

## 明 細 書

## 正常乳腺上皮細胞からの腫瘍細胞の製造方法

## 5 技術分野

本発明は、正常な乳腺上皮細胞をベースに、TERT を用いずに腫瘍細胞を作製する方法、該方法により作製される腫瘍細胞及び該腫瘍細胞を用いた抗腫瘍剤のスクリーニング方法に関する。

## 10 背景技術

乳がんは、乳房組織に発生する癌腫であり、西側諸国においては、10%の女性がその生涯を通じて乳がん罹患することが知られている。また、乳がん罹患した女性患者のうち、約 20%がこの疾患を原因として死亡する。また、男性であっても、発症率は非常に低いものの (0.1%程度)、乳がんが発生することが知られている。

乳がんの発生メカニズムは、未だに系統だった解明がなされていない。このため、乳がんの治療は、現時点では、原則的に外科的ながん組織の摘出に頼らざるを得ず、化学療法や放射線療法は、副次的な治療法に留まっている。乳がんの中でも、特にエストロゲン受容体の発現が陰性かつプロゲステロン受容体の発現が陰性かつ

20 ERBB2 (erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2) タンパク質の発現が陰性である、いわゆるトリプルネガティブタイプと呼ばれる種類のものは、進行が早く、また予後不良であることから、有効な治療法の開発が待たれている。

近年において、正常なヒト細胞を遺伝子操作することによるインビトロ用のがんモデルシステムの開発が進んでいる。腫瘍組織から樹立された従来型のセルライン

25 は、未知の遺伝子異常を含んでいる場合は、遺伝子変化による腫瘍化の研究に適していなかったが、上記のようなインビトロ用の癌モデルシステムのいくつかについては、特定の遺伝子変化による腫瘍化への影響を直接的に解明するのに有用である。

例えば、非特許文献 1 は、正常な乳腺上皮細胞へヒト Telomere Reverse Transcriptase (hTERT) 遺伝子、SV40T 抗原遺伝子及び HRAS<sup>V12</sup> 遺伝子を導入

- することによって、初めて乳腺上皮細胞のがん化に成功した報告である。また、Kendall, S. D. et al は、正常な乳腺上皮細胞に hTERT 遺伝子、TP53 変異遺伝子、Cyclin D1 遺伝子、Cdk4 変異遺伝子、HRAS<sup>V12</sup> 遺伝子及び c-Myc 遺伝子を導入することにより、乳がん細胞を作製することに成功している（非特許文献 2）。さらに、別の遺伝子の組合せとして hTERT 遺伝子、TP53 変異遺伝子、HRAS<sup>V12</sup> 遺伝子及び PIK3CA 変異遺伝子を正常ヒト乳腺上皮細胞に導入し、これを癌化させた例も報告されている（非特許文献 3）。

- しかしながら、このような研究が進められているにも関わらず、現時点において、実際に患者から採取される乳がん組織と病理学的に高い類似性を示す乳がん細胞を人工的に作製できたという報告は殆ど存在しない。特に、トリプルネガティブ型乳がん細胞の作製については、未だに成功例が報告されていない。

- 現時点において、がん細胞の研究及び抗がん剤の開発には、がん患者から採取したがん細胞株を使用しているが、患者から採取されたがん細胞株の殆どは、不特定の遺伝子損傷を有するために、細胞株間で遺伝子の変異の状態にばらつきがある。従って、このような細胞を特定の分子又はシグナル経路の研究に用いた場合、得られた実験結果を異なる細胞株に応用することができない。また、このような細胞は、不特定の遺伝子損傷を有するため、がん化に対する個々の遺伝子の関与を評価するための実験に用いることができない場合がある。

- 非特許文献 1 : Elenbaas, B. et al., Genes Dev. 2001, 15 : 50-65  
非特許文献 2 : Kendall, S. DiSean., Cancer Res. 2005, Nov 1; 65 (21): 9824 - 9828

非特許文献 3 : Zhao, J. J., Proc Natl Acad Sci U S A. 2006, 31; 103 (44): 16296 - 16300

