下の方法でDCTN1-RET融合遺伝子を増幅させた。2  $\mu$ LのcDNA、5  $\mu$ Lの10 $\times$  PCR Buffer for KOD-Plus-Neo、5  $\mu$ Lの2mM dNTPs、3  $\mu$ Lの25mM MgSO<sub>4</sub>、1  $\mu$ LのKOD-Plus-Neo、1.5  $\mu$ LのPrimer 1 (10  $\mu$ M)、1.5  $\mu$ LのPrimer 2 (10  $\mu$ M)、及び31  $\mu$ Lのdouble distilled water (DDW) を混和し、PCRを行った。次いで得られたPCR産物を100倍に希釈し、2  $\mu$ Lの希釈したPCR産物、5  $\mu$ Lの10 $\times$  PCR Buffer for KOD-Plus-Neo、5  $\mu$ Lの2mM dNTPs、3  $\mu$ Lの25mM MgSO<sub>4</sub>、1  $\mu$ LのKOD-Plus-Neo、1.5  $\mu$ LのPrimer 3 (10  $\mu$ M)、1.5  $\mu$ LのPrimer 4 (10  $\mu$ M) 及び31  $\mu$ LのDDW を混和し、nested PCRを行った。
- [0159] Nested PCR産物を1%アガロースゲル (ナカライ) を用いた電気泳動により分離し、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて、ゲルからPCR産物を精製した。
- [0160] 制限酵素SmaI (NEB) で切断したpUC18 DNA (タカラバイオ) と精製したPCR産物とT4 DNA ligase (NEB) とT4 DNA Ligase Reaction Buffer (NEB) を混和し、一晚16℃でインキュベートした。Ligation産物をSmaI (NEB) で処理し、以下の方法でコンピテント細胞へのtransformationを行った。50  $\mu$ LのE. coli DH5 $\alpha$  Competent Cells (タカラバイオ) にSmaI処理をしたLigation

n産物を加え30分氷上で静置した。その後42℃で30秒間ヒートショックを加え、2分間氷上で静置した。SOC培地（タカラバイオ）を加え、37℃で1時間振盪培養した後、アンピシリン含有LB寒天培地プレート（UNITECH）に培養液を塗布し、37℃で一晩静置した。大腸菌コロニーをアンピシリン含有LB培地（InvivoGen）に懸濁し37℃で一晩振盪培養した。増殖した大腸菌からQIAquick Spin Miniprep Kit（Qiagen）を用いて、添付のプロコールに準じてDCTN1-RET融合遺伝子が組み込まれたプラスミドDNAを精製した。

[0161] <1-4 配列の決定>

上記1-3で得られたプラスミドDNAをテンプレートにして、表2に示したシーケンス用プライマーPrimer5からPrimer36を用い、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitを用いシーケンス反応を行い、Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzerを用いてシーケンス解析を実施した。シーケンス解析の結果、DCTN1-RET融合遺伝子は、DCTN1 variant 5（GenBankアクセッション番号：NM\_001190836）のexon1～exon27の3'側の下流にRET variant 2（GenBankアクセッション番号：NM\_020975）のexon12～exon20が融合した遺伝子（配列番号17）であった。

[0162]

[表2]

|           |                                 |        |
|-----------|---------------------------------|--------|
| Primer 5  | 5'-AGTACTGGGGTGGCTGGG-3'        | 配列番号37 |
| Primer 6  | 5'-CACTTTGGACAAGGAGATG-3'       | 配列番号38 |
| Primer 7  | 5'-ACAGAACTGGAGCTGCGG-3'        | 配列番号39 |
| Primer 8  | 5'-GGACTGGTGTACTCGCTG-3'        | 配列番号40 |
| Primer 9  | 5'-TCCTAGACTGCAGGAAACAC-3'      | 配列番号41 |
| Primer 10 | 5'-CATCGAGAAAGTCCAGAC-3'        | 配列番号42 |
| Primer 11 | 5'-GCTGCTGGAGACATTGAA-3'        | 配列番号43 |
| Primer 12 | 5'-TCACTGCTGCTCAGCTCA-3'        | 配列番号44 |
| Primer 13 | 5'-GAGGATCCAAAGTGGGAATT-3'      | 配列番号45 |
| Primer 14 | 5'-AGTATCTGGCCGAGATGAAG-3'      | 配列番号46 |
| Primer 15 | 5'-GCAAAGACCTGGAGAAGATG-3'      | 配列番号47 |
| Primer 16 | 5'-AGGACGTTGAACTCTGACAG-3'      | 配列番号48 |
| Primer 17 | 5'-CCTTTGCTTCATCCAGAATC-3'      | 配列番号49 |
| Primer 18 | 5'-GATTTTGTGTTTCTCCAGCTCT-3'    | 配列番号50 |
| Primer 19 | 5'-CCTGCTTCTCTGAGGAAGAA-3'      | 配列番号51 |
| Primer 20 | 5'-GGGCCTTAGTCTCAGCAAAC-3'      | 配列番号52 |
| Primer 21 | 5'-GAGCACTCTGCGTGAACCTTA-3'     | 配列番号53 |
| Primer 22 | 5'-CAGCTTGTTTCATGGTACTGAT-3'    | 配列番号54 |
| Primer 23 | 5'-TGGTGAGTCCTTACCAG-3'         | 配列番号55 |
| Primer 24 | 5'-CCTAGAGTTTTTCCAAGAACCA-3'    | 配列番号56 |
| Primer 25 | 5'-CATTTAACTGGAATCCGACC-3'      | 配列番号57 |
| Primer 26 | 5'-GACTCTCTCCAGGCCAGTTC-3'      | 配列番号58 |
| Primer 27 | 5'-GGCTATCAGAAGTAAAACCACC-3'    | 配列番号59 |
| Primer 28 | 5'-CGAGAGCTGATGGCACTA-3'        | 配列番号60 |
| Primer 29 | 5'-CTTCATCACAAAGTGAAGTACTTCC-3' | 配列番号61 |
| Primer 30 | 5'-CGTACTCCACGATGAGGAG-3'       | 配列番号62 |
| Primer 31 | 5'-GATTCTGGATGAAGCAAAGG-3'      | 配列番号63 |
| Primer 32 | 5'-GGAAGTACTTCACTTGTGATGAAG-3'  | 配列番号64 |
| Primer 33 | 5'-CCCAGCCACCCCAGTACT-3'        | 配列番号65 |
| Primer 34 | 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'         | 配列番号66 |
| Primer 35 | 5'-GTTTCCCAGTCACGAC-3'          | 配列番号67 |
| Primer 36 | 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'         | 配列番号68 |

