(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2014-532061
(P2014-532061A)
(43)公表日　平成26年12月4日(2014.12.4)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	ZNA	4B024
C07K 14/705	(2006.01)	C07K	14/705		4C084
C07K 16/00	(2006.01)	C07K	16/00		4H045
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02		
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 86 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2014-534677 (P2014-534677)
(86)(22)出願日　平成24年10月4日 (2012.10.4)
(85)翻訳文提出日　平成26年5月27日 (2014.5.27)
(86)国際出願番号　PCT/US2012/058662
(87)国際公開番号　WO2013/052607
(87)国際公開日　平成25年4月11日 (2013.4.11)
(31)優先権主張番号　61/543,186
(32)優先日　平成23年10月4日 (2011.10.4)
(33)優先権主張国　米国 (US)

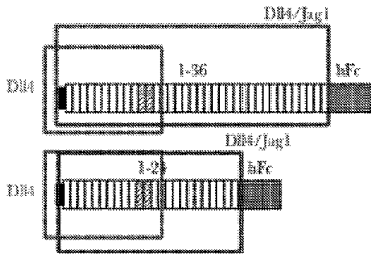
(71)出願人　592104782
ザ・トラスティーズ・オブ・コランビア・ユニバーシティー・イン・ザ・シティー・オブ・ニューヨーク
THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK
アメリカ合衆国、ニューヨーク州　１００２７、ニューヨーク、ウエスト・ワンハンドレッドシックスティーンス・ストリート・アンド・ブロードウエイ（番地無し）
(74)代理人　110001737
特許業務法人スズエ国際特許事務所

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト・ノッチ１デコイ

(57)【要約】
ここに提供されるのは、ノッチ１融合タンパク質である。これらの融合タンパク質は連続的アミノ酸を含んでなり、その配列は、ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインおよび抗体のＦｃ部分におけるアミノ酸の配列と同一である。前記ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインは、ＥＧＦ様反復１０のＮ末端に存在するアミノ酸で開始し、少なくとも、ＥＧＦ様反復２３のＣ末端アミノ酸を通して伸びる。前記ヒト・ノッチ１受容体タンパク質のＥＣＤのＮ末端部分は、ＥＧＦ様反復２４のＣ末端アミノ酸まで延びてよく、またはＥＧＦ様反復３６のＣ末端アミノ酸まで延びてよい。これら融合タンパク汁の組成物もまた提供される。また、ここに記載される融合タンパク質を使用して、加齢関連の黄斑変性症（ＡＭＤ）、糖尿病性網膜症、および癌を治療する方法も提供される。
【選択図】なし

Fig. 1a



【特許請求の範囲】
【請求項１】
融合タンパク質であって、連続的なアミノ酸を含んでなり、その配列は該融合タンパク質のＮ末端で開始し、下記のアミノ酸の配列：
（ａ）ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメイン、および
（ｂ）これに続く抗体のＦｃ部分
と同一であり、
ここで、前記ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインは
（ｉ）ＥＧＦ様反復１０のＮ末端に存在するアミノ酸で始まり、
（ｉｉ）ＥＧＦ様反復２３のＣ末端アミノ酸を通して伸びる
融合タンパク質。
【請求項２】
請求項１に記載の融合タンパク質であって、前記ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列が、ＥＧＦ様反復２４のＣ末端アミノ酸配列にまで伸びる融合タンパク質。
【請求項３】
請求項１に記載の融合タンパク質であって、前記ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列が、ＥＧＦ様反復３６のＣ末端アミノ酸配列にまで伸びる融合タンパク質。
【請求項４】
請求項１～３の何れか１項に記載の融合タンパク質であって、前記抗体のＦｃ部分がヒト抗体のＦｃ部分である融合タンパク質。
【請求項５】
請求項２に記載の融合タンパク質であって、前記連続的なアミノ酸の配列は、２４位のシステインで始まり８３３位のリジンで終わる配列番号３に記載の配列を含んでなる融合タンパク質。
【請求項６】
請求項３に記載の融合タンパク質であって、前記連続的なアミノ酸の配列は、２４位のシステインで始まり１３１８位のリジンで終わる配列番号５に記載の配列を含んでなる融合タンパク質。
【請求項７】
請求項１に記載の融合タンパク質であって、前記（ａ）のヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインにはシグナルペプチドが先行している融合タンパク質。
【請求項８】
請求項７に記載の融合タンパク質であって、前記シグナルペプチドは、ヒト・ノッチタンパク質のシグナルペプチド、またはＩｇＧ重鎖のシグナルペプチドである融合タンパク質。
【請求項９】
請求項８に記載の融合タンパク質であって、前記連続的なアミノ酸の配列は、配列番号３に記載のものである融合タンパク質。
【請求項１０】
請求項８に記載の融合タンパク質であって、前記連続的なアミノ酸の配列は、配列番号５に記載のものである融合タンパク質。
【請求項１１】
請求項１～１０の何れか１項に記載の融合タンパク質を含んでなる組成物。
【請求項１２】
請求項１１に記載の組成物であって、前記融合タンパク質が、ＪＡＧＧＥＤ－１の活性を阻害するのに十分な量で、医薬的に許容可能な担体の中に存在している組成物。
【請求項１３】
加齢関連の黄斑変性症（ＡＭＤ）に罹患した患者を治療する方法であって、前記患者に

対して、請求項１～１０の何れか１項に記載の融合タンパク質を、前記患者のＡＭＤを治療するのに十分な量で投与することを含んでなる方法。
【請求項１４】
請求項１３に記載の方法であって、前記ＡＭＤが湿潤型ＡＭＤである方法。
【請求項１５】
請求項１３に記載の方法であって、前記ＡＭＤが乾燥型ＡＭＤである方法。
【請求項１６】
糖尿病性網膜症に罹患した患者を治療する方法であって、前記患者に対して、請求項１～１０の何れか１項に記載の融合タンパク質を、前記患者の糖尿病性網膜症を治療するのに有効な量で投与することを含んでなる方法。
【請求項１７】
請求項１３～１６の何れか１項に記載の方法であって、更に、血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）の阻害剤を投与することを含んでなる方法。
【請求項１８】
請求項１７に記載の方法であって、前記ＶＥＧＦの阻害剤がＶＥＧＦ－Ａ、ＰＧＩＦ、ＶＥＧＦ－Ｂ、ＶＥＧＦ－Ｃ、またはＶＥＧＦ－Ｄの阻害剤である方法。
【請求項１９】
請求項１３～１６の何れか１項に記載の方法であって、更に、ＶＥＧＦ受容体の阻害剤を投与することを含んでなる方法。
【請求項２０】
請求項１８に記載の方法であって、前記ＶＥＧＦ受容体の阻害剤が、ＶＥＧＦＲ－１またはＶＥＧＦＲ－２の阻害剤である方法。
【請求項２１】
癌に罹患した患者を治療する方法であって、前記患者に対して、請求項１～１０の何れか１項に記載の融合タンパク質の何れかを、前記患者の癌を治療するのに有効な量で投与することを含んでなる方法。
【請求項２２】
請求項２１に記載の方法であって、前記癌が膵臓癌である方法。
【請求項２３】
請求項２１に記載の方法であって、前記癌が乳癌である方法。
【請求項２４】
加齢関連の黄斑変性（ＡＭＤ）に罹患した患者を治療する方法であって、前記患者に対して、前記患者のＡＭＤを治療するのに有効な量で融合タンパク質を投与することを含んでなり、前記融合タンパク質は連続的アミノ酸を含み、その配列は前記融合タンパク質のＮ末端で開始し、且つ下記アミノ酸の配列：
（ａ）ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメイン、および
（ｂ）これに続く抗体のＦｃ部分
と同一であり、
前記ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインは
（ｉ）ＥＧＦ様反復９のＮ末端に存在するアミノ酸を含み、
（ｉｉ）少なくともＥＧＦ様反復１３のＣ末端アミノ酸を通して伸びる
方法：
ただし、前記Ｎ末端アミノ酸がＥＧＦ様反復１のＮ末端アミノ酸であれば、前記Ｃ末端アミノ酸はＥＧＦ様反復３６のＣ末端アミノ酸ではない。
【請求項２５】
請求項２４に記載の方法であって、前記ＡＭＤが湿潤型ＡＭＤである方法。
【請求項２６】
請求項２４に記載の方法であって、前記ＡＭＤが乾燥型ＡＭＤである方法。
【請求項２７】
糖尿病性網膜症に罹患した患者を治療する方法であって、前記患者に対して、前記患者

の糖尿病性網膜症を治療するのに有効な量で融合タンパク質を投与することを含んでなり、前記融合タンパク質は連続的アミノ酸を含み、その配列は前記融合タンパク質のＮ末端で開始し、且つ下記アミノ酸の配列：
（ａ）ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメイン、および
（ｂ）これに続く抗体のＦｃ部分
と同一であり、
前記ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインは
（ｉ）ＥＧＦ様反復９のＮ末端に存在するアミノ酸を含み、
（ｉｉ）少なくともＥＧＦ様反復１３のＣ末端アミノ酸を通して伸びる
方法：
ただし、前記Ｎ末端アミノ酸がＥＧＦ様反復１のＮ末端アミノ酸であれば、前記Ｃ末端アミノ酸はＥＧＦ様反復３６のＣ末端アミノ酸ではない。

【請求項２８】
請求項２４～２７の何れか１項に記載の方法であって、更に、血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）の阻害剤を投与することを含んでなる方法。

【請求項２９】
請求項２８に記載の方法であって、前記ＶＥＧＦの阻害剤がＶＥＧＦ－Ａ、ＰＧＩＦ、ＶＥＧＦ－Ｂ、ＶＥＧＦ－Ｃ、またはＶＥＧＦ－Ｄの阻害剤である方法。

【請求項３０】
請求項２４～２７の何れか１項に記載の方法であって、更に、ＶＥＧＦ受容体の阻害剤を投与することを含んでなる方法。

【請求項３１】
請求項３０に記載の方法であって、前記ＶＥＧＦ受容体の阻害剤が、ＶＥＧＦＲ－１またはＶＥＧＦＲ－２の阻害剤である方法。

【請求項３２】
癌に罹患した患者を治療する方法であって、前記患者に対して、前記患者の癌を治療するのに有効な量で融合タンパク質を投与することを含んでなり、前記融合タンパク質は連続的アミノ酸を含み、その配列は前記融合タンパク質の開始し、且つ下記アミノ酸の配列：
（ａ）ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメイン、および
（ｂ）これに続く抗体のＦｃ部分
と同一であり、
前記ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインは
（ｉ）ＥＧＦ様反復９のＮ末端に存在するアミノ酸を含み、
（ｉｉ）少なくともＥＧＦ様反復１３のＣ末端アミノ酸を通して伸びる
方法：
ただし、前記Ｎ末端アミノ酸がＥＧＦ様反復１のＮ末端アミノ酸であれば、前記Ｃ末端アミノ酸はＥＧＦ様反復３６のＣ末端アミノ酸ではない。

【請求項３３】
請求項３２に記載の方法であって、前記癌が膵臓癌である方法。

【請求項３４】
請求項３２に記載の方法であって、前記癌が乳癌である方法。

【請求項３５】
請求項２４～３４の何れか１項に記載の方法であって、ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列は、ＥＧＦ様反復９のＮ末端に存在するアミノ酸で開始され、且つＥＧＦ様反復２３のＣ末端アミノ酸まで伸びる方法。

【請求項３６】
請求項２４～３４の何れか１項に記載の方法であって、ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列は、ＥＧＦ様反復９のＮ末端に存在するアミノ酸で開始され、且つＥＧＦ様反復３６のＣ末端アミノ酸まで伸びる方法。

【請求項３７】
請求項２４～３４の何れか１項に記載の方法であって、ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列は、ＥＧＦ様反復１のＮ末端に存在するアミノ酸で開始され、且つＥＧＦ様反復１３のＣ末端アミノ酸まで伸びる方法。
【請求項３８】
請求項２４～３４の何れか１項に記載の方法であって、ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列は、ＥＧＦ様反復１のＮ末端に存在するアミノ酸で開始され、且つＥＧＦ様反復２４のＣ末端アミノ酸まで伸びる方法。
【発明の詳細な説明】
【関連出願】
【０００１】
この出願は、２０１１年１０月４日に出願された米国仮出願第６１／５４３，１８６号の優先権を主張するものであり、その内容を本明細書の一部として援用する。
【０００２】
この出願を通して、括弧内に記載した著者および発行日により種々の刊行物を引用する。これら刊行物の完全な書誌的引用は、本明細書の末尾または各実験セクションの末尾に記載する。これら刊行物の開示は、本発明が属する技術をより十分に記述するために、本明細書の一部として本願に援用する。
【発明の背景】
【０００３】
ノッチタンパク質は、脈管構造、造血系および神経系を含む発生の決定において重要な役割を果たしている。かくして、発生の際および成人組織において、細胞の運命の決定および拘束が如何にして制御されるかを理解するために、それらの機能を理解することが重要である。今日まで、ノッチまたはノッチリガンドの遺伝子崩壊に関する幾つかの報告が脈管フェノタイプを記載しており、該報告は、この経路が脈管発生を案内する機構の基本的部分であることを強調している。異常型のノッチ活性は、癌および血管障害の両方を含むヒトの病理（CADASIL）にリンクされてきた。腫瘍血管新生におけるノッチの解析は、最近になって始まったばかりである：しかし、我々によるノッチの潜在的な下流標的の発見は、血管新生に関連した病理的プロセスにおけるその役割を示唆している。例えば、ＶＥＧＦＲ－３は、腫瘍血管新生および腫瘍リンパ管新生（lymphangiogenesis）の両方に関連付けられてきた。エフリンＢ２（ephrinB2）、Ｉｄ３、アンジオポエチン１（Angiopoietin 1）およびＰＤＧＦ－Ｂを含む幾つかの他の可能なノッチ標的の発現または機能もまた、腫瘍血管新生に関連付けられてきた。ノッチ遺伝子機能におけるこれら役割に関する洞察は、ヒトの病理におけるノッチの更なる解析を明らかに促進するであろう。
【０００４】
本発明における更なる背景は米国特許出願公開番号ＵＳ２０１１－０００８３４２Ａ１に見ることができ、本発明が属する技術をより十分に記述するために、その全内容を本明細書の一部として本願に援用する。
【発明の概要】
【０００５】
本発明は、融合タンパク質であって、連続的なアミノ酸を含んでなり、その配列は該融合タンパク質のＮ末端で開始し、下記のアミノ酸の配列：
（ａ）ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメイン、および
（ｂ）これに続く抗体のＦｃ部分
と同一であり、
前記ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインは
（ｉ）ＥＧＦ様反復１０のＮ末端に存在するアミノ酸で始まり、
（ｉｉ）ＥＧＦ様反復２３のＣ末端アミノ酸を通して伸びる
融合タンパク質を提供する。
【０００６】

一実施形態において、本発明の融合タンパク質は、ＥＧＦ様反復２４のＣ末端アミノ酸配列にまで伸びる、ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を含んでなるものである。もう一つの実施形態において、前記融合タンパク質は、ＦＧＦ様反復３６のＣ末端アミノ酸にまで伸びる、ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を含んでなるものである。

【０００７】

現時点での好ましい一つの実施形態において、本発明の融合タンパク質は、ノッチ１ＥＧＦ様反復１０～２４（ここでは、ノッチ１デコイ１０～２４とも称する）を含んでなるものである。この融合タンパク質は、ＤＬＬ４に結合することなくＪＡＧＧＥＤ－１に結合して、該タンパク質がＤＬＬ４経路の阻害によって生じる不快な副作用、例えば肝毒性、心臓および肺における血管腫瘍または壊死が生じるのをなくすことを可能にする。

【０００８】

そのＪＡＧＧＥＤ－１についてのリガンド特異性のために、ノッチ１デコイ１０～２４融合タンパク質は、ＪＡＧＧＥＤ－１関連の悪性腫瘍、例えば乳癌、頭および首の扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）、および成長因子によりＪＡＧＧＥＤリガンドが高度に発現されまたは誘導されることが報告されている関連の癌に対して、優れた抗腫瘍活性を示すであろうこともまた想定および期待される。

【０００９】

加えて、この融合タンパク質は、先に記載したノッチ１融合タンパク質をトランスフェクトされた細胞の分泌プロファイルに比較して優れた分泌プロファイルを有するであろうと思われる。このことは、タンパク質精製についての改善された効率を提供するであろう。

【００１０】

本発明は更に、このような融合タンパク質および担体を含有してなる組成物を提供する。

【００１１】

本発明はまた、加齢関連の黄斑変性症（ＡＭＤ）に罹患した患者を治療する方法であって、前記患者に対して、前記患者のＡＭＤを治療するために有効な量で本発明の融合タンパク質を投与することを含んでなる方法を提供する。

【００１２】

加えて、本発明は、糖尿病性網膜症に罹患した患者を治療する方法であって、前記患者に対して、前記患者の糖尿病性網膜症を治療するために有効な量で本発明の融合タンパク質を投与することを含んでなる方法を提供する。

【００１３】

本発明は更に、癌に罹患した患者を治療する方法であって、前記患者に対して、前記患者のがんを治療するために有効な量で本発明の融合タンパク質を投与することを含んでなる方法を提供する。

【００１４】

本発明はまた、加齢関連の黄斑変性症（ＡＭＤ）に罹患した患者を治療する方法であって、前記患者に対して、前記患者のＡＭＤを治療するために有効な量で前記融合タンパク質を投与することを含んでなり、ここでの前記融合タンパク質は連続的アミノ酸を含み、その配列は前記融合タンパク質のＮ末端で開始し、且つ下記アミノ酸の配列：

（ａ）ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメイン、および

（ｂ）これに続く抗体のＦｃ部分

と同一であり、

前記ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインは

（ｉ）ＥＧＦ様反復９のＮ末端に存在するアミノ酸を含み、

（ｉｉ）少なくともＥＧＦ様反復１３のＣ末端アミノ酸を通して伸びる

方法を提供する：

ただし、前記Ｎ末端アミノ酸が前記ＥＧＦ様反復１のＮ末端アミノ酸であれば、前記Ｃ

末端アミノ酸は前記ＥＧＦ様反復３６のＣ末端アミノ酸ではない。
【００１５】
本発明はまた、糖尿病性網膜症に罹患した患者を治療する方法であって、前記患者に対して、前記患者の糖尿病性網膜症を治療するために有効な量で前記融合タンパク質を投与することを含んでなり、ここでの前記融合タンパク質は連続的アミノ酸を含んでなり、その配列は前記融合タンパク質のＮ末端で開始し、下記アミノ酸の配列：
（ａ）ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメイン、および
（ｂ）これに続く抗体のＦｃ部分
と同一であり、
前記ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインは
（ｉ）ＥＧＦ様反復９のＮ末端に存在するアミノ酸を含み、
（ｉｉ）少なくともＥＧＦ様反復１３のＣ末端アミノ酸を通して伸びる
融合タンパク質を提供する：
ただし、前記Ｎ末端アミノ酸が前記ＥＧＦ様反復１のＮ末端アミノ酸であれば、前記Ｃ末端アミノ酸は前記ＥＧＦ様反復３６のＣ末端アミノ酸ではない。
【００１６】
本発明はまた、癌に罹患した患者を治療する方法であって、前記患者に対して、前記患者の癌を治療するために有効な量で前記融合タンパク質を投与することを含んでなり、ここでの前記融合タンパク質は連続的アミノ酸を含んでなり、その配列は前記融合タンパク質のＮ末端で開始し、下記アミノ酸の配列：
（ａ）ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメイン、および
（ｂ）これに続く抗体のＦｃ部分
と同一であり、
前記ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインは
（ｉ）ＥＧＦ様反復９のＮ末端に存在するアミノ酸を含み、
（ｉｉ）少なくともＥＧＦ様反復１３のＣ末端アミノ酸を通して伸びる
融合タンパク質を提供する：
ただし、前記Ｎ末端アミノ酸が前記ＥＧＦ様反復１のＮ末端アミノ酸であれば、前記Ｃ末端アミノ酸は前記ＥＧＦ様反復３６のＣ末端アミノ酸ではない。
【図面の簡単な説明】
【００１７】
【図１ａ】短縮型ノッチ１デコイ変異体。図１ａは、各々がＤＬＬ４およびＪＡＧＧＥＤ－１と相互作用して、汎ノッチ阻害剤（pan-ノッチ inhibitor）として作用するノッチ１デコイ１～３６およびノッチ１デコイ１～２４の概略図である。図１ｂは、四つの短縮型ノッチ１デコイ変異体１０～３６、１４～３６、１０～２４および１４～２４の概略図である。
【図１ｂ】短縮型ノッチ１デコイ変異体。図１ａは、各々がＤＬＬ４およびＪＡＧＧＥＤ－１と相互作用して、汎ノッチ阻害剤（pan-ノッチ inhibitor）として作用するノッチ１デコイ１～３６およびノッチ１デコイ１～２４の概略図である。図１ｂは、四つの短縮型ノッチ１デコイ変異体１０～３６、１４～３６、１０～２４および１４～２４の概略図である。
【図２ａ】２９３Ｔ細胞における短縮型ノッチ１デコイ変異体の発現および分泌。図２ａは、全細胞溶解物および上清のウエスタンブロット、並びにノッチ１デコイ１～１３、１～２４および１～３６の分子量を示している。図２ｂは、全細胞溶解物および上清のウエスタンブロット、並びにノッチ１デコイ１０～３６、１４～３６、１０～２４および１４～２４の分子量を示している。
【図２ｂ】２９３Ｔ細胞における短縮型ノッチ１デコイ変異体の発現および分泌。図２ａは、全細胞溶解物および上清のウエスタンブロット、並びにノッチ１デコイ１～１３、１～２４および１～３６の分子量を示している。図２ｂは、全細胞溶解物および上清のウエスタンブロット、並びにノッチ１デコイ１０～３６、１４～３６、１０～２４および１４

～２４の分子量を示している。
【図３ａ】デコイ１～１３、１～２４および１～３６についてのノッチレポータ試験。図３ａは、ルシフェラーゼ遺伝子に結合された複数のＣＳＬ結合部位を含むノッチレポータ構築物の概略図である。図３ｂは、ＤＬＬ４を発現するＨＥＬＡ細胞についての結果を示している。図３ｃは、ＪＡＧＧＥＤ－１を発現するＨＥＬＡ細胞についての結果を示している。
【図３ｂ】デコイ１～１３、１～２４および１～３６についてのノッチレポータ試験。図３ａは、ルシフェラーゼ遺伝子に結合された複数のＣＳＬ結合部位を含むノッチレポータ構築物の概略図である。図３ｂは、ＤＬＬ４を発現するＨＥＬＡ細胞についての結果を示している。図３ｃは、ＪＡＧＧＥＤ－１を発現するＨＥＬＡ細胞についての結果を示している。
【図３ｃ】デコイ１～１３、１～２４および１～３６についてのノッチレポータ試験。図３ａは、ルシフェラーゼ遺伝子に結合された複数のＣＳＬ結合部位を含むノッチレポータ構築物の概略図である。図３ｂは、ＤＬＬ４を発現するＨＥＬＡ細胞についての結果を示している。図３ｃは、ＪＡＧＧＥＤ－１を発現するＨＥＬＡ細胞についての結果を示している。
【図４ａ】デコイ１０～２６、１４～３６、１０～２４および１４～２４についてのノッチレポータ試験。図４ａは、ＤＬＬ４を発現するＨＥＬＡ細胞についての結果を示している。図４ｂは、ＪＡＧＧＥＤ－１を発現するＨＥＬＡ細胞についての結果を示している。
【図４ｂ】デコイ１０～２６、１４～３６、１０～２４および１４～２４についてのノッチレポータ試験。図４ａは、ＤＬＬ４を発現するＨＥＬＡ細胞についての結果を示している。図４ｂは、ＪＡＧＧＥＤ－１を発現するＨＥＬＡ細胞についての結果を示している。
【図５ａ】ノッチ１デコイと、可溶性（図５ａ）または全長（図５ｂ）ノッチ１リガンドとを同時形質移入された、２９３細胞溶解物の抗Ｆｃまたは抗ＦＬＡＧ抗体を用いたイムノブロット。
【図５ｂ】ノッチ１デコイと、可溶性（図５ａ）または全長（図５ｂ）ノッチ１リガンドとを同時形質移入された、２９３細胞溶解物の抗Ｆｃまたは抗ＦＬＡＧ抗体を用いたイムノブロット。
【図６】ノッチデコイおよびノッチ１の共免疫沈降。
【図７ａ】Ｐ２日での異なるノッチ１デコイを発現するアデノウイルスの注射後の、Ｐ５マウス網膜のイソレクチンＢ４染色。図７ａは、対照デコイ、ノッチ１デコイ１～１３、ノッチ１０～２４デコイおよびＤＡＰＴである。図７ｂは、Ｒｃ、ノッチ１デコイ１～１３、ノッチ１０～２４デコイおよびノッチデコイ１～２４である。網膜の血管領域は図７ｃに定量化されている。平均血管収斂面積±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．０５
【図７ｂ】Ｐ２日での異なるノッチ１デコイを発現するアデノウイルスの注射後の、Ｐ５マウス網膜のイソレクチンＢ４染色。図７ａは、対照デコイ、ノッチ１デコイ１～１３、ノッチ１０～２４デコイおよびＤＡＰＴである。図７ｂは、Ｒｃ、ノッチ１デコイ１～１３、ノッチ１０～２４デコイおよびノッチデコイ１～２４である。網膜の血管領域は図７ｃに定量化されている。平均血管収斂面積±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．０５
【図７ｃ】Ｐ２日での異なるノッチ１デコイを発現するアデノウイルスの注射後の、Ｐ５マウス網膜のイソレクチンＢ４染色。図７ａは、対照デコイ、ノッチ１デコイ１～１３、ノッチ１０～２４デコイおよびＤＡＰＴである。図７ｂは、Ｒｃ、ノッチ１デコイ１～１３、ノッチ１０～２４デコイおよびノッチデコイ１～２４である。網膜の血管領域は図７ｃに定量化されている。平均血管収斂面積±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．０５
【図８ａ】ノッチ１デコイを発現するＨＵＶＥＣの遺伝子発現プロファイリング。ノッチ受容体（ノッチ１、ノッチ２、ノッチ３、およびノッチ４）のｍＲＮＡ転写物についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが、図８ａ、図８ｂ、図８ｃおよび図８ｄにそれぞれ記載されている。
【図８ｂ】ノッチ１デコイを発現するＨＵＶＥＣの遺伝子発現プロファイリング。ノッチ受容体（ノッチ１、ノッチ２、ノッチ３、およびノッチ４）のｍＲＮＡ転写物についての

定量的ＲＴ－ＰＣＲが、図８ａ、図８ｂ、図８ｃおよび図８ｄにそれぞれ記載されている。

【図８ｃ】ノッチ１デコイを発現するＨＵＶＥＣの遺伝子発現プロファイリング。ノッチ受容体（ノッチ１、ノッチ２、ノッチ３、およびノッチ４）のｍＲＮＡ転写物についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが、図８ａ、図８ｂ、図８ｃおよび図８ｄにそれぞれ記載されている。

【図８ｄ】ノッチ１デコイを発現するＨＵＶＥＣの遺伝子発現プロファイリング。ノッチ受容体（ノッチ１、ノッチ２、ノッチ３、およびノッチ４）のｍＲＮＡ転写物についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが、図８ａ、図８ｂ、図８ｃおよび図８ｄにそれぞれ記載されている。

【図９ａ】ノッチ１デコイを発現するＨＵＶＥＣの遺伝子発現プロファイリング。ＨＥＹ１のｍＲＮＡ転写物についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが、図９ａに示されている。ＨＥＹ２のｍＲＮＡ転写物についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが、図９ｂに示されている。

【図９ｂ】ノッチ１デコイを発現するＨＵＶＥＣの遺伝子発現プロファイリング。ＨＥＹ１のｍＲＮＡ転写物についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが、図９ａに示されている。ＨＥＹ２のｍＲＮＡ転写物についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが、図９ｂに示されている。

【図１０ａ】ノッチ１デコイを発現するＨＵＶＥＣの遺伝子発現プロファイリング。ＨＥＹＬのｍＲＮＡ転写物についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが、図１０ａに示されている。ＨＥＳ１のｍＲＮＡ転写物についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが、図１０ｂに示されている。

【図１０ｂ】ノッチ１デコイを発現するＨＵＶＥＣの遺伝子発現プロファイリング。ＨＥＹＬのｍＲＮＡ転写物についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが、図１０ａに示されている。ＨＥＳ１のｍＲＮＡ転写物についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが、図１０ｂに示されている。

【図１１ａ】ノッチ１デコイを発現するＨＵＶＥＣの遺伝子発現プロファイリング。ＤＬＬ４のｍＲＮＡ転写物についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが図１１ａに；ＪＡＧＧＥＤ－１についての定量的ＴＲ－ＰＣＲが図１１ｂに；ＶＥＧＦＲ－１についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが図１１ｃに；ＶＥＧＦＲ－２についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが図１１ｄに；ＶＥＧＦＲ－３についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが図１１ｅに、それぞれ示されている。

【図１１ｂ】ノッチ１デコイを発現するＨＵＶＥＣの遺伝子発現プロファイリング。ＤＬＬ４のｍＲＮＡ転写物についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが図１１ａに；ＪＡＧＧＥＤ－１についての定量的ＴＲ－ＰＣＲが図１１ｂに；ＶＥＧＦＲ－１についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが図１１ｃに；ＶＥＧＦＲ－２についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが図１１ｄに；ＶＥＧＦＲ－３についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが図１１ｅに、それぞれ示されている。

【図１１ｃ】ノッチ１デコイを発現するＨＵＶＥＣの遺伝子発現プロファイリング。ＤＬＬ４のｍＲＮＡ転写物についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが図１１ａに；ＪＡＧＧＥＤ－１についての定量的ＴＲ－ＰＣＲが図１１ｂに；ＶＥＧＦＲ－１についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが図１１ｃに；ＶＥＧＦＲ－２についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが図１１ｄに；ＶＥＧＦＲ－３についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが図１１ｅに、それぞれ示されている。

【図１１ｄ】ノッチ１デコイを発現するＨＵＶＥＣの遺伝子発現プロファイリング。ＤＬＬ４のｍＲＮＡ転写物についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが図１１ａに；ＪＡＧＧＥＤ－１についての定量的ＴＲ－ＰＣＲが図１１ｂに；ＶＥＧＦＲ－１についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが図１１ｃに；ＶＥＧＦＲ－２についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが図１１ｄに；ＶＥＧＦＲ－３についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが図１１ｅに、それぞれ示されている。

【図１１ｅ】ノッチ１デコイを発現するＨＵＶＥＣの遺伝子発現プロファイリング。ＤＬＬ４のｍＲＮＡ転写物についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが図１１ａに；ＪＡＧＧＥＤ－１についての定量的ＴＲ－ＰＣＲが図１１ｂに；ＶＥＧＦＲ－１についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが図１１ｃに；ＶＥＧＦＲ－２についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが図１１ｄに；ＶＥＧＦＲ－３についての定量的ＲＴ－ＰＣＲが図１１ｅに、それぞれ示されている。

【図１２ａ】ＶＥＧＦ受容体についてのフローサイトメトリー。ＶＥＧＦＲ－１（図１２ａ）、ＶＥＧＦＲ－２（図１２ｂ）、およびＶＥＧＦＲ－３（図１２ｃ）のためのノッチデコイを発現するＨＵＶＥＣのヒストグラム。

【図１２ｂ】ＶＥＧＦ受容体についてのフローサイトメトリー。ＶＥＧＦＲ－１（図１２ａ）、ＶＥＧＦＲ－２（図１２ｂ）、およびＶＥＧＦＲ－３（図１２ｃ）のためのノッチデコイを発現するＨＵＶＥＣのヒストグラム。
【図１２ｃ】ＶＥＧＦ受容体についてのフローサイトメトリー。ＶＥＧＦＲ－１（図１２ａ）、ＶＥＧＦＲ－２（図１２ｂ）、およびＶＥＧＦＲ－３（図１２ｃ）のためのノッチデコイを発現するＨＵＶＥＣのヒストグラム。
【図１３ａ】ノッチ１デコイを発現するＨＵＶＥＣの遺伝子発現プロファイル。全長ＶＥＧＦＲ－１および可溶性ＶＥＧＦＲ－１のｍＲＮＡについての定量的ＲＴ－ＰＣＲ。
【図１３ｂ】ノッチ１デコイを発現するＨＵＶＥＣの遺伝子発現プロファイル。全長ＶＥＧＦＲ－１および可溶性ＶＥＧＦＲ－１のｍＲＮＡについての定量的ＲＴ－ＰＣＲ。
【図１４】マウス乳腺腫瘍細胞（Ｍｍ５ＭＴ）、ヒト膵臓癌細胞（ＫＰ１）、マウスのルイス肺癌細胞（ＬＬＣ）、およびマウスのメラノーマ細胞（Ｂ１６－Ｆ１０）において発現したノッチ受容体の遺伝子発現プロファイリング。
【図１５ａ】Ｍｍ５ＭＴおよびＫＰ１腫瘍細胞の細胞増殖およびアポトーシスに対するノッチデコイ１～１３、１０～２４および１～２４の影響。図１５ａは、Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦＴ細胞における癌増殖研究の結果である。図１５ｂは、ＫＰ１－ＶＥＧＦにおける増殖研究の結果である。アポトーシス細胞のパーセンテージは、右上象限に示されている。平均アポトーシス細胞パーセンテージ±Ｓ．Ｄ．　図１５ｃは、Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４におけるアポトーシス研究の結果である。図１５ｄは、ＫＰ１－ＶＥＧＦにおけるアポトーシス研究の結果である。
【図１５ｂ】Ｍｍ５ＭＴおよびＫＰ１腫瘍細胞の細胞増殖およびアポトーシスに対するノッチデコイ１～１３、１０～２４および１～２４の影響。図１５ａは、Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦＴ細胞における癌増殖研究の結果である。図１５ｂは、ＫＰ１－ＶＥＧＦにおける増殖研究の結果である。アポトーシス細胞のパーセンテージは、右上象限に示されている。平均アポトーシス細胞パーセンテージ±Ｓ．Ｄ．　図１５ｃは、Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４におけるアポトーシス研究の結果である。図１５ｄは、ＫＰ１－ＶＥＧＦにおけるアポトーシス研究の結果である。
【図１５ｃ】Ｍｍ５ＭＴおよびＫＰ１腫瘍細胞の細胞増殖およびアポトーシスに対するノッチデコイ１～１３、１０～２４および１～２４の影響。図１５ａは、Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦＴ細胞における癌増殖研究の結果である。図１５ｂは、ＫＰ１－ＶＥＧＦにおける増殖研究の結果である。アポトーシス細胞のパーセンテージは、右上象限に示されている。平均アポトーシス細胞パーセンテージ±Ｓ．Ｄ．　図１５ｃは、Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４におけるアポトーシス研究の結果である。図１５ｄは、ＫＰ１－ＶＥＧＦにおけるアポトーシス研究の結果である。
【図１５ｄ】Ｍｍ５ＭＴおよびＫＰ１腫瘍細胞の細胞増殖およびアポトーシスに対するノッチデコイ１～１３、１０～２４および１～２４の影響。図１５ａは、Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦＴ細胞における癌増殖研究の結果である。図１５ｂは、ＫＰ１－ＶＥＧＦにおける増殖研究の結果である。アポトーシス細胞のパーセンテージは、右上象限に示されている。平均アポトーシス細胞パーセンテージ±Ｓ．Ｄ．　図１５ｃは、Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４におけるアポトーシス研究の結果である。図１５ｄは、ＫＰ１－ＶＥＧＦにおけるアポトーシス研究の結果である。
【図１６ａ】図１６ａは、ノッチ１デコイ１～１３、１０～２４および１～２４を発現するアデノウイルス、または対照としてのＦｃを静脈注射した、マウス血清中のＦｃ、ノッチ１デコイ１～１３、１０～２４および１～２４のウエスタンブロット分析である。図１６ｂおよび図１６ｃは、抗ヒトＩｇＧ・Ｆｃ抗体により免疫染色し、またＤＡＰＩで対比染色した腫瘍切片である。スケールバー：３０マイクロメータ。
【図１６ｂ】図１６ａは、ノッチ１デコイ１～１３、１０～２４および１～２４を発現するアデノウイルス、または対照としてのＦｃを静脈注射した、マウス血清中のＦｃ、ノッチ１デコイ１～１３、１０～２４および１～２４のウエスタンブロット分析である。図１６ｂおよび図１６ｃは、抗ヒトＩｇＧ・Ｆｃ抗体により免疫染色し、またＤＡＰＩで対比

染色した腫瘍切片である。スケールバー：３０マイクロメータ。
【図１６ｃ】図１６ａは、ノッチ１デコイ１～１３、１０～２４および１～２４を発現するアデノウイルス、または対照としてのＦｃを静脈注射した、マウス血清中のＦｃ、ノッチ１デコイ１～１３、１０～２４および１～２４のウエスタンブロット分析である。図１６ｂおよび図１６ｃは、抗ヒトＩｇＧ・Ｆｃ抗体により免疫染色し、またＤＡＰＩで対比染色した腫瘍切片である。スケールバー：３０マイクロメータ。
【図１７ａ】図１７ａは、ノッチ１デコイ１～１３、１０～２４および１～２４、または対照としてのＦｃを発現するマウスの画像である。ノッチ１デコイは、Ｍｍ５ＭＴ腫瘍の増殖を低下させた。腫瘍増殖は、ゼノジェン（Xenogen）ＩＶＩＳ撮像システムを使用して発光信号からの全放射輝度を評価することによりモニターされた。その結果を図１７ｂに示す。腫瘍重量を、腫瘍収集直前の最終日に測定した。その結果を図１７ｃに示す。
【図１７ｂ】図１７ａは、ノッチ１デコイ１～１３、１０～２４および１～２４、または対照としてのＦｃを発現するマウスの画像である。ノッチ１デコイは、Ｍｍ５ＭＴ腫瘍の増殖を低下させた。腫瘍増殖は、ゼノジェン（Xenogen）ＩＶＩＳ撮像システムを使用して発光信号からの全放射輝度を評価することによりモニターされた。その結果を図１７ｂに示す。腫瘍重量を、腫瘍収集直前の最終日に測定した。その結果を図１７ｃに示す。
【図１７ｃ】図１７ａは、ノッチ１デコイ１～１３、１０～２４および１～２４、または対照としてのＦｃを発現するマウスの画像である。ノッチ１デコイは、Ｍｍ５ＭＴ腫瘍の増殖を低下させた。腫瘍増殖は、ゼノジェン（Xenogen）ＩＶＩＳ撮像システムを使用して発光信号からの全放射輝度を評価することによりモニターされた。その結果を図１７ｂに示す。腫瘍重量を、腫瘍収集直前の最終日に測定した。その結果を図１７ｃに示す。
【図１８ａ】図１８ａは、ノッチ１デコイ１～１３、１０～２４および１～２４、または対照としてのＦｃを発現するマウスの画像である。ノッチ１デコイは、ＫＰ１腫瘍の増殖を低下させた。腫瘍増殖は、ゼノジェン（Xenogen）ＩＶＩＳ撮像システムを使用して発光信号からの全放射輝度を評価することによりモニターされた。その結果を図１８ｂに示す。腫瘍重量を、腫瘍収集直前の最終日に測定した。その結果を図１８ｃに示す。
【図１８ｂ】図１８ａは、ノッチ１デコイ１～１３、１０～２４および１～２４、または対照としてのＦｃを発現するマウスの画像である。ノッチ１デコイは、ＫＰ１腫瘍の増殖を低下させた。腫瘍増殖は、ゼノジェン（Xenogen）ＩＶＩＳ撮像システムを使用して発光信号からの全放射輝度を評価することによりモニターされた。その結果を図１８ｂに示す。腫瘍重量を、腫瘍収集直前の最終日に測定した。その結果を図１８ｃに示す。
【図１８ｃ】図１８ａは、ノッチ１デコイ１～１３、１０～２４および１～２４、または対照としてのＦｃを発現するマウスの画像である。ノッチ１デコイは、ＫＰ１腫瘍の増殖を低下させた。腫瘍増殖は、ゼノジェン（Xenogen）ＩＶＩＳ撮像システムを使用して発光信号からの全放射輝度を評価することによりモニターされた。その結果を図１８ｂに示す。腫瘍重量を、腫瘍収集直前の最終日に測定した。その結果を図１８ｃに示す。
【図１９ａ】腫瘍脈管構造に対するノッチ１の影響。エンドムチン（Endomucin）（緑色）およびＤＬＬ４（赤色）について、腫瘍切片を免疫染色した。その結果を図１９ａに示す。　腫瘍脈管構造の定量化は、腫瘍切片におけるエンドムチン陽性の面積に基づいていた。その結果を図１９ｂに示す。
【図１９ｂ】腫瘍脈管構造に対するノッチ１の影響。エンドムチン（Endomucin）（緑色）およびＤＬＬ４（赤色）について、腫瘍切片を免疫染色した。その結果を図１９ａに示す。　腫瘍脈管構造の定量化は、腫瘍切片におけるエンドムチン陽性の面積に基づいていた。その結果を図１９ｂに示す。
【図２０ａ】腫瘍内皮含量の免疫蛍光分析。ＫＰ１腫瘍をエンドムチンおよびＤＬＬ４について免疫染色した。その結果を図２０ａに示す。腫瘍血管構造の定量化は、エンドムチン陽性の面積に基づいていた。腫瘍脈管構造の定量化は、ＫＰ１腫瘍切片におけるエンドムチン陽性の面積に基づいていた。その結果を図２０ｂに示す。
【図２０ｂ】腫瘍内皮含量の免疫蛍光分析。ＫＰ１腫瘍をエンドムチンおよびＤＬＬ４について免疫染色した。その結果を図２０ａに示す。腫瘍血管構造の定量化は、エンドムチ