## 25 発明の開示

以上の状況に鑑み、遺伝子の変異の状態が特定されたがんモデル細胞、特に、トリプルネガティブ型乳がんモデル細胞の開発が待たれている。

本発明者らは、正常なヒト乳腺上皮細胞に遺伝子操作を施すことにより、前記細胞を腫瘍化させることに成功した。このようにして得られた腫瘍細胞は、正常細

胞に遺伝子操作を行って腫瘍化させたものであるため、遺伝子の変異の状態が特定されている。本発明者らにより得られたこれらの腫瘍細胞を詳細に観察したところ、ヒト乳がん細胞、特にトリプルネガティブ型乳がん細胞の組織学的特徴を示すことが判明した。以上のことから本発明に至った。

5

すなわち、本発明は以下に関する。

[1] 正常乳腺上皮細胞に、以下の処理 (1) 及び (2) を施すことにより、腫瘍細胞を作製する方法。

(1) p53 の機能損失

10 (2) v-Src 遺伝子の導入

[2] サイクリン依存性キナーゼ遺伝子の強制発現がさらに施される、前記[1]に記載の方法。

[3] 前記サイクリン依存性キナーゼ遺伝子が、Cdk4 遺伝子である、前記[2]に記載の方法。

15 [4] 正常乳腺上皮細胞に、以下の処理 (1) ～ (3) を施すことにより、腫瘍細胞を作製する方法。

(1) p53 の機能損失

(2) EGFR 変異遺伝子の導入

(3) c-Myc 遺伝子の導入

20 [5] 前記腫瘍細胞が、エストロゲン受容体の発現が陰性かつプロゲステロン受容体の発現が陰性かつ ERBB2 の発現が陰性である、前記[1]～[4]のいずれか 1 つに記載の方法。

[6] 前記正常乳腺上皮細胞が哺乳類、霊長類またはげっ歯類由来の細胞である、前記[1]～[5]のいずれか 1 つに記載の方法。

25 [7] 前記[1]～[6]のいずれか 1 つに記載の方法により製造された腫瘍細胞。

[8] 以下の工程を含む、腫瘍の治療剤のスクリーニング方法。

(a) 前記[7]に記載の腫瘍細胞と候補物質とを接触させる工程

(b) 腫瘍細胞の増殖阻害効果を検出する工程

[9] 前記[7]に記載の腫瘍細胞が移植された担癌モデル動物。

[10] 以下の工程を含む、腫瘍の治療剤のスクリーニング方法。

- (a) 前記 [9] に記載の担癌モデル動物と候補物質とを接触させる工程
- (b) 腫瘍細胞の増殖阻害効果を検出する工程

- 5      本発明の方法により作製される腫瘍細胞は、正常細胞に遺伝子操作を行って腫瘍化させたものであるため、遺伝子の変異の状態が特定されている。従って、本発明により、乳がんの発達における個々の遺伝子の関与の評価に非常に有用なモデルシステムが提供される可能性を有している。また、本発明の方法により作製される腫瘍細胞は、トリプルネガティブ型乳がんの表現型を示すので、これまで治療が困難
- 10      とされてきたトリプルネガティブ型乳がんの治療法及び治療薬の開発に非常に有用である可能性を有している。

#### 図面の簡単な説明

- 図 1： 本発明の一つの実施態様で使用する正常ヒト乳腺上皮細胞の解剖学的由来を示す図である。
- 15

図 2： 本発明の一つの実施態様による、正常乳腺上皮細胞からの腫瘍細胞の作製方法を示す図である。

- 図 3： 本発明の腫瘍細胞に導入した遺伝子の発現と機能をウェスタンブロッティング法で確認した結果を示す図である。(A) Src 遺伝子の発現を示す図である。(B) p53 の発現を示す図である。(C) 導入した Src 遺伝子によるチロシンのリン酸化を示す図である。
- 20