## [0163] 実施例2 DCTN1-RET融合遺伝子の検出

Asterand Bioscienceより購入したヒト正常甲状腺組織由来RNAと前記1-1で得られたヒト甲状腺がん組織由来RNAからSuperScript VIL0 cDNA Synthesis Kit (invitorgen)を用いて、以下の方法によりcDNAを合成した。280ngのTotal RNAを容量が14 $\mu$ LになるようにRNAse free waterで調製し、5 $\times$  VIL0 Reaction Mixを4 $\mu$ L、10 $\times$  SuperScript Enzyme Mixを2 $\mu$ Lそれぞれ加え混和した。25 $^{\circ}$ Cで10分間保温しその後42 $^{\circ}$ Cで

60分保温した。反応を停止させるために最後に85℃で5分間インキュベートした。

[0164] DCTN1-RET融合遺伝子の検出のために、表3に示すように、DCTN-RET融合遺伝子検出用センスプライマーとしてPrimer37（配列番号69）とDCTN-RET融合遺伝子検出用アンチセンスプライマーとしてPrimer38（配列番号70）、DCTN1-RET融合遺伝子検出用プローブ（プローブはTaqMan MGBプローブ、蛍光色素はFAM（Thermo Fisher Scientific））としてPrimer39（配列番号71）を設計した。

[0165] [表3]

|           |                                 |        |
|-----------|---------------------------------|--------|
| Primer 37 | 5'-CTGGAGCCACAGTACCCACT-3'      | 配列番号69 |
| Primer 38 | 5'-TCCAAATTCGCCTTCTCCTA-3'      | 配列番号70 |
| Primer 39 | 5'-TTCATCAGCCTTCCTCAGGGAGGAT-3' | 配列番号71 |

[0166] 得られたcDNAを10倍希釈し、1μLをテンプレートとして使用し、11μLのddPCR Supermix for probe（Bio-Rad）、2μLのPrimer37（10μM）、2μLのPrimer38（10μM）、0.6μLのPrimer39（10μM）、1.1μLのGAPDHを検出する20× HEX assay（PrimePCR ddPCR Expression Probe Assay: GAPDH, Human, Bio-Rad）を混和させて、Automated Droplet Generator（Bio-Rad）でドロップレットを作製した。作製したドロップレットを用いてPCRを行い、Droplet Reader（Bio-Rad）にてDCTN1-RET及びGAPDH陽性のドロップレットをカウントした。結果を図1及び図2に示す。

[0167] また、上記で合成したcDNAをテンプレートとして、KOD-Plus-Neo（TOYOBO）を使用し以下の方法でDCTN1-RET融合遺伝子を増幅させた。2μLのcDNA、5μLの10× PCR Buffer for KOD-Plus-Neo、5μLの2mM dNTPs、3μLの25mM MgSO<sub>4</sub>、1μLのKOD-Plus-Neo

o、1.5  $\mu$ LのPrimer 1 (10  $\mu$ M)、1.5  $\mu$ LのPrimer 2 (10  $\mu$ M)、及び31  $\mu$ LのDDWを混和し、PCRを行った。次いで得られたPCR産物を100倍に希釈し、2  $\mu$ Lの希釈したPCR産物、5  $\mu$ Lの10 $\times$  PCR Buffer for KOD-Plus-Neo、5  $\mu$ Lの2mM dNTPs、3  $\mu$ Lの25mM MgSO<sub>4</sub>、1  $\mu$ LのKOD-Plus-Neo、1.5  $\mu$ LのPrimer 3 (10  $\mu$ M)、1.5  $\mu$ LのPrimer 4 (10  $\mu$ M) 及び31  $\mu$ LのDDWを混和し、nested PCRを行った。Nested PCR産物を1%アガロースゲル（ナカライ）を用いた電気泳動により分離し撮影を行った。結果を図3に示す。

[0168] 図1、図2及び図3に示したように、ヒト甲状腺がん組織由来のRNAから合成したcDNAにおいては、DCTN1-RET融合遺伝子が検出されたのに対し、ヒト正常甲状腺組織由来RNAから合成したcDNAにおいては、DCTN1-RET融合遺伝子が検出されなかった。以上の結果から、DCTN1-RET融合遺伝子はがんバイオマーカーとして有用であることが示された。

[0169] 実施例3 DCTN1-RET融合遺伝子の発現ベクターの構築

発現ベクター構築のため、表4に示すように、センスプライマーとしてPrimer 40（配列番号72）とアンチセンスプライマーとしてPrimer 41（配列番号73）を設計した。

[0170] [表4]

|           |                                                                          |        |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------|--------|
| Primer 40 | 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCGCCACCAGCAGGATGAGTGCGGAGGCAAGCGCCCGG-3' | 配列番号72 |
| Primer 41 | 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAACTATCAAA CGTGTCATTAAATTTTGC-3'       | 配列番号73 |

[0171] これらのプライマーを用いて上記1-2で合成したcDNAをテンプレートとして、Prime STAR Max DNA Polymerase（TaKaRa）を使用し以下の方法でDCTN1-RET融合遺伝子を増幅させた。1  $\mu$ LのcDNA、25  $\mu$ Lの2 $\times$  Prime STAR M

ax DNA Polymerase、 $1\mu\text{L}$ のPrimer 40 ( $10\mu\text{M}$ )、 $1\mu\text{L}$ のPrimer 41 ( $10\mu\text{M}$ )、及び $22\mu\text{L}$ のdouble distilled water (DDW)を混和し、PCRを行った。得られたPCR産物を1%アガロースゲル(ナカライ)を用いた電気泳動により分離し、GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)を用いて、ゲルからPCR産物を精製した。次いで得られた精製PCR産物をGateway BP Clonase II Enzyme mix (ThermoFisher)を使用し以下の方法でGateway pDONR221 Vectorに組み込み、エントリーベクターを作製した。具体的には、 $5.0\mu\text{L}$ の精製PCR産物、 $3.5\mu\text{L}$ のpDONR221 ( $85\text{ng}/\mu\text{L}$ )、 $4.0\mu\text{L}$ のBP Clonase II Enzyme Mix、 $7.5\mu\text{L}$ のTEを混和し、 $25^\circ\text{C}$ で90分間インキュベートした。インキュベート後にProteinase K ( $2\text{mg}/\text{mL}$ )を $1\mu\text{L}$ 添加し、 $37^\circ\text{C}$ にて10分間インキュベートすることによりエントリーベクターを得た。