ン陽性の面積に基づいていた。腫瘍脈管構造の定量化は、ＫＰ１腫瘍切片におけるエンドムチン陽性の面積に基づいていた。その結果を図２０ｂに示す。

【図２１ａ】腫瘍血管構造に対するノッチ１デコイの影響。フルオレセインに結合されたレクチン（１００μｇ）を、腫瘍収集の２分前にマウスに注射した。腫瘍切片をエンドムチン（赤色）について免疫染色し、また腫瘍血管と結合した灌流レクチン（緑色）について腫瘍切片を免疫染色した。その結果を図２１ａに示す。血管と結合したレクチンの量は、機能性の腫瘍血管を反映しており、その結果を図２１ｂに示した。

【図２１ｂ】腫瘍血管構造に対するノッチ１デコイの影響。フルオレセインに結合されたレクチン（１００μｇ）を、腫瘍収集の２分前にマウスに注射した。腫瘍切片をエンドムチン（赤色）について免疫染色し、また腫瘍血管と結合した灌流レクチン（緑色）について腫瘍切片を免疫染色した。その結果を図２１ａに示す。血管と結合したレクチンの量は、機能性の腫瘍血管を反映しており、その結果を図２１ｂに示した。

【図２２ａ】腫瘍切片を、エンドムチン（緑）およびＮＧ２（赤）について同時免疫染色し、その結果を図２２ａに記載した。ＮＧ２陽性面積のパーセンテージを、腫瘍における周皮細胞補充のパラメータとして測定し、その結果を図２２ｂに示した。

【図２２ｂ】腫瘍切片を、エンドムチン（緑）およびＮＧ２（赤）について同時免疫染色し、その結果を図２２ａに記載した。ＮＧ２陽性面積のパーセンテージを、腫瘍における周皮細胞補充のパラメータとして測定し、その結果を図２２ｂに示した。

【図２３ａ】異なるノッチデコイ群からの発光信号を用いたＬＬＣ腫瘍をもつマウスの第１２日の写真が、図２３ａに示されている。腫瘍増殖がモニターされ、総放射輝度に基づいて定量された。その結果が図２３ｂに示されている。第１２日における腫瘍重量が腫瘍を収集する前に測定された。その結果が図２３ｃに示されている。

【図２３ｂ】異なるノッチデコイ群からの発光信号を用いたＬＬＣ腫瘍をもつマウスの第１２日の写真が、図２３ａに示されている。腫瘍増殖がモニターされ、総放射輝度に基づいて定量された。その結果が図２３ｂに示されている。第１２日における腫瘍重量が腫瘍を収集する前に測定された。その結果が図２３ｃに示されている。

【図２３ｃ】異なるノッチデコイ群からの発光信号を用いたＬＬＣ腫瘍をもつマウスの第１２日の写真が、図２３ａに示されている。腫瘍増殖がモニターされ、総放射輝度に基づいて定量された。その結果が図２３ｂに示されている。第１２日における腫瘍重量が腫瘍を収集する前に測定された。その結果が図２３ｃに示されている。

【図２４ａ】異なるノッチデコイ群からの発光信号を用いた、Ｂ１６－Ｆ１０腫瘍をもつマウスの第１２日の写真が図２４ａに示されている。総放射輝度に基づいて腫瘍増殖をモニターし、その結果を図２４ｂに記載した。第１２日における腫瘍重量を腫瘍の収集前に測定し、その結果を図２４ｃに示した。

【図２４ｂ】異なるノッチデコイ群からの発光信号を用いた、Ｂ１６－Ｆ１０腫瘍をもつマウスの第１２日の写真が図２４ａに示されている。総放射輝度に基づいて腫瘍増殖をモニターし、その結果を図２４ｂに記載した。第１２日における腫瘍重量を腫瘍の収集前に測定し、その結果を図２４ｃに示した。

【図２４ｃ】異なるノッチデコイ群からの発光信号を用いた、Ｂ１６－Ｆ１０腫瘍をもつマウスの第１２日の写真が図２４ａに示されている。総放射輝度に基づいて腫瘍増殖をモニターし、その結果を図２４ｂに記載した。第１２日における腫瘍重量を腫瘍の収集前に測定し、その結果を図２４ｃに示した。

【図２５ａ】第１２日にＬＬＣ腫瘍を有するマウスから肺および肝臓を収集し、３０ｍｇ／ｍＬのＤルシフェリン中でインキュベートし、ゼノジェン（Xenogen）ＩＶＩＳ撮像システムにより解析した。撮像の結果を図２５ａに記載した。総輝度の結果は図２５ｂに記載した。

【図２５ｂ】第１２日にＬＬＣ腫瘍を有するマウスから肺および肝臓を収集し、３０ｍｇ／ｍＬのＤルシフェリン中でインキュベートし、ゼノジェン（Xenogen）ＩＶＩＳ撮像システムにより解析した。撮像の結果を図２５ａに記載した。総輝度の結果は図２５ｂに記載した。

【図２６ａ】腫瘍を有するＢ１６－Ｆ１０マウスから第１２日に肺および肝臓を収集し、３０ｍｇ／ｍＬのＤルシフェリン中でインキュベートし、ゼノジェン（Xenogen）ＩＶＩＳ撮像システムを使用して解析した。肺についてのＦｃ群からの画像は図２６ａおよび図２６ｂに記載し、肝臓についての画像は図２６ｃに記載した。
【図２６ｂ】腫瘍を有するＢ１６－Ｆ１０マウスから第１２日に肺および肝臓を収集し、３０ｍｇ／ｍＬのＤルシフェリン中でインキュベートし、ゼノジェン（Xenogen）ＩＶＩＳ撮像システムを使用して解析した。肺についてのＦｃ群からの画像は図２６ａおよび図２６ｂに記載し、肝臓についての画像は図２６ｃに記載した。
【図２６ｃ】腫瘍を有するＢ１６－Ｆ１０マウスから第１２日に肺および肝臓を収集し、３０ｍｇ／ｍＬのＤルシフェリン中でインキュベートし、ゼノジェン（Xenogen）ＩＶＩＳ撮像システムを使用して解析した。肺についてのＦｃ群からの画像は図２６ａおよび図２６ｂに記載し、肝臓についての画像は図２６ｃに記載した。
【図２７ａ】ノッチ１デコイは、温和な杯状細胞肥厚を誘導する。汎ノッチ阻害剤であるノッチ１デコイ１～２４および１～３６と同様に、リガンド特異的デコイは、杯状細胞の数を僅かに増大させた。小腸の正常なアーキテクチャーが保存され、対照と比較された。結果を図２７ａに示す。視野（field）当たりの平均杯状細胞数が計算され、その結果が図２７ｂに示されている。図２７ｃは、腫瘍を有するマウスがノッチ１デコイに十分に耐えられることを示している。治療群と対照群の間での体重変化に有意な相違は観察されない。平均体重変化±±Ｓ．Ｄ．（ｎ＝５）。
【図２７ｂ】ノッチ１デコイは、温和な杯状細胞肥厚を誘導する。汎ノッチ阻害剤であるノッチ１デコイ１～２４および１～３６と同様に、リガンド特異的デコイは、杯状細胞の数を僅かに増大させた。小腸の正常なアーキテクチャーが保存され、対照と比較された。結果を図２７ａに示す。視野当たりの平均杯状細胞数が計算され、その結果が図２７ｂに示されている。図２７ｃは、腫瘍を有するマウスがノッチ１デコイに十分に耐えられることを示している。治療群と対照群の間での体重変化には有意な相違は観察されない。平均体重変化±±Ｓ．Ｄ．（ｎ＝５）。
【図２７ｃ】ノッチ１デコイは、温和な杯状細胞肥厚を誘導する。汎ノッチ阻害剤であるノッチ１デコイ１～２４および１～３６と同様に、リガンド特異的デコイは、杯状細胞の数を僅かに増大させた。小腸の正常なアーキテクチャーが保存され、対照と比較された。結果を図２７ａに示す。視野当たりの平均杯状細胞数が計算され、その結果が図２７ｂに示されている。図２７ｃは、腫瘍を有するマウスがノッチ１デコイに十分に耐えられることを示している。治療群と対照群の間での体重変化には有意な相違は観察されない。平均体重変化±±Ｓ．Ｄ．（ｎ＝５）。
【図２８－１】ヒト・ノッチ１タンパク質のアミノ酸配列（配列番号１）。
【図２８－２】図２８－１の続き
【図２８－３】図２８－２の続き
【図２８－４】図２８－３の続き
【図２９－１】ヒト・ノッチ１デコイ１０～２４の核酸配列が、配列番号２に記載される。ヒト・ノッチ１シグナルペプチドは、配列番号２のヌクレオチド１～６９に対応し、ＥＧＦ様反復１０～２４は、配列番号２のヌクレオチド７０～１７８８に対応し、またヒトＦｃは配列番号２のヌクレオチド１７８９～２５０２に対応する。ヒト・ノッチ１デコイ１０～２４のアミノ酸配列は、配列番号３に記載されている。
【図２９－２】図２９－１の続き
【図２９－３】図２９－２の続き
【図３０－１】ヒト・ノッチ１デコイ１０～３６の核酸配列が、配列番号４に記載されている。ヒト・ノッチ１シグナルペプチドは、配列番号４のヌクレオチド１～６９に対応し、ＥＧＦ様反復１０～３６は、配列番号４のヌクレオチド７０～３２４３に対応し、またヒトＦｃは配列番号２のヌクレオチド３２４４～３９５７に対応する。ヒト・ノッチ１デコイ１０～３６のアミノ酸配列は、配列番号５に記載されている。
【図３０－２】図３０－１の続き

【図３０－３】図３０－２の続き
【図３０－４】図３０－３の続き
【図３１－１】ヒト・ノッチ１デコイ１４～２１の核酸配列が、配列番号６に記載されている。ヒト・ノッチ１シグナルペプチドは、配列番号６のヌクレオチド１～６９に対応し、ＥＧＦ様反復１４～２４は、配列番号６のヌクレオチド７０～１３２０に対応し、またヒトＦｃは配列番号６のヌクレオチド１３２１～２０３４に対応する。ヒト・ノッチ１デコイ１４～２４のアミノ酸配列は、配列番号７に記載されている。
【図３１－２】図３１－１の続き
【図３２－１】ヒト・ノッチ１デコイ１４～３６の核酸配列が、配列番号８に記載されている。ヒト・ノッチ１シグナルペプチドは、配列番号８のヌクレオチド１～６９に対応し、ＥＧＦ様反復１４～３６は、配列番号８のヌクレオチド７０～２７７５に対応し、またヒトＦｃは配列番号８のヌクレオチド２７７６～３４８９に対応する。ヒト・ノッチ１デコイ１４～３６のアミノ酸配列は、配列番号９に記載されている。
【図３２－２】図３２－１の続き
【図３２－３】図３２－２の続き
【図３２－４】図３２－３の続き
【図３３ａ】ノッチ１デコイ変異体は、インビトロおよび網膜血管新生に対して独特の効果を示す。図３３ａは、ＨＵＶＥＣフィブリンビード発芽アッセイを使用したノッチ１デコイの評価を示している。７日後、管状構造体からの内皮細胞、$N1^{1-13}$デコイを発現するＨＵＮＥＣｓは、有意に増大した発芽を示す。対照的に、$N1^{10-24}$または$N1^{1-24}$を発現するＨＵＶＥＣは、Ｆｃ対象とは逆に、より短く且つより細い発芽を形成する。ルーメンを含む発芽の数が図３３ｂに定量化されている。発芽の平均数±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．０５。網膜をαＳＭＡで免疫染色して、血管平滑筋細胞を同定した。$N1^{10-24}$および$N1^{1-24}$デコイは、網膜動脈に沿った血管平滑筋細胞被覆を顕著に減少させる。結果を図３３ｃに示す。
【図３３ｂ】ノッチ１デコイ変異体は、インビトロおよび網膜血管新生に対して独特の効果を示す。図３３ａは、ＨＵＶＥＣフィブリンビード発芽アッセイを使用したノッチ１デコイの評価を示している。７日後、管状構造体からの内皮細胞、$N1^{1-13}$デコイを発現するＨＵＮＥＣｓは、有意に増大した発芽を示す。対照的に、$N1^{10-24}$または$N1^{1-24}$を発現するＨＵＶＥＣは、Ｆｃ対象とは逆に、より短く且つより細い発芽を形成する。ルーメンを含む発芽の数が図３３ｂに定量化されている。発芽の平均数±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．０５。網膜をαＳＭＡで免疫染色して、血管平滑筋細胞を同定した。$N1^{10-24}$および$N1^{1-24}$デコイは、網膜動脈に沿った血管平滑筋細胞被覆を顕著に減少させる。結果を図３３ｃに示す。
【図３３ｃ】ノッチ１デコイ変異体は、インビトロおよび網膜血管新生に対して独特の効果を示す。図３３ａは、ＨＵＶＥＣフィブリンビード発芽アッセイを使用したノッチ１デコイの評価を示している。７日後、管状構造体からの内皮細胞、$N1^{1-13}$デコイを発現するＨＵＮＥＣｓは、有意に増大した発芽を示す。対照的に、$N1^{10-24}$または$N1^{1-24}$を発現するＨＵＶＥＣは、Ｆｃ対象とは逆に、より短く且つより細い発芽を形成する。ルーメンを含む発芽の数が図３３ｂに定量化されている。発芽の平均数±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．０５。網膜をαＳＭＡで免疫染色して、血管平滑筋細胞を同定した。$N1^{10-24}$および$N1^{1-24}$デコイは、網膜動脈に沿った血管平滑筋細胞被覆を顕著に減少させる。結果を図３３ｃに示す。
【図３４ａ】ノッチ１デコイは、内皮細胞遊走を増大させる。レンチウイルスで形質導入されたＨＵＶＥＣを、ウエル当たり1.0×10^{5}細胞で２４穴プレートに播種し、一晩で集密状態にした。次いで、各ウエルをスクラッチし、傷付けられた領域へのＨＵＶＥＣの遊走を写真に撮り（図３４ａ）、Ｔスクラッチプログラムを用いて定量化した。平均遊走率±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．０３（図３４ｂ）。
【図３４ｂ】ノッチ１デコイは、内皮細胞遊走を増大させる。レンチウイルスで形質導入されたＨＵＶＥＣを、ウエル当たり1.0×10^{5}細胞で２４穴プレートに播種し、一晩

で集密状態にした。次いで、各ウエルをスクラッチし、傷付けられた領域へのＨＵＶＥＣの遊走を写真に撮り（図３４ａ）、Ｔスクラッチプログラムを用いて定量化した。平均遊走率±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．０３（図３４ｂ）。

【図３４ｃ】図３４ｃは、ノッチ１デコイが内皮細胞増殖を増大させることを示している。レンチウイルスでＦｃ、ノッチ１デコイ１～１３、１～２４、１～３６、またはＮ１ＩＣを形質導入されたＨＵＶＥＣを、ウエル当たり１．０×10^4細胞で２４穴プレートに播種した。第１日および第４日に細胞数を定量した。平均細胞数±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．０５。

【図３５ａ】ノッチ１デコイを発現するＨＵＶＥＣは、増大した内皮ネットワークおよび枝分かれを示している。図３５ａ。ＨＵＶＥＣは、ウエル当たり１．０×10^5細胞で２４穴プレート内のコラーゲン層の間に播種し、４日間培養した。図３４ｂ。ネットワークを形成するＨＵＶＥＣの能力を、枝分かれ点の数をカウントすることにより定量した。ＨＵＶＥＣ－Ｎ１ＩＣおよびＨＵＶＥＣ－ノッチ４／ｉｎｔ３は、それらが適正なネットワークを欠いているため含められなかった。細分枝点の平均数±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．０５。

【図３５ｂ】ノッチ１デコイを発現するＨＵＶＥＣは、増大した内皮ネットワークおよび枝分かれを示している。図３５ａ。ＨＵＶＥＣは、ウエル当たり１．０×10^5細胞で２４穴プレート内のコラーゲン層の間に播種し、４日間培養した。図３４ｂ。ネットワークを形成するＨＵＶＥＣの能力を、枝分かれ点の数をカウントすることにより定量した。ＨＵＶＥＣ－Ｎ１ＩＣおよびＨＵＶＥＣ－ノッチ４／ｉｎｔ３は、それらが適正なネットワークを欠いているため含められなかった。細分枝点の平均数±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．０５

【図３６】ノッチリガンドであるＪＡＧＧＥＤ－１およびＤＬＬ４についての定量的リアルタイムＰＣＲ。通常の培養プレートまたはコラーゲンゲル上でのものに比較して。フィブリンゲル上で培養されたＨＵＶＥＣは、ＪＡＧＧＥＤ－１発現を有意に上方調節し、同時に、ＤＬＬ４発現を下方調節した。ｍＲＮＡ転写物の平均相対値±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．０２

【図３７ａ】ノッチ１デコイ１～１３、１０～２４、および１～２４は、Ｍｍ５ＭＴＦＧＦ４中でのコロニー形成を低下させる。図３７ａ。Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４、ＫＰ１－ＶＥＧＦ、ＬＬＣ、およびＢ１６－Ｆ１０腫瘍細胞を、２４穴プレートにおいて、３×10^3細胞／ウエルで半固形寒天培地中に播種し、３週間培養した。コロニーの可視化のために、３ｍｇ／ｍＬのＭＴＴを培養液に加えた。図３７ｂ。コロニー面積の定量化を行った。コロニー面積の平均パーセンテージ±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．００１。

【図３７ｂ】ノッチ１デコイ１～１３、１０～２４、および１～２４は、Ｍｍ５ＭＴＦＧＦ４中でのコロニー形成を低下させる。図３７ａ。Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４、ＫＰ１－ＶＥＧＦ、ＬＬＣ、およびＢ１６－Ｆ１０腫瘍細胞を、２４穴プレートにおいて、３×10^3細胞／ウエルで半固形寒天培地中に播種し、３週間培養した。コロニーの可視化のために、３ｍｇ／ｍＬのＭＴＴを培養液に加えた。図３７ｂ。コロニー面積の定量化を行った。コロニー面積の平均パーセンテージ±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．００１。

【図３８】ノッチ１デコイは、異種移植片の腫瘍増殖をブロックする。ヌードマウスに皮下注射されたＭｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４、ＫＰ１－ＶＥＧＦ、ＬＬＣ、またはＢ１６－Ｆ１０を用いて腫瘍増殖を評価した。異なるノッチ１デコイ変異体をコードするＡｄを、腫瘍移植の３日後に静脈注射した。腫瘍は、ノッチ１デコイ治療群の方が有意に小さかった。収集の時点で腫瘍重量を測定する。平均腫瘍重量±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．０５（ｎ＝４～５）。

【図３９ａ】ノッチ１デコイ１～２４および１～３６は、Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４（図３９ａ）およびＫＰ１－ＶＥＧＦ腫瘍（図３９ｂ）の増殖を同様に低下させた。腫瘍容積（Ｖ）は、長さ（Ｌ）および幅（Ｗ）から計算され（Ｖ＝０．５×Ｌ×Ｗ）、これは毎週ベースで測定された。平均腫瘍体積±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．０５。ノッチ１デコイ１～２４および１～３６は、腫瘍血管構造を有意に低下させた。ＣＤ３１免疫蛍光は、ノッチ１デコイ群からの腫瘍における減少した血管含有量および崩壊された構造を示している。縮尺バ

ー：３０マイクロメータ。データを図３９ｃに示す。
【図３９ｂ】ノッチ１デコイ１～２４および１～３６は、Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４（図３９ａ）およびＫＰ１－ＶＥＧＦ腫瘍（図３９ｂ）の増殖を同様に低下させた。腫瘍容積（Ｖ）は、長さ（Ｌ）および幅（Ｗ）から計算され（Ｖ＝０．５×Ｌ×Ｗ）、これは毎週ベースで測定された。平均腫瘍体積±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．０５。ノッチ１デコイ１～２４および１～３６は、腫瘍血管構造を有意に低下させた。ＣＤ３１免疫蛍光は、ノッチ１デコイ群からの腫瘍における減少した血管含有量および崩壊された構造を示している。縮尺バー：３０マイクロメータ。データを図３９ｃに示す。
【図３９ｃ】ノッチ１デコイ１～２４および１～３６は、Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４（図３９ａ）およびＫＰ１－ＶＥＧＦ腫瘍（図３９ｂ）の増殖を同様に低下させた。腫瘍容積（Ｖ）は、長さ（Ｌ）および幅（Ｗ）から計算され（Ｖ＝０．５×Ｌ×Ｗ）、これは毎週ベースで測定された。平均腫瘍体積±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．０５。ノッチ１デコイ１～２４および１～３６は、腫瘍血管構造を有意に低下させた。ＣＤ３１免疫蛍光は、ノッチ１デコイ群からの腫瘍における減少した血管含有量および崩壊された構造を示している。縮尺バー：３０マイクロメータ。データを図３９ｃに示す。
【図４０ａ】ノッチ１デコイは、異種移植された腫瘍増殖をブロックする。図４０ａは、ノッチ1^{-13}デコイがＤ１１４／ノッチ活性をブロックし、増大した腫瘍血管構造をもたらす一方、ノッチ1^{10-24}またはノッチ1^{-24}デコイは、全ての腫瘍モデルにおいて腫瘍血管を減少させることを示している。腫瘍血管構造は、エンドムチン免疫蛍光（緑）によって分析された。図４０ｂは、複数の腫瘍切片からエンドムチン陽性面積について定量化された図４０ａの画像についてのデータを示している。エンドムチン陽性面積の平均パーセンテージ±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．００３（ｎ＝４～５）。縮尺バー：３０マイクロメータ。
【図４０ｂ】ノッチ１デコイは、異種移植された腫瘍増殖をブロックする。図４０ａは、ノッチ1^{-13}デコイがＤ１１４／ノッチ活性をブロックし、増大した腫瘍血管構造をもたらす一方、ノッチ1^{10-24}またはノッチ1^{-24}デコイは、全ての腫瘍モデルにおいて腫瘍血管を減少させることを示している。腫瘍血管構造は、エンドムチン免疫蛍光（緑）によって分析された。図４０ｂは、複数の腫瘍切片からエンドムチン陽性面積について定量化された図４０ａの画像についてのデータを示している。エンドムチン陽性面積の平均パーセンテージ±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．００３（ｎ＝４～５）。縮尺バー：３０マイクロメータ。
【図４１ａ】ノッチ１デコイは腫瘍血管新生を混乱させ、灌流を低下させて、低酸素症を誘導する。フルオレセイン結合レクチンを注射したマウスからの腫瘍切片を、エンドムチン（赤）および灌流レクチン（緑）で免疫染色する。エンドムチン結合したレクチンの量は、機能性腫瘍血管構造および正常な灌流を反映する。低酸素プローブを腹腔内注射されたマウスからの腫瘍切片を、ＡＰＣに結合された抗低酸素プローブ抗体（赤）およびＤＡＰＩ（青）で免疫染色し、腫瘍低酸素症について定量化した。データを図４１ａに示す。レクチン陽性面積の平均パーセンテージ±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．００６（ｎ＝４～５）を図４１ｂに示す。低酸素プローブ陽性面積±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．００２（ｎ＝４～５）、＊＊Ｐ値＜０．０５（ｎ＝４～５）を図４１ｃに示す。デコイ治療されたマウスは、有意に増大した低酸素症およびネクローシスを示した。縮尺バー：３０マイクロメータ。
【図４１ｂ】ノッチ１デコイは腫瘍血管新生を混乱させ、灌流を低下させて、低酸素症を誘導する。フルオレセイン結合レクチンを注射したマウスからの腫瘍切片を、エンドムチン（赤）および灌流レクチン（緑）で免疫染色する。エンドムチン結合したレクチンの量は、機能性腫瘍血管構造および正常な灌流を反映する。低酸素プローブを腹腔内注射されたマウスからの腫瘍切片を、ＡＰＣに結合された抗低酸素プローブ抗体（赤）およびＤＡＰＩ（青）で免疫染色し、腫瘍低酸素症について定量化した。データを図４１ａに示す。レクチン陽性面積の平均パーセンテージ±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．００６（ｎ＝４～５）を図４１ｂに示す。低酸素プローブ陽性面積±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．００２（ｎ＝４～５）、＊＊Ｐ値＜０．０５（ｎ＝４～５）を図４１ｃに示す。デコイ治療されたマウスは、有

意に増大した低酸素症およびネクローシスを示した。縮尺バー：３０マイクロメータ。
【図４１ｃ】ノッチ１デコイは腫瘍血管新生を混乱させ、灌流を低下させて、低酸素症を誘導する。フルオレセイン結合レクチンを注射したマウスからの腫瘍切片を、エンドムチン（赤）および灌流レクチン（緑）で免疫染色する。エンドムチン結合したレクチンの量は、機能性腫瘍血管構造および正常な灌流を反映する。低酸素プローブを腹腔内注射されたマウスからの腫瘍切片を、ＡＰＣに結合された抗低酸素プローブ抗体（赤）およびＤＡＰＩ（青）で免疫染色し、腫瘍低酸素症について定量化した。データを図４１ａに示す。レクチン陽性面積の平均パーセンテージ±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．００６（ｎ＝４～５）を図４１ｂに示す。低酸素プローブ陽性面積±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．００２（ｎ＝４～５）、＊＊Ｐ値＜０．０５（ｎ＝４～５）を図４１ｃに示す。デコイ治療されたマウスは、有意に増大した低酸素症およびネクローシスを示した。縮尺バー：３０マイクロメータ。
【図４２ａ】ノッチ１デコイは、腫瘍血管新生を崩壊させる。Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４腫瘍切片のＩＶ型コラーゲン（赤）およびエンドムチン（緑）免疫蛍光。ＩＶ型コラーゲンの存在は、腫瘍血管構造と相関しており、ノッチ１デコイが、血管退行を生じることなく、腫瘍血管新生を阻害することを示唆している。画像が図４２ａに示されている。平均ＩＶ型コラーゲン陽性面積および平均エンドムチン陽性面積±Ｓ．Ｄが、それぞれ図４２ｂおよび図４２ｃに示されている。＊Ｐ値＜０．００２* P value < 0.002.
【図４２ｂ】ノッチ１デコイは、腫瘍血管新生を崩壊させる。Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４腫瘍切片のＩＶ型コラーゲン（赤）およびエンドムチン（緑）免疫蛍光。ＩＶ型コラーゲンの存在は、腫瘍血管構造と相関しており、ノッチ１デコイが、血管退行を生じることなく、腫瘍血管新生を阻害することを示唆している。画像が図４２ａに示されている。平均ＩＶ型コラーゲン陽性面積および平均エンドムチン陽性面積±Ｓ．Ｄが、それぞれ図４２ｂおよび図４２ｃに示されている。＊Ｐ値＜０．００２* P value < 0.002.
【図４２ｃ】ノッチ１デコイは、腫瘍血管新生を崩壊させる。Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４腫瘍切片のＩＶ型コラーゲン（赤）およびエンドムチン（緑）免疫蛍光。ＩＶ型コラーゲンの存在は、腫瘍血管構造と相関しており、ノッチ１デコイが、血管退行を生じることなく、腫瘍血管新生を阻害することを示唆している。画像が図４２ａに示されている。平均ＩＶ型コラーゲン陽性面積および平均エンドムチン陽性面積±Ｓ．Ｄが、それぞれ図４２ｂおよび図４２ｃに示されている。＊Ｐ値＜０．００２
【図４３ａ】ＪＡＧＧＥＤ－１を標的とするノッチ１デコイは、腫瘍における壁細胞－内皮細胞の相互作用を遮断する。腫瘍切片を、エンドムチン（緑）およびＮＧ２（赤）について同時免疫染色した。画像を図４３ａに示す。縮尺バー：１０マイクロメータ。ＮＧ２陽性面積のパーセンテージを、腫瘍における周皮細胞被覆のパラメータとして測定した。エンドムチンまたはＮＧ２陽性面積の平均パーセンテージ±Ｓ．Ｄ．を、それぞれ図４３ｂおよび４３ｃにそれぞれ示す。図４３ｄは、ＮＧ２陽性／エンドムチン陽性面積＊Ｐ値＜０．０２（ｎ＝４～５）を示す。
【図４３ｂ】ＪＡＧＧＥＤ－１を標的とするノッチ１デコイは、腫瘍における壁細胞－内皮細胞の相互作用を遮断する。腫瘍切片を、エンドムチン（緑）およびＮＧ２（赤）について同時免疫染色した。画像を図４３ａに示す。縮尺バー：１０マイクロメータ。ＮＧ２陽性面積のパーセンテージを、腫瘍における周皮細胞被覆のパラメータとして測定した。エンドムチンまたはＮＧ２陽性面積の平均パーセンテージ±Ｓ．Ｄ．を、それぞれ図４３ｂおよび４３ｃにそれぞれ示す。図４３ｄは、ＮＧ２陽性／エンドムチン陽性面積＊Ｐ値＜０．０２（ｎ＝４～５）を示す。
【図４３ｃ】ＪＡＧＧＥＤ－１を標的とするノッチ１デコイは、腫瘍における壁細胞－内皮細胞の相互作用を遮断する。腫瘍切片を、エンドムチン（緑）およびＮＧ２（赤）について同時免疫染色した。画像を図４３ａに示す。縮尺バー：１０マイクロメータ。ＮＧ２陽性面積のパーセンテージを、腫瘍における周皮細胞被覆のパラメータとして測定した。エンドムチンまたはＮＧ２陽性面積の平均パーセンテージ±Ｓ．Ｄ．を、それぞれ図４３ｂおよび４３ｃにそれぞれ示す。図４３ｄは、ＮＧ２陽性／エンドムチン陽性面積＊Ｐ値＜０．０２（ｎ＝４～５）を示す。

【図４３ｄ】ＪＡＧＧＥＤ－１を標的とするノッチ１デコイは、腫瘍における壁細胞－内皮細胞の相互作用を遮断する。腫瘍切片を、エンドムチン（緑）およびＮＧ２（赤）について同時免疫染色した。画像を図４３ａに示す。縮尺バー：１０マイクロメータ。ＮＧ２陽性面積のパーセンテージを、腫瘍における周皮細胞被覆のパラメータとして測定した。エンドムチンまたはＮＧ２陽性面積の平均パーセンテージ±Ｓ．Ｄ．を、それぞれ図４３ｂおよび４３ｃにそれぞれ示す。図４３ｄは、ＮＧ２陽性／エンドムチン陽性面積＊Ｐ値＜０．０２（ｎ＝４～５）を示す。

【図４４】ＪＡＧＧＥＤ－１を標的とするノッチ１デコイは、腫瘍における壁細胞－内皮細胞の相互作用を攪乱させる。腫瘍切片をエンドムチン（緑）およびαＳＭＡ（赤）について同時免疫染色する。血管平滑筋細胞被覆を伴う大きな血管が、腫瘍周辺に位置する。縮尺バー：１０マイクロメータ。

【図４５】ノッチ下流標的：ＨＥＹ１、ＨＥＹ２、ＨＥＹＬ、ＨＥＳ１についての、Ｎ１デコイまたはＪＡＧＧＥＤ－１ｓｈＲＮＡを発現するＨＵＶＥＣに対する定量的ＴＲ－ＰＣＲ。

【図４６】ＶＥＧＦ受容体についての、ノッチ１デコイまたはＪＡＧＧＥＤ－１ｓｈＲＮＡを発現するＨＵＶＥＣに対する定量的ＴＲ－ＰＣＲおよびフローサイトメトリー。

【図４７ａ】図４７ａは、ノッチ１デコイを発現するＨＵＶＥＣに対する、またはＶＥＧＦ受容体についての定量的ＲＴ－ＰＣＲを示す。図４７ｂは、可溶性ＶＥＧＦＲ－１についての酵素結合免疫吸着検定法の結果を示している。

【図４７ｂ】図４７ａは、ノッチ１デコイを発現するＨＵＶＥＣに対する、またはＶＥＧＦ受容体についての定量的ＲＴ－ＰＣＲを示す。図４７ｂは、可溶性ＶＥＧＦＲ－１についての酵素結合免疫吸着検定法の結果を示している。

【図４８ａ】腫瘍切片に対するＶＥＧＦＲ－１免疫蛍光は、$N1_{10-24}$デコイおよび１－２４が、可溶性ＶＥＧＦＲ－１の発現を増大させることを確認した。免疫蛍光画像を図４８ａに示す。平均ＶＥＧＦＲ－１陽性面積±Ｓ．Ｄ．が図４８ｂに示されている。＊Ｐ値＜０．０２。縮尺バー：３０マイクロメータ。

【図４８ｂ】腫瘍切片に対するＶＥＧＦＲ－１免疫蛍光は、$N1_{10-24}$デコイおよび１－２４が、可溶性ＶＥＧＦＲ－１の発現を増大させることを確認した。免疫蛍光画像を図４８ａに示す。平均ＶＥＧＦＲ－１陽性面積±Ｓ．Ｄ．が図４８ｂに示されている。＊Ｐ値＜０．０２。縮尺バー：３０マイクロメータ。

【図４９】Ｄ１１およびＪａｇ科の他のメンバーについてのノッチ１デコイのリガンド特異性。ノッチ信号活性化が、ノッチリガンドを発現するＨｅｌａ細胞と共培養された、全長ラット・ノッチ１および１１ＣＳＬ－Ｌｕｃを発現するＨｅＬａ細胞において測定される。$N1_{1-13}$、$N1_{1-24}$、および$N1_{1-36}$デコイだけが、ＤＬＬ１に誘導されたノッチ信号伝達を阻害し、ＤＬＬ１－に誘導されたノッチ信号伝達を阻害するためにはＧＦ様反復１～９が不可欠であることを示唆する。しかしながら、$N1_{1-13}$デコイはＪＡＧ２を阻害しない。$N1_{10-24}$デコイだけがＪＡＧ２をブロックでき、ノッチ１のＥＧＦ様反復１０～２４がＪＡＧＧＥＤ特異性を与えることを示している。平均ルシフェラーゼ倍率誘導±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．００５。

【発明の詳細な説明】

【００１８】

＜用語＞

本願で使用するとき、別途明示的にここに記載する場合を除き、以下の用語の各々は下記に述べる意味を有するものとする。

【００１９】

「投与する」とは、当業者知られた如何なる方法を用いて実施されてもよく、または行われてもよい。該方法には、例えば、病巣内、筋肉内、皮下、静脈内、腹腔内、リポソーム媒介性、経粘膜、腸、局所的、鼻、経口、肛門、眼球、または耳の送達手段が含まれている。

【００２０】

「固定された」とは、何れかの手段によって付着されることを意味するものとする。一つの実施形態において、「固定された」とは共有結合により固定されることを意味する。もう一つの実施形態において、固定されたとは、非共有結合的に固定されることを意味する。

【００２１】

「アミノ酸」、「アミノ酸残基」および「残基」は、ここではタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの中に組み込まれるアミノ酸を指すために互換的に使用される。このアミノ酸は、例えば、天然に生じるアミノ酸、または天然に生じるアミノ酸と同様に機能できる天然アミノ酸の類似体であることができる。

【００２２】

「Ｃ末端」および「Ｎ末端」アミノ酸は、ここで用いるときは、与えられたタンパク質、タンパク質ドメインまたはアミノ酸配列モチーフのそれぞれカルボキシ末端またはアミノ末端にあるか、またはこれら末端に近接したアミノ酸を意味し、それにより前記タンパク質、タンパク質ドメインまたはアミノ酸配列モチーフの構造、機能または特徴に不可欠なアミノ酸残基が、前記Ｃ末端アミノ酸またはＮ末端アミノ酸の外へと越えないことを言う。

【００２３】

「抗体」とは、（ａ）二つの重鎖および二つの軽鎖を含んでなり、抗原を認識する免疫グロブリン分子；（ｂ）ポリクローナルまたはモノクローナル免疫グロブリン分子；（ｃ）それらの一価または二価の断片を含むものであるが、これらに限定されない。免疫グロブリン分子は、共通に知られたクラスの何れかに由来するものであってよく、ＩｇＡ、分泌性ＩｇＡ、ＩｇＧ、ＩｇＥおよびＩｇＭを含むが、これらに限定されない。ＩｇＧサブクラスは当業者に周知であり、ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４を含むが、これらに限定されない。抗体は、天然に生じるものおよび天然に生じないものの両方であることができる。更に、抗体にはキメラ抗体、全合成の抗体、単鎖抗体、およびそれらの断片が含まれる。抗体はヒト抗体または非ヒト抗体であってよい。非ヒト抗体は、ヒトにおけるそれらの免疫原性を低減するために、組み換え法によりヒト化されてよい。抗体断片には、ＦａｂおよびＦｃ断片が含まれるが、これらに限定されない。一実施形態において、「抗体のＦｃ部分」は、免疫グロブリンのパパイン消化により得られる結晶性断片であり、ジスルフィド結合により連結された二つの重鎖のＣ末端側半分からなり、免疫グロブリンの「エフェクター領域」としても知られるものである。もう一つの実施形態において、「抗体のＦｃ部分」は、一つの重鎖のＣ末端側半分の全部、または実質的に全部を意味する。

【００２４】

抗体に関して「ヒト化された」とは、ＣＤＲ領域外のアミノ酸の幾つか、殆どまたは全部が、ヒト免疫グロブリン分子由来の対応するアミノ酸で置き換えられた抗体を意味する。アミノ酸の小さな付加、欠失、挿入、置換または修飾は、それらが所定の抗原に結合する抗体の能力を抑制しない限り許容される。適切なヒト免疫グロブリンには、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡおよびＩｇＭ分子が含まれるが、これらに限定されない。如何にしてヒト化抗体を作製するかについては、種々の刊行物、例えば米国特許第４，８１６，５６７号、同第　５，２２５，５３９号、同第５，５８５，０８９号および同第５，６９３，７６１号、およびＰＣＴ国際公開ＷＯ９０／０７８６１に記載されている。

【００２５】

ここで使用するとき、医薬組成物のような「組成物」の用語は、活性成分および担体を構成する不活性成分を含んでなる生成物、並びに、何れか二つ以上の成分の組み合わせ、複合体形成または集合から生じる何れかの生成物、または一以上の成分の解離から、または一以上の成分の他のタイプの反応もしくは相互作用から直接または間接に生じる何れかの生成物を包含するものである。

【００２６】

ここで使用するとき、「有効量」とは、腫瘍、疾患または障害を有する患者を治療できる量を意味する。従って、有効量は治療される患者、並びに治療すべき状態と共に変化するであろう。当業者は、このような十分な量を決定するために、ルーチンの滴定実験を行うことができる。化合物の有効量は、患者および使用される特定の投与経路に依存して変化するであろう。化合物に基づいて、当該量は、例えば連続ポンプによって連続的に、または周期的間隔で（例えば一以上の別々の機会に）送達されることができる。特定化合物の複数の量の望ましい間隔は、過大な実験を伴うことなく当業者によって決定することができる。一つの実施形態において、前記有効量は約１μｇ／ｋｇ～１０　ｍｇ／ｋｇである。もう一つの実施形態において、前記有効量は約１０μｇ／ｋｇ～１ｍｇ／ｋｇである。更なる実施形態において、前記有効量は１００μｇ／ｋｇである。

【００２７】

ノッチ受容体タンパク質に関連して用いる「細胞外ドメイン」は、（ｉ）細胞外に存在し（即ち、膜貫通部分としても細胞内部分としても存在しない）、また（ｉｉ）完全なノッチ受容体タンパク質が結合する細胞外リガンドに結合する、ノッチの全部または一部を意味する。ノッチの細胞外ドメインは、任意に、単一のペプチド（「ｓｐ」）を含んでいてよい。「細胞外ドメイン」、「ＥＣＤ」および「エクトドメイン」は同義語である。

【００２８】

障害または望ましくない生物学的プロセスの開始を「阻害する」とは、前記障害またはプロセスが開始する可能性を減少させること、または前記障害またはプロセスの開始を完全に防止することを意味するものである。好ましい実施形態において、障害またはプロセスの開始を阻害するとは、その開始を完全に防止することである。

【００２９】

「ノッチ」、「ノッチタンパク質」および「ノッチ受容体タンパク質」は同義語である。以下のノッチアミノ酸配列は既知であり、本願明細書の一部として援用する：ノッチ１（Ｇｅｎｂａｎｋ受付番号Ｓ１８１８８（ラット））；ノッチ２（Ｇｅｎｂａｎｋ受付番号ＮＰ＿０７７３３４（ラット））；ノッチ３（Ｇｅｎｂａｎｋ受付番号Ｑ６１９８２（マウス））；およびノッチ４（Ｇｅｎｂａｎｋ受付番号Ｔ０９０５９（マウス））。以下のノッチ核酸配列は既知であり、本明細書の一部として援用する：ノッチ１（Ｇｅｎｂａｎｋ受付番号ＸＭ＿３４２３９２（ラット）およびＮＭ＿０１７６１７（ヒト））；ノッチ２（Ｇｅｎｂａｎｋ受付番号ＮＭ＿０２４３５８（ラット）、Ｍ９９４３７（ヒト）およびＡＦ３０８６０１（ヒト））；ノッチ３（Ｇｅｎｂａｎｋ受付番号ＮＭ＿００８７１６（マウス）およびＸＭ＿００９３０３（ヒト））；およびノッチ４（Ｇｅｎｂａｎｋ受付番号ＮＭ＿０１０９２９（マウス）およびＮＭ＿００４５５７　（ヒト））。