図 4： (A) 本発明の腫瘍細胞の腫瘍組織形成能を示すグラフである。(B) 本発明の腫瘍細胞をヌードマウスに移植して形成された腫瘍組織を示す図である。

- 図 5： 本発明の腫瘍細胞 (HME/53/ v-Src 細胞) をヌードマウスに移植して形成された腫瘍組織の病理学的特徴を示す図である。
- 25

図 6： 本発明の腫瘍細胞 (HME/53/Cdk4/v-Src 細胞) をヌードマウスに移植して形成された腫瘍組織の病理学的特徴を示す図である。

図 7： 図 7 は、TERT 遺伝子を導入せずに作製した本発明の腫瘍細胞をヌードマウスに移植して腫瘍塊を形成させた結果を示す。

図 8 : 本発明の腫瘍細胞 (HME/53/ EGFR<sup>T790.L858R</sup>/c-Myc 細胞) をヌードマウスに移植して形成された腫瘍組織の病理学的特徴を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

- 5      以下、本発明を詳細に説明する。以下の実施の形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をこの実施の形態のみに限定する趣旨ではない。本発明は、その要旨を逸脱しない限り、様々な形態で実施をすることができる。

        なお、本明細書において引用した全ての文献、および公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込むものとする。また、本明細書は、2010  
10    年 7 月 7 日に出願された本願優先権主張の基礎となる日本国特許出願 (特願 2010-154744 号) の明細書及び図面に記載の内容を包含する。

#### 1. 腫瘍細胞の作製方法

        本発明は、その第一の態様において、正常乳腺上皮細胞に、以下の処理 (1)  
15    及び (2) を施すことにより、腫瘍細胞を作製する方法を提供する。なお、処理 (1)、(2) の順番は特に限定されない。

        (1) p53 の機能損失

        (2) v-Src 遺伝子の導入

        上記態様において、本発明の方法は、上記の処理に加え、処理 (3) として、  
20    サイクリン依存性キナーゼ遺伝子を強制発現させる工程を含んでもよい。

        本発明は、その第二の態様において、正常乳腺上皮細胞に、以下の処理 (1) ~ (3) を施すことにより、腫瘍細胞を作製する方法を提供する。なお、処理 (1) ~ (3) の順番は特に限定されない。

        (1) p53 の機能損失

25    (2) EGFR 変異遺伝子の導入

        (3) c-Myc 遺伝子の導入

        本発明の方法は、TERT 遺伝子を導入することなく、正常乳腺上皮細胞を腫瘍化させることを特徴とする (図 2 参照)。外来遺伝子の発現によって正常細胞から腫瘍細胞を作製する方法において、TERT 遺伝子を導入することなく腫瘍細胞の作

製に成功した例は、未だ報告されていない。

5 本発明において、「正常乳腺上皮細胞」とは、乳腺上皮に由来する正常細胞であり、より好ましくは霊長類又はげっ歯類の乳腺上皮又は乳管上皮に由来する正常細胞であり、さらに好ましくはヒトの乳管上皮又は乳管上皮に由来する正常細胞である。かかる正常細胞のうち、さらに好ましくは、乳管の外層を構成する筋上皮に由来する正常細胞 (Myoepithelial cell) である (図 1 参照)。

10 正常細胞」とは、健康な状態、即ち、検出可能な疾患又は異常を有しない状態の細胞を意味し、「正常ヒト乳腺上皮細胞」とは、健康人のヒトの乳腺上皮細胞など検出可能な疾患又は異常を有しない状態にあるヒトの乳腺上皮細胞である。以下において、「ヒト乳腺上皮細胞」を「HME 細胞 (Human Myoepithelial cell)」と呼ぶ。

15 HME 細胞は、ヒトから採取したものをを用いてもよく、あるいは市販の細胞 (例えば、Lonza 社 (Walkersville, MD, USA) から販売される細胞) を用いてもよい。

20 「p53 の機能喪失」とは、p53 タンパク質がその本来の生物学的機能を有しな

25 いことを意味する。

p53 タンパク質は、TP53 遺伝子によりコードされ、TP53 遺伝子は、DNA 修復タンパク質の活性化、細胞周期の制御、アポトーシスの誘導に関与する p53 タンパク質をコードする遺伝子であり、その機能異常が種々の癌の発生と関連している (Lane, D.P. (1992) *Nature* 358: 15-16) ことが知られている。