[0172] 得られたエントリーベクターを $50\mu\text{L}$ のE. coli DH5 $\alpha$  Competent Cells (タカラバイオ)に加え30分氷上で静置した。その後 $37^\circ\text{C}$ で20秒間ヒートショックを加え、2分間氷上で静置した。SOC培地(タカラバイオ)を加え、 $37^\circ\text{C}$ で1時間振盪培養した後、カナマイシン含有LB寒天培地プレートに培養液を塗布し、 $37^\circ\text{C}$ で一晩静置した。大腸菌コロニーをカナマイシン含有LB培地に懸濁し、 $37^\circ\text{C}$ で一晩振盪培養した。増殖した大腸菌からDCTN1-RET融合遺伝子が組み込まれたプラスミドDNA(エントリーベクタークローン)をDNA自動分離装置 GENE PREP STAR PI-480 (クラボウ)にて精製した。

[0173] 得られたプラスミドとGateway LR Clonase II Enzyme mix (ThermoFisher)を用いて、以下の方法で、pJTI Fast DESTベクターにDCTN1-RET融合遺伝子

を組み込み、発現ベクターとした。150 ngのエントリーベクタークロン、1  $\mu$ LのpJTI Fast DESTベクター(150 ng/ $\mu$ L)、2  $\mu$ LのLR Clonase II Enzyme mix、およびTE bufferを混和して、全量を10  $\mu$ Lとし、25°Cで90分間インキュベートした。インキュベート後にProteinase K(2 mg/mL)を1  $\mu$ L添加し、37°Cにて10分間インキュベートすることにより、DCTN1-RET融合遺伝子が組み込まれたpJTI Fast DESTベクター(DCTN1-RET融合遺伝子発現ベクター)を得た。得られたDCTN1-RET融合遺伝子発現ベクターを50  $\mu$ LのE. coli DH5 $\alpha$  Competent Cells(タカラバイオ)に加え30分氷上で静置した。その後37°Cで20秒間ヒートショックを加え、2分間氷上で静置した。SOC培地(タカラバイオ)を加え、37°Cで1時間振盪培養した後、アンピシリン含有LB寒天培地プレートに培養液を塗布し、37°Cで一晩静置した。大腸菌コロニーをアンピシリン含有LB培地に懸濁し37°Cで一晩振盪培養した。増殖した大腸菌からDCTN1-RET融合遺伝子が組み込まれたプラスミドDNA(DCTN1-RET融合遺伝子発現ベクター)をplasmid plus Maxi kit(QIAGEN)を使用し、精製した。

[0174] 実施例4 DCTN1-RET融合遺伝子発現細胞の樹立

<4-1 細胞の樹立>

DCTN1-RET融合遺伝子発現細胞の樹立のための宿主細胞として、マウス胎児線維芽細胞NIH/3T3細胞(American Type Culture Collection)を選択し、上記にて作製したDCTN1-RET融合遺伝子が組み込まれた発現ベクターをトランスフェクションすることにより、DCTN1-RET融合遺伝子発現細胞を樹立した。詳細な方法は以下に示すとおりを実施した。NIH/3T3細胞は、通常の培養(2次元培養)のために、D-MEM(高グルコース)(L-グルタミン、フェノールレッド、ピルビン酸ナトリウム、1500 mg/L炭酸水素ナ

トリウム含有) (WAKO) に10%となるようにNewborn Calf Serum (NBCS) (GIBCO) を添加したものを2次元培養用の培地として使用し、37℃、5%CO<sub>2</sub>にて培養したものを使用した。トランスフェクションを行う前日に、NIH/3T3細胞を $1.5 \times 10^5$  cells/2 mLにて、6well plate (IWAKI) に播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>にて、一晩インキュベートした。1.5 μgのDCTN1-RET融合遺伝子発現ベクター、1.5 μgのpJTI phiC31 integrase vectorを混合した混合液に、その混合液の6倍量のViraFect Transfection Reagentを添加した後、全量が300 μLとなるようにOpti-MEMを添加し、室温にて5分間インキュベートすることによりトランスフェクション溶液を作製した。NIH/3T3細胞が播種されているwellから培地を300 μL除去し、上記で作製したトランスフェクション溶液を300 μL添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub>にて、一晩インキュベートした。翌日、トランスフェクション溶液を除去するために、培地を交換した。培地を交換する際に、新しい培地には、ハイグロマイシンB (ナカライテスク) を500 μg/mLとなるように添加した。ハイグロマイシンBにより、DCTN1-RET融合遺伝子導入発現ベクターが導入されていない細胞を除去した。

トランスフェクション後、1週間に2回程度の培地交換をしながら、細胞が増殖するまで、培養を行った。トランスフェクション22日後に、細胞をトリプシンにて回収し、以下の方法にてシングルセルクローニングを行った。回収した細胞の細胞数を測定し、1 cell/200 μLとなるように培地を添加した。96well Plate (ThermoFisher) に200 μL/1 wellとなるように細胞を播種した。播種後、日々観察を行い、シングルセルから増殖してきた細胞を取得し、DCTN1-RET融合遺伝子発現細胞 (DCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞) とした。