【００３０】

「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「核酸配列」の用語は、ここでは互換的に使用され、各々がデオキシリボヌクレオチドおよび／またはリボヌクレオチドのポリマーを指称する。デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドは、天然に生じることができ、またはその合成類似体であることができる。「核酸」は何れかの核酸を意味し、限定するものではないが、ＤＮＡ、ＲＮＡおよびそれらのハイブリッドを含むものである。核酸分子を形成する核酸塩基は、塩基Ａ，Ｃ，Ｇ，ＴおよびＵ、並びにそれらの誘導体であることができる。これら塩基の誘導体は当該技術において周知であり、ＰＣＲシステム、試薬および消耗品（PCR Systems, Reagents and Consumables；Perkin Elmer Catalogue 1996-1997, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, New Jersey, USA）に例示されている。核酸には、アンチセンス分子、およびリボザイム（ribozymes）およびＤＮＡザイム（DNAzymes）のような触媒核酸分子が含まれるが、限定されるものではない。核酸にはまた、１以上のアミノ酸残基の同一性の点で天然に生じる形態とは異なり、天然に生じる形態のペプチドの幾つかまたは全ての性質を共有するペプチド類似体、断片または誘導体（特定の全部よりも少ない残基を含む欠失類似体；１以上の残基が１以上の残基で置き換えられた置換類似体；ペプチドの末端または中間部分に１以上の残基が加えられた付加類似体）をコードする核酸が含まれる。

【００３１】
「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、ここでは互換的に用いられ、各々がアミノ酸残基のポリマーを意味する。該アミノ酸残基は天然に生じるもの、またはその化学的類似体であることができる。ポリペプチド、ペプチドおよびタンパク質はまた、グリコシル化、脂質結合、硫酸化、ヒドロキシル化、およびＡＤＰ－リボシル化のような修飾を含むことができる。
【００３２】
ここで用いるとき、「医薬的に許容可能な担体」とは、該担体が製剤の他の成分と適合し、そのレシピエントに対して有害でないことを意味し、標準的な医薬的に許容される担体の何れもが包含される。このような担体には、例えば、０．０１～０．１Ｍ、好ましくは０．０５Ｍのリン酸緩衝液、または０．８％の塩水が含まれる。加えて、このような医薬的に許容可能な担体は、水性または非水性の溶液、懸濁液、およびエマルジョンであることができる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、オレイン酸エチルのような注射可能な有機エステルである。水性担体には、水、アルコール／水の溶液、エマルジョンおよび懸濁液が含まれ、塩水およびバッファーされた媒質が含まれる。非経腸的担体には、塩化ナトリウム溶液、リンゲルのブドウ糖、ブドウ糖および塩化ナトリウム、乳酸加リンゲルおよび固定油が含まれる。静脈内担体には、流動物および栄養補充液、リンゲルのブドウ糖をベースとするもののような電解質補充液等が含まれる。防腐剤や、例えば抗菌剤、抗酸化剤、キレート化剤、不活性ガス等のような他の添加剤が存在してもよい。
【００３３】
「患者」とは、マウス、ラット、イヌ、モルモット、ケナガイタチ、ウサギおよび霊長類のような哺乳類を含む如何なる生物をも意味するものである。一つの実施形態において、患者はヒトである。
【００３４】
「治療する」とは、疾患または障害の進行を遅らせ、停止させ、または反転させることを意味する。ここで用いるとき、「治療する」とはまた、当該疾患または障害に付随しり症状の改善をも意味する。疾患には、腫瘍血管新生、アテローム性硬化症、創傷治癒、未熟児網膜症、前子癇（Pre-eclampsia）、糖尿病性網膜症、虚血、脳卒中、心臓血管系疾患、乾癬、リンパ浮腫、腫瘍形成、腫瘍リンパ管新生、加齢関連の黄斑変性症（age-related macular degeneration；ＡＭＤ）、湿潤型ＡＭＤ（wet AMD）、膵臓癌および乳癌が含まれるが、これらに限定されない。
【００３５】
血管新生は創傷治癒プロセス、女性の月経サイクル、および子宮内膜再構築の際、並びに胎児発生および器官成長の際に遭遇する。病理的設定においては、リウマチ性関節炎、乾癬、黄斑変性、糖尿病性網膜症および腫瘍増殖のような異なる疾患において、血管新生は重要な役割を果たす。
【００３６】
臨床的所見を含めて、異常な血管新生が、リウマチ性関節炎、炎症、癌、乾癬、変性眼症状（degenerative eye conditions）を含む多くの疾病条件に関与しているとの、インビボでのかなりの証拠が存在する。
【００３７】
ノッチ融合タンパク質を使用するための他の疾患は、限定されるものではないが、糖尿病、肥満、前糖尿病状態、アテローム性硬化症、虚血、脳卒中、心臓血管系疾患、インスリンの発現調節、およびインスリンの機能調節のような代謝障害である。
【００３８】
ノッチ融合タンパク質の使用はまた、メタボリック症候群についての適応症が指示されており、これは心臓血管系疾患および糖尿病の人々へのリスクを増大させる医学的障害の組み合わせを言う。このような症候群を指称する他の知られた名称は、シンドロームＸ、インスリン耐性症候群、レバン氏症候群（Reaven’s syndrome）である。該症候群の幾つ

かの特徴には、空腹時高血糖、高血圧、中心性肥満（内臓肥満としても知られる）、高密度リポタンパク質（ＬＤＬ）減少、高トリグリセド、高尿酸レベルが含まれる。上記で述べた空腹時高血糖は、２型糖尿病または空腹時血糖以上および耐糖能異常、またはインスリン耐性を含んでいる。メタボリック症候群に加えて、ノッチデコイは前糖尿病状態についての適応症を有する可能性がある。

【００３９】

単位、接頭語および記号は、それらのＳＩ許容形で表示されてよい。他に別途支持しない限り、核酸配列は左から右へと５’から３’の向きで、またアミノ酸配列は左から右へとアミノ端末からカルボキシ端末への向きで記載される。アミノ酸は、ここではそれらの普通に知られた三文字記号により、またはＩＵＰＡＣ－ＩＵＢバイオケミカル命名委員会が推奨する一文字記号によって指定されてよい。

【００４０】

ここでは以下の略語が用いられる。ＥＣＤ：細胞外ドメイン、ＩＣ：細胞間ドメイン、ＮＥＣＤ／Ｆｃ：ノッチをベースとする融合タンパク質、Ｎ１：ノッチ１、Ｎ２：　ノッチ２、Ｎ３：ノッチ３、Ｎ４：ノッチ４、Ｄｌｌ：デルタ様、ＤＬＬ１：デルタ様１、ＤＬＬ４：デルタ様４、ＪＡＧ：ＪＡＧＧＥＤ、ＪＧ：ＪＡＧＧＥＤ、ＪＡＧＧＥＤ－１：ＪＡＧＧＥＤ１、ＪＧ１：ＡＧＧＥＤ１、ＥＣ：内皮細胞、ＨＵＶＥＣ：ヒト臍帯静脈内皮細胞、ｍ．ｏ．ｉ．：感染多重度、ＶＥＧＦ：血管内皮細胞増殖因子、ＶＥＧＦＲ：血管内皮細胞増殖因子受容体、ｓｐ：シグナルペプチド、ＰＤＧＦ：血小板由来成長因子、ＰＤＧＦＲ：血小板由来成長因子受容体、Ｐ１ＧＦ：胎盤成長因子。

【００４１】

＜発明の実施形態＞

一つの実施形態において、前記融合タンパク質は連続的アミノ酸を含んでなる融合タンパク質であり、当該融合タンパク質のＮ末端で始まる前記連続的アミノ酸の配列が下記のアミノ酸配列：

（ａ）ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインと、

（ｂ）これに続く、抗体のＦｃ部分

と同一であり、

前記ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインが、

（ｉ）ＥＧＦ様反復１０のＮ末端に存在するアミノ酸で開始し、

（ｉｉ）少なくとも、ＥＧＦ様反復２３のＣ末端アミノ酸を通して伸びる

ものである。

【００４２】

もう一つの実施形態において、本発明の融合タンパク質は、ＥＧＦ様反復２４のＣ末端アミノ酸まで伸びるヒト・ノッチ１受容体タンパク質における細胞外ドメインのアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含んでなるものである。

【００４３】

もう一つの実施形態において、前記連続的アミノ酸の配列は、２４位のシステインで始まり８３３位のリジンで終わる配列番号３に記載の配列を含んでなるものである。

【００４４】

もう一つの実施形態において、本発明の融合タンパク質は、ＥＧＦ様反復３６のＣ末端アミノ酸にまで伸びるヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインにおけるアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含んでなるものである。

【００４５】

もう一つの実施形態において、前記連続的アミノ酸の配列は、２４位のシステインで始まり１３１８位のリジンで終わる配列番号５に記載の配列を含んでなるものである。

【００４６】

本発明の融合タンパク質の何れかのもう一つの実施形態において、前記抗体のＦｃ部分はヒト抗体のＦｃ部分である。

【００４７】

本発明の融合タンパク質のもう一つの実施形態において、（ａ）ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインにはシグナルペプチドが先行している。更なる実施形態において、前記シグナルペプチドは、ヒト・ノッチタンパク質のシグナルペプチド、またはＩｇＧ重鎖のシグナルペプチドである。

【００４８】

本発明の融合タンパク質の何れかのもう一つの実施形態において、前記ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列は、ＥＧＦ様反復２４のＣ末端アミノ酸まで伸びる。更なる実施形態において、前記融合タンパク質は、配列番号３に記載の連続的アミノ酸の配列を含んでなるものである。

【００４９】

本発明の融合タンパク質の何れかのもう一つの実施形態において、前記ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列は、ＥＧＦ様反復３６のＣ末端アミノ酸まで伸びる。更なる実施形態において、前記融合タンパク質は、配列番号５に記載の連続的アミノ酸の配列を含んでなるものである。

【００５０】

本発明の融合タンパク質の何れかおよび担体を含んでなる組成物もまた提供される。

【００５１】

一つの実施形態において、前記融合タンパク質は、医薬的に許容可能な担体の中に、ＪＡＧＧＥＤ－１の活性を阻害するのに十分な量で存在する。

【００５２】

加齢関連の黄斑変性症（ＡＭＤ）に罹患した患者を治療する方法であって、前記患者に対して、本発明の融合タンパク質の何れかを、前記患者のＡＭＤを治療するのに十分な量で投与することを含んでなる方法が提供される。

【００５３】

一つの実施形態において、前記ＡＭＤは湿潤型ＡＭＤ（wet AMD）である。もう一つの実施形態において、前記ＡＭＤは乾燥型ＡＭＤ（dry AMD）である。

【００５４】

また、糖尿病性網膜症に罹患した患者を治療する方法であって、前記患者に対して、本発明の融合タンパク質の何れかを、前記患者の糖尿病性網膜症を治療するのに有効な量で投与することを含んでなる方法が提供される。

【００５５】

本発明の何れかの方法の一実施形態において、当該方法は更に、血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）の阻害剤を投与することを含む。もう一つの実施形態では、前記ＶＥＧＦの阻害剤はＶＥＧＦ－Ａ、ＰＧＩＦ、ＶＥＧＦ－Ｂ、ＶＥＧＦ－Ｃ、またはＶＥＧＦ－Ｄの阻害剤である。

【００５６】

本発明の方法の何れかの一つの実施形態において、当該方法は更に、ＶＥＧＦ受容体阻害剤を投与することを含む。もう一つの実施形態において、前記ＶＥＧＦ受容体阻害剤はＶＥＧＦＲ－１またはＶＥＧＦＲ－２阻害剤である。

【００５７】

また、癌に罹患した患者を治療する方法であって、前記患者に対して、本発明の融合タンパク質の何れかを、前記患者の癌を治療するのに有効な量で投与することを含んでなる方法も提供される。

【００５８】

一実施形態において、前記癌は膵臓癌である。もう一つの実施形態において、前記癌は乳癌である。

【００５９】

また、加齢関連の黄斑変性（ＡＭＤ）に罹患した患者を治療する方法であって、前記患者に対して、前記患者のＡＭＤを治療するのに有効な量で融合タンパク質を投与することを含んでなり、前記融合タンパク質は連続的アミノ酸を含み、その配列は前記融合タンパ

ク質のＮ末端で開始し、且つ下記アミノ酸の配列：
（ａ）ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメイン、および
（ｂ）これに続く抗体のＦｃ部分
と同一であり、
前記ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインは
（ｉ）ＥＧＦ様反復９のＮ末端に存在するアミノ酸を含み、
（ｉｉ）少なくともＥＧＦ様反復１３のＣ末端アミノ酸を通して伸びる
方法が提供される：
ただし、前記Ｎ末端アミノ酸がＥＧＦ様反復１のＮ末端アミノ酸であれば、前記Ｃ末端アミノ酸はＥＧＦ様反復３６のＣ末端アミノ酸ではない。

【００６０】
一つの実施形態において、ＡＭＤは湿潤型ＡＭＤである。もう一つの実施形態において、前記ＡＭＤは乾燥型ＡＭＤである。

【００６１】
また、糖尿病性網膜症に罹患した患者を治療する方法であって、前記患者に対して、前記患者の糖尿病性網膜症を治療するのに有効な量で融合タンパク質を投与することを含んでなり、前記融合タンパク質は連続的アミノ酸を含み、その配列は前記融合タンパク質のＮ末端で開始し、且つ下記アミノ酸の配列：
（ａ）ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメイン、および
（ｂ）これに続く抗体のＦｃ部分
と同一であり、
前記ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインは
（ｉ）ＥＧＦ様反復９のＮ末端に存在するアミノ酸を含み、
（ｉｉ）少なくともＥＧＦ様反復１３のＣ末端アミノ酸を通して伸びる
方法が提供される：
ただし、前記Ｎ末端アミノ酸がＥＧＦ様反復１のＮ末端アミノ酸であれば、前記Ｃ末端アミノ酸はＥＧＦ様反復３６のＣ末端アミノ酸ではない。

【００６２】
本発明の何れかの方法の一実施形態において、前記方法は更に、血管内皮成長因子の（ＦＥＧＦ）阻害剤を投与することを含んでいる。更なる実施形態において、前記ＦＥＧＦの阻害剤はＶＥＧＦ－Ａ、ＰＧＩＦ、ＶＥＧＦ－Ｂ、ＶＥＧＦ－Ｃ、またはＶＥＧＦ－Ｄの阻害剤である。

【００６３】
本発明の何れかの方法の一実施形態において、前記方法は更に、ＶＥＧＦ受容体阻害剤を投与することを含む。更なる実施形態において、前記ＦＥＧＦ受容体阻害剤は、ＶＥＧＦＲ－１またはＶＥＧＦＲ－２阻害剤である。

【００６４】
また、癌に罹患した患者を治療する方法であって、前記患者に対して、前記患者の癌を治療するのに有効な量で融合タンパク質を投与することを含んでなり、前記融合タンパク質は連続的アミノ酸を含み、その配列は前記融合タンパク質の開始し、且つ下記アミノ酸の配列：
（ａ）ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメイン、および
（ｂ）これに続く抗体のＦｃ部分
と同一であり、
前記ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインは
（ｉ）ＥＧＦ様反復９のＮ末端に存在するアミノ酸を含み、
（ｉｉ）少なくともＥＧＦ様反復１３のＣ末端アミノ酸を通して伸びる
方法が提供される：
ただし、前記Ｎ末端アミノ酸がＥＧＦ様反復１のＮ末端アミノ酸であれば、前記Ｃ末端アミノ酸はＥＧＦ様反復３６のＣ末端アミノ酸ではない。

【００６５】
一つの実施形態において、前記癌は膵臓癌である。もう一つの実施形態において、前記癌は乳癌である。
【００６６】
本発明の何れかの方法の一実施形態において、前記ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列は、ＥＧＦ様反復９のＮ末端に存在するアミノ酸で開始され、且つＥＧＦ様反復２３のＣ末端アミノ酸まで伸びる。
【００６７】
本発明の何れかの方法の一実施形態において、前記ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列は、ＥＧＦ様反復９のＮ末端に存在するアミノ酸で開始され、且つＥＧＦ様反復３６のＣ末端アミノ酸まで伸びる。
【００６８】
本発明の何れかの方法の一実施形態において、前記ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列は、ＥＧＦ様反復１のＮ末端に存在するアミノ酸で開始され、且つＥＧＦ様反復１３のＣ末端アミノ酸まで伸びる。
【００６９】
本発明の何れかの方法の一実施形態において、前記ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列は、ＥＧＦ様反復１のＮ末端に存在するアミノ酸で開始され、且つＥＧＦ様反復２４のＣ末端アミノ酸まで伸びる。
【００７０】
本発明の何れかの融合タンパク質の一実施形態において、ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列は、ＥＧＦ様反復１０～２４からなっている。更なる実施形態において、前記融合タンパク質は連続するアミノ酸を含んでなり、その配列は配列番号３に記載されている。
【００７１】
本発明の何れかの融合タンパク質の一実施形態において、ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列は、ＥＧＦ様反復１０～３６からなっている。更なる実施形態において、前記融合タンパク質は連続するアミノ酸を含んでなり、その配列は配列番号５に記載されている。
【００７２】
本発明の何れかの融合タンパク質の一実施形態において、ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列は、ＥＧＦ様反復１４～２４からなっている。更なる実施形態において、前記融合タンパク質は連続するアミノ酸を含んでなり、その配列は配列番号７に記載されている。
【００７３】
本発明の何れかの融合タンパク質の一実施形態において、ヒト・ノッチ１受容体タンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列は、ＥＧＦ様反復１４～３６からなっている。更なる実施形態において、前記融合タンパク質は連続するアミノ酸を含んでなり、その配列は配列番号９に記載されている。
【００７４】
本発明の何れかの融合タンパク質の一実施形態において、前記抗体のＦｃ部分はヒト抗体のＦｃ部分である。本発明の何れかの融合タンパク質のもう一つの実施形態において、前記シグナルペプチドはヒト・ノッチ１タンパク質のシグナルペプチド、またはＩｇＧ重鎖のシグナルペプチドである。
【００７５】
ここに記載する融合タンパク質の何れか一つと、医薬的に許容可能な担体とを含有する医薬組成物もまた提供される。
【００７６】
本発明は、患者における加齢関連の黄斑変性症（ＡＭＤ）を治療する方法であって、前記患者に対して、本発明の何れか一つの融合タンパク質を、前記患者を治療するのに有効

な量で投与することを含んでなり、それによって患者におけるＡＭＤを治療する方法を提供する。

【００７７】

一つの実施形態において、前記融合タンパク質は、患者における加齢関連の黄斑変性症を治療することに使用するための、本発明の融合タンパク質の何れか一つである。

【００７８】

本発明はまた、患者における加齢関連の黄斑変性症（ＡＭＤ）を治療する方法であって、前記患者に対して、ＪＡＧＧＥＤ－１阻害剤を、血管新生を減少させるのに有効な量で投与することを含んでなり、それによって患者におけるＡＭＤを治療する方法を提供する。一つの実施形態において、前記ＡＭＤは湿潤型ＡＭＤである。もう一つの実施形態において、前記ＪＡＧＧＥＤ阻害剤はノッチ１融合タンパク質である。

【００７９】

例えば、ニューヨーク市のコロンビア大学信託財団の名義で２００８年８月２２に出願されたＰＣＴ国際出願番号ＰＣＴ／ＵＳ２００８／０１００４５には、追加のノッチ１融合タンパク質が記載されており、その全ての内容を本明細書の一部として本願に援用する。もう一つの実施形態において、前記ノッチ１融合タンパク質は、ここに記載する融合タンパク質の何れかである。

【００８０】

本発明はまた、患者における加齢関連の黄斑変性を治療することに使用するための、ＪＡＧＧＥＤ－１阻害剤を提供する。一つの実施形態において、前記ＡＭＤは湿潤型ＡＭＤである。もう一つの実施形態において、前記ＪＡＧＧＥＤ阻害剤はノッチ１融合タンパク質である。もう一つの実施形態において、前記ノッチ１融合タンパク質は、ここに記載した融合タンパク質の何れかである。

【００８１】

本発明の一つの実施形態において、前記方法は更に、血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）の阻害剤を投与することを含んでいる。更なる実施形態において、前記ＶＥＧＦの阻害剤は、ＶＥＧＦ－Ａ、ＰＧＩＦ、ＶＥＧＦ－Ｂ、ＶＥＧＦ－Ｃ、またはＶＥＧＦ－Ｄの阻害剤である。

【００８２】

本発明の一実施形態において、前記方法は更に、ＶＥＧＦ受容体阻害剤を投与することを含んでいる。更なる実施形態において、前記ＶＥＧＦ受容体阻害剤は、ＶＥＧＦＲ－１またはＶＥＧＦＲ－２阻害剤である。

【００８３】

本発明は、患者における膵臓癌を治療する方法であって、前記患者に対して、ここに記載した融合タンパク質の何れか一つを、前記患者を治療するのに有効な量で投与することを含んでなり、それによって膵臓癌を有する前記患者を治療する方法を提供する。

【００８４】

一つの実施形態において、前記融合タンパク質は、患者において膵臓癌を治療することに使用するための本発明の融合タンパク質の何れか一つである。

【００８５】

本発明は、腫瘍増殖を遅延させまたは阻害する方法であって、前記腫瘍は膵臓癌細胞を含んでなり、前記方法は、前記腫瘍を、前記腫瘍の増殖を遅延または阻害するのに有効なある量の、ここに記載した融合タンパク質の何れかと接触させることを含んでなる方法を提供する。

【００８６】

一つの実施形態において、前記融合タンパク質は、腫瘍増殖を阻害することに使用するための本発明の融合タンパク質の何れか一つであり、前記腫瘍は膵臓癌を包含するものである。

【００８７】

本発明は、患者における乳癌を治療する方法であって、前記患者に対して、本発明の融

合タンパク質の何れか一つを、前記患者を治療するのに有効な量で投与することを含んでなり、それによって患者における乳癌を治療する方法を提供する。

【００８８】

一つの実施形態において、前記融合タンパク質は、患者において乳癌を治療することにおいて使用するための、本発明の融合タンパク質の何れか一つである。

【００８９】

本発明は、腫瘍増殖を遅延または阻害する方法であって、前記腫瘍は乳癌細胞を包含するものであり、前記方法は、前記腫瘍を、前記腫瘍の増殖を遅延または阻害するのに有効な量で本発明の融合タンパク質の何れか一つと接触させることを含んでなる方法を提供する。

【００９０】

一つの実施形態において、前記融合タンパク質は、腫瘍増殖を阻害することにおいて使用するための本発明の融合タンパク質の何れか一つであり、前記腫瘍は乳癌細胞を包含するものである。

【００９１】

本発明を、以下の実験の詳細の項において例示する。この項は、本発明の理解を助けるために記載するものであり、後述の特許請求の範囲に記載する本発明を限定することを意図したものではなく、そのような限定として解釈されるべきではない。

【実験の詳細】

【００９２】

第一実験シリーズ：

＜序＞

ノッチ信号伝達は、ノッチ受容体およびリガンドが相互作用することを可能にする細胞－細胞接触を必要とする。ノッチ細胞外ドメインの主な部分は、Ca^{2+}－結合コンセンサス配列を含んだ３６以下のＥＧＦ様反復を含んでいる。ノッチリガンドはまた、それらの細胞外領域にＥＧＦ様反復を含んでいるが、それらはシステインに富んだドメインの存在または不存在により識別することができる。ＪＡＧＧＥＤリガンドファミリーは、１６のＥＧＦ様反復およびシステインに富んだドメインを含んでいるのに対して、デルタ様リガンドファミリーは８以下のＥＧＦ様反復を含んでいる。幾つかの証拠は、ＤＳＬ領域がノッチ結合に特異性を与え、またＣ末端ＥＧＦ様反復が容易な結合を補助することを示した（Shimizu et al.; Glittenberg et al.; Henderson et al.）。ここでは、ＥＧＦ様反復１１～１３が、ノッチ／Ｄ１１１とノッチ／ＪＡＧＧＥＤ－１の相互作用のために必要であることが示される。

【００９３】

新規な可溶性構築物が、ノッチ１阻害剤としてのヒトＩｇＧ・Ｆｃ（ノッチ１デコイ）と融合された、ラット・ノッチ１細胞外ドメインの３６－ＥＦＧ様反復に基づいて作成された（Funahashi et al.）。ノッチ１デコイは、ノッチリガンドＪＡＧＧＥＤ－１、Ｄｌｌ１、およびＤｌｌ４によって刺激されたノッチ活性を阻害することが示された。この発見は、ＥＧＦ様反復がノッチ１リガンドと効果的に相互作用するのに十分であり、従ってノッチ受容体がそのリガンドにより活性化されるのを防止するのに十分であることを意味している。ノッチリガンドの特異性は、この細胞外ＥＧＦ様反復によって決定されるかどうかが研究された。加えて、ノッチは抗血管新生療法の標的の一つであることが十分に確立されており、従って我々は、治療目的のために、ヒト・ノッチ１に基づく新たなノッチ１デコイ構築物を創出した。ラット・ノッチ１およびヒト・ノッチ１のタンパク質配列は９８％相動性（９２．６％同一）であり、またラットおよびヒト・ノッチ１デコイは、ノッチ信号伝達および機能の試験において識別できない活性を有することが示されてきた。ここでは、単にノッチ１デコイと称されるヒト・ノッチ１デコイが、次章でのインビトロ研究、並びにインビボおよび腫瘍実験において用いられる。

【００９４】

ノッチ経路の広範な遺伝子的研究および細胞的研究にも拘わらず、ノッチ－リガンド相

互作用の分子的特徴付けは未だ謎のままである。ノッチ－リガンド認識の分子的基礎の理解を増大させるために、ＥＧＦ様反復１～１３および１～２４を含むノッチデコイの短縮型断片が作成された。ＥＧＦ様反復１１～１３はリガンド結合に関与しているので、該１１～１３はリガンド結合活性を未だ保持する最短縮形態のノッチであろうと仮定された。ノッチ１デコイ１～３６の分子量は、そのグリコシル化された分泌形態において約１８０ｋＤであるか、または２５０ｋＤを超え、従って、それは治療目的のために更に高いレベルで製造および分泌されるように修飾または短縮され得るかが調査された。これらの新規なデコイ変異体は、それらの阻害効果並びにそれらのリガンド特異性を評価するために利用された。ここに記載した結果は、ノッチ１デコイ１～１３がＤＬＬ４特異的阻害剤として作用し、またノッチ１デコイ１～２４が汎ノッチ阻害剤として働くことを示している。

【００９５】

ＪＡＧＧＥＤ－１特異的阻害剤もまた成功裏に構築された。１０～２４、１０～３６および１４～３６を含む第二世代のノッチ１デコイが構築され、試験された。ノッチ１デコイ１０～２４だけが、ＪＡＧＧＥＤ－１特異的であり、また内皮細胞ベースの試験、網膜血管新生、および遺伝子プロファイリング解析において異なる活性を示すことが証明された。それらの多様な活性に基づき、可能な抗腫瘍剤および抗血管新生剤としてのデコイ１～１３、１０～２４、および１～２４を用いて腫瘍研究が行われた。

【００９６】

＜材料および方法＞

・ノッチ１デコイ変異体の創生：

全長ノッチ１デコイ１～３６およびノッチデコイ１～２４が、図１（ａ）に示されている。ノッチ１デコイ１～３６および１～２４構築物のＰＣＲ変異形成から誘導された、四つの短縮型ノッチ１デコイ変異体が作製された。これらは、ノッチ１０～３６デコイ、ノッチ１４～３６デコイ、ノッチ１０～２４デコイおよびノッチ１４～２４デコイであった。これらデコイの模式図が、図１ｂに記載されている。ヒト・ノッチ１のアミノ酸配列が配列番号１に記載されている。ヒト・ノッチ１デコイ１０～２４の核酸配列が配列番号２に記載されており、そのアミノ酸配列は配列番号３に記載されている。ヒト・ノッチ１デコイ１０～３６の核酸配列は配列番号４に記載されており、そのアミノ酸配列は配列番号５に記載されている。ヒト・ノッチ１デコイ１４～２４の核酸配列は配列番号６に記載されており、そのアミノ酸配列は配列番号７に記載されている。ヒト・ノッチ１デコイ１４～２６の核酸配列は配列番号８に記載されており、そのアミノ酸配列は配列番号９に記載されている。

【００９７】

・２９３Ｔ細胞における短縮型ノッチ１デコイ変種の発現および分泌：

２９３Ｔ細胞に、リン酸カルシウムトランスフェクションにより、ｐＣＣＬベースのノッチ１デコイプラスミドを形質移入させた。形質移入の２日後に、全細胞溶解物を収集し、ウサギ抗ヒトＦｃ抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。ノッチ１デコイ１～１３、１～２４および１～３４の分子量は、それぞれ　８３ｋＤ、１２７ｋＤ、および１７８ｋＤである。図２ａ参照。ノッチ１デコイ１０～３６、１４～３６、１０～２４および１４～２４の分子量は、それぞれ１４０ｋＤ、１２８ｋＤ、９１ｋＤおよび７３ｋＤである。図２ｂ参照。

【００９８】

・ノッチレポータ試験：

ノッチ信号伝達に対するノッチデコイ類の効果を試験するために、ルシフェラーゼ遺伝子に連結された複数のＣＳＬ結合部位を含むノッチレポータ構築物（１１ＣＳＬ－Ｌｕｃ）を利用した。ノッチ信号伝達の活性化は、ノッチリガンドを発現するＨｅＬａ細胞と共培養された、ノッチ１および１１ＣＳＬ－Ｌｕｃを発現するＨｅＬａ細胞において測定した。全てのノッチデコイ類は、ＤＬＬ４に誘導されたノッチ信号伝達を阻害した。しかし、ノッチ１～１３はＪＡＧＧＥＤ－１を阻害しなかった。平均ルシフェラーゼ誘導倍率±Ｓ．Ｄ．　＊Ｐ値＜０．００２。図３参照。ＥＧＦ様反復１～９は、ＤＬＬ４に誘導さ

れたノッチ信号伝達を阻害するために不可欠であることが示された（図４ａ参照）。ノッチ１デコイ１０～２４だけがＪＡＧＧＥＤ－１をブロックでき、ＥＧＦ様反復１０～２４がＪＡＧＧＥＤ－１特異性を保有し得ることが示された。図４ｂ参照。

【００９９】

・ノッチ１デコイと可溶性リガンドとの同時形質移入：

ノッチ１デコイを、可溶性リガンドと共に（図５ａ参照）または全長いリガンドと共に（図５ｂ参照）、２９３Ｔ細胞に同時形質移入した。２９３細胞は、ｐｃＤＮＡ３．１－デコイ、およびｐＣＲＩＩＩ－ＤＬＬ４－ＦＬＡＧもしくはｐＣＲＩＩＩ－ＪＡＧＧＥＤ－１－ＦＬＡＧ、または空のベクターを用いて同時形質移入された。タンパク質複合体としての前記デコイおよびリガンドの相互作用を安定化させるために、架橋剤のＤＳＧもまた添加された。次いで、細胞溶解物を収集し、プロテインＡ／Ｇアガロースによりプルダウンした。次いで、このプルダウン複合体を、抗ＦＬＡＧ抗体により免疫ブロットした。ノッチ１デコイ１～１３はＤＬＬ４と相互作用し、またノッチ１デコイ１０～２４はＪＡＧＧＥＤ－１と相互作用した。

【０１００】

・共免疫沈降アッセイ：

ノッチ１デコイおよび全長ノッチ１受容体を用いて共免疫沈降が行われた。細胞溶解物をプロテインＡ／Ｇアガロースによりプルダウンし、抗Ｆｃ抗体または抗ノッチ１抗体を用いてブロッティングした。ノッチ１デコイは、ノッチ１受容体と相互作用しない。図６参照。

【０１０１】

・網膜血管新生：

異なるデコイ類（１～１３、１０～２４、１～２４、および１～３６）を発現する５０μＬの５．０×10^9ｆｆｕ／ｍＬのアデノウイルス、または５０μＬの２ｍｇ／ｍＬＤＡＰＴをＰ２新生児瞳孔の中に皮下注射した。Ｐ５で網膜を採取し、網膜血管についてイソレクチンＢ４を用いて固定および免疫染色した。該デコイ類の発現および分泌を、血清のヒトＦｃウエスタンブロッティングにより確認した。結果を図７ａ～図７ｄに示す。ノッチ１デコイ１～１３および１０～２４は、網膜血管新生に対して逆の影響を示した。

【０１０２】

・遺伝子発現プロファイリング：

ｉ）初代細胞および癌細胞株

細胞培養は、５％CO_2および９５％加湿空気中において３７℃で維持した。ＨＵＶＥＣは、ＥＧＭ－２培地（ロンザグループ、ウオーカーズビル、ＭＤ）中で増殖させた。Ｍｍ５ＭＴ、ＬＬＣ、およびＢ１６－Ｆ１０は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC, Manassas, VA）から得たものであった。癌細胞株は、１０％仔牛血清（ＦＢＳ）およびＰｅｎ－Ｓｔｒｅｐを含む１×高グルコース濃度ＤＭＥＭ（Invitrogen, Carlsbad, CA）中で維持した。

【０１０３】

ｉｉ）ノッチ１デコイを発現するＨＵＶＥＣ

逆転写および定量的ＲＴ－ＰＣＲのために、レンチウイルスで形質導入したＨＵＶＥＣからＲＮＡを収集した。

【０１０４】

ノッチ受容体、ノッチ１～ノッチ４のｍＲＮＡ転写物について、定量的ＲＴ－ＰＣＲを行った。結果を図８ａ～図８ｄに示す。平均相対値±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．０３

ＨＥＹ１およびＨＥＹ２のｍＲＮＡ転写物について、定量的ＲＴ－ＰＣＲを行った。全てのノッチ１デコイがＨＥＹ１を下方調節したが、１～１３および１～２４だけがＨＥＹ２を下方調節した。結果を図９ａおよび図９ｂに示す。平均相対値±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．０３

ＨＥＹＬおよびＨＥＳ１のｍＲＮＡ転写物について、定量的ＲＴ－ＰＣＲを行った。ノッチ信号伝達の下流標的、即ちＨＥＹＬおよびＨＥＳ１もまた、ＨＵＶＥＣにおけるノッ

チ１デコイの発現によって下方調節された。結果を図１０ａおよび図１０ｂに示す。平均相対値±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．０３

ＤＬＬ４、ＪＡＧＧＥＤ－１、ＶＥＧＦＲ－１、ＶＥＧＦＲ－２およびＶＥＧＦＲ－３のｍＲＮＡ転写物について、定量的ＲＴ－ＰＣＲを行った。ノッチ１デコイ１～１３および１０～２４は、ＶＥＧＦＲ－１転写物の異なる影響を有していた。結果を図１１ａ～図１１ｅに示す。平均相対値±Ｓ．Ｄ．＊Ｐ値＜０．０３

ｉｉｉ）癌細胞株の遺伝子発現プロファイリング

四つの異なる細胞株：マウス乳腺腫瘍細胞（Ｍｍ５ＭＴ）、ヒト膵臓癌細胞（ＫＰ１）、マウス・ルイス肺癌細胞（ＬＬＣ）、およびマウス・メラノーマ細胞（Ｂ１６－Ｆ１０）を利用した。循環腫瘍細胞からＲＮＡを単離し、逆転写した。ＰＣＲを行って、これら細胞株における全てのノッチ受容体およびリガンドの発現を探索した。このＰＣＲの結果を図１４に示す。

【０１０５】

・細胞増殖およびアポトーシス細胞試験：

腫瘍細胞は、異なるノッチ１デコイ変異体をレンチウイルスで形質導入され、細胞増殖およびアポトーシスについて評価された。アポトーシス試験は、ＦＩＴＣ結合型のアネキシンＶ抗体を用いて行われた。アポトーシス細胞のパーセンテージを、図１５ｃおよび図１５ｄの右上象限に示した。

【０１０６】

・ウエスタンブロッティングおよび免疫染色によるノッチ１検出

ノッチ１デコイ１～１３、１０～２４および１～２４、または対照としてのＦｃを発現するアデノウイルスを、成人マウスに静脈注射した。ウエスタンブロット分析を行った。図１６ａ参照。腫瘍を収集し、腫瘍切片中のデコイレベルを免疫蛍光法により評価した。図１６ｂ参照。結果を図１６ａおよび図１６ｂに挙げた。

【０１０７】

・腫瘍増殖実験：

Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４およびＫＰ１－ＶＥＧＦ腫瘍細胞を、最初にレンチウイルスで形質移入してルシフェラーゼを発現させ、ルシフェラーゼ活性または発光信号で腫瘍増殖をモニターした。実験は２方向で行った：第一にはレンチウイルス形質導入により、第二にはアデノウイルスを使用することによって、異なるノッチ１デコイまたはＦｃを直接腫瘍細胞の中に導入した。腫瘍低酸素症および血管灌流を解析するために、腫瘍収集の前に、組織における低酸素症のマーカーであるヒポキシプローブ（登録商標：Hypoxyprobe）、およびＦＩＴＣに結合されたレクチンをマウスに注射した。ゼノジェン（Xenogen）ＩＶＩＳ撮像システムを使用して、発光信号からの総放射輝度を評価することにより腫瘍増殖をモニターした。平均総フラックス±Ｓ．Ｄ．　＊Ｐ値＜０．０５（ｎ＝４～５）。結果は図１７ａ～図１７ｃ、および図１８ａ～図１８ｃに記載されている。

【０１０８】

・腫瘍血管の特徴付け：

エンドムチン陽性（Endomucin-positive）の領域（緑）およびＤＬＬ４（赤）について、腫瘍切片を免疫染色した。平均エンドムチン陽性領域±Ｓ．Ｄ．　＊Ｐ値＜０．００３（ｎ＝４～５）。縮尺バー：３０マイクロメータ。結果を、図１９ａおよび図１９ｂ、並びに図２０ａおよび図２０ｂに記載した。

【０１０９】

フルオレセインに結合されたレクチン（１００μｇ）を、腫瘍収集の２分前にマウスに注射した。エンドムチン（赤）について腫瘍切片を免疫染色し、また灌流レクチン（緑）は腫瘍血管と結合された。血管と結合したレクチンの量は機能性の腫瘍血管を反映する。平均レクチン陽性面積±Ｓ．Ｄ．　＊Ｐ値＜０．００６（ｎ＝４～５）。縮尺バー：３０マイクロメータ。結果を、図２１ａおよび図２１ｂに記載した。

【０１１０】

・Ｍｍ５ＭＴおよびＫＰ１腫瘍切片に対するＮＧ２およびエンドムチン免疫蛍光法：

腫瘍切片を、エンドムチン（緑）およびＮＧ２（赤）について同時免疫染色した。ＮＧ２陽性領域のパーセンテージを、腫瘍における周皮細胞補充のパラメータとして測定した。平均ＮＧ２陽性面積±Ｓ．Ｄ．　＊Ｐ値＜０．０２（ｎ＝４～５）。縮尺バー：１０マイクロメータ。結果を、図２２ａおよび図２２ｂに記載した。

【０１１１】

・腫瘍の浸潤および転移：

ルシフェラーゼを発現する皮下ＬＬＣおよびＢ１６－Ｆ１０腫瘍を使用して、腫瘍の浸潤および転移におけるノッチ１デコイ活性を評価した。腫瘍を有するマウスの写真が、異なるデコイ群（１～１３、１０～２４および１～２４）からの発光信号を用いて第１２日に撮られた。腫瘍増殖は、総放射輝度に基づいてモニターおよび定量された。平均総フラックス±Ｓ．Ｄ．（ｎ＝５）。腫瘍重量を、腫瘍収集前の１２日に測定した。平均腫瘍重量±Ｓ．Ｄ．　＊Ｐ値＜０．０５（ｎ＝５）。結果を、図２３ａ～図２３ｃおよび図２４ａ～図２４ｃに記載した。

【０１１２】

腫瘍を有するマウスから、第１２日に肺および肝臓を収集し、３０ｍｇ／ｍＬのＤ－ルシフェリン中でインキュベートし、ゼノジェン（Xenogen）撮像システムＩＶＩＳ撮像システムにより解析した。各群からのマウスは、ＬＬＣモデルについては第１２日に肺転移を発症し、腫瘍負荷はグループ間で顕著には異ならなかった。何れのグループにおいても、肝臓転移は存在しなかった。平均総フラックス±Ｓ．Ｄ．（ｎ＝５）。その結果を図２５ａおよび図２５ｂに示す。

【０１１３】

腫瘍を有するマウスから、第１２日に肺および肝臓を収集し、３０ｍｇ／ｍＬのＤ－ルシフェリン中でインキュベートし、ゼノジェン（Xenogen）ＩＶＩＳ撮像システムにより解析した。器官の画像は、肺（図２６ａおよび図２６ｂ）および肝臓（図２６ｃ）においてＦｃ群から転移病巣が表示された。デコイ治療群には転移は見られなかった。Ｂ１６－Ｆ１０腫瘍を有するマウスは、デコイ治療群において肺転移および肝臓転移の発症において遅延を示した。