30 p53 の機能を喪失させる方法としては、種々の方法が適用でき、p53 タンパク質が機能を喪失するのであれば特に限定されないが、例えば、p53 タンパク質の中和抗体の添加、前記抗体をコードする遺伝子の細胞導入、p53 タンパク質をコードする遺伝子 (以下、「TP53 遺伝子」という) のノックアウト、RNA 干渉による TP53 遺伝子のノックダウン (Sato M et al (Cancer Res. 66, (2006)

2116-2128) 参照)、ドミナントネガティブ TP53 遺伝子の強制発現等が挙げられる。本発明において好ましい p53 の機能を喪失させる方法としては、ドミナントネガティブ TP53 遺伝子(以下、p53CT 遺伝子ともいう) の遺伝子導入である。ドミナントネガティブ TP53 遺伝子のヌクレオチド配列は、Shaulian, E. らの文献

5 (Mol. Cell. Biol., Dec 1992; 12: 5581) を参照することで得られる。p53 タンパク質の機能喪失に際して使用する TP53 遺伝子又は p53 タンパク質は、好ましくは哺乳動物由来の遺伝子又はタンパク質であり、より好ましくは霊長類由来の遺伝子又はタンパク質であり、さらに好ましくは、ヒト由来の遺伝子又はタンパク質である。

10 なお、p53 の機能を喪失させる代わりに、カスパーゼ-3、-8~10、12 等他のアポトーシス誘導タンパク質の機能を喪失させてもよい。この場合も p53 の機能喪失と同様の方法で当該タンパク質の機能を喪失させることが可能である。

「v-Src 遺伝子」は、レトロウィルス的一种である Rous sarcoma virus に由来するがん関連遺伝子として発見されたものであり、その配列は Mayer BJ et al.(J Virol. 1986 Dec; 60(3):858-67.)に記載されている。

「サイクリン依存性キナーゼ (Cdk) 遺伝子」は、細胞周期の回転に関与するタンパク質をコードする遺伝子であり、そのファミリーは、Cdk1~13 から構成される。本発明において正常乳腺上皮細胞に導入する Cdk 遺伝子は、Cdk1~13 のいずれをコードする遺伝子であってもよいが、好ましくは、Cdk4 をコードする

20 遺伝子 (Cdk4 遺伝子) を用いることができる。Cdk4 は、Cyclin D1 の結合パートナーであり、Cdk4 遺伝子の変異が各種腫瘍内で検出されている (Zuo, L. et al., (1996). Nature Genet. 12, 97-99)。Cdk 遺伝子のヌクレオチド配列は、NCBI データベースに登録されているものを使用すればよい。本発明において、Cdk 遺伝子は、好ましくは哺乳動物由来の Cdk 遺伝子であり、より好ましくは霊長類由来

25 の Cdk 遺伝子であり、さらに好ましくはヒト由来の Cdk 遺伝子である。

「EGFR 遺伝子」は、上皮成長因子受容体タンパク質をコードする遺伝子であり、EGFR 遺伝子の発現上昇は肺がん、乳がん、大腸がん、胃がん、脳腫瘍など多くのがんで認められる。(Sharma SV et al., Nature Rev Cancer. 2007; 7(3): 169-81)。

本発明において、「EGFR 変異遺伝子」は、野生型が変異した EGFR 遺伝子であり、例えば、790 番目のスレオニン残基がメチオニンに、858 番目のロイシン残基がアルギニンに置換された EGFR<sup>T790M.L858R</sup> 変異タンパク質 (配列番号 10) をコードする遺伝子が挙げられる。EGFR 変異遺伝子のヌクレオチド配列は、NCBI

5 データベースに登録されている野生型の遺伝子配列を基に、McCoy, M. S. et al (Mol. Cell. Biol., (1984), 4,1577-1582)、Samuels, Y et al (Science, (2004), 304, 554) 又は Scott, K. D. et al (Cancer Res, (2007), 67, 5622-5627) に記載の方法により作製可能である。本発明において、EGFR 遺伝子は、好ましくは哺乳動物由来の EGFR 遺伝子であり、より好ましくは霊長類由来の EGFR 遺伝子であり、