[0175] <4-2 目的タンパク質の発現確認>

得られたDCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞におけるDCTN1-RET融合タンパク質の発現を、ウエスタンブロット法にて確認した。すなわち、培養フラスコから培地を除去し、PBSにて1度洗浄した。培養フラスコ内にPhosphatase inhibitor (ロシュ) とProtease inhibitor (ロシュ) を含有したSample Diluent Concentrate 2 (R&D SYSTEMS) を添加し、スクレイパーにて細胞溶解液を回収した。回収した細胞溶解液から遠心分離により、タンパク質サンプルを得た。タンパク質サンプルは、タンパク質定量を行い、タンパク質濃度を一定にした。一定濃度のタンパク質サンプルに対して、Sample Buffer Solution with Reducing Reagent (6x) for SDS-PAGE (ナカライテスク) を加え、95℃にて5分間インキュベートすることにより、タンパク質を変性させ、ウエスタンブロッティング用のサンプルを得た。なお、ネガティブコントロール用のサンプルとして、親株であるNIH/3T3細胞を用いて、同様の方法にてウエスタンブロッティング用のサンプルを得た。上記サンプルを用いて、以下に示す方法にて、タンパク質の発現を確認した。4-15パーセント Acrylamide gel (BIO-RAD) および1× Tris/Glycine/SDS Bufferを用いて、SDS-PAGE電気泳動(200Vで30分)にて、タンパク質を分離した。Trans-Blot Turb RTA Midi PVDF Transfer Kit (BIO-RAD) とTrans blot Turbo 転写システム (BIO-RAD) を用いてPVDF膜にタンパク質を転写し、PVDF膜をBlocking One-Pに1時間浸漬した。Blocking One-Pが10%となるようにTBSTで希釈した溶液で一次抗体 (Phospho-Ret (Tyr905) Antibody (CST)、Ret (C31B4) Rabbit mAb (CST) 及びAnti-Dctn1 Antibody (ATLAS ANTIBODIES)) を1/1000濃度になるように希釈し、P

VDF膜を浸漬させ、4℃にて一晩インキュベートした。TBS-Tにて洗浄後、Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (CST) を1/2000濃度になるようにTBS-Tにて希釈した2次抗体希釈液にて、PVDF膜を浸漬させ、室温にて1時間インキュベートした。TBS-Tにて洗浄後、SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (ThermoFisher) 及びルミノ・イメージアナライザー Amersham Imager 600 (GEヘルスケア) を用いてタンパク質の検出を行った。なお、検出タンパク質の分子量は、プレジジョン Plus プロテイン カレイドスコープスタンダード (BIORAD) により確認した。

その結果、図4 a) 及びb) に示すように、抗pRET抗体と抗RET抗体を用いたところ内在性のRET (150及び175 kDa) は検出されなかった。一方、DCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞においてのみ、175 kDa付近にDCTN1-RET融合タンパク質と推測されるバンドが確認できた。

また、図4 c) に示すように抗DCTN1抗体を用いたところ、150 kDa付近に内在性のDCTN1が検出された。一方、DCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞においてのみ、内在性の150 kDaのDCTN1のバンドの上の175 kDa付近にバンドが検出された。すなわち、DCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞においてのみ、RETに対する抗体及びDCTN1に対する抗体の両方で175 kDa付近のバンドが検出されたことから、作成したDCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞では、DCTN1とRETが融合したタンパク質が発現していることが明らかとなった。

[0176] 実施例5 DCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞の3次元培養による増殖確認

NIH/3T3細胞は、2次元培養条件では良好な増殖を示すが、3次元培養条件では、ほとんど増殖しない。一方で、NIH/3T3細胞に癌遺伝

子を発現させることにより、3次元培養条件でも増殖することが知られている。その性質を利用し、DCTN1-RET融合遺伝子が癌遺伝子であるかの確認を行った。37℃、5%CO<sub>2</sub>にて、2次元培養で培養したDCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞及びNIH/3T3細胞をトリプシンにて回収し、細胞数を測定した。3次元培養を行うために、FCem series Preparation kit (日産化学工業株式会社)とD-MEM (高グルコース) (L-グルタミン、フェノールレッド、ピルビン酸ナトリウム、1500mg/L炭酸水素ナトリウム含有) (WAKO)とNewborn Calf Serum (NBCS) (GIBCO)を用いて、3次元培養用の培地を作製した。作製した3次元培養用の培地に、細胞を1000cells/90μLとなるように懸濁し、96 Well Clear Black Round Bottom、Spheroid Microplate (Corning)に90μL/1wellとなるように播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>にてインキュベートした。播種翌日 (Day 1) 及び播種8日後 (Day 8) に細胞内ATP発光検出試薬であるCelltiter-Glo 2.0 Reagent (Promega) 及びルミノメーター (EnSpire, PerkinElmer) を用いて発光量 (counts per second: cps) を測定し、生細胞数の指標とした。Day 1での測定結果とDay 8での測定結果から各細胞の増殖率を算出した (N=3)。

その結果、図5に示すように、NIH/3T3細胞では、Day 8の細胞数はDay 1の細胞数と比較して2.4倍であったのに対して、DCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞では、20.9倍であった。また、NIH/3T3細胞は、3次元培養において細胞の凝集塊は形成されないが、DCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞では、3次元培養により細胞の凝集塊が形成されていることが確認された。

すなわち、DCTN1-RET融合遺伝子を導入することにより、細胞の増殖が亢進したことが明らかとなり、DCTN1-RET融合遺伝子が癌遺伝

子であることが示唆された。

[0177] 実施例6 DCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞のin vivoにおける造腫瘍性確認

DCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞のin vivoにおける造腫瘍性を確認するために、ヌードマウスを用いた移植実験を行った。なお、親株であるNIH/3T3細胞は、ヌードマウスの皮下では増殖しないことが、一般的に知られており、DCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞をヌードマウスの皮下に移植することにより、DCTN1-RET融合遺伝子が造腫瘍性に寄与するか、すなわち癌遺伝子であるかの確認ができる。被移植動物としては、ヌードマウス(BALB/cAJcl-nu/nu、日本クレア)を用いた。DCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞をトリプシンにて回収し、最終的に $1 \times 10^8$  cells/mLとなるようにPBSに懸濁し、同量のマトリゲル基底膜マトリックス(Corning)を加え、 $5 \times 10^7$  cells/mLにしたものを移植用細胞液とした。25G注射針と1mLシリンジを用いて、移植用細胞液をヌードマウス(N=10)の右側胸部の皮下に0.1mLずつ移植した。電子ノギス(ミットヨ)を用い、移植後、10、13、17日目に、1匹ずつ腫瘍の長径及び短径を測定し、以下の式を用いて腫瘍体積を算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = (\text{長径, mm}) \times (\text{短径, mm}) \times (\text{短径, mm}) / 2$$