【０１１４】

＜結果＞

・ＪＡＧＧＥＤ－１特異的ノッチデコイの構築

幾つかのインビトロ機能検定によって示されるように、ノッチ１デコイ変異体は、ノッチリガンドに応じて異なる阻害活性を示した。ノッチ１デコイ１～１３は、ＤＬＬ４に誘導されたノッチ信号伝達だけを阻害することが示され、機能検定におけるその阻害効果は、可溶性ＤＬＬ４－Ｆｃおよび抗ＤＬＬ４抗体を含む他のＤＬＬ４中和剤のそれと非常に類似していた。オリジナル構築物に基づけば、ＥＧＦ様反復１～２４は、ＤＬＬ４およびＪＡＧＧＥＤ－１に誘導されたノッチ活性化の両方について必要とされる。また、ＥＧＦ様反復１～１３は、Ｄｌｌ４だけでなくＪＡＧＧＥＤ－１をもブロックした。従って、ＥＧＦ様反復１４～２４および１４～３６は、ＪＡＧＧＥＤ－１特異性を示し得る。にもかかわらず、幾つかの系統の証拠は、ＪＡＧＧＥＤ－１とのノッチ相互作用に必要であることを示唆している。そこで、ノッチ１デコイ変異体１０～２４および１０～３６が、可能なＪＡＧＧＥＤ－１特異的物質として作製された。最初の９または１３ＥＧＦ様反復を欠失させるために、ノッチ１デコイ１～２４または１～３６プラスミドに対してＰＣＲ突然変異誘発を行った。この新たな構築物は、図２に示すように、２９３Ｔ細胞における発現および分泌によって確認された。それらの発現レベルは、より大きな変異体がより小さい変異体よりも低いレベルで発現および分泌された点において、以前のデコイ変異体の場合と同様であった。

【０１１５】

・ＥＧＦ様反復１～９または１～１３を欠失したノッチ１デコイ変異体は、
ＤＬＬ４をブロックできなかったが、ノッチ１デコイ１０～２４は
ＪＡＧＧＥＤ－１に誘導されたノッチ信号伝達を顕著に阻害した

ノッチ１デコイ１～１３は、ＤＬＬ４特異的な阻害剤として機能する。当該新規なノッチ１デコイの構築が達成された後に、共培養信号伝達アッセイを利用して、前記阻害効果およびリガンド特異性を試験した。全ての第二世代ノッチ１デコイ類は、ＤＬＬ４に誘導されたノッチ信号伝達を阻害しなかった（図３ａ～図３ｃ）。これは、ＤＬＬ４との受容体相互作用のために、ＥＧＦ様反復１～９が必要であることを示唆した。しかしながら、ノッチ１デコイ１０～２４は、ＪＡＧＧＥＤ－１に誘導されたノッチ信号伝達を顕著にブロックする一方、他のデコイ類は如何なる効果も有さなかった（図４ａ～図４ｂ）。ノッチ１デコイ１０～３６もまた僅かなＪＡＧＧＥＤ－１阻害を示したが、その阻害効果は一貫せず、或いは顕著でなかった。ＥＧＦ様反復１１～１３は、デルタ様リガンドおよびＪＡＧＧＥＤリガンドの両者と相互作用することが知られているが、ここに記載した細胞ベースの信号伝達アッセイは、ＥＧＦ様反復１～９の不存在によってノッチ受容体の親和性がＪＡＧＧＥＤ－１の方にシフトされるように見えるので、この発見は特に興味深いものである。

【０１１６】

・ノッチ１デコイは、特異性をもってノッチリガンドに結合する：

ノッチ１デコイはノッチ阻害剤であることが証明されており、また受容体デコイ自身の性質に基づいていること、それらはノッチリガンドと競合的に相互作用することによりノッチ信号伝達をブロックすること、並びにそれによってノッチ受容体が活性化されるのを防止することが仮定されている。阻害の機構を更に探究するために、ノッチ１デコイおよび全長ノッチリガンド，ＤＬＬ４およびＪＡＧＧＥＤ－１のを行った。予測した通り、ノッチ１デコイ１～１３は、ＤＬＬ４とだけ相互作用し、ＪＡＧＧＥＤ－１とは相互作用しない一方、ノッチ１デコイ１０～２４は、ＪＡＧＧＥＤ－１とだけ相互作用することが示された（図５ａおよび図５ｂ）。ノッチ１デコイ１～２４は、ＤＬＬ４およびＪＡＧＧＥＤ－１の両者と相互作用し、これは先の機能試験を支持した。

【０１１７】

ノッチ外部ドメインのオリゴマー化は現在のところ未知であるが、ノッチ１デコイがノッチ受容体と相互作用して、ノッチ活性をブロックできるかどうかを研究した。ノッチデコイおよび全長ラット・ノッチ１の共免疫沈降を２９３Ｔ細胞において行い、その結果を図６に示した。Ｆｃプルダウンからはノッチ１は検出されなかったことから、ノッチ１デコイはリガンドと競合し、受容体と相互作用しないことによって、ノッチ信号伝達を阻害するらしいことが示唆された。

【０１１８】

・ノッチ１デコイは、網膜血管新生において抗血管新生的である：

出世以後で早期のマウス網膜は、広範に研究された血管新生モデルである。それは、抹消での血管発芽、中心におけるポンピングおよびリモデリングを含む充分に定義された一連の事象において、血管パターンを発達させる。従って、網膜血管新生が、我々のノッチ１デコイの効果を更に研究するためのモデルとして利用された。ＤＬＬ４のブロックまたはＤＬＬ４の欠失は血管新生発芽を増大させる（Lobov et al.）のに対して、内皮細胞特異的ＪＡＧＧＥＤ－１の欠乏は、減少した血管新生発芽をもたらした（Benedito et al.）。網膜血管新生の一つの顕著な特徴は、血管全面の糸状仮足が伸びる内皮先端細胞（filopodia-extending endothelial tip cells）の出現である。ノッチデコイ１～１３は、網膜血管が先端細胞および血管新生発芽の数における顕著な増大を示すことにおいて、ＤＬＬ４欠乏を表現型模写した。しかしながら、ノッチデコイ１０～２４は、内皮細胞におけるＪＡＧＧＥＤ－１の喪失と同様に、減少した血管新生をもたらした。二つのデコイ間での網膜血管における相違は著しく劇的であり、ノッチリガンドの示差阻害（differential inhibition）を明瞭に示している。ノッチ１デコイ１～２４および１～３６、並びにＧＳＩ、ＤＡＰＴは、発芽血管新生を増大させたが、これを著しく混乱させた（図７ａ）。

【０１１９】

・ノッチ１デコイ変異体を発現するＨＵＶＥＣの遺伝子プロファイリングは、

それらがノッチ信号伝達をブロックすることを示す。

【０１２０】

次に、ノッチ信号伝達およびその下流標的に対するノッチ１デコイの影響を探索した（図８～図１１参照）。ノッチ１の転写レベルは、該デコイの発現と共に顕著に減少し（それぞれ９９％、９７％、および９７％）、ノッチ１がノッチ活性のレベルによって自動的に調節されることを示した。興味深いことに、他のノッチの転写レベルはこれらのデコイによって影響されなかった。ノッチ２およびノッチ３は、内皮細胞では通常は発現されないが、時々は、培養されたＨＵＶＥＣにおいて検出することができる。ノッチリガンドであるＪＡＧＧＥＤ－１およびＤＬＬ４の発現は、ノッチ１デコイ発現では変化しなかった。加えて、インビトロアッセイの結果を確認するために、ノッチ信号伝達の直接下流の標的もまた探索された。ＨＥＹ１、ＨＥＹＬ、およびＨＥＳ１を含む殆どの標的が、全てのデコイの発現に伴って有意に減少し、ノッチ１デコイ類がノッチ活性を効果的にブロックすることを示した。しかし、他のデコイ類とは異なり、ノッチ１デコイ１０～２４は、ＨＥＹ２の発現レベルを低減しなかった。この結果は、ノッチリガンドによる、異なるＨＥＹｓおよびＨＥＳｓを介したノッチ活性の異なる調節を示唆する可能性がある。ノッチ信号伝達のＪＡＧＧＥＤ－１およびＤＬＬ４（または一般的にＪＡＧおよびＤＬＬリガンド）調節の機構は未だ完全には理解されておらず、これらの発現プロファイリングデータは、リガンド特異的ノッチ信号伝達において如何なる下流標的が重要であるかについての手掛かりを与えてくれるかも知れない。ノッチ経路は、ＶＥＧＦ信号伝達を調節するために十分に確立されている。従って、ノッチ１デコイがＶＥＧＦ受容体の発現に対して何等かの影響を有するかどうかを更に探索した。全てのノッチ１デコイ変異体は、Ｎ１ＩＣとは逆に、ＨＵＶＥＣにおけるＶＥＧＦＲ－２発現を増大させた。この発見は、ノッチ１デコイでのノッチ活性の阻害がＨＵＶＥＣの増殖および遊走を増大させ、これはＶＥＧＲＦ－２の発現および活性における増大から生じるらしいとの所見を支持した。更に、ノッチの阻害はＶＥＧＦＲ－３の発現を顕著に減少させるように見えた。ノッチ１デコイ１～１３および１～２４は、ＶＥＧＦＲ－１の発現を減少させた；しかし、ノッチ１デコイ１０～２４は、Ｎ１ＩＣを発現するＨＵＶＥＣにおけると同様に、その発現を増大させた。ノッチ１デコイ１０～２４が顕著なノッチ阻害活性を示したので、この結果は予測されなかったものである。ＶＥＧＦ受容体の遺伝子発現プロファイリングは、フローサイトメトリーによって確認された。ＶＥＧＦＲ－２の細胞表面発現は、前記デコイを発現するＨＵＶＥＣにおいて増大し、またＶＥＧＦＲ－３は図１２のヒストグラムに示すように減少した。しかし、ｑＲＴ－ＰＣＲデータが示唆するように、ＶＥＧＦＲ－１の表面発現は劇的にはシフトされなかった。これらのアイソフォームは、異なるｍＲＮＡスプライス変異体から誘導される。ｑＲＴ－ＰＣＲおよびフローサイトメトリーからのデータは、増大したＶＥＧＦＲ－１の発現が、表面受容体ではなく、可溶性のアイソフォーム転写物に起因し得ることを示唆した。次いで、前記可溶性アイソフォームのスプライス変異体に特異的なＰＣＲプライマーを用いて、発現解析が繰り返された、図１３に示すように、可溶性ＶＥＧＦＲ－１転写物は、ノッチ１デコイ１０～２４によって１４倍増加したが、ノッチ１デコイ１～１３および１～２４によっては有意に影響されることはなかった。この発見は、ＪＡＧＧＥＤ－１阻害は可溶性ＶＥＧＦＲ－１の上方調節を導くが、全長受容体の上方調節は導かず、またＤＬＬ４阻害は全長ＶＥＧＦＲ－１を減少させ、可溶性ＶＥＧＦＲ－１には影響がないことを意味していた。

【０１２１】

・発現したノッチ／ノッチリガンドを定義するための癌細胞株の遺伝子発現プロファイリング

ノッチ１デコイの腫瘍血管新生に対する影響を探索するために、我々は４つの異なる細胞株を用いた：即ち、マウス乳腺腫瘍細胞（Ｍｍ５ＭＴ）、ヒト膵臓癌細胞（ＫＰ１）、マウス・ルイス肺癌細胞（ＬＬＣ）、マウス・メラノーマ細胞（Ｂ１６－Ｆ１０）である。Ｍｍ５ＭＴおよびＫＰ１細胞株は、皮下移植では転移しないが、ＬＬＣおよびＢ１６－Ｆ１０は肺および肝臓に転移する。従って、これら腫瘍モデルは、腫瘍増殖および腫瘍血

管新生に対するデコイ効果だけでなく、腫瘍細胞浸潤および転移に対する効果を研究することを可能にした。その結果を図１４に示す。Ｍｍ５ＭＴおよびＬＬＣは、同様に、高レベルのノッチ１、ノッチ２、およびＤ１１１を発現し、低レベルのノッチ３、ノッチ４、およびＪＡＧＧＥＤ－１を発現した。ＫＰ１細胞はノッチ１、ノッチ２、ノッチ３、ＪＡＧＧＥＤ－１、およびＤＬＬ４を発現した。また、Ｂ１６－Ｆ１０細胞は、ノッチ２、ノッチ３ノッチ４、および唯一のリガンドＪＡＧＧＥＤ－１を発現した。

【０１２２】

・ノッチ１デコイは、腫瘍細胞増殖およびアポトーシスに対して
如何なる影響も有していなかった：

マウスでの腫瘍実験のためにこれら腫瘍細胞を利用する前に、我々は、我々のノッチ１デコイが培養中の腫瘍細胞増殖に対して何等かの影響を有するかどうかを試験した。最初に、全てのＭｍ５ＭＴおよびＫＰ１腫瘍細胞に、異なるノッチ１デコイ変異体１～１３、１０～２４、および１～２４をレンチウイルスで形質移入し、増殖およびアポトーシスアッセイを行った。細胞増殖を４日間に亘って観察したところ、実験の終了時点において細胞の数に有意な相違はなかった（図１５）。アポトーシスについては、培養細胞を際懸濁させ、ＦＩＴＣに結合されたアネキシンＶ（AnnexinV）抗体と共にインキュベートし、フローサイトメトリーにより解析した。アネキシンＶ陽性細胞の数に顕著な相違は観察されなかった。

【０１２３】

・アデノウイルスベクターを介した発現されたときに、ノッチデコイは血液循環
の中に分泌され、腫瘍において検出された：

デコイ類の全身送達を模すために、アデノウイルス送達アプローチを用いた。ノッチ１デコイまたは対照としてのＦｃを発現するアでのウイルスを、成人マウスに静脈ｋ注射した。注射されたアデノウイルスは肝細胞に感染して、高血清レベルのコードされたノッチ１デコイを産生し、これはウエスタンブロットによって検出できた（図１６ａおよび図１６ｂ参照）。腫瘍を収集した後、腫瘍切片中のデコイレベルもまた免疫蛍光法によって評価され、これにより全てのデコイ変異体が腫瘍に到達したことが示された。

【０１２４】

・全てのノッチ１デコイ１～１３、１０～２４、および１～２４が腫瘍増殖
を顕著に低下させ、また腫瘍血管新生に対して異なる効果を示した：

ノッチ１デコイ１～２４および１～３６は腫瘍増殖および腫瘍血管新生を同様に阻害したので、その後の腫瘍実験は、１～２４変異体並びにリガンド特異的デコイだけを用いて行った。ＤＬＬ阻害は、非機能的腫瘍血管を増大させることによって腫瘍を低減することが広範に示された（Noguera-Troise et al.; Ridgway et al.; Hoey et al.）。従って、ＤＬＬ４特異的デコイ１～１３は同じ方法で挙動することが予測された。Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４およびＫＰ１－ＶＥＧＦ腫瘍細胞は、先ず、ルシフェラーゼを発現させるようにレンチウイルスで形質移入され、腫瘍増殖がルシフェラーゼ活性または発光信号についてモニターできるようにされた。この腫瘍実験は２つの方法で行われた：第一は、レンチウイルス形質導入により異なるノッチ１デコイまたはＦｃを直接腫瘍細胞の中に導入することによって；第二は、アデノウイルスを用いることによってである。加えて、組織における低酸素症のマーカーであるヒポキシプローブ（登録商標）、およびＦＩＴＣに結合したレクチンを、腫瘍低酸素症および血管灌流を解析するために、腫瘍収集の前にマウスに注射した。異なるデコイの存在は、腫瘍増殖において顕著な減少をもたらした。１～１３、１０～２４、および１～３６Ｍｍ５ＭＴ腫瘍は、対照よりも重量で６９％、５２％および３９％小さく（図１７ａ～図１７ｃ）、またＫＰ１腫瘍はそれぞれ４０％、４９％および５７％だけ小さかった（図１８ａ～図１８ｃ）。デコイの影響は、腫瘍が迅速に増殖し始めた後に見られたが、それまでに通常は移植後約１週間を要した。デコイ群からの腫瘍増殖は、ＫＰ１腫瘍に見られるように遅延または逆転するように見えた。腫瘍データは、生細胞でのルシフェラーゼ活性を表する発光信号から収集されたので、我々は、実験の終了に向かう腫瘍サイズの減少は腫瘍細胞の死滅およびネクローシスから生じたものであり得る

と予想した。

【０１２５】

・ノッチ１デコイ１～１３は非機能性腫瘍血管構造の増加を導く：

腫瘍血管構造は、エンドムチン免疫蛍光法およびレクチン灌流によって解析した。図１９ａおよび図１９ｂ並びに図２０ａおよび図２０ｂに示すように、ノッチ１デコイ１～１３を持った腫瘍は、Ｍｍ５ＭＴおよびＫＰ１の両方のモデルにおいて血管密度の著な増加を示した。１～１３腫瘍における血管構造は、対照腫瘍よりも、著しくより高度に分岐し且つより広範な内皮ネットワークを有していた。ＤＬＬ４免疫蛍光法はまた、ＤＬＬ４陽性内皮細胞の増加を示し、これはエンドムチン陽性細胞の超発芽ネットワーク（hypersprouting networks）を支持した。対照的に、１０～２４および１～２４で治療されたマウスからの腫瘍は、エンドムチン免疫染色法による血管含量の減少を明瞭に示した。これらの形態学的変化はまた、エンドムチン免疫蛍光法からの血管面積の定量によっても示された。加えて、組織学的評価は、全ての実験群の全体に亘って更に広範な腫瘍低酸素症を示し、これにより、デコイ１～１３群での増加した腫瘍血管構造は正しく機能しない可能性があることが示唆された。血管灌流の分布が血管内レクチンにより比較され、これはレクチン陽性面積および内皮エンドムチン免疫蛍光について定量化された。図２１ａおよび図２１ｂに示すように、全てのデコイ治療群からの血管構造は乏しい血管灌流を示し、それぞれ７２％、９０％および８４％減少した。幾つかの大きな腫瘍血管は正常に灌流されたが、殆どの小さい分岐血管は蛍光性レクチンを含んでいなかった。従って、腫瘍低酸素症およびレクチン灌流データは、ノッチ１デコイ１～１３がノッチ／ＤＬＬ４信号伝達経路を阻害し、増大した非機能性血管ネットワークを導くことを示唆した。

【０１２６】

・腫瘍血管拡張および崩壊した形態は、ノッチ１デコイ１０～２４の異なる活性を示した：

１～１３腫瘍における増大した血管ネットワークとは異なり、１０～２４腫瘍における腫瘍血管構造は内皮細胞含量および補遺鵜飼した血管構造における顕著な減少を示した。殆どの腫瘍血管は大きく且つ拡張して見えた。ノッチ１デコイ１０～２４は、ＪＡＧＧＥＤ－１特異的阻害剤として作用することがインビトロで示されており、従って、腫瘍血管構造におけるこれらの形態学的変化は、ＪＡＧＧＥＤ－１阻害から生じる可能性がある。ノッチ３は、動脈アイデンティティーおよび血管平滑筋細胞成熟のための優勢なノッチ受容体であり、その発現および活性は内皮発現したＪＡＧＧＥＤ－１を必要とする（Domenga et al.; Liu, Kennard, and Lilly）。従って、ＪＡＧＧＥＤ－１媒介性ノッチ信号伝達の阻害は、崩壊した壁細胞被覆および異常な腫瘍血管成熟をもたらす可能性がある。

【０１２７】

・ノッチデコイ１０～２４および１～２４によるＪＡＧＧＥＤ－１遮断は、調節不全の内皮－周皮細胞相互作用をもたらす：

腫瘍における内皮細胞がデコイ治療群において顕著に影響されたので、更に、血管周囲成分、特に周皮細胞およびマクロファージも変化するかどうかを研究した。図２２は、Ｍｍ５ＭＴおよびＫＰ１腫瘍切片上でのＮＧ２およびエンドムチン免疫蛍光を示している。１～１３群由来のＮＧ２陽性周皮細胞の含量に顕著な増大があった。周皮細胞が腫瘍血管の周囲に見られ、それらと腫瘍内皮との相互作用は正常で、且つ対照腫瘍切片に類似しているように見えた。ＮＧ２陽性周皮細胞は稀に、エンドムチン陽性血管を伴わない遊離成分のように見えた。しかしながら、１０～２２および１～２４腫瘍切片上のＮＧ２免疫蛍光は、腫瘍血管に関連しない周皮細胞数の顕著な増大を示した。ＮＧ２およびエンドムチン信号伝達は減弱され、物理的には崩壊されるように見えた。個々の周皮細胞は、腫瘍血管から不規則に脱離し、正常な血管構造の喪失を示した。これらの結果は、内皮－周皮細胞の相互作用および機能の調節および維持のためにはＪＡＧＧＥＤ－１に媒介されたノッチ活性化が必要とされること、またこれら相互作用の調節解除は血管の不安定性および不完全な血管灌流を導くことを示唆した。

【０１２８】

・ノッチ１デコイはＬＬＣ腫瘍転移に影響しなかったが、肺および肝臓における
Ｂ１６－Ｆ１０微少転移の形成を遅延させた：

皮下ＬＬＣおよびＢ１６－Ｆ１０腫瘍は、マウスにおいて肺および肝臓に転移する。従って、我々はこれら二つの追加の腫瘍モデルを利用し、ルシフェラーゼを発現する腫瘍株を用いることにより腫瘍浸潤および転移におけるデコイ活性を評価した。図２３および図２４は、全てのノッチデコイがＬＬＣおよびＢ１６－Ｆ１０腫瘍の増殖を、重量で４０％、３７％、および５８％、７８％７１％だけ顕著に阻害したことを示している（ＬＬＣおよびＢ１６－Ｆ１０；それぞれ１～１３、１０～２４、および１～２４）。腫瘍を持ったマウスから肺および肝臓を収集し、分析した（表１および表２）。肺および肝臓からの発光信号の解析により、信頼性をもって、転移病巣が検出された（図２５および図２６）。全体の臓器の総光子放射から総転移負荷を定量する一方、個々の信号から転移病巣の数およびサイズも評価した。ＬＬＣについては、総転移負荷はデコイ群の間で統計的に異なっておらず、また微少転移の数も異ならなかった。この時点では、肝臓転移は存在しなかった。興味深いことに、Ｂ１６－Ｆ１０腫瘍のデータは、対照群のマウスの幾らかが肺および肝臓転移を有していたのに対して、デコイ群は転移を有していないことを示した。腫瘍転移実験は、腫瘍増殖の長さを延長するように異なる実験設計を必要とする可能性があるが、これらのデータは、ノッチ１デコイが腫瘍転移を遅延させる可能性があることを示唆した。

【０１２９】

表１：　ＬＬＣ腫瘍を有するマウスにおける肺転移の数

群		肺転移の数
Ｆｃ	1	1
	2	5
	3	2
	4	0
	5	3
１～１３	1	3
	2	3
	3	1
	4	3
	5	1
１０～２４	1	0
	2	0
	3	5
	4	0
	5	4
１～２４	1	1
	2	2
	3	1
	4	0
	5	0

表２：　Ｂ１６－Ｆ１０腫瘍を有するマウスにおける肺および肝臓転移の数

群		肺転移の数	肝臓転移の数
Ｆｃ	1	3	3
	2	5	0
	3	0	0
	4	0	0
	5	0	0
１～１３	1	0	0

	2	0	0
	3	0	0
	4	0	0
	5	0	0
１０～２４	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
	4	0	0
	5	0	0
１～２４	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
	4	0	0
	5	0	0

・ノッチ１デコイは、温和な杯状細胞肥厚を誘導した：

汎ノッチ阻害剤の治療的応用に対する障害は、杯状細胞肥厚による腸毒性であった。以下のＧＳＩ治療に見られるように（Wu et al.）、このような毒性は、ノッチ１受容体およびノッチ２受容体の両方の阻害を必要とすることが示されている。図２７おいて、ノッチ１デコイが、ヌードマウスにおいて僅かに腸毒性を誘導することが分かった。しかし、この効果はＧＳＩ治療に比較して非常に温和であった。腸腺窩（intestinal crypts）の構造は変化せずに維持され、またデコイ治療を受けたマウスの体重には有意な変化はなかった。従って、個々のノッチ１デコイは、マウスにおけるノッチ信号伝達をブロックすることにおいて効果的であり、また杯状細胞肥厚を顕著に低減することが証明された。

【０１３０】

＜考察＞

本件のインビボ研究における主な発見は、（１）ノッチ１デコイが腫瘍細胞の増殖およびアポトーシスに影響しないこと；（２）ノッチ１デコイは、腫瘍血管新生および欠陥周囲成分を乱すことによって腫瘍増殖を顕著に阻害すること；（３）腫瘍細胞の浸潤および転移は、ノッチ１デコイ治療によって遅延されるように見えること；（４）ＧＳＩとは異なり、全てのノッチ１デコイがマウスにおいて温和な腸毒性を生じることである。この研究は、リガンド特異的（１～１３および１０～２４）または汎ノッチ１デコイ変異体は腫瘍血管新生に対して異なる効果を有するが、その全てが、腫瘍増殖および腫瘍転移を阻止することを示す最初の証拠である。

【０１３１】

・ノッチ１デコイ１～３６と小さいデコイ変異体の間の相違

以前の発見によって、ノッチ１デコイ１～３６が、リガンドＪＡＧＧＥＤ－１、Ｄ１１１、およびＤＬＬ４に誘導されたノッチ１信号伝達を阻害することが示された（Funahashi et al.）。Ｍｍ５ＭＴおよびヒトユーロブラストーマ腫瘍（ＮＧＰ）研究は、ノッチ１デコイ１～３６が腫瘍の血管および生存力を崩壊させることを示した。これら血管新生効果は、腫瘍におけるＤＬＬ４阻害、特に、内皮超発芽の欠失について以前に報告したものとは異なる。従って、ノッチ１デコイ１～３６の活性は独特であり、ＤＬＬ４阻害において観察されたのとは逆に、複数のノッチ－リガンド相互作用の阻害を反映しているらしいことは明瞭である。これらのデータはまた、血管ネットワークが、異なる血管新生プロセスまたは異なる細胞タイプにおいて異なる役割を果たし得る異なったノッチ受容体およびリガンドによって調節されることを示唆している。

【０１３２】

もとのノッチ１デコイの構造に基づいて、ノッチ１の細胞外ドメインにおけるＥＧＦ様反復は、リガンドへの結合によるノッチ活性化を阻害するのに十分であることが証明された。ＥＧＦ様反復１１および１２は、デルタ（Delta）との相互作用、および程度は低い

が鋸歯状腺腫（Serrate）との相互作用を媒介する（Rebay et al.）。ノッチ１デコイ構築物は、ＤＬＬ４特異的またはＪＡＧＧＥＤ－１特異的であるように修飾された。ノッチ／ＤＬＬ４信号伝達の役割は、発生および腫瘍の血管新生の両方において十分に確立されているから、ＤＬＬ４遮断は、我々にとって、ノッチ１デコイ変異体の効果を評価するための対照として効果的に役立った。加えて、異なるノッチリガンドが、異なるタイプの腫瘍において上方調節されたことが示されている。例えば、ＪＡＧＧＥＤ－１およびＤ１１１は、Ｍｍ５ＭＴ細胞においてＦＧＦ４により誘導されたのに対して、ＪＡＧＧＥＤ－１だけはＢ１６－Ｆ４マウス・メラノーマ細胞において発現された。従って、これら腫瘍における内皮中のノッチ活性は、異なる組のノッチリガンドによって誘導されるらしい。リガンド特異的なノッチ１デコイは、異なるタイプの腫瘍では異なる効果を示し得るものと考えられる。結局、リガンド特異的なデコイは、癌治療のための治療剤をより良く設計するために、腫瘍の血管新生プロセスにおけるノッチリガンドの異なる役割を我々が理解することを可能にするであろう。

【０１３３】

・ノッチ１デコイの生体利用性：

小さいデコイ変異体である１～１３、１０～２４、および１～２４は、１～３６よりも高レベルで産生および分泌されることが示された。腫瘍分泌に対する免疫組織化学はまた、ノッチ１デコイ１～３６が、腫瘍細胞の中に高度に浸透される小さいデコイとは対照的に、腫瘍血管構造に限定されることを示唆した。腫瘍血管新生におけるデコイの異なる効果は、部分的にはそれらの生体利用性に起因し得るものである。腫瘍血管の退行および過剰産生は、屡々、灌流の乏しい非機能的血管に付随しているので、小さいデコイは、腫瘍血管構造が損なわれた時でさえも、それらが容易に拡散し且つより良好に腫瘍にアクセスできる点において、大きい変異体を凌駕する幾つかの利点を有するかもしれない。

【０１３４】

・ノッチ１デコイの抗血管新生活性および抗腫瘍活性

ＪＡＧＧＥＤ－１特異的デコイおよびＤＬＬ４特異的デコイの両者は、我々の腫瘍モデルの全てにおいて腫瘍増殖を同様に低下させ、また腫瘍血管構造を崩壊させた。これらのデータは、ノッチ信号伝達の攪乱が腫瘍内皮および腫瘍細胞自体に対して顕著な影響を導入できることを示唆している。しかし、これらの影響は異なる機構から生じるらしい。ＤＬＬ４／ノッチ信号伝達を遮断することが非機能的血管新生および乏しい血管灌流の増大を導くことは、充分に確立されている。ノッチ１デコイ１～１３は同様の活性を有しており、ＤＬＬ４遮断に対して類似の効果を与える。しかし、ＪＡＧＧＥＤ－１阻害は腫瘍血管新生を減少させる。ノッチは、内皮－周皮細胞の相互作用を促進する広範な信号伝達分子を調節することが示されている（Armulik, Abramsson, and Betsholtz）。従って、一つの可能な気候は、ＪＡＧＧＥＤ－１がデコイ１０～２４を介して阻害し、また１～２４が血管の周皮細胞被覆を崩壊させ、それによって腫瘍血管新生を抑制することである。

【０１３５】

・ノッチ１デコイの抗転移活性

腫瘍細胞の浸潤および転移におけるノッチ１デコイの役割を研究するために、二つの転移モデルが利用された。この研究の重要な発見は、ノッチ１デコイ１～１３、１０～２４、１～２４が全て、Ｂ１６－Ｆ１０モデルにおける肺転移を遅延させるように見えるが、ＬＬＣではそうでないことである。これらの腫瘍はヌードマウスにおいて顕著に迅速に増殖したので、この実験は１２日後に終了した。これは、むしろ初期段階の転移プロセスでの正常サイズの腫瘍の解析を可能にしたにすぎない。これらの腫瘍は、腫瘍細胞の皮下移植に由来するものであり、従って、肺および肝臓転移は原発部位からの腫瘍細胞の侵入から来たものに違いない。従って、転移に対するデコイの効果は次のことに焦点を当てることができる：即ち、腫瘍細胞血管内異物侵入、循環系における生存および輸送、転移性ニッシェの促進、並びにホーミングおよびコロニー形成。幾つかの証拠は、Ｒｉｐ１／Ｔａｇ２膵臓腫瘍モデルにおいて、周皮細胞被覆の遺伝的崩壊が増大した転移を誘発することを示した（Xian et al.）。該デコイは腫瘍血管の一体性を低下させ、周皮細胞被覆を

減少させたので、原発腫瘍を越える腫瘍細胞の播種および転移が阻害されたらしい。
【０１３６】
＜第一実験シリーズについての参照文献＞
【参照文献１】
【０１３７】

Armulik, Annika, Alexandra Abramsson, and Christer Betsholtz. "Endothelial/Pericyte Interactions." *Circulation Research* 97.6 (2005) : 512-523. Web.

Benedito, Rui et al. "The Notch Ligands Dll4 and Jagged1 Have Opposing Effects on Angiogenesis." *Cell* 137.6 (2009) : 1124-1135. Web.

Cordle, Jemima et al. "A Conserved Face of the Jagged/Serrate DSL Domain Is Involved in Notch Trans-Activation and Cis-Inhibition.." *Nature Structural & Molecular Biology* 15.8 (2008) : 849-857. Web.

Domenga, Valérie et al. "Notch3 Is Required for Arterial Identity and Maturation of Vascular Smooth Muscle Cells." *Genes & Development* 18.22 (2004) : 2730-2735. Web.

Funahashi, Yasuhiro et al. "A Notch1 Ectodomain Construct Inhibits Endothelial Notch Signaling, Tumor Growth, and Angiogenesis." *Cancer Research* 68.12 (2008) : 4727-4735. Web.

Glittenberg, Marcus et al. "Role of Conserved Intracellular Motifs in Serrate Signaling, Cis-Inhibition and Endocytosis.." *The EMBO Journal* 25.20 (2006) : 4697-4706. Web.

Hambleton, Sophie et al. "Structural and Functional Properties of the Human Notch-1 Ligand Binding Region." *Structure (London, England : 1993)* 12.12 (2004) : 2173-2183. Web.

Henderson, S T et al. "Functional Domains of LAG-2, a Putative Signaling Ligand for LIN-12 and GLP-1 Receptors in Caenorhabditis Elegans.." *Molecular Biology of the Cell* 8.9 (1997) : 1751-1762. Print.

Hoey, Timothy et al. "DLL4 Blockade Inhibits Tumor Growth and Reduces Tumor-Initiating Cell Frequency." *Cell Stem Cell* 5.2 (2009) : 168-177. Web.

Liu, Hua, Simone Kennard, and Brenda Lilly. "NOTCH3 Expression Is Induced in Mural Cells Through an Autoregulatory Loop That Requires Endothelial-Expressed JAGGED1." *Circulation Research* 104.4 (2009) : 466-475. Web.

(つづく)

（つづき）

Lobov, I B et al. "Delta-Like Ligand 4 (Dll4) Is Induced by VEGF as a Negative Regulator of Angiogenic Sprouting." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104.9 (2007) : 3219-3224. Web.

Nakatsu, M.N., and Hughes, C.C.W. (2008). An optimized three-dimensional in vitro model for the analysis of angiogenesis. Meth Enzymol 443, 65-82.

Noguera-Troise, Irene et al. "Blockade of Dll4 Inhibits Tumour Growth by Promoting Non-Productive Angiogenesis." *Nature* 444.7122 (2006) : 1032-1037. Web.

Rebay, I et al. "Specific EGF Repeats of Notch Mediate Interactions with Delta and Serrate: Implications for Notch as a Multifunctional Receptor." *Cell* 67.4 (1991) : 687-699. Print.

Ridgway, John et al. "Inhibition of Dll4 Signaling Inhibits Tumour Growth by Deregulating Angiogenesis." *Nature* 444.7122 (2006) : 1083-1087. Web.

Shimizu, K et al. "Mouse Jagged1 Physically Interacts with Notch2 and Other Notch Receptors. Assessment by Quantitative Methods.." *The Journal of Biological Chemistry* 274.46 (1999) : 32961-32969. Print.

Wu, Yan et al. "Therapeutic Antibody Targeting of Individual Notch Receptors." *Nature* 464.7291 (2010) : 1052-1057. Web.

Xian, Xiaojie et al. "Pericytes Limit Tumor Cell Metastasis.." *The Journal of Clinical Investigation* 116.3 (2006) : 642-651. Web.

第二実験シリーズ：

＜序＞

ノッチは、細胞表面に発現されたリガンドと相互作用する膜貫通受容体である。哺乳類では、四つのノッチ遺伝子（１～４）、並びにＪＡＧＧＥＤ（ＪＡＧＧＥＤ１およびＪＡＧＧＥＤ２）またはデルタ様（１、３および４）と称される五つのリガンドが知られている。ノッチ１を介して作用するデルタ様４（Ｄｌｌ４）は、生理学的および病理学的網膜血管新生の際に、血管新生発芽限定において機能することが確立されている（Thurston, G and Kitajewski J, 2008）。対照的に、ＪＡＧＧＥＤ－１は、前血管発生因子として関係づけられてきたが、この能力におけるＪＡＧＧＥＤ－１の作用機構は十分には理解されていない（Benedito R, et al. 2009）

加齢関連の黄斑変性症（ＡＭＤ）は、失明の共通の原因であり、熟年個人の健康に対して著しい負のインパクトを有するものである。湿潤（滲出性）形態のＡＭＤにおいて、血管は網膜の背後の脈絡膜から成長する。これらの異常な血管は漏出性であり、網膜を剥離させるに至る可能性がある。湿潤ＡＭＤの最前線の治療は、血管の異常成長を低減させる抗血管新生剤によるものであった。ＶＥＧＦ阻害剤は、このような治療に現在使用されている。これらの薬剤は、湿潤型ＡＭＤ治療の有効な手段であるが、他の抗血管新生剤が同様に効果的で、抗ＶＥＧＦ剤と組み合わせたときに有用であり得ること、またはＶＥＧＦのブロックが長期の視力回復を導かないときに効果的であり得ることの可能性がある。ここでは、血管の成長および分化における重要な信号伝達経路であるノッチ（Dufraine, J. et al. 2008）を標的とする抗血管新生剤が研究される。即ち、タンパク質に基づく、ノッチ経路の受容体アンタゴニストであるノッチ１デコイが開発された（Funahashi Y, 2008）。ＪＡＧＧＥＤ－１／ノッチ１経路を標的とするノッチ１デコイが開発され、これらは網膜血管新生および腫瘍血管新生のマウスモデルにおいて、抗血管新生剤であることが示された。ここでは、病理的血管新生のマウスモデルを用いて、網膜血管新生におけるＪＡＧＧＥＤ－１ノッチ１の治療的阻害が測定される。

【０１３８】

＜予備的研究＞

図１に模式化されたノッチ1^{-36}デコイは、ＤＬＬ４およびＪＡＧＧＥＤ－１（Funahashi Y, et al. 2008）を含む幾つかのノッチリガンドに結合して、これを不活性化する。阻害抗体によるＤＬＬ４単独の阻害は、非機能的血管新生を促進し、超発芽したが灌流の乏しい血管をもたらすことが報告されている（Yan, M. et al. Nature 463 and Ridgway J, et al. Nature 2006）。対照的に、ノッチ1^{-36}デコイは、増大した発芽の証拠を伴わずに血管新生を阻止する（Funahashi Y, et al. 2008）。従って、ノッチ1^{-36}デコイは、ＤＬＬ４遮断とは異なり、且つ血管に対して正常組織における異常増殖を導く効果を誘発しない機構を介して作用する（Yan, M. et al., Clin. Cancer Res. 207 and Yan, M. et al., Nature 2010）。オリジナルのノッチ1^{-36}デコイから誘導されたリガンド特異的ノッチ１デコイ変異体が創生された。インビトロのノッチ信号伝達アッセイを用いると、ノッチ1^{-24}およびノッチ1^{-36}デコイは、ＤＬＬ４およびＪＡＧＧＥＤ－１に媒介されたノッチ信号伝達を阻害する。ノッチ1^{-13}デコイはＤＬＬ４媒介性のノッチ信号伝達を阻害したが、ＪＡＧＧＥＤ－１を阻害しなかった。ノッチ1^{-13}デコイはＤＬＬ４に特異的であり、またノッチ1^{-24}はＤＬＬ４およびＪＡＧＧＥＤ－１の両方をブロックするので、ＥＧＦ反復１４～２４はＪＡＧＧＥＤ－１特異性の領域を包含する可能性がある。ノッチ1^{-24}デコイが製造され、ＪＡＧＧＥＤ－１をブロックするが、ＤＬＬ４媒介性のノッチ１信号伝達を阻止しないことが示された。従って、ＪＡＧＧＥＤ－１およびＤＬＬ４の両方を阻止するノッチ１デコイ（ノッチ1^{-24}デコイ）、ＤＬＬ４を阻止するがＪＡＧＧＥＤ－１は阻止しない変異体（ノッチ1^{-13}デコイ）、およびＪＡＧＧＥＤ－１を阻止するが、ＤＬＬ４は阻止しない変異体（ノッチ1^{10-24}デコイ）が存在する。これらの変異体をインビトロ血管新生アッセイを使用して試験し、ノッチ1^{-13}デコイは、ＤＬＬ４阻害剤から予測されるように内皮細胞の過剰な発芽を生じさせるのに対して、ノッチ1^{10-24}デコイはインビトロでの血管新生発芽を減少させることが示された（データは示さず）。ノッチ１デコ

イ変異体を、新生児においてノッチ１デコイを発現させることにより、網膜血管新生マウスモデルを使用して試験した。新たに成長された血管を可視化するために使用された全組織標本イソレクチン染色（Wholemount isolectin staining）によって、ノッチ１$^{1-13}$デコイの発現は、化学的ノッチ信号伝達ガンマセクレターゼ阻害剤であるＤＡＰＴが新生児に投与されたときに見られるのに類似した、網膜血管の過剰増殖を生じさせることが示された。対照的に、ノッチ１$^{10-24}$デコイは新生児網膜における低下した血管分岐および増殖を生じさせた（図２Ｃ）。病理学的網膜血管新生のマウスモデルにおける、ＤＬＬ４、ＪＡＧＧＥＤ－１、または組み合わされたＤＬＬ４／ＪＡＧＧＥＤ－１遮断の阻害の効果がここに記載される。

【０１３９】

＜実験手順＞

我々は、生理学的および病理学的な網膜血管新生に対するノッチ１デコイの効果を測定する。

【０１４０】

ノッチ１受容体アンタゴニストを介したＪＡＧＧＥＤ－１阻害または汎ノッチリガンド阻害は、それらの抗血管新生効果により、低酸素症に駆動された網膜血管新生を阻止することができる。

【０１４１】

ＪＡＧＧＥＤ－１／ノッチ１の特異的阻害は、湿潤型ＡＭＤの治療医に適用される抗血管新生を狙った極めて新規なアプローチであり、異常な血管新生に起因した失明のための改善された治療を促進するように探索すべき価値がある。

【０１４２】

＜マウスでの生理学的網膜血管新生についてのノッチ阻害の結果を決定する＞

新生児を感染させるアデノウイルスベクターを使用して、全てのノッチリガンド（ノッチ１$^{1-24}$）、ＤＬＬ４（ノッチ１$^{1-13}$）、またはＪＡＧＧＥＤ－１（ノッチ１$^{10-24}$）を阻害するノッチ１デコイが新生児マウスにおいて発現され、網膜血管新生が研究される。網膜は、発芽血管新生を研究するための優れたモデルである（Connolly, SE. et al., 1988 and Gerhardt, H. et al. 2003）。ノッチ１デコイを発現する新生児由来の網膜を、出生後４日（Ｐ４）、Ｐ８およびＰ２１の時点で単離する。Ｐ４において、網膜は発芽血管新生を起こしている。Ｐ８において、主な神経叢は網膜縁に達しており、Ｐ２１までに血管新生は完了している。イソレクチンでの全組織標本免疫染色（ＩＨＣ）を用いて内皮細胞を同定し、またＣＤ１１ｂまたはＦ４／８０を用いて網膜骨髄性細胞を同定する。これらは網膜血管新生に積極的に関与するものである。内皮血管先端細胞は、血管先端細胞マーカーである高ＶＥＧＦＲ－２およびＤＬＬ４についてのＩＨＣによって決定される。標準の共焦点顕微鏡によって、血管密度、血管直径、内皮細胞含量、キャピラリー間ジャンクションの数、および糸状仮足の量／位置が調べられるであろう。視神経から成長した主要神経叢の距離が決定されるであろう。内皮細胞増殖またはアポトーシスをそれぞれ可視化するために、エンドムチン＋細胞またはＶＥカドヘリン＋細胞、およびホスホヒストン－３またはＡｐｏＴａｇ（登録商標）抗体についての二重染色が行われた。網膜切片のアルブミン染色を行って、血管外網膜アルブミン染色としてスコアリングされたキャピラリー透過性を評価する。

【０１４３】

＜マウスおいて、低酸素症で駆動された網膜血管新生についてのノッチ阻害の結果を決定する＞

未熟児において、不適切な酸素露出は未熟児網膜症（retinopathy of prematurity；ＲＯＰ）、増大した血管透過性を伴う低酸素症に駆動された増殖性網膜症、基底膜の肥厚（thickening of basement membrane）、および血管の制御されない増殖を導く。酸素に誘導された虚性網膜症（ＯＩＲ）のマウスモデル（Smith, LE et al. 1994）を、病理学的網膜血管新生の阻止におけるノッチ１デコイの薬効を評価する手段として使用した。新生児におけるノッチ１デコイの発現の後、上記のようにしてＯＩＲモデルを導き、ここでは

Ｐ７マウスを７５％酸素に５日間露出させる。網膜は、Ｐ８において中心網膜毛細血管閉塞を示し、Ｐ１２までに広範囲になる。Ｐ１２に部屋の空気に戻すと、内部網膜が低酸素症になり、ＶＥＧＦが上方調節され、制御されない網膜新血管新生がＰ１２～Ｐ１７まで起きる。活性な新血管新生の際（Ｐ１７）にマクロファージが骨髄から補充されること（Kataoka, K. et al. 2011）を示すために、また血管構造の正常化促進がマクロファージ含量について評価されることを示すために、ＯＩＲモデルが使用されてきた。ＯＲＩ研究のために、実験マウスは、Ｐ８、Ｐ１２、およびＰ１７において、網膜の全組織標本ＩＨＣおよび切片ＩＨＣによって評価されるであろう。Ｐ８およびＰ１２での網膜は、イソレクチンおよびＣＤ１１ｂまたはＦＡ／８０についての二重染色によって、中心網膜血管閉塞の範囲およびマクロファージ密度について評価される。Ｐ１７における網膜は、調節不能になった新血管新生およびマクロファージ身づ度について評価される。

【０１４４】

＜第二実験シリーズについての参照文献＞

【参照文献２】

【０１４５】

Thurston G, Kitajewski J. VEGF and Delta-Notch: interacting signalling pathways in tumour angiogenesis. Br J Cancer. 2008;99:1204-9.