10 さらに好ましくはヒト由来の EGFR 遺伝子である。

「c-Myc 遺伝子」は、種々の遺伝子の発現調節及び DNA 複製に関与する DNA 結合因子タンパク質、即ち転写因子タンパク質をコードする遺伝子であり、c-Myc 遺伝子の発現異常は、種々のがんとの関連性が示唆されている (Dominguez-Sola, D. et al., (2007). Nature 448, 445-451)。c-Myc 遺伝子のヌクレオチド配列は、

15 NCBI データベースに登録されているものを使用すればよい。本発明においては、c-Myc 遺伝子は、好ましくは哺乳動物由来の c-Myc 遺伝子であり、より好ましくは霊長類由来の c-Myc 遺伝子であり、さらに好ましくは、ヒト由来の c-Myc 遺伝子である。

後述する実施例において使用する各遺伝子の各ヌクレオチド配列及びペプチド配列を下記表 1 に示すが、これらに限定されない。

20

表 1

| 遺伝子名                | NCBI<br>Accession No. | Species               | 配列番号<br>(遺伝子) | 配列番号<br>(タンパク質) |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|-----------------|
| TP53 遺伝子            | NM_000546.4           | Homo sapiens          | —             | —               |
| ドミナントネガティブ TP53 遺伝子 | —                     | Homo sapiens          | 1             | 2               |
| v-Src 遺伝子           | —                     | Rous sarcoma<br>virus | 3             | 4               |
| Cdk4 遺伝子            | NM_000075.2           | Homo sapiens          | 5             | 6               |
| EGFR 遺伝子            | NM_005228.3           | Homo sapiens          | —             | —               |
| EGFR 変異遺伝子          | —                     | Homo sapiens          | 9             | 10              |
| c-Myc 遺伝子           | V00568.1              | Homo sapiens          | —             | —               |

### 遺伝子導入方法

本発明において、遺伝子を HME 細胞に導入する場合、当該遺伝子を適切な発現カセットとして発現ベクターに挿入し、該ベクターで HME 細胞を形質転換すればよい。適切な発現カセットは、少なくとも以下の (i) ~ (iii) を構成要素として含む。

- (i) HME 細胞で転写可能なプロモーター；
- (ii) 該プロモーターに in-frame に結合した遺伝子；及び
- (iii) RNA 分子の転写終結及びポリアデニル化シグナルをコードする配列

10

HME 細胞で転写可能なプロモーターの例としては、CMV、CAG、LTR、EF-1  $\alpha$ 、SV40 プロモーター等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

前記発現ベクターは、前記発現カセットの他に、形質転換された HME 細胞をセクションするための選択マーカー発現カセットを有していてもよい。選択マーカーの例としては、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン B ホスホトランスフェラーゼ遺伝子等のポジティブセクションマーカー、LacZ、GFP (Green Fluorescence Protein) 及びルシフェラーゼ遺伝子などの発現レポーター、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子 (HSV-TK)、ジフテリア毒素 A フラグメント (DTA) 等のネガティブセクションマーカー等が挙げられるが、これらに

20

形質転換された HME 細胞は、上記マーカーにより容易に選択することができる。例えば、ネオマイシン耐性遺伝子をマーカーとして導入した細胞であれば、G418 を加えた培地中で培養することにより、一次セクションを行うことができる。また、ターゲティングベクターが GFP 等の蛍光タンパク質の遺伝子をマーカーとして含む場合には、薬剤耐性によるセクションに加えて、FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) 等を用いた蛍光タンパク質発現細胞のソーティングを行ってもよい。

25

HME 細胞への遺伝子の導入に使用可能な発現ベクターは、例えば細胞へ遺伝子導入可能な発現ベクターが挙げられ、市販されているものを用いてもよい。例と

して pEGFP-C1™ (Clontech)、pCMV-HA™ (Clontech)、pMSCVpuro™ (Clontech)、pEF-DEST51™ (Invitrogen)、pCEP4™ (Invitrogen)、ViraPower II Lentiviral Gateway System™ (Invitrogen) 等が挙げられる。発現ベクターは、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リン酸カルシウム法、リポ  
5 フェクション法、ウィルス感染等、公知の遺伝子導入法により HME 細胞へ導入することができる。遺伝子導入法の詳細については、「Sambrook & Russell, Molecular Cloning : A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor, Laboratory Press 2001」等を参照することができる。