腫瘍体積の測定結果を図6に示す。その結果、ヌードマウスの皮下に移植されたDCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞は、腫瘍を形成し、良好に増殖することが確認され、in vivo実験においてもDCTN1-RET融合遺伝子が癌遺伝子であることが示唆された。

[0178] 実施例7 DCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞を用いたsiRNAによるDCTN1-RET融合タンパク質の抑制と細胞増殖抑制効果の確認

DCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞に対するsiRNA処理による影響を確認した。用いたsiRNAは、下記の表5に示した3

種類のRET siRNAとネガティブコントロールとしてSilencer Select Negative Control #1 siRNA (Ambion)を使用した。なお、3種類のRET siRNAは、いずれもヒトRETを標的とするsiRNAであるが、RET siRNA1及びRET siRNA2はDCTN1-RET融合遺伝子内のRET部分に結合する配列を含み、RET siRNA3はDCTN1-RET融合遺伝子内に結合する配列を含まない。すなわち、RET siRNA1及びRET siRNA2はDCTN1-RET融合遺伝子の発現を抑制するが、RET siRNA3はDCTN1-RET融合遺伝子の発現を抑制しないことが想定された。以下にsiRNAを用いた実験の方法について記載した。

[0179] [表5]

|            |                       |        |
|------------|-----------------------|--------|
| RET siRNA1 | CACAUGUCAUCAAUUGUATT  | 配列番号74 |
| RET siRNA2 | GGAUUGAAAACAAACUCUATT | 配列番号75 |
| RET siRNA3 | CCACUGCUACCACAAGUUUTT | 配列番号77 |

[0180] DCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞は、2次元培養用の培地を使用し、37℃、5%CO<sub>2</sub>にて培養したものを使用した。siRNA処理を行う前日に、各細胞を3×10<sup>5</sup> cells/2 mLにて、6 well plate (IWAKI) に播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>にて、一晩インキュベートした。事前に水を用いて20 μMに調製した各siRNAを12 μL、4 μLのLipofectamin RNAiMAX Transfection Reagent (ThermoFisher) 及び384 μLのOpti-MEMを混合し、室温にて15分インキュベートすることによりsiRNA溶液を作製した。各細胞が播種されているwellにsiRNA溶液を400 μL添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub>にて、一晩インキュベートした。

翌日、一部は、タンパク質発現解析用にサンプリングを行い、一部については、細胞増殖確認用に再播種を行った。タンパク質発現解析用のサンプリング及びタンパク質発現解析は、一次抗体として、Phospho-Ret (Tyr905) Antibody (CST)、Ret (C31B4)

Rabbit mAb (CST) 及び GAPDH (D16H11) X P Rabbit mAb (CST) を用いた以外は、上記<4-2 目的タンパク質の発現確認>と同様の方法で実施した。その結果、図7に示すように、siRNA処理していない細胞（無処理）に比べ、ネガティブコントロール siRNA (NC) を処理した細胞において、DCTN1-RET 融合タンパク質の発現は抑制されていないことが確認できた。一方、RET siRNA 1 及び RET siRNA 2 を処理した場合、DCTN1-RET 融合遺伝子発現 NIH/3T3 細胞の DCTN1-RET 融合タンパク質の発現が抑制されることが確認され、RET siRNA 3 では抑制されないことが明らかとなった。

次に細胞増殖抑制効果の確認のために、無処理又は siRNA 処理された well からトリプシンにより細胞を回収し、細胞数を測定した。上記実施例 5 と同様の方法で 3 次元培養を行い、播種当日 (Day 0) 及び播種 4 日後 (Day 4) に実施例 5 と同様の方法で生細胞数を測定した。Day 0 での測定結果と Day 4 での測定結果から各細胞における増殖率を算出した。

その結果、図8に示すように、siRNA を処理していない細胞（無処理）及びネガティブコントロール siRNA (NC) を処理した細胞では、Day 4 の細胞数は、Day 0 の細胞数と比較して、4.9 倍及び 3.6 倍であったのに対して、RET siRNA 1 及び RET siRNA 2 で処理した細胞では、2.0 倍及び 2.4 倍程度の増殖であり、顕著に増殖率が低下した。一方、RET siRNA 3 はで処理した細胞では、3.7 倍の増殖であり、ネガティブコントロール siRNA と同程度の増殖率であり、増殖率の低下は見られなかった。これらの結果から、DCTN1-RET 融合遺伝子発現 NIH/3T3 細胞の増殖は、siRNA によって RET の発現を阻害した場合にも抑制されることが明らかとなった。

[0181] 実施例 8 DCTN1-RET 融合遺伝子発現 NIH/3T3 細胞を用いた細胞増殖抑制効果

DCTN1-RET 融合遺伝子発現 NIH/3T3 細胞に対する in v

i t r o細胞増殖試験を行った。上記実施例5と同様の方法で、3次元培養及び播種を行った。播種後37℃、5%CO<sub>2</sub>にて一晩インキュベートした(Day 0)。RETを阻害すると報告されているカボザチニブ、バンデタニブ、アレクチニブ、レンバチニブ、縮合ピリミジン化合物(Compound 1から9;表6に示す)をジメチルスルホキシドにて10 mmol/Lの濃度に溶解し、さらに3次元培養用の培地を用いて、これらの化合物の最終濃度がそれぞれ1000、333、111、37.0、12.3、4.12、1.37、0.457 nmol/Lになるように希釈を行った。これを先に述べた細胞が播種されたプレートの各Wellに0.01 mLずつ加え(Day 1)、37℃、5%CO<sub>2</sub>にて7日間インキュベートした。培養後(Day 8)、全てのWellに細胞内ATP発光検出試薬であるCell titer-Glo 2.0 Reagent (Promega)を添加し、ルミノメーター(EnSpire、PerkinElmer)を用いて発光量(counts per second: cps)を測定した。T<sub>day8</sub>とC<sub>day1</sub>の値の大きさに応じて、以下の式より化合物の各濃度におけるDay 1からの増殖率を算出し、細胞増殖を50%抑制する被験化合物の濃度(GI<sub>50</sub> (nM))を求めた。