Benedito R, Roca C, Sorensen I, Adams S, Gossler A, Fruttiger M, et al. The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. Cell. 2009;137:1124-35.

Dufraine J, Funahashi Y, Kitajewski J. Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms. Oncogene. 2008;27:5132-7.

Funahashi Y, Hernandez SL, Das I, Ahn A, Huang J, Vorontchikhina M, et al. A notch1 ectodomain construct inhibits endothelial notch signaling, tumor growth, and angiogenesis. Cancer Res. 2008;68:4727-35.

Yan M, Callahan CA, Beyer JC, Allamneni KP, Zhang G, Ridgway JB, et al. Chronic DLL4 blockade induces vascular neoplasms. Nature.463:E6-7.

Ridgway J, Zhang G, Wu Y, Stawicki S, Liang WC, Chanthery Y, et al. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. Nature. 2006;444:1083-7.

(つづく)

（つづき）

Yan M, Plowman GD. Delta-like 4/Notch signaling and its therapeutic implications. Clin Cancer Res. 2007;13:7243-6.

Yan M, Callahan CA, Beyer JC, Allamneni KP, Zhang G, Ridgway JB, et al. Chronic DLL4 blockade induces vascular neoplasms. Nature. 2010;463:E6-7.

Connolly SE, Hores TA, Smith LE, D'Amore PA. Characterization of vascular development in the mouse retina. Microvasc Res. 1988;36:275-90.

Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. J Cell Biol. 2003;161:1163-77.

Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994;35:101-11.

Kataoka K, Nishiguchi KM, Kaneko H, van Rooijen N, Kachi S, Terasaki H. The roles of vitreal macrophages and circulating leukocytes in retinal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011;52:1431-8.

Ritter MR, Banin E, Moreno SK, Aguilar E, Dorrell MI, Friedlander M. Myeloid progenitors differentiate into microglia and promote vascular repair in a model of ischemic retinopathy. J Clin Invest. 2006;116:3266-76.

第三実験シリーズ：

＜序＞

腫瘍血管新生は種々の信号伝達経路によって調節され、その幾つかは抗血管新生治療の有効な標的である。最初の承認された抗血管新生薬であるベバチズマブ（bevacizumab）（アバスチン(Avastin)）は、幾つかのタイプの癌において使用され、ある程度の成功が証明されてきている。しかし、ＶＥＧＦ経路を標的とする抗血管新生剤は、耐久性の腫瘍応答を示さず、最終的には薬物耐性を誘導し、または腫瘍転移に影響を及ぼす（Bergers and Hanahan, 2008; Ebos et al., 2009; Paez-Ribes et al., 2009）。腫瘍血管構造の崩壊は腫瘍灌流を妨害し、低酸素症をもたらす。次いで、これＶＥＧＦ阻害にも拘らず腫瘍血管新生および腫瘍増殖を促進する広範囲の因子および化学誘因物質を誘導する。該ノッチ信号伝達経路は、抗血管新生療法のための標的を表しており、幾つかのノッチ阻害剤が開発されてきた。ノッチ信号活性化またはデルタ様４（ＤＬＬ４）の阻止のために必要とされるガンマセクレターゼ活性を阻止する薬剤は、腫瘍血管新生を崩壊させる（Noguera-Troise et al., 2006; Ridgway et al., 2006; Kalen et al., 2011）。分子的および遺伝子的研究は、ノッチ信号伝達が、細胞の状況に応じて、細胞の運命、細胞増殖、分化、およびアポトーシスを調節することを解明する。内皮において、ノッチ信号伝達は増殖、遊走および発芽を調節する（Hellstroem et al., 2007）。

【０１４６】

ノッチ信号伝達は細胞－細胞接触を必要とし、ノッチタンパク質およびそのリガンドが隣接する細胞と相互作用することを可能にする。高度に保存されたノッチ遺伝子ファミリーは、膜貫通受容体であるノッチ１、ノッチ２、ノッチ３、およびノッチ４をコードする。ノッチのためのリガンドは、二つのクラスの膜貫通タンパク質：即ち、Ｊａｇｇｅｄリガンド（Ｊａｇ）、Ｊａｇｇｅｄ１およびＪａｇ２；およびデルタ様リガンド（ｄ１１）、Ｄ１１１、Ｄ１１３、およびＤＬＬ４である。リガンド活性化時には、ガンマセクレターゼ依存性のタンパク質分解開裂により細胞間ノッチペプチドが放出され、核へと移行し、ＣＳＬ転写抑制因子を活性化因子へと変換させる（Kopan and Ilagan, 2009）。ノッチ１リガンド結合ドメインは、３６のＥＧＦ様反復を含んでなるものである。ノッチリガンドは保存された縮退ＥＧＦ様反復、ノッチ結合に特異性を与えるＤＳＬドメイン（Henderson et al., 1997; Shimizu et al., 1999; Glittenberg et al., 2006）およびこれに続くＥＧＦ様反復領域を共有している；ＪＡＧＧＥＤは１６のＥＧＦ様反復を有しており、Ｄ１１は８以下のＥＧＦ様反復を含んでいる。ノッチＥＧＦ様反復１１および１２、並びにＤＳＬドメインは、Ｄ１１１またはＪＡＧＧＥＤ－１とのノッチ相互作用のために必要である（Hambleton et al., 2004; Cordle et al., 2008）。ＥＧＦ様反復２４～２９、またはアブルプテックス（Abruptex）領域は、リガンド結合部位についてＤ１１１リガンドと競合することにより、ノッチの活性化に対抗する（Pei and Baker, 2008）。Ｄ１１ｖｓ Ｊａｇリガンドと相互作用する異なるノッチＥＧＦ様反復が存在するかどうかは知られていない。知識におけるこのギャップは、ノッチとのリガンド特異的相互作用および信号伝達結果の我々の理解を制限してきた。

【０１４７】

ノッチ受容体およびリガンドは、幾つかの癌において上方調節されることが示されてきた。腫瘍細胞におけるノッチ信号伝達は、腫瘍のタイプに応じて、腫瘍の促進活性および抑制活性の両方を含んでいる（Takebe et al., 2010; Ranganathan et al., 2011）。内皮ノッチ機能の阻害は、腫瘍血管新生を崩壊させる。ＤＬＬ４のブロックは、腫瘍血管新生を失調させることによって腫瘍の増殖を阻害するが、これは増大した内皮細胞増殖および先端細胞数を増大させ、非機能的血管構造をもたらすことを特徴とするものである（Noguera-Troise et al., 2006; Ridgway et al., 2006）。

【０１４８】

ノッチおよびＶＥＧＦ信号伝達経路は複雑にリンクされている。ＶＥＧＦはノッチ受容体およびＤｌｌ４の発現を誘導し（Liu et al., 2003; Funahashi et al., 2011）、またノッチの活性化はＶＥＧＦＲ－２の発現を低下させるが、ＶＥＧＦＲ－１／ｓＴｌｔ－１の発現を増大させる（Taylor et al., 2002; Shawber et al., 2007）。内皮細胞におい

て、ＶＥＧＦＲ－３はノッチによって誘導され（Shawber et al., 2007; Geudens et al., 2010)）、またはノッチ信号伝達によって減少される可能性がある（Tammela et al., 2011）。機能実験の内皮ロスが異なるフェノタイプをもたらすので、網膜血管新生において、Ｄｌｌ４およびＪＡＧＧＥＤ－１は内皮において独特な活性を有することが示されてきた。

【０１４９】

我々は、ヒトＩｇＧ・Ｆｃ（ノッチｌデコイ）と融合された、異なるＥＧＦ様反復をコードする可溶性の細胞外ドメインノッチ１構築物を作製した。該ノッチ１デコイは、ノッチ阻害剤として機能する。全ての３６ＥＧＦ様反復を備えたヒト・ノッチ１デコイは、Ｊａｇｇｅｄ－１、Ｄ１１１およびＤ１１４を阻害するラット・ノッチ１デコイと同様に機能した（Funahashi et al., 2008）。我々は、異なるノッチ１・ＥＧＦ様反復を組み込んだノッチ１デコイが選択的ノッチ１リガンドを中和するかどうかを自問した。ＤＬＬ４またはＪＡＧＧＥＤ－１を選択的に阻害するノッチ１デコイ変異体が同定され、これはヒト・ノッチ１におけるリガンド特異的な相互作用ドメインの最初の描写を提供した。ノッチ１デコイ変異体を、インビトロでの網膜および腫瘍血管新生に対する効果について評価した。ＤＬＬ４を特的に妨げるノッチ１デコイ変異体は、超発芽フェノタイプを生じ、機能障害性腫瘍血管新生を促進し、また腫瘍増殖を阻害した。ＪＡＧＧＥＤ－１をブロックするノッチ１デコイ変異体は、低下したノッチ１信号伝達を生じ、網膜および腫瘍における血管新生増殖をブロックし、また腫瘍増殖を低下させた。ＪＡＧＧＥＤ－１阻害は、抗血管新生性の可溶性ＶＥＧＦＲ－１（ｓＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１）レベルを増大させ、周皮細胞被覆を崩壊させ、それによってＪＡＧＧＥＤ－１阻害が腫瘍増殖を崩壊させる機構を提供した。

【０１５０】

＜材料および方法＞

・原発性細胞および癌細胞株：

細胞培養は、５％CO_2および９５％加湿の空気中において３７℃で維持された。ＨＵＶＥＣを、ＥＧＭ－２培地（Lonza Group, Walkersville, MD）中で増殖させた。Ｍｍ５ＭＴ、ＬＬＣ、およびＢ１６－Ｆ１０は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC, Manassas, VA）から入手した。ＫＰＩは、ヒューマンサイエンス研究資源バンク（Health Science Research Resource Bank； Osaka, Japan）から入手した。癌細胞株は、１０％仔牛血清（ＦＢＳ）およびＰｅｎ－Ｓｔｒｅｐを伴う１Ｘ高グルコースＤＭＥＭ（Invitrogen, Carlsbad, CA）中で維持した。

【０１５１】

・ノッチレポータ検定：

ＨｅＬａ細胞に、エフェクテン形質導入試薬（Effectene Transfection Reagent ；Qiagen, Germantown, MD）を用いて、ｐＢＯＳ－ノッチ１、ｐＧＬ３－１１ＣＳＬ－ＬｕｃおよびＲｅｎｉｌｌａを形質導入し、またはｐＣＲＩＩＩ－ＪＡＧＧＥＤ－１－ＦＬＡＧもしくはｐＣＲＩＩＩ－ＤＬＬ４－ＦＬＡＧを、または対照としてｐＣＲＩＩＩ－ＧＦＰ－ＦＬＡＧを形質導入した。形質導入の２４時間後に、２４穴プレートにおいて受容体細胞およびリガンド細胞を共培養した。共培養の２４時間後に細胞を収集し、デュアル－ルシフェラーゼレポータ検定システム（Promega Corporation, Madison, WI）を使用して、ルシフェラーゼ活性を測定した。検定は３回行った。

【０１５２】

・共免疫沈降：

ノッチ１デコイおよび全長ＤＬＬ４－ＦＬＡＧまたはＪＡＧＧＥＤ－１－ＦＬＡＧを、リン酸カルシウム形質導入法により２９３Ｔ細胞に同時形質導入した。形質導入の２４時間後に、該培養体にＤＳＧ（Thermo Scientific, Waltham, MA）を２０ｎｍｏｌ／ｍＬの最終濃度で加え、３０分間インキュベートし、１０ｍＭのＴｒｉｓで１５分間急冷した。この溶解物を、２０μＬのプロテインＡ／Ｇアガロース（Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA）によりプルダウンした。架橋を逆転させるために、免疫複合体を

５０μｍｏｌ／ｍＬのＤＴＴで処理し、電気泳動前に５分間煮沸した。

【０１５３】

・発芽血管新生検定：

発芽検定（Nakatsu and Hughes, 2008）は、ビーズ当たり４００細胞でサイトデックス３（Cytodex 3）デキストランビーズ（GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ）に付着されたＨＵＶＥＣを使用した。２４穴プレートにおいて、２ｍｇ／ｍＬのフィブリノーゲン（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）、０．１５Ｕ／ｍＬのアプロチニン（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）、および０．０６２５Ｕ／ｍＬのスロンビン（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）で構成されたフィブリンクロット中にビーズをウエル当たり２５０ビーズで埋め込んだ。１時間後に、デトロイト５５１繊維芽細胞（ATCC, Manassas, VA）を、ウエル当たり１．０×10^5細胞でフィブリンゲルの頂部に播種した。実験は３回行った。

【０１５４】

・網膜分析：

Ｐ２子犬に、異なるノッチ１デコイまたはＦｃをコードするアデノウイルス（Ａｄ）を皮下注射した。１×ＰＢＳ中において５．０×10^9ｆｆｕ／ｍＬでＡｄを調製し、子犬は５０μＬの一回投与量を受けた。Ｐ５において集めた眼球を、４％ＰＦＡ中で固定した。網膜を切除し、１％ＢＳＡおよび０．５トリトンＸ－１００を含む１×ＰＢＳ中において室温で２時間透過化処理し、続いてＰＢＬＥＣバッファー（ｐＨ６．８の１×ＰＢＳ中の、１％トリトンＸ－１００、０．１ｍＭのＭｇCl_2、０．１ｍＭのＣａCl_2、０．１ｍＭのＭｎCl_2）中で３回洗浄した。免疫蛍光について、網膜をＦＩＴＣに結合したイソレクチンＢ４（Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA）と共に一晩インキュベートし、ＰＢＬＥＣで洗浄し、４％ＰＦＡで後固定し、マウントした。

【０１５５】

・定量的リアルタイプポリメラーゼ連鎖反応（ｑＲＴ－ＰＣＲ）：

ＲＮイージーミニキット（Qiagen, Germantown, MD）を用いて培養細胞からＲＮＡを収集した。単離されたＲＮＡをＤＮａｓｅＩで３０分間処理し、ＲＴ－ＰＣＲのためのスーパースクリプト第一鎖合成システム（Invitrogen, Carlsbad, CA）を用いて逆転写ＰＣＲに使用した。ｑＲＴ－ＰＣＲのために、ＡＢｓｏｌｕｔｅブルーＱＰＣＲ・ＳＹＢＲグリーンＭｉｘ（Thermo Scientific, Waltham, MA）で反応を行った

・腫瘍実験：

４～６週齢の雌ＮＣｒヌードマウス（NCI-Frederick, Frederick, MD）に、１．０×10^5のＭｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４細胞、または２．０×10^6のＫＰ１－ＶＥＧ細胞、または５．０×10^5のＬＬＣ細胞もしくはＢ１６－Ｆ１０細胞の上部脇腹への皮下移植を受けさせた。２日後、ノッチ１デコイをコードするＡｄを、眼窩後静脈注射を介して投与した。第２１日に腫瘍を収集し、分析した。腫瘍低酸素症を測定するために、屠殺する３０分前のマウスに、低酸素症プローブ１（Hypoxyprobe, Inc., Burlington, MA）を６０ｍｇ／ｋｇで腹腔内注射した。腫瘍を抗低酸素症プローブ抗体で免疫染色した。血管灌流を評価するために、マウスは左心室に、１００μｇのフルオレセイン・リコペルシコン・エスキュレンタム・レクチン（fluorescein Lycopersicon esculentum lectin; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA）の心臓内注射を受けた。２分後、マウスは１％ＰＦＡを灌流された。腫瘍を内皮細胞表面に結合したレクチンについて、蛍光顕微鏡により分析した。腸毒性分析のために、Ａｄ感染させた腫瘍保有マウスから十二指腸を収集した。該組織を４％ＰＦＡ中で一晩固定し、３０％蔗糖溶液中で脱水した後にパラフィン包埋した。杯状細胞を分析するためにＰＡＳ染色を行った。

【０１５６】

・免疫蛍光染色

厚さ７μｍの新鮮な凍結腫瘍組織切片を、例アセトン中で３分間の後固定を行い、１×ＰＢＳ中で５分間の洗浄を２回行い、次いで、３％ＢＳＡおよび２％血清を含有するブロッキング溶液中において室温で１時間ブロック処理した。次いで、一次抗体溶液を該ブ

ロッキング溶液に加え、スライドに添加し、４℃で一晩インキュベートした。スライドを、１×ＰＢＳ中で５分間の洗浄を２回行った。蛍光的に結合された二次抗体を前記切片に加え、３０分間インキュベートした。該スライドを１×ＰＢＳ中で２回洗浄し、マウントした。

【０１５７】

＜結果＞

・ノッチ１$^{1-13}$デコイは毛管発芽を増大させる一方、ノッチ１$^{10-24}$は発芽および血管平滑筋細胞被覆を低下させる：

内皮細胞による血管新生および内腔含有発芽形成に対するノッチ１デコイの効果を決定するために、我々は、ＨＵＶＥＣにおいてノッチ１デコイを発現させ、またインビトロ発芽検定を行った。ＨＵＶＥＣで被覆されたデキストランビーズをフィブリン中に埋設し、第７日に発芽形成を評価した。Ｆｃ制御において、内皮細胞発芽は吻合して多細胞の分岐した内腔を含むネットワークを形成した（図３３Ａ）。ノッチ１$^{1-13}$デコイを発現するＨＵＶＥＣは、毛細血管発芽の数における７６％増加に見られるように、増大した先端細胞を特徴とする超発芽フェノタイプを示した（図３３Ａおよび図３３Ｂ）。抗ＤＬＬ４抗体が内皮細胞増殖および発芽を高めたことが示されているので（Ridgway et al., 2006）、ノッチ１$^{1-13}$デコイフェノタイプは、ＤＬＬ４／ノッチ信号伝達の減衰と一致している。対照的に、ノッチ１$^{10-24}$デコイおよびノッチ１$^{1-24}$デコイを発現するＨＵＶＥＣは、発育を阻害された発芽、およびそれぞれ４０％および６８％の発芽数の減少を示した（図３３Ｂ）。対照群において観察された吻合は、ノッチ１$^{10-24}$およびノッチ１$^{1-24}$デコイを発現するＨＵＶＥＣには存在しなかった。これらの結果は、ＪＡＧＧＥＤ－１の阻害が抗血管新生性であること、および該効果がＤＬＬ４阻害を凌駕することを示唆する。

【０１５８】

試験された全てのノッチ１デコイ（ノッチ１$^{1-13}$、ノッチ１$^{10-24}$、ノッチ１$^{1-24}$、ノッチ１$^{1-36}$）が、ノッチ１ＩＣによるノッチ信号活性化とは逆に、単層中で増殖したときに、ＨＵＶＥＣの遊走および増殖を増大させた（図３４Ａ～図３４Ｃ）。ＨＵＶＥＣをコラーゲンゲルの間に埋設した毛細血管様ネットワーク形成検定において、ノッチ１１－１３デコイは、ＨＵＶＥＣに、分岐点が増大した更に複雑な血管ネットワークを形成させたのに対して、ノッチ１$^{10-24}$は完全なネットワークを形成できなかった（図３５Ａおよび図３５Ｂ）。ノッチ１$^{1-13}$およびノッチ１$^{10-24}$が、インビトロ検定において３次元（３Ｄ）で異なる血管新生応答を誘発させる能力（図３３Ａ）は、単層検定では見られなかった。この相違の可能な説明は、ノッチリガンドの発現が細胞外マトリックス（ＥＣＭ）により影響を受けるということである。ＨＵＶＥＣがフィブリン上で増殖されたとき、コラーゲンに比較してＪＡＧＧＥＤ－１発現は有意に増大し、またＤＬＬ４は減少した（図３６）。こうして、ＨＵＶＥＣ中においてノッチ１デコイ変種により誘発されたリガンド特異的な応答は、ＥＣＭによって影響され、また毛細血管様発芽の評価がインビトロで３Ｄにおいてモデル化されるときに顕在化される。

【０１５９】

我々は、ノッチ信号伝達が発芽形成を限定する場合に、ノッチ１デコイがマウス網膜血管新生に対して如何なる効果を有するかを問うた（Lobov et al., 2007; Suchting et al., 2007）。該デコイまたはＦｃを発現するアデノウイルスベクタを新生児に注射し、循環系におけるデコイ発現をウエスタンブロッティングにより検証し、循環するデコイの網膜血管新生に対する影響を評価した。アデノウイルス感染は、ノッチ１デコイの検出可能な血清レベルを導いた（データは示さず）。ノッチ１$^{1-13}$デコイは、ＤＬＬ４を選択的にブロックするその能力（図３３Ａ）に一致して、内皮発芽および発芽先端細胞の数を有意に増大させた（図３３Ｂ）。ノッチ１$^{10-24}$デコイは、網膜における血管密度を低下させた（図７Ｂ）。従って、ノッチ１$^{1-24}$デコイは、マウス網膜血管新生におけるＤ１１４アンタゴニストおよびインビトロ発芽の際のＪＡＧＧＥＤ－１アンタゴニストとして挙動した。

【０１６０】
ＪＡＧＧＥＤ－１は、血管平滑筋細胞の補充のために重要であることが示されてきた（High et al., 2008; Benedito et al., 2009）。α平滑筋アクチン（αＳＭＡ）免疫蛍光の解析により、ノッチ1^{10-24}およびノッチ1^{1-24}デコイ治療群において、動脈に沿った血管平滑筋細胞被覆の減少が明らかになり（図３３Ｃ）、内皮特異的ＪＡＧＧＥＤ－１変異体マウスにおけるフェノタイプも見られた（High et al., 2008; Benedito et al., 2009）。ＮＧ２免疫蛍光法は、網膜周皮細胞被覆に有意な相違を示さなかった（データは示さず）。インビトロおよび印日簿での発芽血管新生二対する効果を評価したときに、ッチ1^{1-13}デコイはＤＬＬ４阻害剤として機能し、またノッチ1^{10-24}デコイはＪＡＧＧＥＤ－１阻害剤として機能した。

【０１６１】
・ノッチ1^{1-13}デコイ、ノッチ1^{10-24}デコイ、およびノッチ1^{1-24}デコイは、
主要増殖を有意に低下させ、また腫瘍血管新生を不調不全にする：
我々は、腫瘍細胞に直接影響を与えるノッチ１デコイの能力を試験し；Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４（マウス乳腺腫瘍）、ＫＰ１－ＶＥＧＦ（ヒト膵臓腫瘍）、ＬＬＣ（マウス肺腫瘍）、およびＢ１６－Ｆ１０（マウスメラノーマ）のインビトロでのコロニー形成、増殖、およびアポトーシスに対して、ノッチ1^{1-13}、ノッチ1^{10-24}、およびノッチ1^{1-24}デコイが影響を及ぼすかどうかを評価した。全てのノッチ１デコイがＭｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４のコロニー形成を阻害したが、他の主要細胞株を阻害しなかった（図３７）。従って、Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４腫瘍において、ノッチ１デコイは、内皮細胞および壁細胞のような、腫瘍細胞およびホスト細胞の両者を阻害する能力を有している。ノッチ１デコイは、単層培養において増殖した腫瘍株の何れにおいても、腫瘍細胞増殖またはアポトーシスに影響しなかった（図１５）。

【０１６２】
腫瘍におけるノッチ１デコイ変異体の作用を評価するために、我々は、４つの異なる腫瘍細胞株を使用して異種移植研究を行った。異なるノッチ１デコイをコードするアデノウイルスを、皮下腫瘍移植の３日後のマウスに静脈注射した。注射の２日後には早くも、ウエスタンブロットにより血清中に、また免疫蛍光法により腫瘍中に高レベルのタンパク質が検出された（図１８）。試験した全てのノッチ１デコイが、Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４、ＬＬＣ、およびＢ１６－Ｆ１０腫瘍の増殖を有意に減少させたのに対して；ノッチ1^{10-24}デコイおよびノッチ1^{1-24}デコイだけが、ＫＰ１－ＶＥＧＦ腫瘍の増殖を阻害した（図３９Ａ～図３８Ｄ）。Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４およびＫＰ１－ＶＥＧＦ腫瘍増殖を撹乱するノッチ1^{1-24}デコイの能力は、全長ノッチ１デコイ（ノッチ$^{1-36}$）について観察されたものと類似していた（図３９）。このノッチ１デコイの効果は腫瘍が迅速に増殖を始めた後に見られ、それは移植の約１週間後に起こった（データは示さず）。

【０１６３】
ノッチ$^{1-13}$デコイ、ノッチ1^{10-24}デコイ、およびノッチ1^{1-24}デコイは、腫瘍血管新生に対して異なる効果を有していた。ノッチ$^{1-13}$デコイは、Ｄｌｌ遮断で見られたもの（Ridgway et al., 2006）に類似して、全ての腫瘍モデルにおいて内皮細胞密度を有意に増加させた（図４０Ａ～図４０Ｂ）。対照的に、ノッチ1^{10-24}およびノッチ1^{1-24}デコイ群からの腫瘍は、内皮細胞含量において減少を示した（図４０Ａ～図４０Ｂ）。Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４モデルにおいて、血管灌流は、レクチン灌流に続く腫瘍内皮のエンドムチン染色によって決定された。Ｆｃ腫瘍に比較して、全てのノッチ１デコイ治療群由来の血管構造は乏しい血管灌流を示し、７２％（ノッチ1^{1-13}）、９０％（ノッチ1^{10-24}）、および８４％（ノッチ1^{1-24}）減少した（図４１Ａおよび図４１Ｂ）。乏しい灌流に一致して、ノッチ１デコイで治療された腫瘍は増大した低酸素症および腫瘍ネクローシスを有していた（図４１Ａおよび図４１Ｃ）。血管退化を決定するために、腫瘍をエンドムチンおよびコラーゲンＩＶについて免疫染色した。コラーゲンＩＶ沈着は、ノッチ1^{1-13}デコイ治療された腫瘍において増大し、またノッチ

１$^{10-24}$およびノッチ１$^{1-24}$デコイ腫瘍において減少した（図４２Ａ～図４２Ｃ）。エンドムチン染色に対して正規化したときにＦｃ群とノッチ１デコイ治療群の間に相違はなく（図４２Ｃ）、減少した腫瘍血管構造が血管退化によるものでないことが示された。

【０１６４】

結論として、ＤＬＬ４およびＪＡＧＧＥＤ－１阻害は、マウス腫瘍異種移植片において異なる血管新生フェノタイプをもたらした。ノッチ１$^{1-13}$デコイ、即ち、ＤＬＬ４阻害剤は内皮細胞含量を増加させ、血管灌流を低下させ、腫瘍低酸素症およびネクローシスを増大させた。ノッチ１$^{10-24}$デコイ、即ち、ＪＡＧＧＥＤ－１阻害剤は腫瘍血管新生を低下させ、腫瘍血管の灌流を乏しくして増大した低酸素症を導いた。

【０１６５】

・ノッチ１デコイ類は腫瘍血管の壁細胞被覆を撹乱する異なった能力を示す：

ノッチ１デコイの網膜壁細胞被覆に対する効果に基づいて、我々は、ノッチ１デコイで処理されたＭｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４腫瘍における壁細胞を評価した。腫瘍切片を、エンドムチンおよびＮＧ２またはαＳＭＡについて免疫染色し、それぞれ周皮細胞および血管平滑筋細胞を可視化した。ノッチ１$^{1-13}$デコイ腫瘍において、周皮細胞は内皮細胞と密接に関連付けされた（図４３Ａ）。Ｆｃ群に比べ、ノッチ１$^{1-13}$デコイは、増大した内皮細胞含量と一致して周皮細胞を増大させ（図４３Ｂ～図４３Ｄ）、シュウヒ細胞密度が変化しないことを示した。ノッチ１$^{10-24}$およびノッチ１$^{1-24}$デコイで治療された腫瘍において、周皮細胞は内皮細胞から解離された（図４３Ａ）。

【０１６６】

された。内皮細胞に対する周皮細胞の数は、ノッチ１$^{10-24}$デコイ腫瘍においては有意に減少した（図４３Ｄ）；即ち、血管の全体の周皮細胞被覆が減少した。αＳＭＡ免疫染色は、ノッチ１$^{10-24}$およびノッチ１$^{1-24}$デコイで治療された腫瘍について、大きな動脈の減少した血管平滑筋細胞被覆を明らかにした（図４４）。ノッチ１$^{10-24}$デコイおよびノッチ１$^{1-24}$デコイの同様の効果が、Ｂ１６－Ｆ１０腫瘍の壁細胞について観察された（データは示さず）。ＫＰ１－ＶＥＧＦおよびＬＬＣ対照腫瘍は、乏しい壁細胞被覆を有している（データは示さず）。従って、腫瘍血管新生において、Ｄ１１４阻害は血管壁細胞に対して明らかな影響を有していなかったのに対して、ノッチ１$^{1-24}$デコイおよびノッチ１$^{10-24}$デコイを介してＪＡＧＧＥＤ－１をブロックすることは、血管のある周皮細胞および血管平滑筋細胞被覆をもたらした。

・ＪＡＧＧＥＤ特異的ノッチ１$^{10-24}$ デコイは、可溶性ＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１を増加させる：

我々は、ノッチ標的遺伝子発現を評価することによって、ＤＬＬ４特異的およびＪＡＧＧＥＤ－１特異的なノッチ１デコイ変種が、内皮細胞において異なる効果を誘発する機構を探求した。ＨＵＶＥＣにＦｃ、ノッチ１$^{1-13}$デコイ、ノッチ１$^{10-24}$デコイ、またはノッチ１$^{1-24}$デコイをコードするレンチウイルスを感染させ、内皮ノッチ下流評定に対する効果を決定した。ｓｈＲＮＡ含有レンチウイルス（Ｊ１ＫＤ）を使用して、ＨＵＶＥＣにおいてＪＡＧＧＥＤ－１をノックダウンした。ノッチ１$^{1-13}$デコイ、ノッチ１$^{10-24}$デコイ、およびノッチ１$^{1-24}$デコイ、並びにＪ１ＫＤの発現は、ノッチ／ＣＳＬトランス活性化の直接の標的（Nakagawa et al., 2000）であるＨＥＹ１、ＨＥＹＬおよびＨＥＳ１の発現を抑制した（図４５）。他のノッチ１デコイとは異なり、ノッチ１$^{10-24}$デコイまたはＪ１ＫＤは、ＨＥＹ２転写物を減少させなかった（図４５）。従って、ノッチのＤＬＬ４およびＪＡＧＧＥＤ－１活性化は、内皮細胞におけるＨＥＹ２の発現を差別的に調節する。

【０１６７】

ノッチ信号伝達は、殆どはＶＥＧＦ受容体の調節を介して、内皮細胞におけるＶＥＧＦ信号伝達を調節する（Thurston and Kitajewski, 2008）。我々は、ＶＥＧＦ受容体の発現に対するノッチ１デコイ変異体またはＪ１ＫＤの効果を決定するために、定量的ＲＴ－ＰＣＲおよびＦＡＣｓを使用した。ノッチ１$^{1-13}$、ノッチ１$^{10-24}$、ノッチ１^{1}

$^{-24}$デコイ変異体およびＪ１ＫＤのノックダウンは、ＶＥＧＦＲ－２を減少させた（データは示さず）ノッチ１細胞内ドメイン（ノッチ１ＩＣ）とは逆に、ＨＵＶＥＣにおいてＶＥＧＦＲ－２発現を増大した。ノッチ１デコイによるＶＥＧＦＲ－２の増加は、ＨＵＶＥＣの増殖および遊走における増大に寄与するらしい（図３４）。全てのノッチ１デコイ変異体およびＪ１ＫＤは、ＦＥＧＦＲ－３発現を有意に増加させる（図４５）。

【０１６８】

ノッチ１デコイによるＤＬＬ４またはＪＡＧＧＥＤ－１に媒介されたノッチ信号伝達の阻害は、ＶＥＧＦＲ－１発現を差別的に調節した。ノッチ1^{-13}デコイおよびノッチ1^{-24}デコイは、ＶＥＧＦＲ－１転写物を減少させた；これに対して、ノッチ1^{10-24}デコイまたはＪ１ＫＤは、ＶＥＧＦＲ－１を増大させた（図４６）。しかし、ＶＥＧＦＲ－１の表面発現は、ノッチ1^{10-24}デコイＨＵＶＥＣにおいて増大しなかった（図４６）。

ＶＥＧＦＲ－１は、膜貫通受容体（ＶＥＧＦＲ－１）または可溶性タンパク質（ｓＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１）を産生する二つのスプライス変異体として存在する。ｓＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１に特異的なＰＣＲプライマーを使用することにより、我々は、ノッチ1^{10-24}デコイまたはＪ１ＫＤがｓＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１転写物を有意に増大させることを見出した（図４７Ａ）。Ｄｌｌ４およびＪＡＧＧＥＤ－１の両方を阻害するノッチ1^{-24}デコイはまた、ＨＵＶＥＣにおいて、ｓＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１発現を増大させた。ｓＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１スプライス変異体は、ＨＵＶＥＣにおいて、Ｄｌｌ４特異的なノッチ1^{-13}デコイにより影響されなかった（図４７Ａ）。我々は、異なるノッチ１デコイ類、Ｊ１ＫＤまたはノッチ１ＩＣを発現するＨＵＶＥＣ由来の馴らし培地上でのＥＬＩＳＡを用いることにより、ＪＡＧＧＥＤ－１ノッチ信号伝達がｓＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１を調節することを確認した。ｓＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１のレベルは、ノッチ1^{10-24}デコイおよびノッチ1^{-24}デコイまたはＪＡＧＧＥＤ－１のノックダウンと共に有意に増大し、またノッチ1^{-13}デコイまたはノッチ１ＩＣによって影響されなかった（図４７Ｂ）。

【０１６９】

Ｍｍ５ＭＴ－ＦＧＦ４腫瘍のＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１免疫蛍光は、ノッチ1^{10-24}デコイおよびノッチ1^{-24}デコイ群におけるＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１の有意な増加を示した（図４８Ａおよび図４８Ｂ）。ノッチ1^{10-24}デコイおよびノッチ1^{-24}デコイで治療された腫瘍における核酸および非血管染色パターンは、増大した可溶性のＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１を示している。こうして、我々は、ノッチ1^{-24}またはノッチ1^{10-24}デコイの何れかが、ＨＵＶＥＣおよびマウス腫瘍異種移植片におけるｓＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１のレベルを特異的に増大させることを発見した。ｓＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１がＶＥＧＦ／ＶＥＧＦＲ－２信号伝達の競争的アンタゴニストとして機能するので、ノッチ1^{10-24}デコイおよびノッチ1^{-24}デコイで知慮いうされた腫瘍において我々が観察した腫瘍血管新生における減少は、減少したＶＥＧＦＲ－２信号伝達によって起きるかもしれない。

【０１７０】

・ノッチ１デコイは腫瘍を有するマウスに対して有毒ではない：

先の刊行物は、ＧＳＩ、または組み合わされたノッチ１／ノッチ２遮断で治療されたマウスにおける腸杯状細胞の肥厚を報告した（van Es et al., 2005; Wu et al., 2010）。ノッチ1^{-13}デコイ、ノッチ1^{-24}デコイ、またはノッチ1^{10-24}デコイは、３週間の実験の終了時に、腫瘍を有するマウスの腸において、杯状細胞数を２倍未満で穏やかに増加させた（図２７Ａおよび図２７Ｂ）。対照的に、ＧＳＩ（化合物Ｅ）で治療されたマウスは、杯状細胞における５倍の増加を有していた。温和な腸フェノタイプと一致して、ノッチ１デコイ変種腫瘍を持ったマウスにおいて体重ロスは観察されなかった（図２７Ｃ）。これらの結果は、ノッチ１デコイには有意な腸毒性がなく、抗血管新生療法のための別のノッチを標的とする薬剤を表すことを示唆している。

【０１７１】

＜考察＞

ノッチリガンドと生産的に相互作用するために、ノッチ受容体はＥＧＦ様反復１１および１２、並びにカルシウムイオンを必要とする（Rebay et al., 1991; Rand et al., 2000）；しかし、ノッチ上のリガンド特異的相互作用ドメインに関しては僅かしか知られていない。我々は、ＤＬＬ４およびＪＡＧＧＥＤ－１に焦点を当てて、リガンド特異的相互作用のためのドメインを決定するために、生化学的および機能的検定を利用した。この知識を用いることにより、我々は、ＤＬＬ４またはＪＡＧＧＥＤ－１に媒介されたノッチ信号伝達のための、独特な下流信号伝達事象を解明した。即ち、ノッチ1^{1-24}デコイは汎リガンド阻害剤として機能し、ＤＬＬ４またはＪＡＧＧＥＤ－１により誘発された信号伝達と相互作用し、且つ阻害する。ノッチ1^{1-13}デコイは、ＤＬＬ４特異的アンタゴニストとして機能し、ＤＬＬ４を妨害できるがＪＡＧＧＥＤ－１は妨害しない第一のＥＧＦ様反復を定義する。逆に、ノッチ１のＥＧＦ様反復１０～２４を含んだノッチ1^{10-24}デコイは、ＪＡＧＧＥＤ－１を阻害したが、ＤＬＬ４は阻害しなかった。これらのリガンド選択的なノッチ１デコイを使用して、我々は、ＤＬＬ４またはＪＡＧＧＥＤ－１阻害により誘発されたｓＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１の反対の調節を見出し、ＤＬＬ４およびＪＡＧＧＥＤ－１がノッチ１の下流の異なる信号伝達効果を有することを示した。最後に、我々は、ＤＬＬ４またはＪＡＧＧＥＤ－１の何れかを選択的に阻害し、またはその両方を阻害するノッチ１デコイを使用して、腫瘍阻害が達成され得ることを示した。しかし、ＤＬＬ４またはＪＡＧＧＥＤ－１の阻害は、網膜および腫瘍異種移植片において、異なる血管新生フェノタイプをもたらした。