## 10 2. 腫瘍細胞

本発明において「腫瘍細胞」とは、*in vivo* で自立的に過剰増殖する細胞を意味し、上記の「腫瘍細胞の作製方法」において作製された腫瘍細胞のみならず、後述する「担癌モデル動物」から採取される腫瘍細胞であってもよく、あるいは、当該担癌モデル動物から採取される腫瘍細胞を *in vitro* で培養した細胞であって  
15 もよい。

腫瘍細胞の例としては、乳がん腫に含まれる細胞が挙げられる。本発明のある実施態様では、腫瘍細胞の好ましい形態として、乳がん細胞が挙げられる。腫瘍細胞は、より好ましくは、エストロゲン受容体 (Estrogen Receptor: ER)、プロゲステロン受容体 (Progesteron Receptor: PgR) 及び ERBB2 (別称は「HER2」) タン  
20 パク質の全てのマーカーについて陰性のトリプルネガティブ型乳がん細胞である。

細胞の腫瘍化を確認する場合には、被検細胞を適切なモデル動物に皮下注射して腫瘍塊形成を観察することにより確認することができる。

モデル動物の例としては、ヒトを除く哺乳動物が好ましく、特に免疫抑制された哺乳動物が好ましい。免疫抑制された哺乳動物の例としては、ヌードラット及びヌードマウスが挙げられるが、これらに限定されるものではない。  
25

細胞の腫瘍化を確認するための別の方法としては、被検細胞をソフトアガー上で培養し、そのコロニー形成を観察する方法(ソフトアガーコロニー形成アッセイ)が挙げられる。具体的には、TP53 変異遺伝子及び v-Src 遺伝子を導入した HME 細胞を一定の細胞濃度に調製した上でソフトアガー培地に播種し、細胞増殖速度を観

察する方法が挙げられる。ソフトアガーコロニー形成アッセイの詳細については、以下の文献を参照できる：Tanaka, S. et al., Proc. natl. Acad. Sci.USA. 94:2356-2361, 1997。

- 本発明において得られる腫瘍細胞（以下、「本発明の腫瘍細胞」）は、非常に高い増殖能を有することを特徴とする。図 4A に示すように、本発明の腫瘍細胞は、ヒト乳がん細胞株 MDA-MB231 細胞 (ATCC HTB-26) と比べて顕著に高い増殖能を有する。また、ある実施態様において、本発明の腫瘍細胞をモデル動物に移植して得られる腫瘍組織は、ER（－）、PgR（－）、ERBB2（－）であり、たとえばヒト由来の乳腺上皮細胞を用いた場合には ER（－）、PgR（－）、HER2（－）であり、トリプルネガティブ型の乳がん細胞の形態を示す（図 5、6 及び 8）。

ヒトのトリプルネガティブ型の乳がんを観察される腫瘍細胞では、ホルモン受容体である ER 及び PgR が発現しておらず、また、受容体型チロシンキナーゼである HER2 も発現していないため、ホルモン療法又は化学療法による治療効果が期待できず、最も治療が困難な種類の乳がんであると考えられている。

- 本発明の腫瘍細胞は、いずれも腫瘍形成率及び増殖能が高い。特に、モデル動物に本発明の腫瘍細胞を移植して腫瘍を形成させた場合、乳腺（管）上皮細胞が属する動物種において自然発生し得る腫瘍組織と病理学的に酷似した腫瘍をモデル動物で形成する。例えば、ヒト由来の乳腺上皮細胞を移植した場合には、ヒトであるがん患者から採取されたがん組織、特に、トリプルネガティブ型乳がん組織と病理学的に酷似した腫瘍をモデル動物で形成する。従って、本発明の腫瘍細胞は、トリプルネガティブ型乳がんの治療法又は治療薬の開発に非常に有用である可能性を有している。