1)  $T_{day8} \geq C_{day1}$  の場合

$$\text{増殖率}(\%) = (T_{day8} - C_{day1}) / (C_{day8} - C_{day1}) \times 100$$

T: 被験化合物を添加したWellのcps

C: 被験化合物を添加しなかったWellのcps

Day 1: 被験化合物を添加した日

Day 8: 評価日

2)  $T_{day8} < C_{day1}$  の場合

$$\text{増殖率}(\%) = (T_{day8} - C_{day1}) / (C_{day1}) \times 100$$

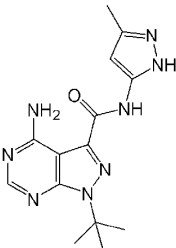
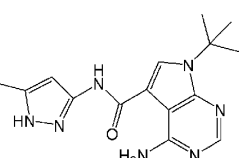
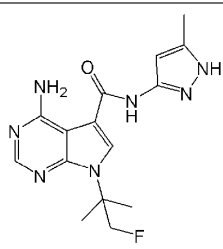
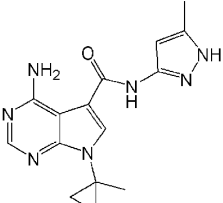
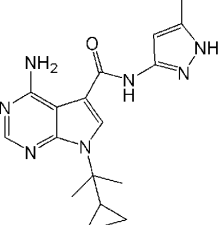
T: 被験化合物を添加したWellのcps

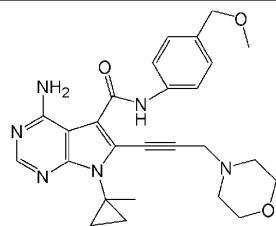
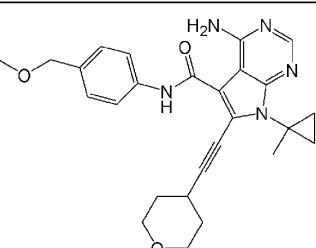
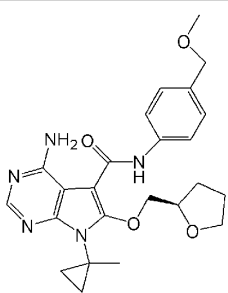
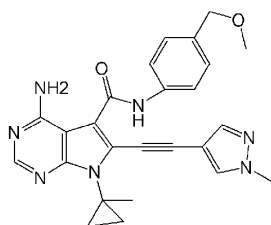
C: 被験化合物を添加しなかったWellのcps

Day 1: 被験化合物を添加した日

Day 8 : 評価日

[0182] [表6]

| 化合物番号      | 構造式                                                                                 | 化学名                                                                                  | 国際公開番号及び実施例番号                      |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Compound 1 |    | 4-アミノ-1-(4-tert-ブチル)-N-(5-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-3-カルボキサミド           | 国際公開第<br>2017/043550号<br>実施例化合物 34 |
| Compound 2 |    | 4-アミノ-7-(4-tert-ブチル)-N-(5-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-カルボキサミド            | 国際公開第<br>2017/043550号<br>実施例化合物 48 |
| Compound 3 |   | 4-アミノ-7-(1-フルオロ-2-メチルプロパン-2-イル)-N-(5-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-カルボキサミド | 国際公開第<br>2017/043550号<br>実施例化合物 50 |
| Compound 4 |  | 4-アミノ-N-(5-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-7-(1-メチルシクロプロピル)-7H-pyrido[2,3-d]ピリミジン-5-カルボキサミド       | 国際公開第<br>2017/043550号<br>実施例化合物 51 |
| Compound 5 |  | 4-アミノ-7-(2-シクロプロピルプロパン-2-イル)-N-(5-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-カルボキサミド    | 国際公開第<br>2017/043550号<br>実施例化合物 52 |

|            |                                                                                     |                                                                                                        |                                    |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Compound 6 |    | 4-アミノ-N-[4-(メトキシメチル)フェニル]-7-(1-メチルシクロプロピル)-6-(3-モルホリノプロ-1-ピロ-1-イル)-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-カルボキサミド        | 国際公開第<br>2017/146116号<br>実施例化合物 85 |
| Compound 7 |    | 4-アミノ-N-[4-(メトキシメチル)フェニル]-7-(1-メチルシクロプロピル)-6-(4-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)エチニル)-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-カルボキサミド | 国際公開第<br>2017/146116号<br>実施例化合物 87 |
| Compound 8 |   | (R)-4-アミノ-N-[4-(メトキシメチル)フェニル]-7-(1-メチルシクロプロピル)-6-(4-(テトラヒドロフラン-2-イル)メトキシ)-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-カルボキサミド | 国際公開第<br>2017/146116号<br>実施例化合物 89 |
| Compound 9 |  | 4-アミノ-N-[4-(メトキシメチル)フェニル]-6-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)エチニル)-7-(1-メチルシクロプロピル)-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-カルボキサミド   | 国際公開第<br>2017/146116号<br>実施例化合物 90 |

[0183] その結果、表7に示すように、カボザンチニブ、バンデタニブ、レンバチニブ及び縮合ピリミジン化合物（Compound 1から9）において、DCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞の増殖が抑制された。

[0184]

[表7]

| 化合物        | GI <sub>50</sub> (nmol/L) |
|------------|---------------------------|
| Compound 1 | 8.50                      |
| Compound 2 | 5.80                      |
| Compound 3 | 5.40                      |
| Compound 4 | 5.70                      |
| Compound 5 | 4.20                      |
| Compound 6 | 3.60                      |
| Compound 7 | 11.40                     |
| Compound 8 | 17.90                     |
| Compound 9 | 4.80                      |
| カボザンチニブ    | 91.10                     |
| バンデタニブ     | 68.70                     |
| レンバチニブ     | 50.30                     |
| アレクチニブ     | >1000                     |

[0185] 以上の結果から、上記のRET阻害剤は、DCTN1-RET融合遺伝子が検出されたがんに対する治療薬として有用である可能性が示唆された。また、DCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞を用いることで、DCTN1-RETを抑制する化合物のスクリーニングが可能であることが示唆された。