【０１７２】

・内皮細胞におけるＪＡＧＧＥＤ－１ 対 ＤＬＬ４リガンド特異的ノッチ信号伝達：

我々は以前に、ＪＡＧＧＥＤ－１、Ｄｌｌ１またはＤｌｌ４によりノッチ１信号伝達をブックするラット・ノッチ1^{1-36}デコイを記載した（Funahashi et al., 2008）。我々は、ヒト・ノッチ1^{1-36}デコイおよびノッチ1^{1-24}デコイを作製し（図３６）、それらがＪＡＧＧＥＤ－１およびＤＬＬ４をブロックすることを示した。ノッチ1^{1-36}デコイおよびノッチ1^{1-24}デコイは、それらがＤＬＬ４（その阻害は超発芽応答を誘発するはず）と相互作用するとの事実にも拘わらず、抗血管新生剤として機能した。我々は、ノッチ1^{1-36}デコイおよびノッチ1^{1-24}デコイの項血管新生活性が、ＪＡＧＧＥＤ－１をブロックすることにより、またはＤＬＬ４およびＪＡＧＧＥＤ－１の両方をブロックすることにより誘発されたフェノタイプを反映すると仮定した。

【０１７３】

活性なアンタゴニストである全てのノッチ１デコイ変異体は、ノッチ１のＥＧＦ様反復１１～１３を含んでいた。我々は、ノッチ１のＥＧＦ様反復１０～１３の上流側の反復が、ＤＬＬ４に対する阻害活性を与え（図３Ｂおよび図３Ｃ）、またＤＬＬ４に対する特異的結合を与える（図５Ｂ）ことを発見した。逆に、ＥＧＦ様反復１０～１３の下流側の反復は、ＪＡＧＧＥＤ－１に対する阻害活性を与え（図４Ａおよび図４Ｂ）、またＪＡＧＧＥＤ－１に対する結合を与える（図５Ｂ）が、ＤＬＬ４に対しては与えない。これは、ノッチ１タンパク質におけるリガンド選択的な会合ドメインの最初の記述である。

【０１７４】

我々の研究は、ＪＡＧＧＥＤ－１／ノッチおよびＤＬＬ／ノッチの信号伝達が重なりを有しており、また独特な分子標的を有していることを示している。汎リガンドであるノッチ1^{1-24}デコイ、ＤＬＬ４－特異的ノッチ1^{1-13}デコイ、およびＪＡＧＧＥＤ－１特異的ノッチ1^{10-24}デコイは、全て、ノッチ標的であるＨＥＹ１、ＨＥＹＬ、ＨＥＳ１、ＶＥＧＦＲ－３のレベルの減少、およびＶＥＧＦＲ－２における増大を生じさせ、これら遺伝子がＤＬＬ４／ノッチおよびＪＡＧＧＥＤ－１／ノッチの両方の信号伝達の標的であることを示した。ノッチ１デコイ変異体活性における相違は、我々が、ＶＥＧＦｒ－１のためのデコイ受容体として機能する抗血管新生剤であり、且つＦＥＧＦＲ－２信号伝達を弱める可溶性ＦＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１のリガンド特異的調節を分析したときに発見された（Shibuya, 2006）。ＤＬＬ４－特異的ノッチ1^{1-13}デコイは、ｓＶ

ＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１スプライス変異体およびタンパク質レベルを低下させたのに対して、ＪＡＧＧＥＤ－１特異的なノッチ１$^{10-24}$デコイは、増大したｓＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１をもたらした。従って、インビトロの発芽検定および腫瘍異種移植において、ＪＡＧＧＥＤ－１特異的なノッチデコイについて観察された抗血管新生フェノタイプは、ｓＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１における増大から生じたのかも知れない。

【０１７５】

・ノッチ１デコイの抗血管新生活性および抗腫瘍活性

ＪＡＧＧＥＤ－１特異的およびＤＬＬ特異的なノッチ１デコイは、両者共に腫瘍増殖を低下させ、また腫瘍における低酸素症を誘導して、該ノッチ１デコイが腫瘍への血流を効果的にブロックすることを示した。我々の解析により、ＤＬＬ４および／またはＪＡＧＧＥＤ－１が標的であるとき、ノッチ１デコイ変異体の腫瘍阻害効果は異なる血管新生機構から生じることが示された。

【０１７６】

Ｄｌｌ４／ノッチの遮断は、増大した内皮細胞増殖および増大した先端細胞を導き、最終的には、非機能的血管新生および血管灌流をもたらす（Noguera-Troise et al., 2006; Ridgway et al., 2006; Li et al., 2007; Hoey et al., 2009）。これらの研究と一致して、ＤＬＬ４特異的なノッチ１$^{1-13}$デコイは、インビトロフィブリンビード検定において（図３３Ａおよび図３３Ｂ）、網膜血管新生の際（図７Ｂおよび図７Ｃ）、および四つの異なる腫瘍異種移植において（図３８）、超発芽を生じた。ノッチ１$^{1-13}$デコイは、ＶＥＧＦＲ－２の上昇およびＶＥＧＦＲ－１の減少を生じ、該超発芽フェノタイプの根底にあるものとして提案される変化はＤｌｌ４遮断により生じる（Potente et al., 2011）。従って、ノッチ１$^{1-13}$デコイの血管新生フェノタイプは、ＤＬＬ４阻害剤としての生化学的活性と一致した。

【０１７７】

ＪＡＧＧＥＤ－１阻害剤であるノッチ１$^{10-24}$デコイは、インビトロで（図３３Ａ）、網膜血管新生の際（図７Ｂおよび図７Ｃ）、および複数の腫瘍異種移植において（図３８）、低下した発芽を生じた。これは先の研究と一致するものであり、そこでは内皮ＪＡＧＧＥＤ－１が網膜血管新生発芽を低下させる（High et al., 2008; Benedito et al., 2009）。ノッチ１$^{10-24}$デコイによるＪＡＧＧＥＤ－１阻害は、減少したＪＡＧＧＥＤ－１／ノッチ１に誘導されたＣＳＬレポータ発現、並びにＨＥＹ１、ＨＥＹＬ、およびＨＥＳ１の発現に見られるように、低下したノッチ信号伝達と関連していた。しかしながら、ＪＡＧＧＥＤ－１の阻害は、内皮細胞におけるｓＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１産生を特異的に増大させた。従って、ノッチ１$^{10-24}$デコイによるＪＡＧＧＥＤ－１遮断の効果は、内皮細胞により産生される抗血管新生剤のレベルを上昇させることであった。事実、ｓＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１の有意な上昇が、ノッチ１$^{10-24}$デコイで治療された腫瘍においてみられた（図４８）；従って、低下した腫瘍血管新生は、高いｓＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１レベルと相関していた。

【０１７８】

ノッチ１$^{10-24}$デコイ発現は、網膜および腫瘍血管の両方に付随した血管壁細胞を低下および崩壊させた。網膜において、ＪＡＧＧＥＤ－１特異的阻害は、小動脈の血管平滑筋細胞被覆を低減した（図３３Ｄ）。周皮細胞もまた、ノッチ１$^{10-24}$デコイで治療された腫瘍において、腫瘍内皮と結合できなかった。ノッチ１$^{10-24}$デコイで観察された壁細胞被覆の方かいはまた、ＪＡＧＧＥＤ－１／ノッチ相互作用が、動脈上での適正な平滑筋細胞結合について必要とされることを示した先の研究（High et al., 2008; Benedito et al., 2009）と一致した。

【０１７９】

我々は、ＪＡＧＧＥＤ－１に媒介されたノッチ活性化が内皮－周皮細胞相互作用の調節および維持のために必要とされることを見出し、これらの相互作用の調節解除が血管の不安定性に寄与することを提案した。従って、ｓＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１を上昇させることに加えて、我々は、ノッチ１$^{10-24}$デコイが腫瘍血管新生をブロックする追加

の機構を提案する。ノッチ１$^{10-24}$デコイは、ＪＡＧＧＥＤ－１の阻害を介して、内皮週比細胞相互作用を攪乱させることにより、腫瘍血管を不安定化する。ノッチは、内皮－壁細胞相互作用を促進する広範囲の信号伝達分子（Armulik et al., 2005)を調節し、また平滑筋細胞において、ノッチは分化を促進することにより内皮ＪＡＧＧＥＤ－１に応答する（Domenga et al., 2004）。周皮細胞はＶＥＧＦ－Ａを産生するものであり、また内皮細胞生存を促進することが知られている（Franco et al., 2011）。ノッチ１$^{10-24}$デコイは、腫瘍血管の周皮細胞被覆を酷く崩壊させ、またｓＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１を上昇させるので、この腫瘍内皮は、ＶＥＧＦ－Ａにより提供される生存促進信号の欠失に対して特に敏感であろう。従って、ノッチ１$^{10-24}$デコイは、腫瘍において、周皮細胞を崩壊させ且つｓＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１を上昇させるように働く強力な血管新生剤を代表するものである。

【０１８０】

・ＪＡＧＧＥＤ－１：血管新生促進性ノッチリガンド

血管におけるノッチ信号伝達の調節は、内皮ノッチリガンド、即ち、ＪＡＧＧＥＤ－１およびＤｌｌ４に起因する。Ｄｌｌ４とは異なり、ノッチがマニックフリンジ（Manic Fringe；Benedito et al., 2009）によりグリコシル化されるなら、内皮ＪＡＧＧＥＤ－１がノッチ信号伝達を活性化する減少した能力を有することが示されるまで、ＪＡＧＧＥＤ－１の役割は幾分わかり難いままであった。このデータは、内皮ＪＡＧＧＥＤ－１が、Ｄｌｌ４／ノッチ相互作用を妨害することにより、またはＤｌｌ４により媒介されるものよりも低いノッチ信号伝達を促進することにより、Ｄｌｌ４／ノッチ信号伝達を妨害するモデルを示唆する（Benedito et al., 2009）。このモデルのサポートにおいて、ＪＡＧＧＥＤ－１の内皮特異的喪失は、網膜血管内において増大したノッチ標的であるＨｅｙ１及びＨｅｓ１を導く（Benedito et al., 2009）。

【０１８１】

我々は、内皮ＪＡＧＧＥＤ－１が、ｓＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ１および未だ同定されていない他の可能なＪＡＧＧＥＤ－１特異的ノッチ標的を下方調節することによって血管新生を促進するために、ノッチ信号活性化を介して作用できることを提案する。培養された内皮細胞において、ノッチ信号伝達を活性化するＪＡＧＧＥＤ－１の能力は、概ねＤＬＬ４と同様であった（図３Ｂ～３Ｃ、および図４Ａ～４ｂ）。ノッチ１$^{10-24}$ デコイまたはＪ１ＫＤを介してＪＡＧＧＥＤ－１活性をブロックすることは、ＨＥＹ１、ＨＥＹＬ、ＨＥＳ１、ＶＥＧＦＲ－３を含む殆どのノッチ下流標的を下方調節し、またＶＥＧＦＲ－２を上方調節した（図４５）。しかし、ノッチ１$^{10-24}$デコイまたはＪ１ＫＤによるＪＡＧＧＥＤ－１／ノッチ信号伝達の阻害は、ＤＬＬ４遮断とは異なり、ＨＥＹ２を阻止せず、またｓＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１を上昇させた。従って、ノッチ１$^{10-24}$デコイまたはＪ１ＫＤを使用した機能喪失実験は、内皮ＪＡＧＧＥＤ－１が、ノッチ信号伝達を活性化し、これがｓＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１の下方調節をもたらすことにより、血管新生を促進できることを示している。ＪＡＧＧＥＤ－１が活性化リガンドであるとき、内皮細胞はｓＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１を減少させることによって応答するであろう。これに対して、ＪＡＧＧＥＤ－１がマニック・フリンジで修飾され（manic fringe-modified）、且つリガンドとして活性が低ければ、増大したＤＬＬ４信号伝達が発芽形成を限定するであろう。従って、血管新生におけるＪＡＧＧＥＤ－１の特別な役割は状況に依存するものであり、ノッチのレベルおよびグリコシル化状態、またはＪＡＧＧＥＤ－１を内皮細胞ノッチに提示する細胞タイプに基づいて異なる。我々の研究から得られた全ての証拠は、ＪＡＧＧＥＤ－１活性が生産的血管新生のために決定的に重要であるとの結論と一致している。

【０１８２】

・ＤＬＬ４およびＪＡＧＧＥＤ－１の両方をブロックするノッチ１デコイの機能：

ＤＬＬ４およびＪＡＧＧＥＤ－１の両方を各々について選択的にブロックするノッチ１デコイを開発することによって、我々は、リガンド選択的な遮断を用いて、組み合わされたＤＬＬ４およびＪＡＧＧＥＤ－１遮断の効果を比較する機会を持った。ノッチ１^{10}

$^{-24}$デコイと同様に、ノッチ1^{1-24}デコイはインビトロのフィブリンビード発芽試験を使用した内皮発芽をブロックし（図３３Ａ）、またノッチ1^{10-24}デコイのように協力にではないが、ｓＶＥＧＦＲ１／ｓＦｌｔ－１のタンパク質レベルを増大させた（図４７Ｂ）。しかしながら、ノッチ1^{1-24}デコイはまた、増大したＨＵＶＥＣ増殖、遊走およびネットワーク形成によってわかるように、ＤＬＬ４特異的なノッチ1^{1-13}デコイと同様に機能した。網膜において、ノッチ1^{1-24}デコイは混合型フェノタイプを示し、超発芽を生じたが（図７Ｂ）、また壁細胞被覆も低減させた（図３３Ｄ）。従って、ノッチ1^{1-24}デコイは、網膜血管において、Ｄ１１４およびＪＡＧＧＥＤ－１機能の両方を乱すことができる。対照的に、ノッチ1^{1-24}デコイは、四つの異なる腫瘍モデルにおいてノッチ1^{10-24}デコイを表現型模写して腫瘍血管構造を低減させ、またＭｍ５ＭＴ腫瘍モデルにおいてＶＥＧＦＲ－１／ｓＦｌｔ－１を上昇させた。ノッチ1^{1-24}デコイは、腫瘍微小環境において主にＪＡＧＧＥＤ－１阻害剤として作用し、腫瘍におけるその有用性は、明らかに、異なるノッチリガンドの存在および活性に依存するであろう。

【０１８３】

・ノッチ１デコイの治療的能力

腫瘍血管新生の阻害におけるノッチ１デコイ類の他と異なる示差的能力は、それらの生体利用性によって影響されるであろう。ノッチ1^{1-13}デコイおよびノッチ1^{1-24}デコイは、ノッチ1^{1-36}デコイよりも高いレベルで発現および分泌され、従って、製造がより容易である可能性があり、また潜在的にはより効果的である。腫瘍切片の分析により、ノッチ1^{1-36}デコイは、腫瘍血管の周囲で検出され且つ腫瘍細胞をおおって拡散されるより小さいノッチ１デコイ変異体とは逆に、腫瘍血管構造に限定されることが示された（図３９）。より拡散性であるため、ノッチ1^{1-13}デコイおよびノッチ1^{1-24}デコイは、腫瘍微小環境において、腫瘍血管新生、腫瘍細胞、癌細胞、および他の細胞に影響する能力を有している。ＪＡＧＧＥＤ－１を過剰発現する腫瘍細胞は、マウスにおける腫瘍血管新生を促進し（Zeng et al., 2005; Funahashi et al., 2008）、腫瘍由来のＪＡＧＧＥＤ－１が、ＶＥＧＦ遮断のケースにおいて代替の血管新生経路として働き得ることを示唆した。従って、ＪＡＧＧＥＤ－１に媒介されたノッチ信号伝達の選択的阻害は、多くの細胞タイプに由来するＪＡＧＧＥＤ－１の腫瘍促進活性をターゲッティングするために重要である。

【０１８４】

ノッチ1^{1-36}デコイの血管局在化の潜在的な利点は、オフ・ターゲット副作用を最小化することであり得るであろう。ガンマセクレターゼ阻害剤（van Es et al., 2005）、またはノッチ１／ノッチ２の組み合わされた阻害抗体（Wu et al., 2010）を使用したノッチ遮断の大きな副作用は、損なわれた胃腸機能である。我々は、ＧＳＩ治療に比較して、ノッチ1^{1-13}デコイ、ノッチ1^{10-24}デコイ、ノッチ1^{1-24}デコイが、最小限の杯細胞異型性のみを誘導し、またノッチ１デコイ類を発現するマウスが８週までは耐容性を示すことを見出した（データは示さず）。

【０１８５】

活性および標的の相違にも拘わらず、ノッチ1^{1-13}デコイ、ノッチ1^{10-24}デコイ、ノッチ1^{1-24}デコイは、全て、四つの異なる腫瘍モデルにおいて、最小限の毒性で腫瘍増殖を抑制する上で効果的であった。ノッチ経路の複雑さおよびノッチが機能するプロセスの多様性が、我々に対して、該信号伝達経路を様々に調節できる広範な治療剤、および癌治療のための新規な代替法を研究および開発する機会を提供した。

【０１８６】

＜第三実験シリーズについての参照文献＞

【参照文献３】

【０１８７】

Armulik, A., Abramsson, A., and Betsholtz, C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. Circulation Research *97*, 512-523.

Benedito, R., Roca, C., Sörensen, I., Adams, S., Gossler, A., Fruttiger, M., and Adams, R.H. (2009). The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. Cell *137*, 1124-1135.

Bergers, G., and Hanahan, D. (2008). Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. Nat Rev Cancer *8*, 592-603.

Cordle, J., Johnson, S., Tay, J.Z.Y., Roversi, P., Wilkin, M.B., de Madrid, B.H., Shimizu, H., Jensen, S., Whiteman, P., Jin, B., et al. (2008). A conserved face of the Jagged/Serrate DSL domain is involved in Notch trans-activation and cis-inhibition. Nat Struct Mol Biol *15*, 849-857.

Domenga, V., Fardoux, P., Lacombe, P., Monet, M., Maciazek, J., Krebs,

(つづく)

(つづき)

L.T., Klonjkowski, B., Berrou, E., Mericskay, M., Li, Z., et al. (2004). Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. Genes & Development *18*, 2730-2735.

Ebos, J.M.L., Lee, C.R., Cruz-Munoz, W., Bjarnason, G.A., Christensen, J.G., and Kerbel, R.S. (2009). Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. Cancer Cell *15*, 232-239.

Franco, M., Roswall, P., Cortez, E., Hanahan, D., and Pietras, K. (2011). Pericytes promote endothelial cell survival through induction of autocrine VEGF-A signaling and Bcl-w expression. Blood *118*, 2906-2917.

Funahashi, Y., Hernandez, S.L., Das, I., Ahn, A., Huang, J., Vorontchikhina, M., Sharma, A., Kanamaru, E., Borisenko, V., Desilva, D.M., et al. (2008). A notch1 ectodomain construct inhibits endothelial notch signaling, tumor growth, and angiogenesis. Cancer Res *68*, 4727-4735.

Funahashi, Y., Shawber, C.J., Sharma, A., Kanamaru, E., Choi, Y.K., and Kitajewski, J. (2011). Notch modulates VEGF action in endothelial cells by inducing Matrix Metalloprotease activity. Vascular Cell *3*, 2.

Geudens, I., Herpers, R., Hermans, K., Segura, I., Ruiz de Almodovar, C., Bussmann, J., de Smet, F., Vandevelde, W., Hogan, B.M., Siekmann, A., et al. (2010). Role of delta-like-4/Notch in the formation and wiring of the lymphatic network in zebrafish. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *30*, 1695-1702.

Glittenberg, M., Pitsouli, C., Garvey, C., Delidakis, C., and Bray, S. (2006). Role of conserved intracellular motifs in Serrate signalling, cis-inhibition and endocytosis. The EMBO Journal *25*, 4697-4706.

Hambleton, S., Valeyev, N.V., Muranyi, A., Knott, V., Werner, J.M., McMichael, A.J., Handford, P.A., and Downing, A.K. (2004). Structural and functional properties of the human notch-1 ligand binding region. Structure *12*, 2173-2183.

(つづく)

(つづき)

Hellström, M., Phng, L.-K., Hofmann, J.J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., Alva, J., Nilsson, A.-K., Karlsson, L., Gaiano, N., et al. (2007). Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. Nature *445*, 776-780.

Henderson, S.T., Gao, D., Christensen, S., and Kimble, J. (1997). Functional domains of LAG-2, a putative signaling ligand for LIN-12 and GLP-1 receptors in Caenorhabditis elegans. Mol. Biol. Cell *8*, 1751-1762.

High, F.A., Lu, M.M., Pear, W.S., Loomes, K.M., Kaestner, K.H., and Epstein, J.A. (2008). Endothelial expression of the Notch ligand Jagged1 is required for vascular smooth muscle development. Proc Natl Acad Sci USA *105*, 1955-1959.

Hoey, T., Yen, W.-C., Axelrod, F., Basi, J., Donigian, L., Dylla, S., Fitch-Bruhns, M., Lazetic, S., Park, I.-K., Sato, A., et al. (2009). DLL4 blockade inhibits tumor growth and reduces tumor-initiating cell frequency. Cell Stem Cell *5*, 168-177.

Kalén, M., Heikura, T., Karvinen, H., Nitzsche, A., Weber, H., Esser, N., Ylä-Herttuala, S., and Hellström, M. (2011). Gamma-Secretase Inhibitor Treatment Promotes VEGF-A-Driven Blood Vessel Growth and Vascular Leakage but Disrupts Neovascular Perfusion. PLoS ONE *6*, e18709.

Kopan, R., and Ilagan, M.X.G. (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. Cell *137*, 216-233.

Li, J.-L., Sainson, R.C.A., Shi, W., Leek, R., Harrington, L.S., Preusser, M., Biswas, S., Turley, H., Heikamp, E., Hainfellner, J.A., et al. (2007). Delta-like 4 Notch ligand regulates tumor angiogenesis, improves tumor vascular function, and promotes tumor growth in vivo. Cancer Res *67*, 11244-11253.

Liu, Z.-J., Shirakawa, T., Li, Y., Soma, A., Oka, M., Dotto, G.P., Fairman, R.M., Velazquez, O.C., and Herlyn, M. (2003). Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. Mol Cell Biol *23*, 14-25.

(つづく)

(つづき)

Lobov, I.B., Renard, R.A., Papadopoulos, N., Gale, N.W., Thurston, G., Yancopoulos, G.D., and Wiegand, S.J. (2007). Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. Proc Natl Acad Sci USA *104*, 3219-3224.

Nakagawa, O., McFadden, D.G., Nakagawa, M., Yanagisawa, H., Hu, T., Srivastava, D., and Olson, E.N. (2000). Members of the HRT family of basic helix-loop-helix proteins act as transcriptional repressors downstream of Notch signaling. Proc Natl Acad Sci USA *97*, 13655-13660.

Nakatsu, M.N., and Hughes, C.C.W. (2008). An optimized three-dimensional in vitro model for the analysis of angiogenesis. Meth Enzymol *443*, 65-82.

Noguera-Troise, I., Daly, C., Papadopoulos, N.J., Coetzee, S., Boland, P., Gale, N.W., Lin, H.C., Yancopoulos, G.D., and Thurston, G. (2006). Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. Nature *444*, 1032-1037.

Pàez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Viñals, F., Inoue, M., Bergers, G., Hanahan, D., and Casanovas, O. (2009). Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. Cancer Cell *15*, 220-231.

Pei, Z., and Baker, N.E. (2008). Competition between Delta and the Abruptex domain of Notch. BMC Dev Biol *8*, 4.

Potente, M., Gerhardt, H., and Carmeliet, P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. Cell *146*, 873-887.

Rand, M.D., Grimm, L.M., Artavanis-Tsakonas, S., Patriub, V., Blacklow, S.C., Sklar, J., and Aster, J.C. (2000). Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors. Mol Cell Biol *20*, 1825-1835.

Ranganathan, P., Weaver, K.L., and Capobianco, A.J. (2011). Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. Nat Rev Cancer *11*, 338-351.

(つづく)

(つづき)

Rebay, I., Fleming, R., Fehon, R., Cherbas, L., Cherbas, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. Cell *67*, 687-699.

Ridgway, J., Zhang, G., Wu, Y., Stawicki, S., Liang, W.-C., Chanthery, Y., Kowalski, J., Watts, R.J., Callahan, C., Kasman, I., et al. (2006). Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. Nature *444*, 1083-1087.

Shawber, C.J., Funahashi, Y., Francisco, E., Vorontchikhina, M., Kitamura, Y., Stowell, S.A., Borisenko, V., Feirt, N., Podgrabinska, S., Shiraishi, K., et al. (2007). Notch alters VEGF responsiveness in human and murine endothelial cells by direct regulation of VEGFR-3 expression. J Clin Invest *117*, 3369-3382.

Shibuya, M. (2006). Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. Angiogenesis *9*, 225-230; discussion231.

Shimizu, K., Chiba, S., Kumano, K., Hosoya, N., Takahashi, T., Kanda, Y., Hamada, Y., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1999). Mouse jagged1 physically interacts with notch2 and other notch receptors. Assessment by quantitative methods. J Biol Chem *274*, 32961-32969.

Suchting, S., Freitas, C., Le Noble, F., Benedito, R., Bréant, C., Duarte, A., and Eichmann, A. (2007). The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. Proc Natl Acad Sci USA *104*, 3225-3230.

Takebe, N., Harris, P.J., Warren, R.Q., and Ivy, S.P. (2010). Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. Nature Reviews Clinical Oncology.

Tammela, T., Zarkada, G., Nurmi, H., Jakobsson, L., Heinolainen, K., Tvorogov, D., Zheng, W., Franco, C.A., Murtomäki, A., Aranda, E., et al. (2011). VEGFR-3 controls tip to stalk conversion at vessel fusion sites by reinforcing Notch signalling. Nature.

Taylor, K.L., Henderson, A.M., and Hughes, C.C.W. (2002). Notch

(つづく)

（つづき）

activation during endothelial cell network formation in vitro targets the basic HLH transcription factor HESR-1 and downregulates VEGFR-2/KDR expression. Microvascular Research *64*, 372-383.

Thurston, G., and Kitajewski, J. (2008). VEGF and Delta-Notch: interacting signalling pathways in tumour angiogenesis. British Journal of Cancer *99*, 1204-1209.

van Es, J.H., van Gijn, M.E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D.J., Radtke, F., et al. (2005). Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. Nature *435*, 959-963.

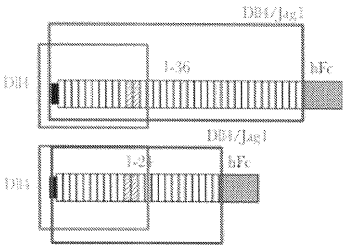
Wu, Y., Cain-Hom, C., Choy, L., Hagenbeek, T.J., de Leon, G.P., Chen, Y., Finkle, D., Venook, R., Wu, X., Ridgway, J., et al. (2010). Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. Nature *464*, 1052-1057.

Zeng, Q., Li, S., Chepeha, D., Giordano, T., Li, J., Zhang, H., Polverini, P., Nor, J., Kitajewski, J., and Wang, C. (2005). Crosstalk between tumor and endothelial cells promotes tumor angiogenesis by MAPK activation of Notch signaling. Cancer Cell *8*, 13-23.

【図１ａ】

図 1a

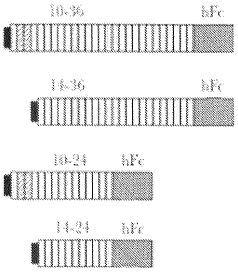
Fig. 1a



【図１ｂ】

図 1b

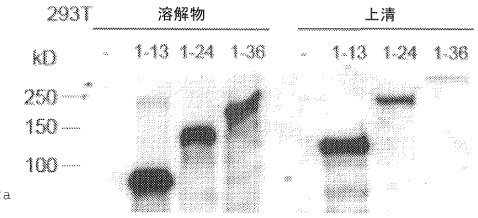
Fig. 1b



【図２ａ】

図 2a

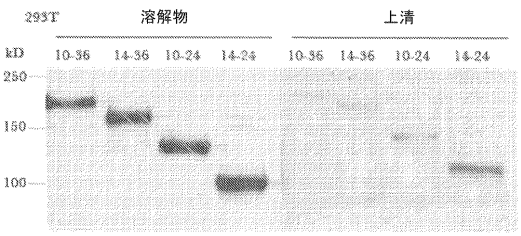
Fig. 2a



【図２ｂ】

図 2b

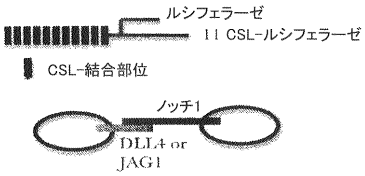
Fig. 2b



【図３ａ】

図 3a

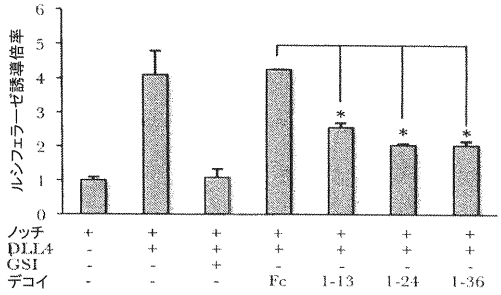
Fig. 3a



【図３ｂ】

図 3b

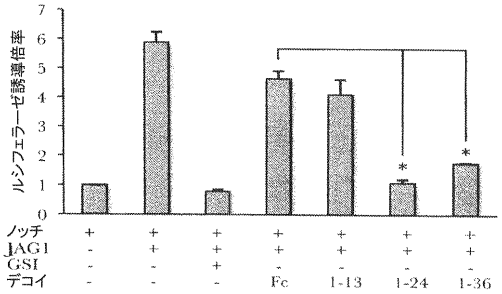
Fig. 3b



【図３ｃ】

図 3c

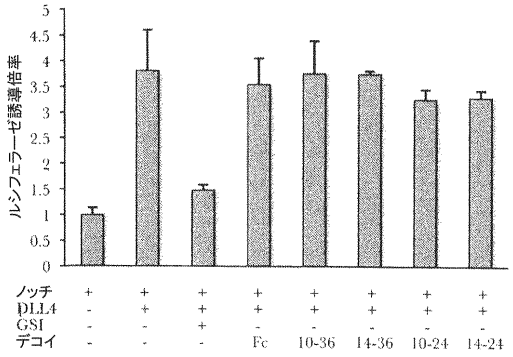
Fig. 3c



【図４ａ】

図 4a

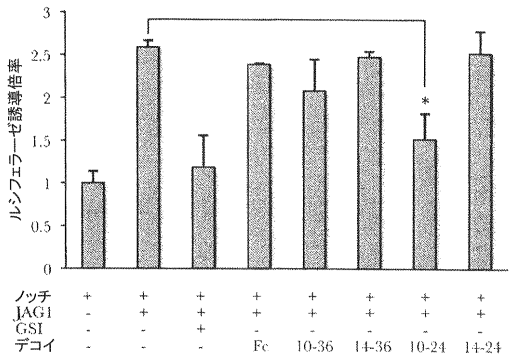
Fig. 4a



【図４ｂ】

図 4b

Fig. 4b



【図５ａ】

図 5a

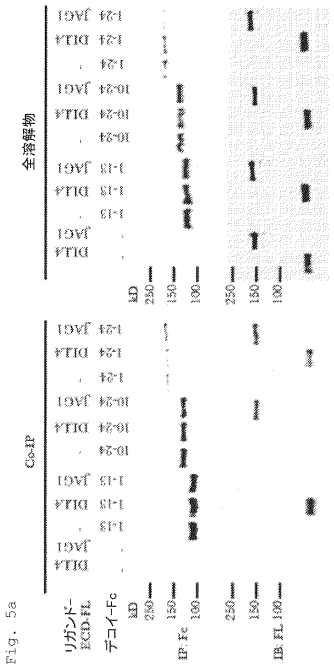


Fig. 5a

【図５ｂ】

図 5b

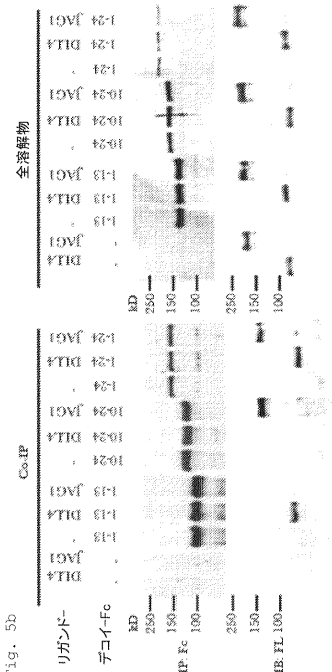


Fig. 5b

【図６】

図 6

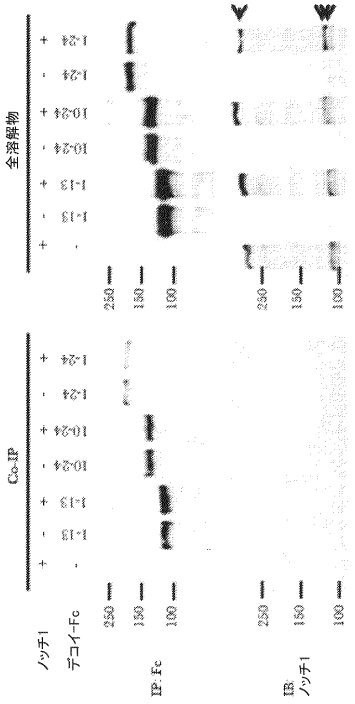
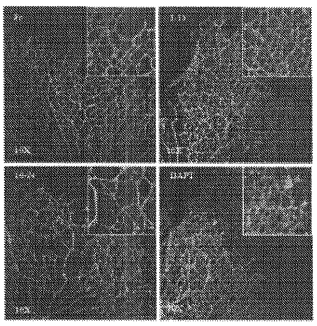


FIGURE 6

【図７ａ】

図 7a

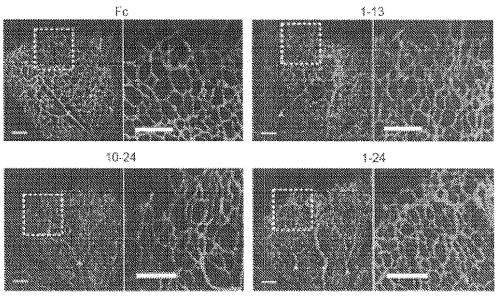
Fig. 7a



【図７ｂ】

図 7b

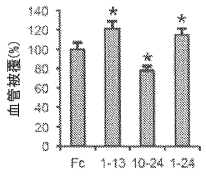
Fig. 7b



【図７ｃ】

図 7c

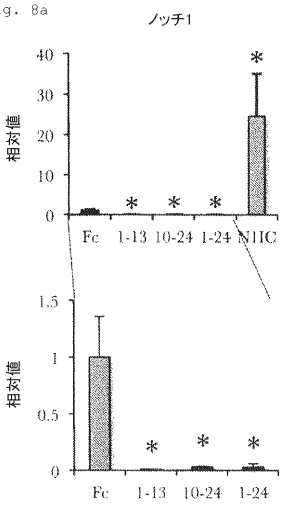
Fig. 7c



【図８ａ】

図 8a

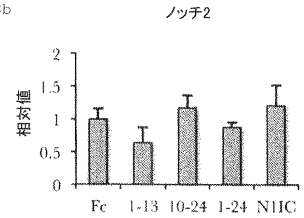
Fig. 8a



【図８ｂ】

図 8b

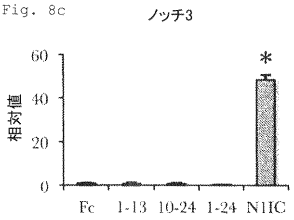
Fig. 8b



【図８ｃ】

図 8c

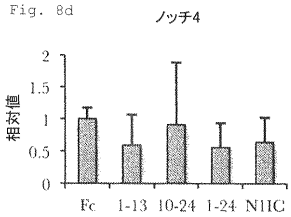
Fig. 8c



【図８ｄ】

図 8d

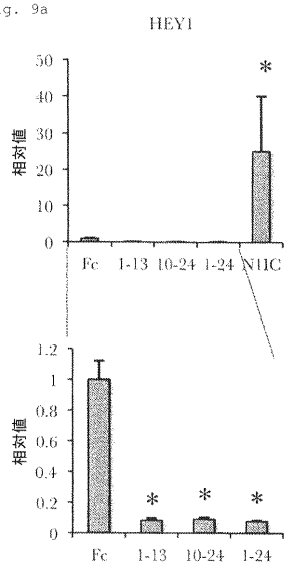
Fig. 8d



【図９ａ】

図 9a

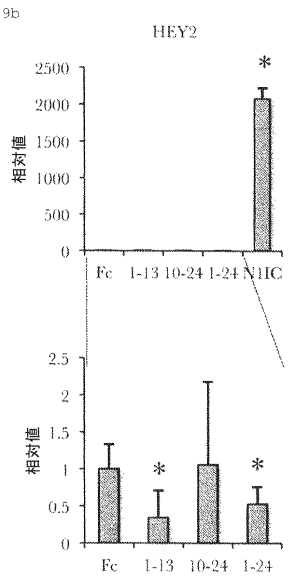
Fig. 9a



【図９ｂ】

図 9b

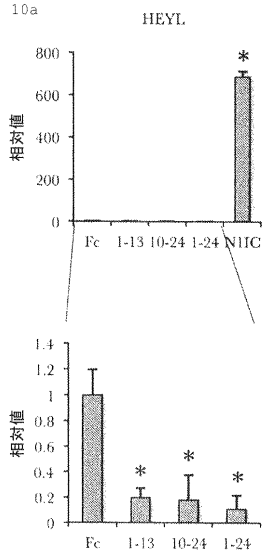
Fig. 9b



【図１０ａ】

図 10a

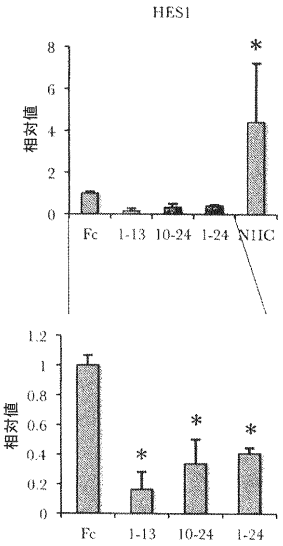
Fig. 10a



【図１０ｂ】

図 10b

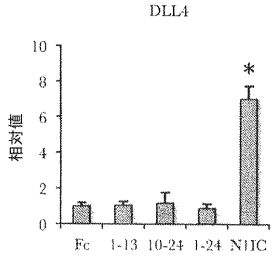
Fig. 10b



【図１１ａ】

図 11a

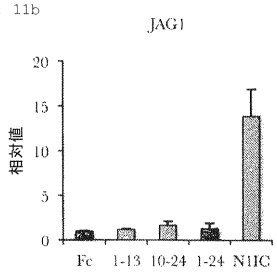
Fig. 11a



【図１１ｂ】

図 11b

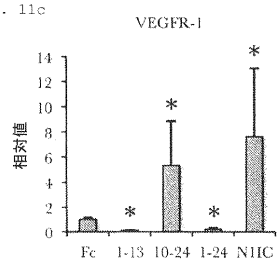
Fig. 11b



【図１１ｃ】

図 11c

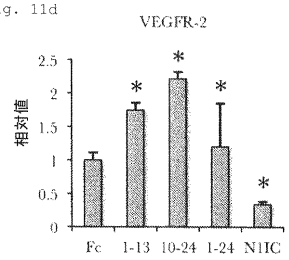
Fig. 11c



【図１１ｄ】

図 11d

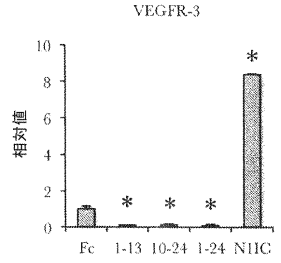
Fig. 11d



【図１１ｅ】

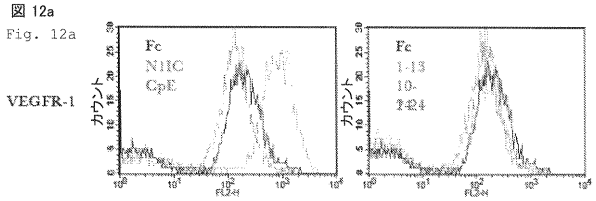
図 11e

Fig. 11e



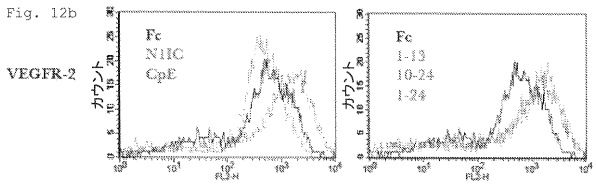
【図１２ａ】

図 12a
Fig. 12a



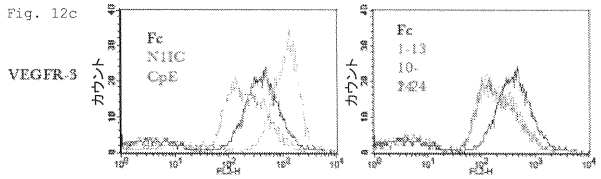
【図１２ｂ】

図 12b
Fig. 12b



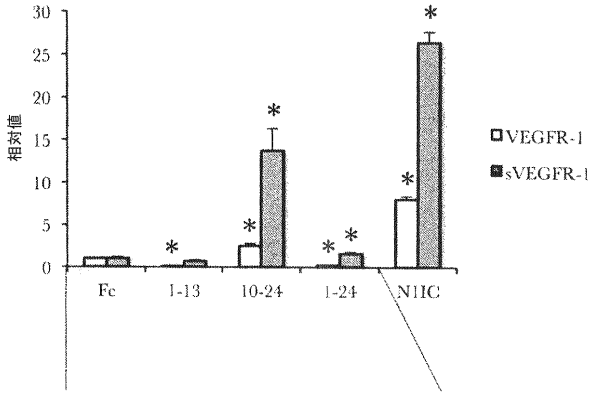
【図１２ｃ】

図 12c
Fig. 12c



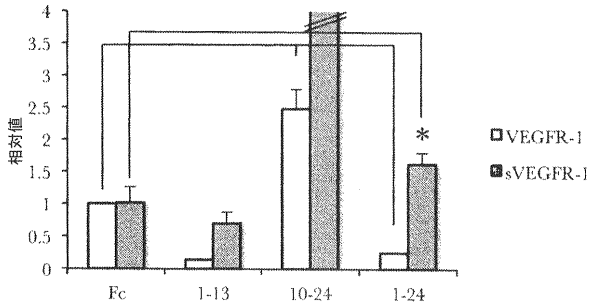
【図１３ａ】

図 13a
Fig. 13a



【図１３ｂ】

図 13b
Fig. 13b



【図１４】

図 14

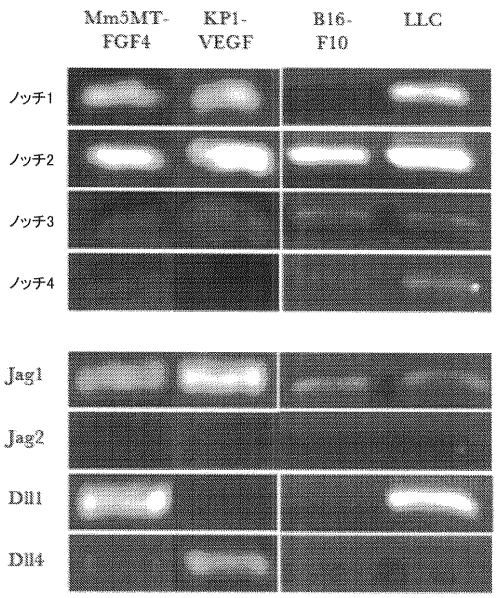
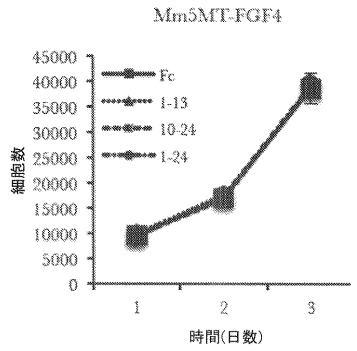


FIGURE 14

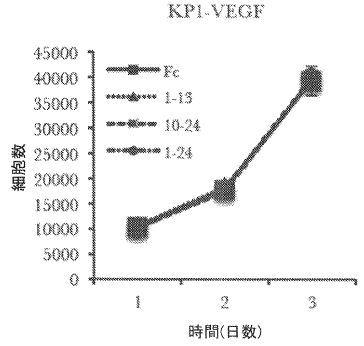
【図１５ａ】

図 15a
Fig. 15a



【図１５ｂ】

図 15b
Fig. 15b



【図１５ｃ】

図 15c

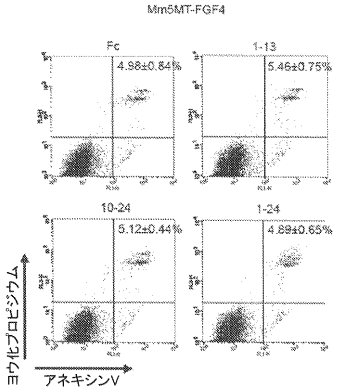


Fig. 15c

【図１５ｄ】

図 15d

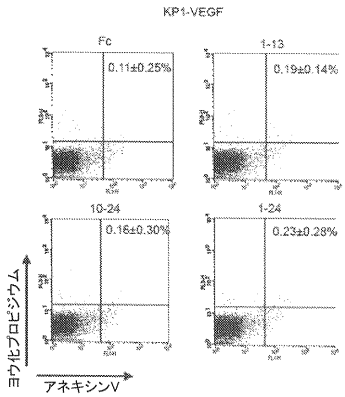
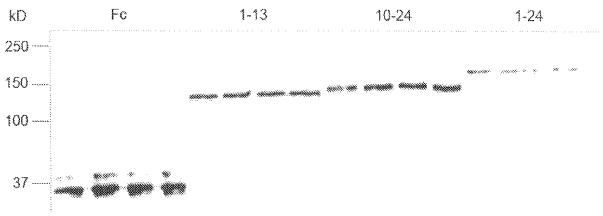


Fig. 15d

【図１６ａ】

図 16a

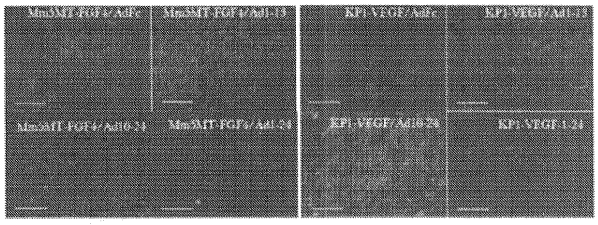
Fig. 16a



【図１６ｂ】

図 16b

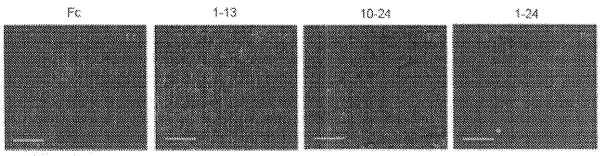
Fig. 16b



【図１６ｃ】

図 16c

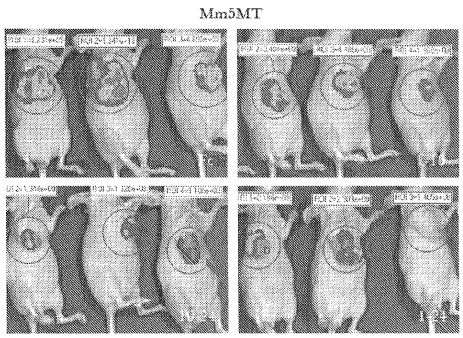
Fig. 16c



【図１７ａ】

図 17a

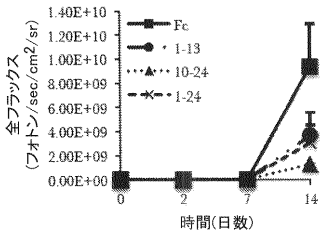
Fig. 17a



【図１７ｂ】

図 17b

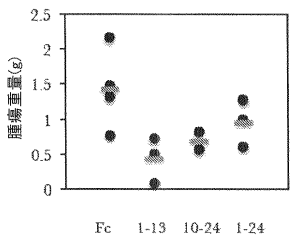
Fig. 17b



【図１７ｃ】

図 17c

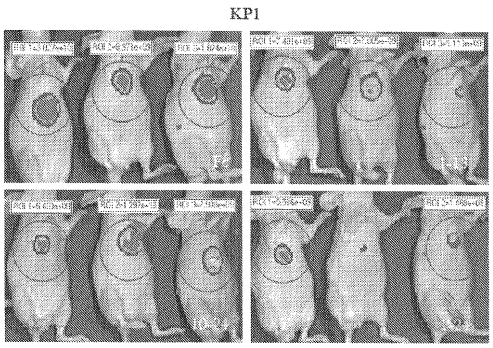
Fig. 17c



【図１８ａ】

図 18a

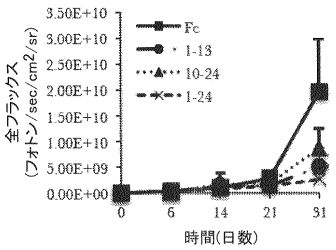
Fig. 18a



【図１８ｂ】

図 18b

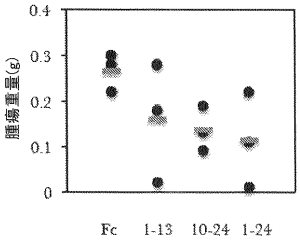
Fig. 18b



【図１８ｃ】

図 18c

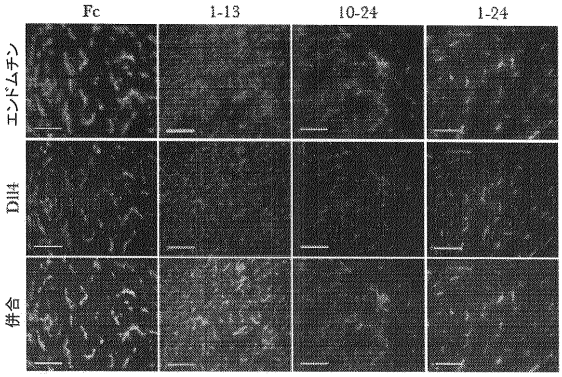
Fig. 18c



【図１９ａ】

図 19a

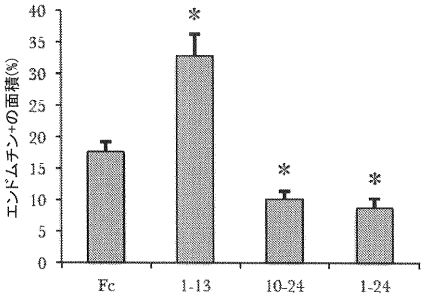
Fig. 19a



【図１９ｂ】

図 19b

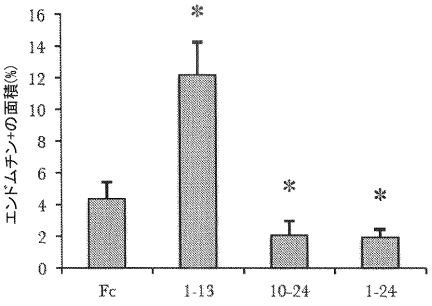
Fig. 19b



【図２０ｂ】

図 20b

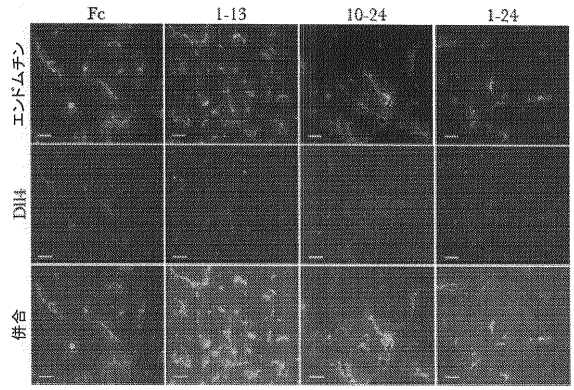
Fig. 20b



【図２０ａ】

図 20a

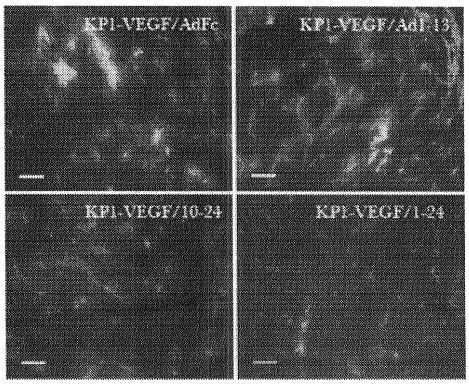
Fig. 20a



【図２１ａ】

図 21a

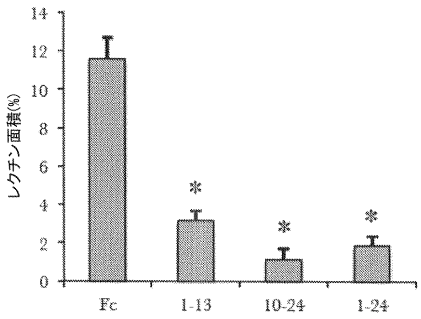
Fig. 21a



【図２１ｂ】

図 21b

Fig. 21b



【図２２ａ】

図 22a

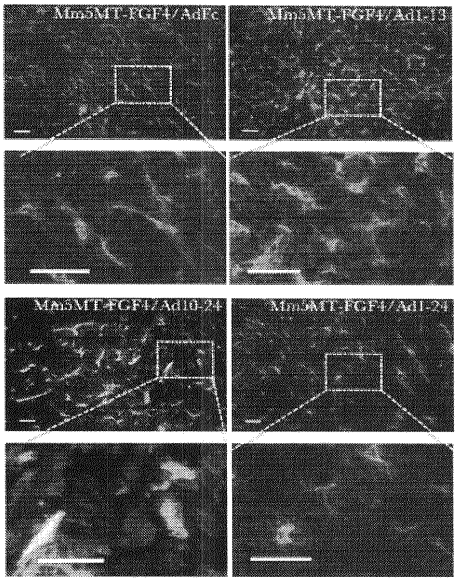
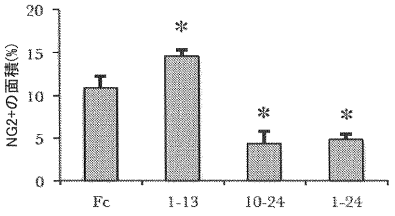


Fig. 22a

【図２２ｂ】

図 22b

Fig. 22b



【図２３ａ】

図 23a

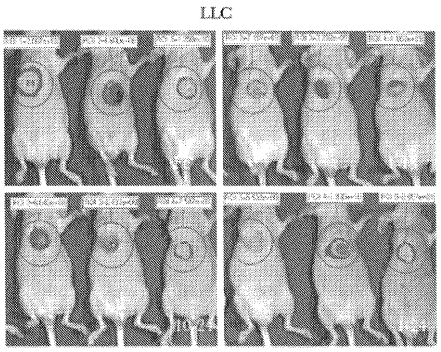
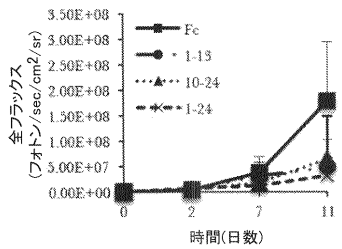


Fig. 23a

【図２３ｂ】

図 23b

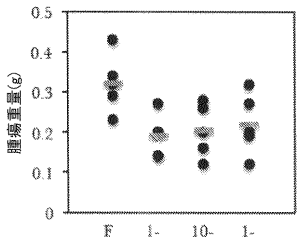
Fig. 23b



【図２３ｃ】

図 23c

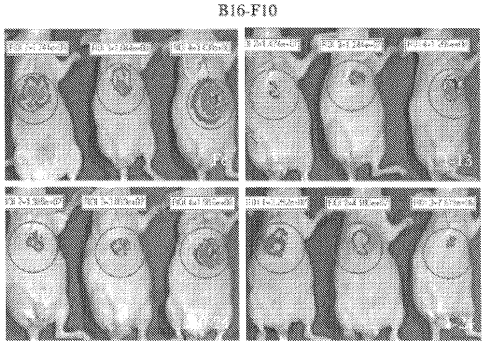
Fig. 23c



【図２４ａ】

図 24a

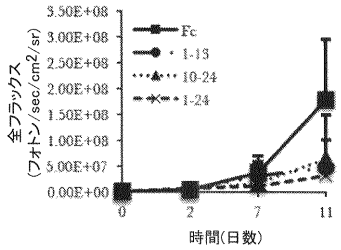
Fig. 24a



【図２４ｂ】

図 24b

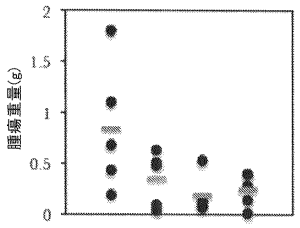
Fig. 24b



【図２４ｃ】

図 24c

Fig. 24c



【図２５ａ】

図 25a

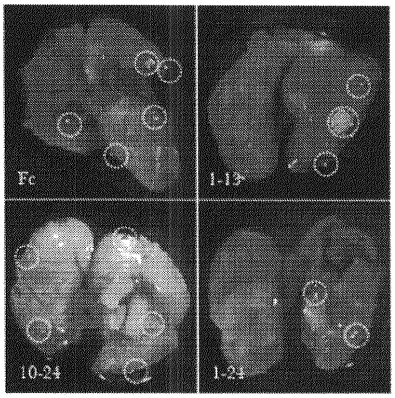
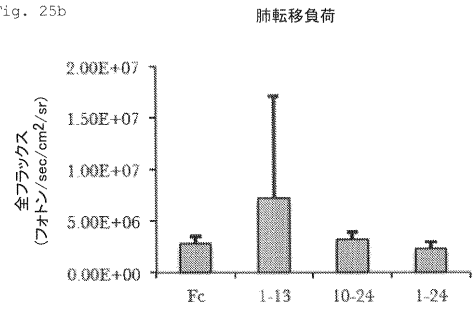


Fig. 25a

【図２５ｂ】

図 25b

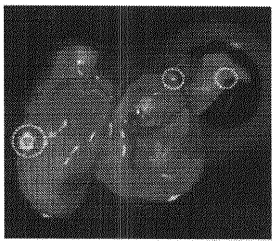
Fig. 25b



【図２６ａ】

図 26a

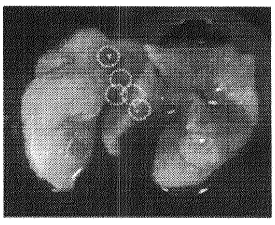
Fig. 26a



【図２６ｂ】

図 26b

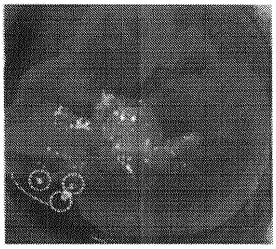
Fig. 26b



【図２６ｃ】

図 26c

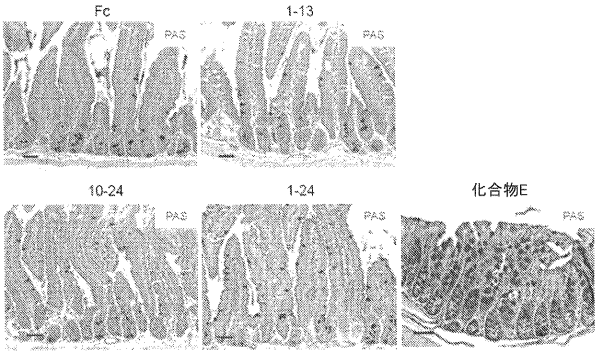
Fig. 26c



【図２７ａ】

図 27a

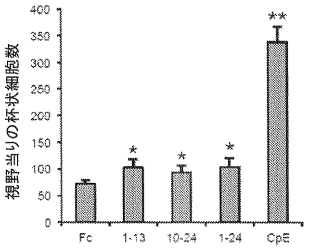
Fig. 27 a



【図２７ｂ】

図 27b

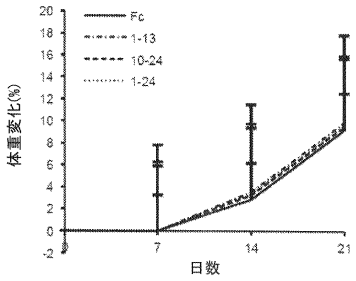
Fig. 27 b



【図２７ｃ】

図 27c

Fig. 27 c



【図２８－１】

図 28

Figure 28:

ヒト･ノッチ1タンパク質配列 (SEQ ID NO:1)

SP　　EGF-様反復1

1 MPPLLAPLLC LALLPALAAR GPRCSQPGET CLNGGKCEAA NGTEACVCGG AFVGPRCQDP

2　　3

61 NPCLSTPCKN AGTCHVVDRR GVADYACSCA LGFSGPLCLT PLDNACLTNP CRNGGTCDLL

4

121 TLTEYKCRCP PGWSGKSCQQ ADPCASNPCA NGGQCLPFEA SYICHCPPSF HGPTCRQDVN

5　　6

181 ECGQKPGLCR HGGTCHNEVG SYRCVCRATH TGPNCERPYV PCSPSPCQNG GTCRPTGDVT

7　　8

241 HECACLPGFT GQNCEENIDD CPGNNCKNGG ACVDGVNTYN CRCPPEWTGQ YCTEDVDECQ

9

301 LMPNACQNGG TCHNTHGGYN CVCVNGWTGE DCSENIDDCA SAACFHGATC HDRVASFYCE

10　　11

361 CPHGRTGLLC HLNDACISNP CNEGSNCDTN PVNGKAICTC PSGYTGPACS QDVDECSLGA

12

421 NPCEHAGKCI NTLGSFECQC LQGYTGPRCE IDVNECVSNP CQNDATCLDQ IGEFQCICMP

13　　14

481 GYEGVHCEVN TDECASSPCL HNGRCLDKIN EFQCECPTGF TGHLCQYDVD ECASTPCKNG

15

541 AKCLDGPNTY TCVCTEGYTG THCEVDIDEC DPDPCHYGSC KDGVATFTCL CRPGYTGHHC

16　　17

601 ETNINECSSQ PCRHGGTCQD RDNAYLCFCL KGTTGPNCEI NLDDCASSPC DSGTCLDKID

18　　19

661 GYECACEPGY TGSMCNINID ECAGNPCHNG GTCEDGINGF TCRCPEGYHD PTCLSEVNEC

20

721 NSNPCVHGAC RDSLNGYKCD CDPGWSGTNC DINNNECESN PCVNGGTCKD MTSGYVCTCR

21　　22

【図２８－２】

図 28-2

Figure 28 続き

781 EGFSGPNCQT NINECASNPC LNQGTCIDDV AGYKCNCLLP YTGATCEVVL APCAPSPCRN

23

841 GGECRQSEDY ESFSCVCPTG WQGQTCEVDI NECVLSPCRH GASCQNTHGG YRCHCQAGYS

24　　25

901 GRNCETDIDD CRPNPCHNGG SCTDGINTAF CDCLPGFRGT FCEEDINECA SDPCRNGANC

26

961 TDCVDSYTCT CPAGFSGIHC ENNTPDCTES SCFNGGTCVD GINSFTCLCP PGFTGSYCQH

27　　28

1021 DVNECDSQPC LHGGTCQDGC GSYRCTCPQG YTGPNCQNLV HWCDSSPCKN GGKCWQTHTQ

29

1081 YRCECPSGWT GLYCDVPSVS CEVAAQRQGV DVARLCQHGG LCVDAGNTHH CRCQAGYTGS

30　　31

1141 YCEDLVDECS PSPCQNGATC TDYLGGYSCK CVAGYHGVNC SEEIDECLSH PCQNGGTCLD

32

1201 LPNTYKCSCP RGTQGVHCEI NVDDCNPPVD PVSRSPKCFN NGTCVDQVGG YSCTCPPGFV

33　　34

1261 GERCEGDVNE CLSNPCDARG TQNCVQRVND FHCECRAGHT GRRCESVING CKGKPCKNGG

35

1321 TCAVASNTAR GFICKCPAGF EGATCENDAR TCGSLRCLNG GTCISGPRSP TCLCLGPFTG

36　　|

1381 PECQFPASSP CLGGNPCYNQ GTCEPTSESP FYRCLCPAKF NGLLCHILDY SFGGGAGRDI

LNR 1　　2

1441 PPPLIEEACE LPECQEDAGN KVCSLQCNNH ACGWDGGDCS LNFNDPWKNC TQSLQCWKYF

3

1501 SDGHCDSQCN SAGCLFDGFD CQRAEGQCNP LYDQYCKDHF SDGHCDQGCN SAECEWDGLD

|

1561 CAEHVPERLA AGTLVVVVLM PPEQLRNSSF HFLRELSRVL HTNVVFKRDA HGQQMIFPYY

S1

【図２８－３】

図 28-3

Figure 28 続き

1621 GREEELRKHP IKRAAEGWAA PDALLGQVKA SLLPGGSEGG RRRRELDPMD VRGSIVYLEI

S2　　TM

1681 DNRQCVQASS QCFQSATDVA AFLGALASLG SLNIPYKIEA VQSETVEPPP PAQLHFMYVA

S3

1741 AAAFVLLFFV GCGVLLSRKR RRQHGQLWFP EGFKVSEASK KKRREPLGED SVGLKPLKNA

1801 SDGALMDDNQ NEWGDEDLET KKFRFEEPVV LPDLDDQTDH RQWTQQHLDA ADLRMSAMAP

1861 TPPQGEVDAD CMDVNVRGPD GFTPLMIASC SGGGLETGNS EEEEDAPAVI SDFIYQGASL

ANK反復1

1921 HNQTDRTGET ALHLAARYSR SDAAKRLLEA SADANIQDNM GRTPLHAAVS ADAQGVFQIL

1981 IRNRATDLDA RMHDGTTPLI LAARLAVEGM LEDLINSHAD VNAVDDLGKS ALHWAAAVNN

2041 VDAAVVLLKN GANKDMQNNR EETPLFLAAR EGSYETAKVL LDHFANRDIT DHMDRLFRDI

|

2101 AQERMHHDIV RLLDEYNLVR SPQLHGAPLG GTPTLSPPLC SPNGYLGSLK PGVQGKKVRK

2161 PSSKGLACGS KEAKDLKARR KKSQDGKGCL LDSSGMLSPV DSLESPHGYL SDVASPPLLP

2221 SPFQQSPSVP LNHLPGMPDT HLGIGHLNVA AKPEMAALGG GGRLAFETGP PRLSHLPVAS

2281 GTSTVLGSSS GGALNFTVGG STSLNGQCEW LSRLQSGMVP NQYNPLRGSV APGPLSTQAP

2341 SLQHGMVGPL HSSLAASALS QMMSYQGLPS TRLATQPHLV QTQQVQPQNL QMQQQNLQPA

2401 NIQQQQSLQP PPPPPQPHLG VSSAASGHLG RSFLSGEPSQ ADVQPLGPSS LAVHTILPQE

PEST

【図２８－４】

図 28-4

Figure 28 続き

2461 SPALPTSLPS SLVPPVTAAQ FLTPPSQHSY SSPVDNTPSH QLQVPEHPFL TPSPESPDQW

2521 SSSSPHSNVS DWSEGVSSPP TSMQSQIARI PEAFK

【図２９－１】

図 29

Figure 29:

ノッチ1デコイ10-24(2502)

ヒト･ノッチ1シグナルペプチド:1-69

EGF-様反復10-24:70-1788

ヒトFc:1789-2502

DNA配列 (SEQ ID NO:2)

```
   1 ATGCCGCCGC TCCTGGCGCC CCTGCTCTGC CTGGCGCTGC TGCCCGCGCT CGCCGCACGA
  61 GGCCCGCGAT GCATCAGCAA CCCCTGTAAC GAGGGCTCCA ACTGCGACAC CAACCCTGTC
 121 AATGGCAAGG CCATCTGCAC CTGCCCCTCG GGGTACACGG GCCCGGCCTG CAGCCAGGAC
 181 GTGGATGAGT GCTCGCTGGG TGCCAACCCC TGCGAGCATG CGGGCAAGTG CATCAACACG
 241 CTGGGCTCCT TCGAGTGCCA GTGTCTGCAG GGCTACACGG GCCCCCGATG CGAGATCGAC
 301 GTCAACGAGT GCGTCTCGAA CCCGTGCCAG AACGACGCCA CCTGCCTGGA CCAGATTGGG
 361 GAGTTCCAGT GCATCTGCAT GCCCGGCTAC GAGGGTGTGC ACTGCGAGGT CAACACAGAC
 421 GAGTGTGCCA GCAGCCCCTG CCTGCACAAT GGCCGCTGCC TGGACAAGAT CAATGAGTTC
 481 CAGTGCGAGT GCCCCACGGG CTTCACTGGG CATCTGTGCC AGTACGATGT GGACGAGTGT
 541 GCCAGCACCC CCTGCAAGAA TGGTGCCAAG TGCCTGGACG GACCCAACAC TTACACCTGT
 601 GTGTGCACGG AAGGGTACAC GGGGACGCAC TGCGAGGTGG ACATCGATGA GTGCGACCCC
 661 GACCCCTGCC ACTACGGCTC CTGCAAGGAC GGCGTCGCCA CCTTCACCTG CCTCTGCCGC
 721 CCAGGCTACA CGGGCCACCA CTGCGAGACC AACATCAACG AGTGCTCCAG CCAGCCCTGC
 781 CGCCACGGGG GCACCTGCCA GGACCGCGAC AACGCCTACC TCTGCTTCTG CCTGAAGGGG
 841 ACCACAGGAC CCAACTGCGA GATCAACCTG GATGACTGTG CCAGCAGCCC CTGCGACTCG
 901 GGCACCTGTC TGGACAAGAT CGATGGCTAC GAGTGTGCCT GTGAGCCGGG CTACACAGGG
 961 AGCATGTGTA ACATCAACAT CGATGAGTGT GCGGGCAACC CCTGCCACAA CGGGGGCACC
1021 TGCGAGGACG GCATCAATGG CTTCACCTGC CGCTGCCCCG AGGGCTACCA CGACCCCACC
1081 TGCCTGTCTG AGGTCAATGA GTGCAACAGC AACCCCTGCG TCCACGGGGC CTGCCGGGAC
1141 AGCCTCAACG GGTACAAGTG CGACTGTGAC CCTGGGTGGA GTGGGACCAA CTGTGACATC
1201 AACAACAATG AGTGTGAATC CAACCCTTGT GTCAACGGCG GCACCTGCAA AGACATGACC
1261 AGTGGCTACG TGTGCACCTG CCGGGAGGGC TTCAGCGGTC CCAACTGCCA GACCAACATC
1321 AACGAGTGTG CGTCCAACCC ATGTCTGAAC CAGGGCACGT GTATTGACGA CGTTGCCGGG
1381 TACAAGTGCA ACTGCCTGCT GCCCTACACA GGTGCCACGT GTGAGGTGGT GCTGGCCCCG
```

【図２９－２】

図 29-2

Figure 29 続き

```
1441 TGTGCCCCCA GCCCCTGCAG AAACGGCGGG GAGTGCAGGC AATCCGAGGA CTATGAGAGC
1501 TTCTCCTGTG TCTGCCCCAC GGGCTGGCAA GGGCAGACCT GTGAGGTCGA CATCAACGAG
1561 TGCGTTCTGA GCCCGTGCCG GCACGGCGCA TCCTGCCAGA ACACCCACGG CGGCTACCGC
1621 TGCCACTGCC AGGCCGGCTA CAGTGGGCGC AACTGCGAGA CCGACATCGA CGACTGCCGG
1681 CCCAACCCGT GTCACAACGG GGGCTCCTGC ACAGACGGCA TCAACACGGC CTTCTGCGAC
1741 TGCCTGCCCG GCTTCCGGGG CACTTTCTGT GAGGAGGACA TCAACGAGGA TCTGGGCCCG
1801 GGCGAGCCCA AATCTTGTGA CAAAACTCAC ACATGCCCAC CGTGCCCAGC ACCTGAACTC
1861 CTGGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CCAAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC
1921 CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG
1981 TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG
2041 CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGACTGGCTG
2101 AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA
2161 ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGTACACCCT GCCCCCATCC
2221 CGGGAGGAGA TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTTCTATCCC
2281 AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG AGAACAACTA CAAGACCACG
2341 CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC TTCCTCTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG
2401 AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC
2461 CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCCTGTCT CCGGGTAAAT GA
```

タンパク質配列 (SEQ ID NO:3)

```
   1 MPPLLAPLLC LALLPALAAR GPRCISNPCN EGSNCDTNPV NGKAICTCPS GYTGPACSQD
  61 VDECSLGANP CEHAGKCINT LGSFECQCLQ GYTGPRCEID VNECVSNPCQ NDATCLDQIG
 121 EFQCICMPGY EGVHCEVNTD ECASSPCLHN GRCLDKINEF QCECPTGFTG HLCQYDVDEC
 181 ASTPCKNGAK CLDGPNTYTC VCTEGYTGTH CEVDIDECDP DPCHYGSCKD GVATFTCLCR
 241 PGYTGHHCET NINECSSQPC RHGGTCQDRD NAYLCFCLKG TTGPNCEINL DDCASSPCDS
 301 GTCLDKIDGY ECACEPGYTG SMCNINIDEC AGNPCHNGGT CEDGINGFTC RCPEGYHDPT
 361 CLSEVNECNS NPCVHGACRD SLNGYKCDCD PGWSGTNCDI NNNECESNPC VNGGTCKDMT
 421 SGYVCTCREG FSGPNCQTNI NECASNPCLN QGTCIDDVAG YKCNCLLPYT GATCEVVLAP
 481 CAPSPCRNGG ECRQSEDYES FSCVCPTGWQ GQTCEVDINE CVLSPCRHGA SCQNTHGGYR
```

【図２９－３】

図 29-3

Figure 29 続き

```
 541 CHCQAGYSGR NCETDIDDCR PNPCHNGGSC TDGINTAFCD CLPGFRGTFC EEDINEDLGP
 601 GEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
 661 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK
 721 TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
 781 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK*
```

【図３０－１】

図 30

Figure 30:

ノッチ1デコイ10-36(3957)

ヒト・ノッチ1シグナルペプチド:1-69

EGF-様反復10-36:70-3243

ヒトFc:3244-3957

DNA配列(SEQ ID NO:4)

```
   1 ATGCCGCCGC TCCTGGCGCC CCTGCTCTGC CTGGCGCTGC TGCCCGCGCT CGCCGCACGA
  61 GGCCCGCGAT GCATCAGCAA CCCCTGTAAC GAGGGCTCCA ACTGCGACAC CAACCCTGTC
 121 AATGGCAAGG CCATCTGCAC CTGCCCCTCG GGGTACACGG GCCCGGCCTG CAGCCAGGAC
 181 GTGGATGAGT GCTCGCTGGG TGCCAACCCC TGCGAGCATG CGGGCAAGTG CATCAACACG
 241 CTGGGGCTCCT TCGAGTGCCA GTGTCTGCAG GGCTACACGG GCCCCCGATG CGAGATCGAC
 301 GTCAACGAGT GCGTCTCGAA CCCGTGCCAG AACGACGCCA CCTGCCTGGA CCAGATTGGG
 361 GAGTTCCAGT GCATCTGCAT GCCCGGCTAC GAGGGTGTGC ACTGCGAGGT CAACACAGAC
 421 GAGTGTGCCA GCAGCCCCTG CCTGCACAAT GGCCGCTGCC TGGACAAGAT CAATGAGTTC
 481 CAGTGCGAGT GCCCCACGGG CTTCACTGGG CATCTGTGCC AGTACGATGT GGACGAGTGT
 541 GCCAGCACCC CCTGCAAGAA TGGTGCCAAG TGCCTGGACG GACCCAACAC TTACACCTGT
 601 GTGTGCACGG AAGGGTACAC GGGGACGCAC TGCGAGGTGG ACATCGATGA GTGCGACCCC
 661 GACCCCTGCC ACTACGGCTC CTGCAAGGAC GGCGTCGCCA CCTTCACCTG CCTCTGCCGC
 721 CCAGGCTACA CGGGCCACCA CTGCGAGACC AACATCAACG AGTGCTCCAG CCAGCCCTGC
 781 CGCCACGGGG GCACCTGCCA GGACCGCGAC AACGCCTACC TCTGCTTCTG CCTGAAGGGG
 841 ACCACAGGAC CCAACTGCGA GATCAACCTG GATGACTGTG CCAGCAGCCC CTGCGACTCG
 901 GGCACCTGTC TGGACAAGAT CGATGGCTAC GAGTGTGCCT GTGAGCCGGG CTACACAGGG
 961 AGCATGTGTA ACATCAACAT CGATGAGTGT GCGGGCAACC CCTGCCACAA CGGGGGCACC
1021 TGCGAGGACG GCATCAATGG CTTCACCTGC CGCTGCCCCG AGGGCTACCA CGACCCCACC
1081 TGCCTGTCTG AGGTCAATGA GTGCAACAGC AACCCCTGCG TCCACGGGGC CTGCCGGGAC
1141 AGCCTCAACG GGTACAAGTG CGACTGTGAC CCTGGGTGGA GTGGGACCAA CTGTGACATC
1201 AACAACAATG AGTGTGAATC CAACCCTTGT GTCAACGGCG GCACCTGCAA AGACATGACC
1261 AGTGGCTACG TGTGCACCTG CCGGGAGGGC TTCAGCGGTC CCAACTGCCA GACCAACATC
1321 AACGAGTGTG CGTCCAACCC ATGTCTGAAC CAGGGCACGT GTATTGACGA CGTTGCCGGG
1381 TACAAGTGCA ACTGCCTGCT GCCCTACACA GGTGCCACGT GTGAGGTGGT GCTGGCCCCG
```

【図３０－２】

図 30-2

Figure 30 続き

```
1441 TGTGCCCCCA GCCCCTGCAG AAACGGCGGG GAGTGCAGGC AATCCGAGGA CTATGAGAGC
1501 TTCTCCTGTG TCTGCCCCAC GGGCTGGCAA GGGCAGACCT GTGAGGTCGA CATCAACGAG
1561 TGCGTTCTGA GCCCGTGCCG GCACGGCGCA TCCTGCCAGA ACACCCACGG CGGCTACCGC
1621 TGCCACTGCC AGGCCGGCTA CAGTGGGCGC AACTGCGAGA CCGACATCGA CGACTGCCGG
1681 CCCAACCCGT GTCACAACGG GGGCTCCTGC ACAGACGGCA TCAACACGGC CTTCTGCGAC
1741 TGCCTGCCCG GCTTCCGGGG CACTTTCTGT GAGGAGGACA TCAACGAGTG TGCCAGTGAC
1801 CCCTGCCGCA ACGGGGCCAA CTGCACGGAC TGCGTGGACA GCTACACGTG CACCTGCCCC
1861 GCAGGCTTCA GCGGGATCCA CTGTGAGAAC AACACGCCTG ACTGCACAGA GAGCTCCTGC
1921 TTCAACGGTG GCACCTGCGT GGACGGCATC AACTCGTTCA CCTGCCTGTG TCCACCCGGC
1981 TTCACGGGCA GCTACTGCCA GCACGATGTC AATGAGTGCG ACTCACAGCC CTGCCTGCAT
2041 GGCGGCACCT GTCAGGACGG CTGCGGCTCC TACAGGTGCA CCTGCCCCCA GGGCTACACT
2101 GGCCCCAACT GCCAGAACCT TGTGCACTGG TGTGACTCCT CGCCCTGCAA GAACGGCGGC
2161 AAATGCTGGC AGACCCACAC CCAGTACCGC TGCGAGTGCC CCAGCGGCTG GACCGGCCTT
2221 TACTGCGACG TGCCCAGCGT GTCCTGTGAG GTGGCTGCGC AGCGACAAGG TGTTGACGTT
2281 GCCCGCCTGT GCCAGCATGG AGGGCTCTGT GTGGACGCGG GCAACACGCA CCACTGCCGC
2341 TGCCAGGCGG GCTACACAGG CAGCTACTGT GAGGACCTGG TGGACGAGTG CTCACCCAGC
2401 CCCTGCCAGA ACGGGGCCAC CTGCACGGAC TACCTGGGCG GCTACTCCTG CAAGTGCGTG
2461 GCCGGCTACC ACGGGGTGAA CTGCTCTGAG GAGATCGACG AGTGCCTCTC CCACCCCTGC
2521 CAGAACGGGG GCACCTGCCT CGACCTCCCC AACACCTACA AGTGCTCCTG CCCACGGGGC
2581 ACTCAGGGTG TGCACTGTGA GATCAACGTG GACGACTGCA ATCCCCCCGT TGACCCCGTG
2641 TCCCGGAGCC CCAAGTGCTT TAACAACGGC ACCTGCGTGG ACCAGGTGGG CGGCTACAGC
2701 TGCACCTGCC CGCCGGGCTT CGTGGGTGAG CGCTGTGAGG GGGATGTCAA CGAGTGCCTG
2761 TCCAATCCCT GCGACGCCCG TGGCACCCAG AACTGCGTGC AGCGCGTCAA TGACTTCCAC
2821 TGCGAGTGCC GTGCTGGTCA CACCGGGCGC CGCTGCGAGT CCGTCATCAA TGGCTGCAAA
2881 GGCAAGCCCT GCAAGAATGG GGGCACCTGC GCCGTGGCCT CCAACACCGC CCGCGGGTTC
2941 ATCTGCAAGT GCCCTGCGGG CTTCGAGGGC GCCACGTGTG AGAATGACGC TCGTACCTGC
3001 GGCAGCCTGC GCTGCCTCAA CGGCGGCACA TGCATCTCCG GCCCGCGCAG CCCCACCTGC
3061 CTGTGCCTGG GCCCCTTCAC GGGCCCCGAA TGCCAGTTCC CGGCCAGCAG CCCCTGCCTG
```

【図３０－３】

図 30-3

Figure 30 続き

```
3121 GGCGGCAACC CCTGCTACAA CCAGGGGACC TGTGAGCCCA CATCCGAGAG CCCCTTCTAC
3181 CGTTGCCTGT GCCCCGCCAA ATTCAACGGG CTCTTGTGCC ACATCCTGGA CTACAGCTTC
3241 GGAGATCTGG GCCCGGGCGA GCCCAAATCT TGTGACAAAA CTCACACATG CCCACCGTGC
3301 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCCAAA ACCCAAGGAC
3361 ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA
3421 GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA
3481 AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG
3541 CACCAGGACT GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
3601 GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC
3661 ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC
3721 AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC
3781 AACTACAAGA CCACGCCTCC CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTACAGCAAG
3841 CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
3901 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAATGA
```