[0186] 実施例9 DCTN1-RET融合遺伝子発現細胞を用いたRETのリン酸化阻害

DCTN1-RET融合遺伝子発現細胞におけるRETのリン酸化が、RETを阻害すると報告されている既存の薬剤で阻害されるかについて以下の方法にて検討した。

DCTN1-RET融合遺伝子発現NIH/3T3細胞は、2次元培養用の培地を使用し、37℃、5%CO<sub>2</sub>にて培養したものを使用した。薬剤処理を行う前日に、各細胞を3×10<sup>5</sup>cells/2mLにて、6well plate (IWAKI) に播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>にて、一晩インキュベートした。カボザンチニブ、バンデタニブ、アレクチニブ、レンバチニブをジメチルスルホキシドにて10mmol/Lの濃度に溶解し、さらにPBSを用いて、これらの化合物の最終濃度がそれぞれ1000、100、10n

m o l / L になるように希釈を行った。これを先に述べた細胞が播種されたプレートの各W e l l に 2 0 μ L ずつ加え ( D a y 1 ) 、 3 7 ℃ 、 5 % C O <sub>2</sub> にて 1 時間インキュベートした。インキュベート後、上記実施例 7 に記載されている方法と同様の方法でタンパク質発現解析用のサンプリングを行い、タンパク質発現解析を実施した。

その結果、図 9 に示すように、D C T N 1 - R E T 融合遺伝子発現 N I H / 3 T 3 細胞のリン酸化 R E T レベルがカボザンチニブ及びレンバチニブにより顕著に減少することが確認された。また、上記と同様の方法で、縮合ピリミジン化合物を用いて、R E T のリン酸化阻害を評価した結果、縮合ピリミジン化合物においても R E T のリン酸化が顕著に減少することが確認できた。

以上の結果から、リン酸化 R E T レベルを顕著に減少させる薬剤は、D C T N 1 - R E T 融合遺伝子発現 N I H / 3 T 3 細胞の増殖を抑制できる化合物であり、D C T N 1 - R E T 融合遺伝子が検出されたがんに対する治療薬として有用である可能性が示唆された。また、D C T N 1 - R E T 融合遺伝子発現 N I H / 3 T 3 細胞のリン酸化 R E T レベルを用いることで R E T 阻害剤のスクリーニングが可能であることが示唆された。

### 配列表フリーテキスト

[0187] 配列番号 1 は、D C T N 1 v a r i a n t 1 ( v 1 ) [配列番号 25 の一部] と R E T v a r i a n t 2 ( v 2 ) [配列番号 31 の一部] との融合ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を示す。

配列番号 2 は、D C T N 1 v 1 と R E T v 2 との融合ペプチドのアミノ酸配列を示す。

配列番号 3 は、D C T N 1 v 1 と R E T v a r i a n t 4 ( v 4 ) [配列番号 32 の一部] との融合ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を示す。

配列番号 4 は、D C T N 1 v 1 と R E T v 4 との融合ペプチドのアミノ酸配列を示す。

配列番号5は、DCTN1 variant 2 (v2) [配列番号26の一部]とRET v2との融合ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を示す。

配列番号6は、DCTN1 v2とRET v2との融合ペプチドのアミノ酸配列を示す。

配列番号7は、DCTN1 v2とRET v4との融合ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を示す。

配列番号8は、DCTN1 v2とRET v4との融合ペプチドのアミノ酸配列を示す。

配列番号9は、DCTN1 variant 3 (v3) [配列番号27の一部]とRET v2との融合ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を示す。

配列番号10は、DCTN1 v3とRET v2との融合ペプチドのアミノ酸配列を示す。

配列番号11は、DCTN1 v3とRET v4との融合ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を示す。

配列番号12は、DCTN1 v3とRET v4との融合ペプチドのアミノ酸配列を示す。

配列番号13は、DCTN1 variant 4 (v4) [配列番号28の一部]とRET v2との融合ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を示す。

配列番号14は、DCTN1 v4とRET v2との融合ペプチドのアミノ酸配列を示す。

配列番号15は、DCTN1 v4とRET v4との融合ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を示す。

配列番号16は、DCTN1 v4とRET v4との融合ペプチドのアミノ酸配列を示す。

配列番号17は、DCTN1 variant 5 (v5) [配列番号29

の一部] と R E T v 2 との融合ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を示す。

配列番号 18 は、D C T N 1 v 5 と R E T v 2 との融合ペプチドのアミノ酸配列を示す。

配列番号 19 は、D C T N 1 v 5 と R E T v 4 との融合ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を示す。

配列番号 20 は、D C T N 1 v 5 と R E T v 4 との融合ペプチドのアミノ酸配列を示す。

配列番号 21 は、D C T N 1 v 6 と R E T v 2 との融合ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を示す。

配列番号 22 は、D C T N 1 v 6 と R E T v 2 との融合ペプチドのアミノ酸配列を示す。

配列番号 23 は、D C T N 1 v 6 と R E T v 4 との融合ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を示す。

配列番号 24 は、D C T N 1 v 6 と R E T v 4 との融合ペプチドのアミノ酸配列を示す。

配列番号 33 は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号 34 は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号 35 は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号 36 は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号 37 は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号 38 は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号 39 は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号 40 は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号 41 は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号 42 は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号 43 は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号 44 は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号45は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号46は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号47は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号48は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号49は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号50は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号51は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号52は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号53は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号54は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号55は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号56は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号57は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号58は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号59は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号60は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号61は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号62は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号63は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号64は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号65は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号66は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号67は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号68は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号69は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号70は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号71は、プライマーの塩基配列を示す。  
配列番号72は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号 73 は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号 74 は、RET siRNA の塩基配列を示す。

配列番号 75 は、RET siRNA の塩基配列を示す。

配列番号 76 は、RET siRNA の塩基配列を示す。

配列番号 77 は、RET siRNA の塩基配列を示す。

### 請求の範囲

- [請求項1] D C T N 1 タンパク質のN末端部分と、R E T タンパク質のC末端部分とが融合しているポリペプチド。
- [請求項2] 以下の（a）～（c）から選択される請求項1記載のポリペプチド。
- （a）配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、又は配列番号24で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- （b）配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、又は配列番号24で示されるアミノ酸配列において、1個若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- （c）配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、又は配列番号24で示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- [請求項3] 請求項1又は2記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。
- [請求項4] 以下の（d）～（f）から選択される請求項3記載のポリヌクレオチド。
- （d）配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、又は配列番号24で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。
- （e）配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号