タンパク質配列(SEQ ID NO:5)

```
   1 MPPLLAPLLC LALLPALAAR GPRCISNPCN EGSNCDTNPV NGKAICTCPS GYTGPACSQD
  61 VDECSLGANP CEHAGKCINT LGSFECQCLQ GYTGPRCEID VNECVSNPCQ NDATCLDQIG
 121 EFQCICMPGY EGVHCEVNTD ECASSPCLHN GRCLDKINEF QCECPTGFTG HLCQYDVDEC
 181 ASTPCKNGAK CLDGPNTYTC VCTEGYTGTH CEVDIDECDP DPCHYGSCKD GVATFTCLCR
 241 PGYTGHHCET NINECSSQPC RHGGTCQDRD NAYLCFCLKG TTGPNCEINL DDCASSPCDS
 301 GTCLDKIDGY ECACEPGYTG SMCNINIDEC AGNPCHNGGT CEDGINGFTC RCPEGYHDPT
 361 CLSEVNECNS NPCVHGACRD SLNGYKCDCD PGWSGTNCDI NNNECESNPC VNGGTCKDMT
 421 SGYVCTCREG FSGPNCQTNI NECASNPCLN QGTCIDDVAG YKCNCLLPYT GATCEVVLAP
 481 CAPSPCRNGG ECRQSEDYES FSCVCPTGWQ GQTCEVDINE CVLSPCRHGA SCQNTHGGYR
 541 CHCQAGYSGR NCETDIDDCR PNPCHNGGSC TDGINTAFCD CLPGFRGTFC EEDINECASD
 601 PCRNGANCTD CVDSYTCTCP AGFSGIHCEN NTPDCTESSC FNGGTCVDGI NSFTCLCPPG
```

【図３０－４】

図 30-4

Figure 30 続き

```
 661 FTGSYCQHDV NECDSQPCLH GGTCQDGCGS YRCTCPQGYT GPNCQNLVHW CDSSPCKNGG
 721 KCWQTHTQYR CECPSGWTGL YCDVPSVSCE VAAQRQGVDV ARLCQHGGLC VDAGNTHHCR
 781 CQAGYTGSYC EDLVDECSPS PCQNGATCTD YLGGYSCKCV AGYHGVNCSE EIDECLSHPC
 841 QNGGTCLDLP NTYKCSCPRG TQGVHCEINV DDCNPPVDPV SRSPKCFNNG TCVDQVGGYS
 901 CTCPPGFVGE RCEGDVNECL SNPCDARGTQ NCVQRVNDFH CECRAGHTGR RCESVINGCK
 961 GKPCKNGGTC AVASNTARGF ICKCPAGFEG ATCENDARTC GSLRCLNGGT CISGPRSPTC
1021 LCLGPFTGPE CQFPASSPCL GGNPCYNQGT CEPTSESPFY RCLCPAKFNG LLCHILDYSF
1081 GDLGPGEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE
1141 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
1201 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN
1261 NYKTTPPVLD SDGSPFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK*
```

【図３１－１】

図 31

Figure 31:

ノッチ1デコイ14-24(2034)

ヒト･ノッチ1シグナルペプチド:1-69

EGF-様反復14-24:70-1320

ヒトFc:1321-2034

DNA配列 (SEQ ID NO:6)

```
   1 ATGCCGCCGC TCCTGGCGCC CCTGCTCTGC CTGGCGCTGC TGCCCGCGCT CGCCGCACGA
  61 GGCCCGCGAT GTGCCAGCAC CCCCTGCAAG AATGGTGCCA AGTGCCTGGA CGGACCCAAC
 121 ACTTACACCT GTGTGTGCAC GGAAGGGTAC ACGGGGACGC ACTGCGAGGT GGACATCGAT
 181 GAGTGCGACC CCGACCCCTG CCACTACGGC TCCTGCAAGG ACGGCGTCGC CACCTTCACC
 241 TGCCTCTGCC GCCCAGGCTA CACGGGCCAC CACTGCGAGA CCAACATCAA CGAGTGCTCC
 301 AGCCAGCCCT GCCGCCACGG GGGCACCTGC CAGGACCGCG ACAACGCCTA CCTCTGCTTC
 361 TGCCTGAAGG GGACCACAGG ACCCAACTGC GAGATCAACC TGGATGACTG TGCCAGCAGC
 421 CCCTGCGACT CGGGCACCTG TCTGGACAAG ATCGATGGCT ACGAGTGTGC CTGTGAGCCG
 481 GGCTACACAG GGAGCATGTG TAACATCAAC ATCGATGAGT GTGCGGGCAA CCCCTGCCAC
 541 AACGGGGGCA CCTGCGAGGA CGGCATCAAT GGCTTCACCT GCCGCTGCCC CGAGGGCTAC
 601 CACGACCCCA CCTGCCTGTC TGAGGTCAAT GAGTGCAACA GCAACCCCTG CGTCCACGGG
 661 GCCTGCCGGG ACAGCCTCAA CGGGTACAAG TGCGACTGTG ACCCTGGGTG GAGTGGGACC
 721 AACTGTGACA TCAACAACAA TGAGTGTGAA TCCAACCCTT GTGTCAACGG CGGCACCTGC
 781 AAAGACATGA CCAGTGGCTA CGTGTGCACC TGCCGGGAGG GCTTCAGCGG TCCCAACTGC
 841 CAGACCAACA TCAACGAGTG TGCGTCCAAC CCATGTCTGA ACCAGGGCAC GTGTATTGAC
 901 GACGTTGCCG GGTACAAGTG CAACTGCCTG CTGCCCTACA CAGGTGCCAC GTGTGAGGTG
 961 GTGCTGGCCC CGTGTGCCCC CAGCCCCTGC AGAAACGGCG GGGAGTGCAG GCAATCCGAG
1021 GACTATGAGA GCTTCTCCTG TGTCTGCCCC ACGGGCTGGC AAGGGCAGAC CTGTGAGGTC
1081 GACATCAACG AGTGCGTTCT GAGCCCGTGC CGGCACGGCG CATCCTGCCA GAACACCCAC
1141 GGCGGCTACC GCTGCCACTG CCAGGCCGGC TACAGTGGGC GCAACTGCGA GACCGACATC
1201 GACGACTGCC GGCCCAACCC GTGTCACAAC GGGGGCTCCT GCACAGACGG CATCAACACG
1261 GCCTTCTGCG ACTGCCTGCC CGGCTTCCGG GGCACTTTCT GTGAGGAGGA CATCAACGAG
1321 GATCTGGGCC CGGGCGAGCC CAAATCTTGT GACAAAACTC ACACATGCCC ACCGTGCCCA
1381 GCACCTGAAC TCCTGGGGGG ACCGTCAGTC TTCCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC
```

【図３１－２】

図 31-2

Figure 31 続き

```
1441 CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC
1501 CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG
1561 CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC
1621 CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC
1681 CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC
1741 CTGCCCCCAT CCCGGGAGGA GATGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA
1801 GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC
1861 TACAAGACCA CGCCTCCCGT GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAAGCTC
1921 ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG
1981 GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGA
```

タンパク質配列 (SEQ ID NO:7)

```
   1 MPPLLAPLLC LALLPALAAR GPRCASTPCK NGAKCLDGPN TYTCVCTEGY TGTHCEVDID
  61 ECDPDPCHYG SCKDGVATFT CLCRPGYTGH HCETNINECS SQPCRHGGTC QDRDNAYLCF
 121 CLKGTTGPNC EINLDDCASS PCDSGTCLDK IDGYECACEP GYTGSMCNIN IDECAGNPCH
 181 NGGTCEDGIN GFTCRCPEGY HDPTCLSEVN ECNSNPCVHG ACRDSLNGYK CDCDPGWSGT
 241 NCDINNNECE SNPCVNGGTC KDMTSGYVCT CREGFSGPNC QTNINECASN PCLNQGTCID
 301 DVAGYKCNCL LPYTGATCEV VLAPCAPSPC RNGGECRQSE DYESFSCVCP TGWQGQTCEV
 361 DINECVLSPC RHGASCQNTH GGYRCHCQAG YSGRNCETDI DDCRPNPCHN GGSCTDGINT
 421 AFCDCLPGFR GTFCEEDINE DLGPGEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT
 481 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH
 541 QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK
 601 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
 661 ALHNHYTQKS LSLSPGK*
```

【図３２－１】

図 32

Figure 32:

ノッチ1デコイ14-36(3489)

ヒト･ノッチ1シグナルペプチド:1-69

EGF-様反復14-36:70-2775

ヒトFc:2776-3489

DNA配列 (SEQ ID NO:8)

```
   1 ATGCCGCCGC TCCTGGCGCC CCTGCTCTGC CTGGCGCTGC TGCCCGCGCT CGCCGCACGA
  61 GGCCCGCGAT GTGCCAGCAC CCCCTGCAAG AATGGTGCCA AGTGCCTGGA CGGACCCAAC
 121 ACTTACACCT GTGTGTGCAC GGAAGGGTAC ACGGGGACGC ACTGCGAGGT GGACATCGAT
 181 GAGTGCGACC CCGACCCCTG CCACTACGGC TCCTGCAAGG ACGGCGTCGC CACCTTCACC
 241 TGCCTCTGCC GCCCAGGCTA CACGGGCCAC CACTGCGAGA CCAACATCAA CGAGTGCTCC
 301 AGCCAGCCCT GCCGCCACGG GGGCACCTGC CAGGACCGCG ACAACGCCTA CCTCTGCTTC
 361 TGCCTGAAGG GGACCACAGG ACCCAACTGC GAGATCAACC TGGATGACTG TGCCAGCAGC
 421 CCCTGCGACT CGGGCACCTG TCTGGACAAG ATCGATGGCT ACGAGTGTGC CTGTGAGCCG
 481 GGCTACACAG GGAGCATGTG TAACATCAAC ATCGATGAGT GTGCGGGCAA CCCCTGCCAC
 541 AACGGGGGCA CCTGCGAGGA CGGCATCAAT GGCTTCACCT GCCGCTGCCC CGAGGGCTAC
 601 CACGACCCCA CCTGCCTGTC TGAGGTCAAT GAGTGCAACA GCAACCCCTG CGTCCACGGG
 661 GCCTGCCGGG ACAGCCTCAA CGGGTACAAG TGCGACTGTG ACCCTGGGTG GAGTGGGACC
 721 AACTGTGACA TCAACAACAA TGAGTGTGAA TCCAACCCTT GTGTCAACGG CGGCACCTGC
 781 AAAGACATGA CCAGTGGCTA CGTGTGCACC TGCCGGGAGG GCTTCAGCGG TCCCAACTGC
 841 CAGACCAACA TCAACGAGTG TGCGTCCAAC CCATGTCTGA ACCAGGGCAC GTGTATTGAC
 901 GACGTTGCCG GGTACAAGTG CAACTGCCTG CTGCCCTACA CAGGTGCCAC GTGTGAGGTG
 961 GTGCTGGCCC CGTGTGCCCC CAGCCCCTGC AGAAACGGCG GGGAGTGCAG GCAATCCGAG
1021 GACTATGAGA GCTTCTCCTG TGTCTGCCCC ACGGGCTGGC AAGGGCAGAC CTGTGAGGTC
1081 GACATCAACG AGTGCGTTCT GAGCCCGTGC CGGCACGGCG CATCCTGCCA GAACACCCAC
1141 GGCGGCTACC GCTGCCACTG CCAGGCCGGC TACAGTGGGC GCAACTGCGA GACCGACATC
1201 GACGACTGCC GGCCCAACCC GTGTCACAAC GGGGGCTCCT GCACAGACGG CATCAACACG
1261 GCCTTCTGCG ACTGCCTGCC CGGCTTCCGG GGCACTTTCT GTGAGGAGGA CATCAACGAG
1321 TGTGCCAGTG ACCCCTGCCG CAACGGGGCC AACTGCACGG ACTGCGTGGA CAGCTACACG
1381 TGCACCTGCC CCGCAGGCTT CAGCGGGATC CACTGTGAGA ACAACACGCC TGACTGCACA
```

【図３２－２】

図 32-2

Figure 32 続き

```
1441 GAGAGCTCCT GCTTCAACGG TGGCACCTGC GTGGACGGCA TCAACTCGTT CACCTGCCTG
1501 TGTCCACCCG GCTTCACGGG CAGCTACTGC CAGCACGATG TCAATGAGTG CGACTCACAG
1561 CCCTGCCTGC ATGGCGGCAC CTGTCAGGAC GGCTGCGGCT CCTACAGGTG CACCTGCCCC
1621 CAGGGCTACA CTGGCCCCAA CTGCCAGAAC CTTGTGCACT GGTGTGACTC CTCGCCCTGC
1681 AAGAACGGCG GCAAATGCTG GCAGACCCAC ACCCAGTACC GCTGCGAGTG CCCCAGCGGC
1741 TGGACCGGCC TTTACTGCGA CGTGCCCAGC GTGTCCTGTG AGGTGGCTGC GCAGCGACAA
1801 GGTGTTGACG TTGCCCGCCT GTGCCAGCAT GGAGGGCTCT GTGTGGACGC GGGCAACACG
1861 CACCACTGCC GCTGCCAGGC GGGCTACACA GGCAGCTACT GTGAGGACCT GGTGGACGAG
1921 TGCTCACCCA GCCCCTGCCA GAACGGGGCC ACCTGCACGG ACTACCTGGG CGGCTACTCC
1981 TGCAAGTGCG TGGCCGGCTA CCACGGGGTG AACTGCTCTG AGGAGATCGA CGAGTGCCTC
2041 TCCCACCCCT GCCAGAACGG GGGCACCTGC CTCGACCTCC CCAACACCTA CAAGTGCTCC
2101 TGCCCACGGG GCACTCAGGG TGTGCACTGT GAGATCAACG TGGACGACTG CAATCCCCCC
2161 GTTGACCCCG TGTCCGGAG CCCCAAGTGC TTTAACAACG GCACCTGCGT GGACCAGGTG
2221 GGCGGCTACA GCTGCACCTG CCCGCCGGGC TTCGTGGGTG AGCGCTGTGA GGGGGATGTC
2281 AACGAGTGCC TGTCCAATCC CTGCGACGCC CGTGGCACCC AGAACTGCGT GCAGCGCGTC
2341 AATGACTTCC ACTGCGAGTG CCGTGCTGGT CACACCGGGC GCCGCTGCGA GTCCGTCATC
2401 AATGGCTGCA AAGGCAAGCC CTGCAAGAAT GGGGGCACCT GCGCCGTGGC CTCCAACACC
2461 GCCCGCGGGT TCATCTGCAA GTGCCCTGCG GGCTTCGAGG GCGCCACGTG TGAGAATGAC
2521 GCTCGTACCT GCGGCAGCCT GCGCTGCCTC AACGGCGGCA CATGCATCTC CGGCCCGCGC
2581 AGCCCCACCT GCCTGTGCCT GGGCCCCTTC ACGGGCCCCG AATGCCAGTT CCCGGCCAGC
2641 AGCCCCTGCC TGGGCGGCAA CCCCTGCTAC AACCAGGGGA CCTGTGAGCC CACATCCGAG
2701 AGCCCCTTCT ACCGTTGCCT GTGCCCCGCC AAATTCAACG GGCTCTTGTG CCACATCCTG
2761 GACTACAGCT TCGGAGATCT GGGCCCGGGC GAGCCCAAAT CTTGTGACAA AACTCACACA
2821 TGCCCACCGT GCCCAGCACC TGAACTCCTG GGGGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCCCCCA
2881 AAACCCAAGG ACACCCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC
2941 GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT
3001 AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTCAGCGTC
3061 CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC
```

【図３２－３】

図 32-3
Figure 32 続き

```
3121 AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA
3181 CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGG GAGGAGATGA CCAAGAACCA GGTCAGCCTG
3241 ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG
3301 CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGCTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC
3361 CTCTACAGCA AGCTCACCGT GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC
3421 TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
3481 GGTAAATGA
```

タンパク質配列 (SEQ ID NO:9)

```
   1 MPPLLAPLLC LALLPALAAR GPRCASTPCK NGAKCLDGPN TYTCVCTEGY TGTHCEVDID
  61 ECDPDPCHYG SCKDGVATFT CLCRPGYTGH HCETNINECS SQPCRHGGTC QDRDNAYLCF
 121 CLKGTTGPNC EINLDDCASS PCDSGTCLDK IDGYECACEP GYTGSMCNIN IDECAGNPCH
 181 NGGTCEDGIN GFTCRCPEGY HDPTCLSEVN ECNSNPCVHG ACRDSLNGYK CDCDPGWSGT
 241 NCDINNNECE SNPCVNGGTC KDMTSGYVCT CREGFSGPNC QTNINECASN PCLNQGTCID
 301 DVAGYKCNCL LPYTGATCEV VLAPCAPSPC RNGGECRQSE DYESFSCVCP TGWQGQTCEV
 361 DINECVLSPC RHGASCQNTH GGYRCHCQAG YSGRNCETDI DDCRPNPCHN GGSCTDGINT
 421 AFCDCLPGFR GTFCEEDINE CASDPCRNGA NCTDCVDSYT CTCPAGFSGI HCENNTPDCT
 481 ESSCFNGGTC VDGINSFTCL CPPGFTGSYC QHDVNECDSQ PCLHGGTCQD GCGSYRCTCP
 541 QGYTGPNCQN LVHWCDSSPC KNGGKCWQTH TQYRCECPSG WTGLYCDVPS VSCEVAAQRQ
 601 GVDVARLCQH GGLCVDAGNT HHCRCQAGYT GSYCEDLVDE CSPSPCQNGA TCTDYLGGYS
 661 CKCVAGYHGV NCSEEIDECL SHPCQNGGTC LDLPNTYKCS CPRGTQGVHC EINVDDCNPP
 721 VDPVSRSPKC FNNGTCVDQV GGYSCTCPPG FVGERCEGDV NECLSNPCDA RGTQNCVQRV
 781 NDFHCECRAG HTGRRCESVI NGCKGKPCKN GGTCAVASNT ARGFICKCPA GFEGATCEND
 841 ARTCGSLRCL NGGTCISGPR SPTCLCLGPF TGPECQFPAS SPCLGGNPCY NQGTCEPTSE
 901 SPFYRCLCPA KFNGLLCHIL DYSFGDLGPG EPKSCDRTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP
 961 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
1021 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
1081 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
```

【図３２－４】

図 32-4 Figure 32 続き

```
1141 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK*
```

【図３３ａ】

図 33a

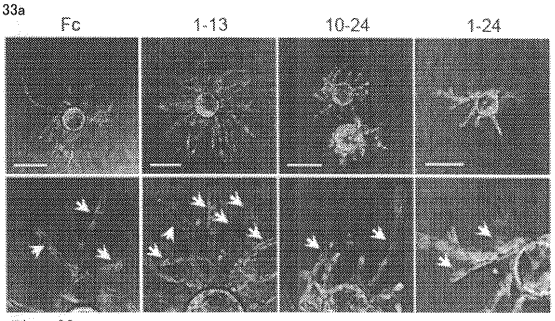
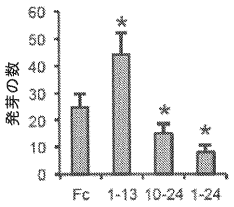


Fig. 33a

【図３３ｂ】

図 33b

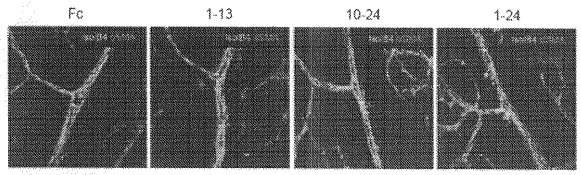
Fig. 33b



【図３３ｃ】

図 33c

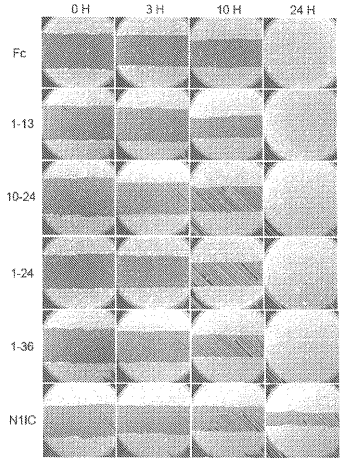
Fig. 33c



【図３４ａ】

図 34a

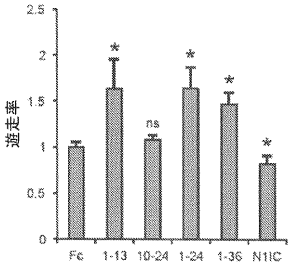
Fig. 34a



【図３４ｂ】

図 34b

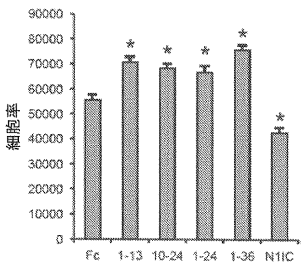
Fig. 34b



【図３４ｃ】

図 34c

Fig. 34c



【図３５ａ】

図 35a

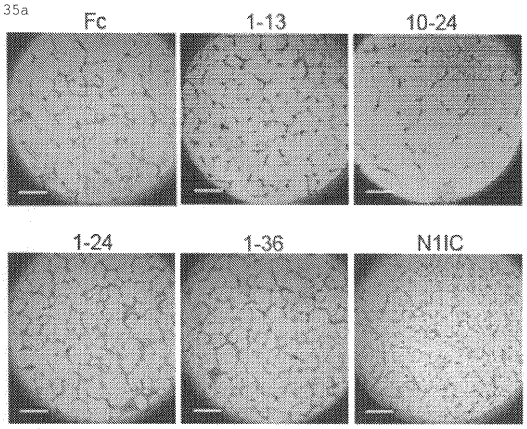


Fig. 35a

【図３５ｂ】

図 35b

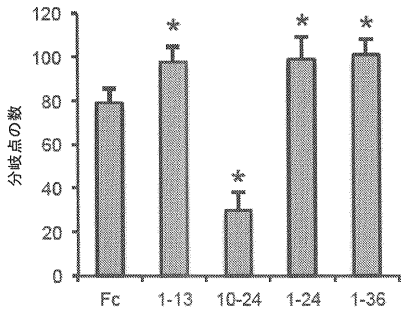


Fig. 35b

【図３６】

図 36

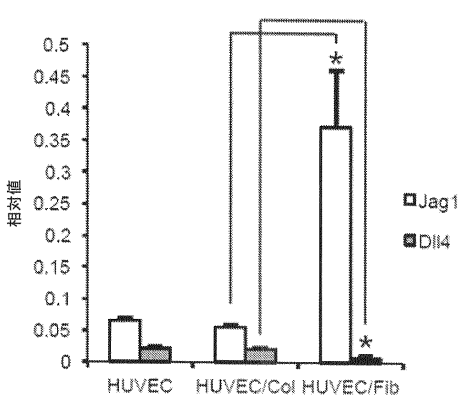


FIGURE 36

【図３７ａ】

図 37a

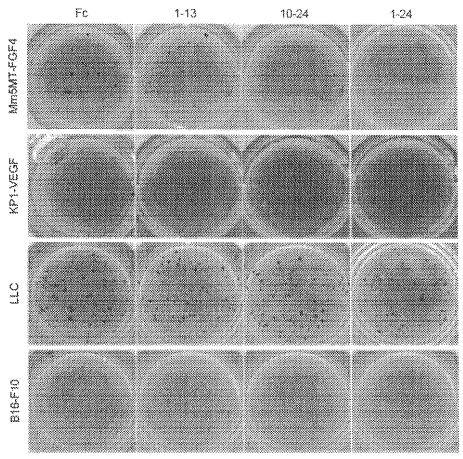


Fig. 37a

【図３７ｂ】

図 37b

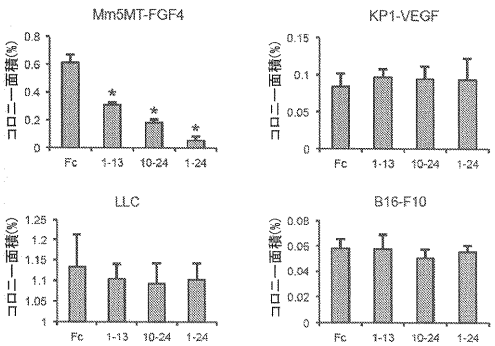


Fig. 37b

【図３８】

図 38

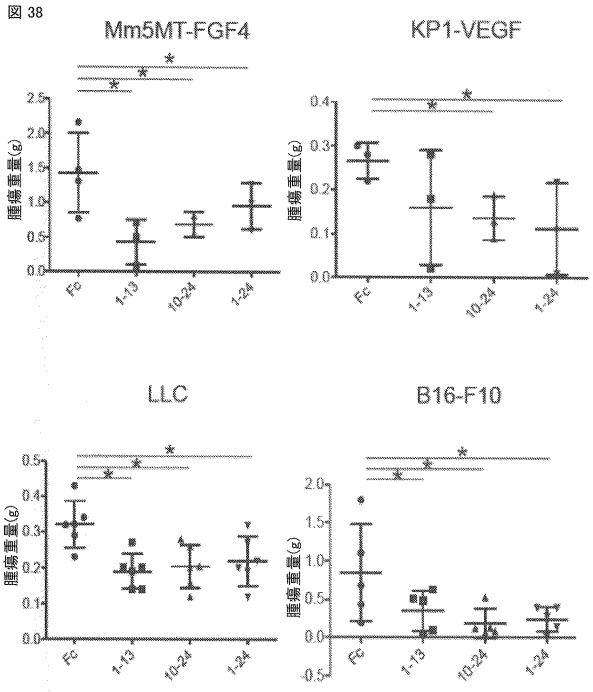
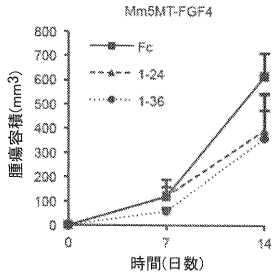


FIGURE 38

【図３９ａ】

図 39a

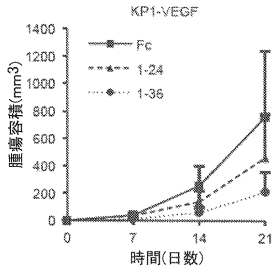
Fig. 39a



【図３９ｂ】

図 39b

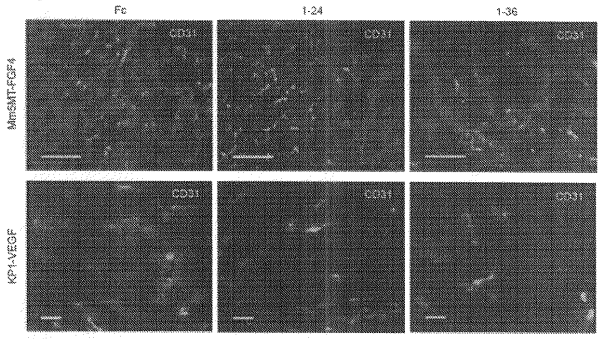
Fig. 39b



【図３９ｃ】

図 39c

Fig. 39c



【図４０ａ】

図 40a

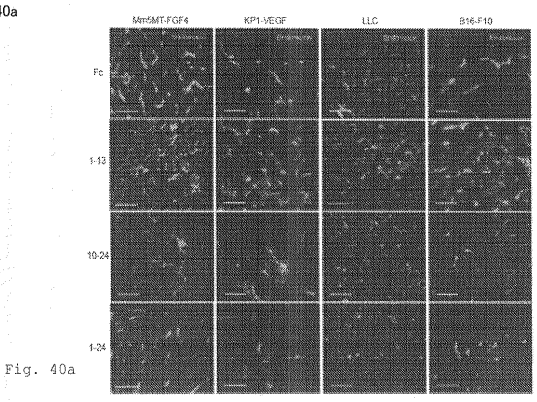


Fig. 40a

【図４０ｂ】

図 40b

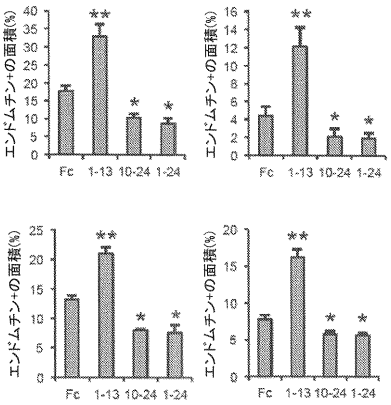
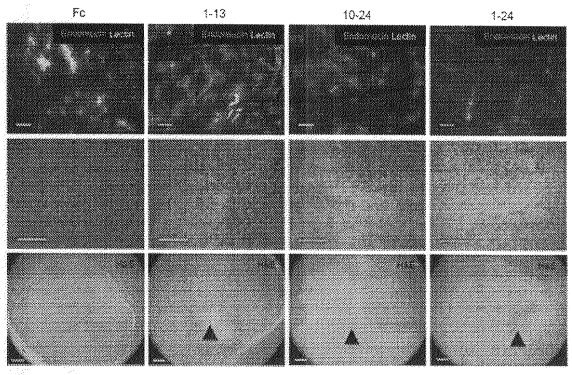


Fig. 40b

【図４１ａ】

図 41a

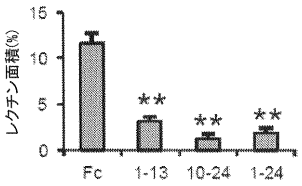
Fig. 41a



【図４１ｂ】

図 41b

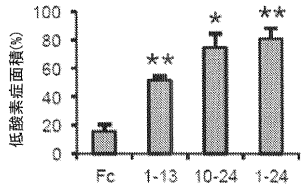
Fig. 41b



【図４１ｃ】

図 41c

Fig. 41c



【図４２ａ】

図 42a

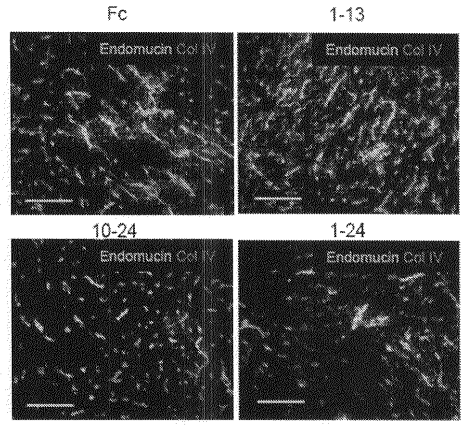
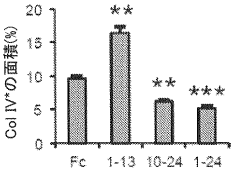


Fig. 42a

【図４２ｂ】

図 42b

Fig. 42b



【図４２ｃ】

図 42c

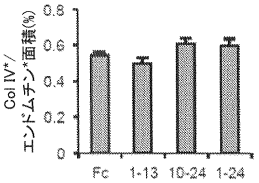


Fig. 42c

【図４３ａ】

図 43a

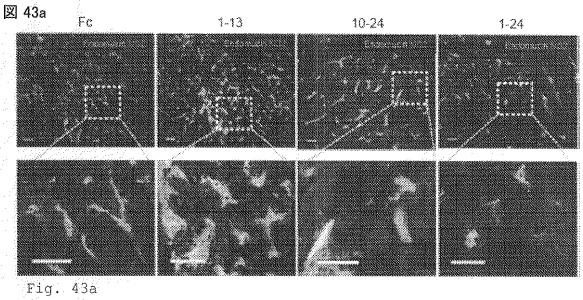


Fig. 43a

【図４３ｂ】

図 43b

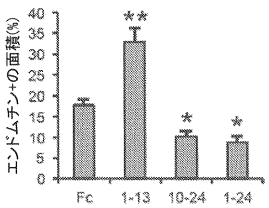
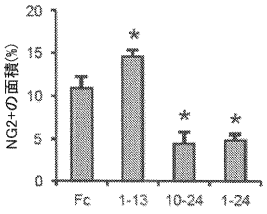


Fig. 43b

【図４３ｃ】

図 43c

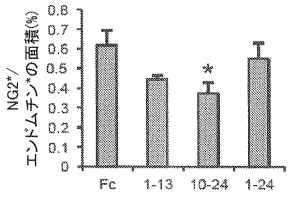
Fig. 43c



【図４３ｄ】

図 43d

Fig. 43d



【図４４】

図 44

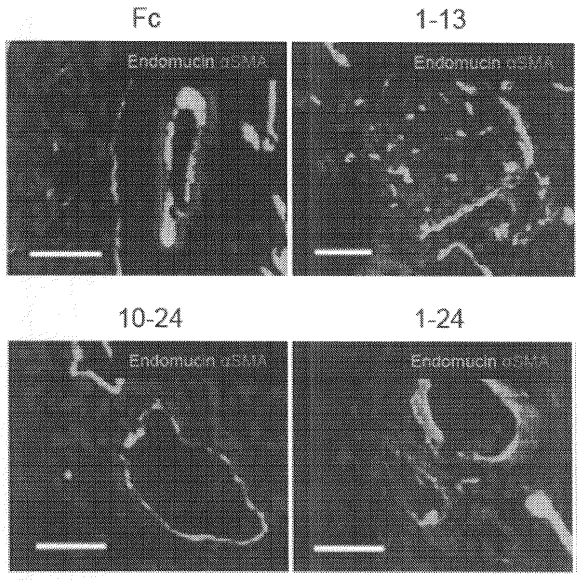


FIGURE 44

【図４５】

図 45

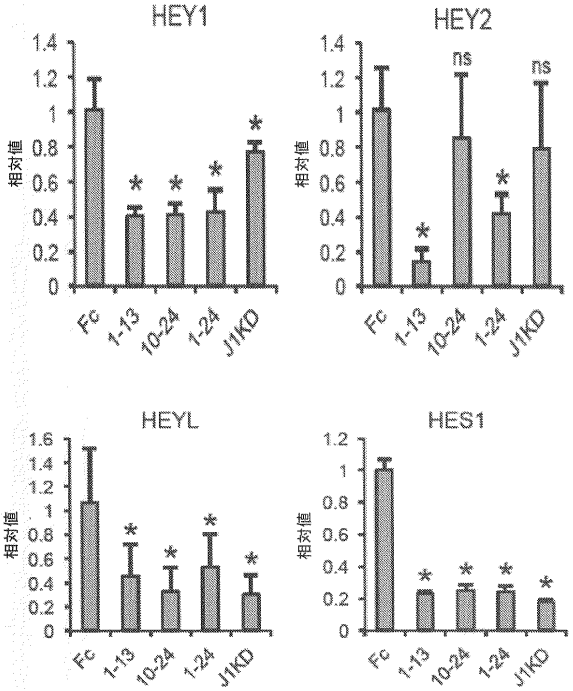


FIGURE 45

【図４６】

図 46

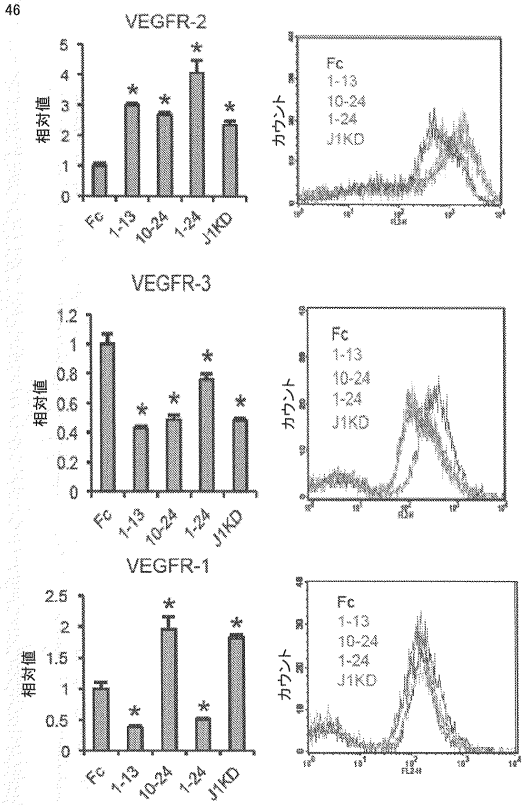
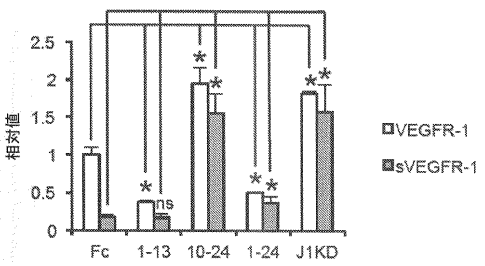


FIGURE 46

【図４７ａ】

図 47a

Fig. 47a



【図４７ｂ】

図 47b

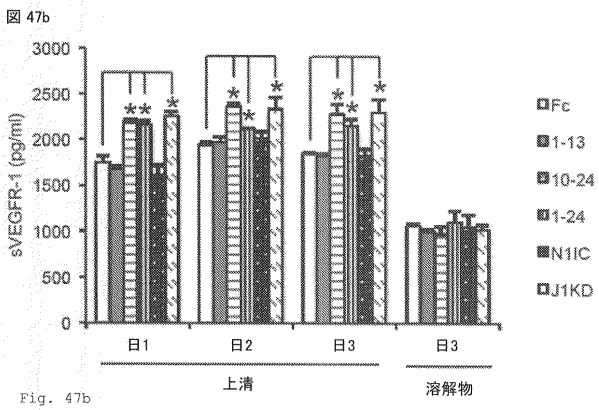


Fig. 47b

【図４８ａ】

図 48a

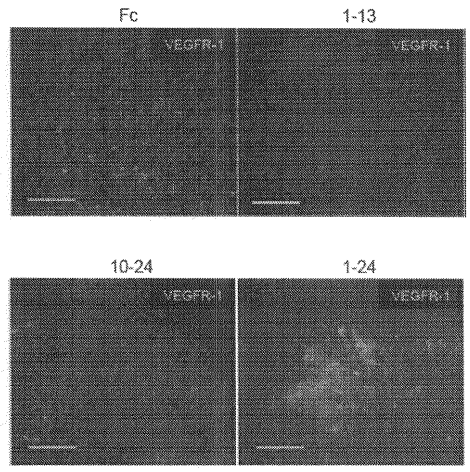
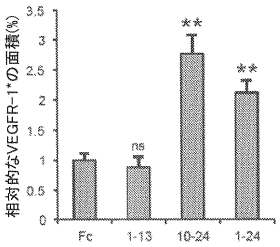


Fig. 48a

【図４８ｂ】

図 48b

Fig. 48b



【図４９】

図 49

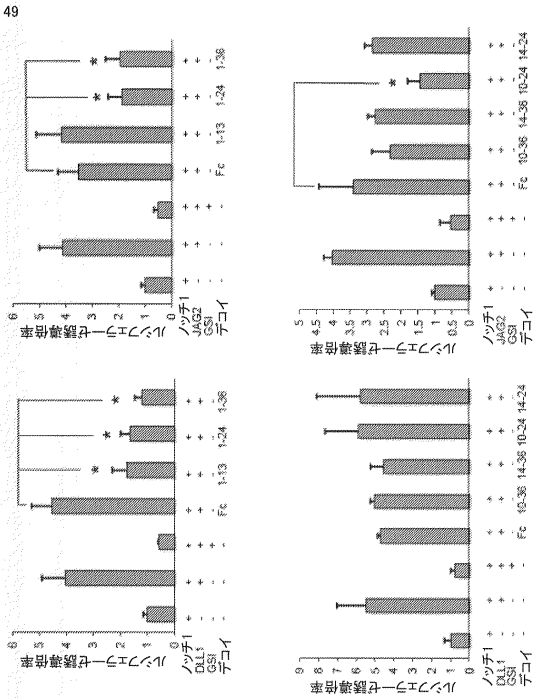


FIGURE 49

【配列表】
2014532061000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/058662

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 39/395 (2012.01)
USPC - 424/134.1
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8) - A61K 38/17 39/395; A61P 35/00; C07K 14/705, 16/00, 16/46 (2012.01)
USPC - 424/18.1, 134.1; 514/12; 530/350, 387.3, 391.1

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

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

PatBase, Google Patents, Google, PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	US 2011/0008342 A1 (KITALEWSKI et al) 13 January 2011 (13.01.2011) entire document	24, 27-34 --- 25, 26
Y	AHMAD et al. Regulation of Ocular Angiogenesis by Notch Signaling: Implications in Neovascular Age-Related Macular Degeneration. IOVS 52(6): 2868-2878. May 2011 entire document	25, 26
A	FUNAHASHI et al. A Notch1 Ectodomain Construct Inhibits Endothelial Notch Signaling, Tumor Growth, and Angiogenesis. Cancer Res 68:4727-4735. 16 June 2008 entire document	1-10, 24-34
A	US 6,379,925 B1 (KITAJEWSKI et al) 30 April 2002 (30.04.2002) entire document	1-10, 24-34
A	US 2006/0030694 A1 (KITAJEWSKI et al) 09 February 2006 (09.02.2006) entire document	1-10, 24-34
A	US 6,090,922 A (ARTAVANIS-TSAKONAS et al) 18 July 2000 (18.07.2000) entire document	1-10, 24-34

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 November 2012	18 JAN 2013
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/058662

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 11-23, 35-38
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2009)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	***43/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	
Ａ６１Ｐ	***27/02***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	27/02		
Ｃ１２Ｎ	*15/09*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(72)発明者 キタジェウスキー、ジャン
アメリカ合衆国、ニュージャージー州 ０７４５０、リッジウッド、ヒルクレスト・ロード ３２３
(72)発明者 ショーバー、キャリー
アメリカ合衆国、ニュージャージー州 ０７６７６、タウンシップ・オブ・ワシントン、ビーチ・ストリート ４１８
(72)発明者 カンサマクシン、タネド
タイ王国、５２１００、ランパン、ムアン、ブンヤワット・ロード・スアンドク ２１２

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA61 BA63 BA80 CA01 DA02 EA02 GA11 HA08
4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA41 CA53 NA14 ZA331 ZB211 ZB261 ZC411
4H045 AA10 AA11 AA30 BA09 BA41 CA40 DA50 DA75 EA20