号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、又は配列番号24で示されるアミノ酸配列において、1個若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。(f)配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、又は配列番号24で示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

[請求項5]

以下の(g)～(i)から選択される請求項3記載のポリヌクレオチド。

(g)配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、又は配列番号23で示される塩基配列からなるポリヌクレオチド。

(h)配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、又は配列番号23で示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

(i)配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、又は配列番号23で示される塩基配列と90%以上の同一性を有するポリヌクレオチド。

[請求項6]

請求項3から5のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[請求項7]

請求項3から5のいずれかに記載のポリヌクレオチドを導入した細胞。

- [請求項8] 請求項1又は2記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体。
- [請求項9] 試料中の、請求項1又は2記載のポリペプチドの存在を検出する方法。
- [請求項10] 試料中の、請求項3から5のいずれかに記載のポリヌクレオチドの存在を検出するためのプライマー又はプローブであって、当該プライマー又はプローブが以下の(j)～(l)から選択されるポリヌクレオチド。
- (j) DCTN1タンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプローブ及びRETタンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプローブからなる群から選択される少なくとも1つのプローブであるポリヌクレオチド。
- (k) DCTN1タンパク質をコードするポリヌクレオチドとRETタンパク質をコードするポリヌクレオチドとの融合点にハイブリダイズするプローブであるポリヌクレオチド。
- (l) DCTN1タンパク質をコードするポリヌクレオチドとRETタンパク質をコードするポリヌクレオチドとの融合点を挟み込むように設計されたセンスプライマーとアンチセンスプライマーのセットであるポリヌクレオチド。
- [請求項11] 試料中の、請求項3から5のいずれかに記載のポリヌクレオチドの存在を検出する方法。
- [請求項12] 請求項9又は11記載の検出方法において、試料中の、請求項1若しくは2記載のポリペプチド又は請求項3から5のいずれかに記載のポリヌクレオチドの存在を検出した場合に、試料の由来となる患者が癌であると判定する方法。
- [請求項13] RETを阻害する化合物を有効成分とする、DCTN1遺伝子とRET遺伝子との融合遺伝子陽性及び／又はDCTN1タンパク質とRETタンパク質との融合タンパク質陽性の癌治療用医薬組成物。
- [請求項14] 以下の(1)及び(2)の工程を含む請求項1又は2記載のポリペ

プチドの発現及び／又は活性、又は請求項3から5のいずれかに記載のポリヌクレオチドの発現を抑制する化合物をスクリーニングする方法。

(1) 請求項1又は2記載のポリペプチド、請求項1若しくは2記載のポリペプチド又は請求項3から5のいずれかに記載のポリヌクレオチドを発現している細胞、又は請求項7の細胞に試験化合物を接触する工程。

(2) 上記工程(1)において、請求項1又は2記載のポリペプチドの発現及び／又は活性、又は請求項3から5のいずれかに記載のポリヌクレオチドの発現が抑制されるか測定する工程、又は上記工程(1)記載の細胞の増殖が抑制されるか測定する工程。

[請求項15] 請求項1若しくは2記載のポリペプチド又は請求項3から5のいずれかに記載のポリヌクレオチドを、RETを阻害する化合物を用いた化学療法が有効であるか否かの指標とする方法であって、請求項9記載の検出方法により、試料中から、請求項1若しくは2記載のポリペプチドを検出した場合、及び／又は請求項11記載の検出方法により、試料中から、請求項3から5のいずれかに記載のポリヌクレオチドの存在を検出した場合に、RETを阻害する化合物を用いた化学療法が有効であると判定する方法。

[請求項16] DCTN1タンパク質のN末端部分と、RETタンパク質のC末端部分とが融合しているポリペプチド、及び当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドからなる群より選択される少なくとも1種からなる癌を検出するためのバイオマーカー。

[請求項17] DCTN1遺伝子とRET遺伝子との融合遺伝子陽性及び／又はDCTN1タンパク質とRETタンパク質との融合タンパク質陽性の癌患者に、RETを阻害する化合物を用いた化学療法を行う工程を含む、癌の治療方法。

[請求項18] 被験者由来の試料中から、請求項1又は2記載のポリペプチドの存在

を検出すること及び／又は請求項3から5のいずれかに記載のポリヌクレオチドの存在を検出することを行う工程、ならびに  
請求項1又は2記載のポリペプチドの存在が検出されるか、かつ／又は請求項3から5のいずれかに記載のポリヌクレオチドの存在が検出された場合に、当該被験者に対し、RETを阻害する化合物を用いた化学療法を行う工程を含む、癌の治療方法。

[請求項19] DCTN1遺伝子とRET遺伝子との融合遺伝子陽性及び／又はDCTN1タンパク質とRETタンパク質との融合タンパク質陽性の癌患者を治療するための、RETを阻害する化合物。

[請求項20] DCTN1遺伝子とRET遺伝子との融合遺伝子陽性及び／又はDCTN1タンパク質とRETタンパク質との融合タンパク質陽性の癌患者を治療するための癌治療用医薬組成物を製造するための、RETを阻害する化合物の使用。

[請求項21] 試料中の請求項1又は2記載のポリペプチドの存在を検出するための手段及び／又は試料中の請求項3から5のいずれかに記載のポリヌクレオチドの存在を検出するための手段の、RETを阻害する化合物を用いた化学療法が有効であるか否かの判定薬の製造方法。

[請求項22] 請求項3から5のいずれかに記載のポリヌクレオチドの存在を検出するための抗DCTN1抗体及び抗RET抗体の組み合わせ。

[請求項23] 請求項1若しくは2記載のポリペプチド又は請求項3から5のいずれかに記載のポリヌクレオチドの存在を検出するための検出薬を製造するための、請求項8記載の抗体、請求項22記載の抗体の組み合わせ又は請求項10記載のプライマー若しくはプローブの使用。