### 3. 担癌モデル動物

- 本発明において「担癌モデル動物」とは、前記腫瘍細胞をヒトを除くモデル動物に移植して腫瘍塊が形成された動物を意味する。モデル動物の例としては、ヒトを除く哺乳動物が好ましく、マウス、ラット、ブタ、イヌ、サル、ハムスター、ウサギなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。このようなモデル動物のうち、哺乳動物が好ましく、さらに霊長類又はげっ歯類に属する動物が好ま

- しい。これらのうち、特に免疫抑制された哺乳動物が好ましく、さらには免疫抑制された霊長類又はげっ歯類に属する動物が好ましい。免疫抑制された哺乳動物は、通常の哺乳動物にシクロスポリン等の免疫抑制剤を投与することにより作製することもできるが、好ましくは、遺伝的バックグラウンドにより先天的に免疫が抑制された哺乳動物が好ましい。先天的に免疫が抑制された哺乳動物の例としては、ヌードラット及びヌードマウスが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

- モデル動物への前記腫瘍細胞の移植方法は特に限定されない。移植されるモデル動物に応じて従来から利用されている方法を適宜選択すればよい。マウス以外に移植した事例として例えば、Genetic induction of tumorigenesis in Swine Oncogene 26, 1038-1045 (11 September 2006)等を参照できる。移植した腫瘍細胞の再摘出の容易性の観点からは、皮下注射又は腹腔内注射による移植が好ましく、一方で、解剖学的な観点からは、同所移植が好ましい。

#### 4. 抗腫瘍剤のスクリーニング方法

- 15 本発明は、腫瘍の治療剤のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法の第一の態様として、以下の工程を含む、腫瘍の治療剤のスクリーニング方法を提供する。

(a) 本発明の腫瘍細胞と候補物質とを接触させる工程

(b) 腫瘍細胞の増殖阻害効果を検出する工程

- 20 また、本発明のスクリーニング方法の第二の態様として、以下の工程を含む、腫瘍の治療剤のスクリーニング方法を提供する。

(a) 本発明の腫瘍細胞が移植された担癌モデル動物と候補物質とを接触させる工程

(b) 腫瘍細胞の増殖阻害効果を検出する工程

25

上記において、「腫瘍細胞と候補物質とを接触させる」または「腫瘍細胞が移植された担癌モデル動物と候補物質とを接触させる」とは、該候補物質が、腫瘍細胞表面の分子と相互作用を生じさせる程度に接近するか、該分子と結合するか、又は該腫瘍細胞内に取り込まれる条件を調整することを意味する。腫瘍細胞が、たと

例えば培養細胞などの腫瘍細胞である場合、該細胞が接している培養培地に該候補物質を一定濃度以上で添加することにより、該細胞と候補物質とを接触させることができる。一方、腫瘍細胞が動物体内に移植されている場合、すなわち、腫瘍細胞が移植された担癌モデル動物の場合、該動物に候補物質を一定量で投与することにより、該腫瘍細胞と候補物質とを接触させることができる。この場合、投与経路は、候補物質の投与に一般的に採用されている経路であれば、特に限定はされないが、具体例としては、経口、舌下、経鼻、経肺、経消化管、経皮、点眼、静脈内注射、皮下注射、筋肉内注射、腹腔内注射、局所注射、外科的移植が挙げられ、好ましくは経口投与、腹腔内注射及び静脈内注射である。

- 10 候補物質の例としては、既に抗腫瘍効果が確認されている薬剤及び抗腫瘍作用の可能性のある化合物、ポリペプチド、核酸、抗体及び低分子化合物等が挙げられる。このような候補物質の具体例としては、代謝拮抗剤（例えば、5-フルオロウラシル (5-FU)）、葉酸代謝拮抗薬（例えば、ジヒドロプテロイン酸シンターゼ阻害薬であるスルファジアジン及びスルファメトキサゾール、ジヒドロ葉酸レダクターゼ阻害薬 (DHFR 阻害薬) であるメソトレキセート、トリメトプリム、ピリメタミン）、ピリミジン代謝阻害薬（例えば、チミジル酸シンターゼ阻害薬である 5-FU、フルシトシン (5-FC)）、プリン代謝阻害薬（例えば、IMPDH 阻害薬である 6-メルカプトプリン及びそのプロドラッグであるアザチオプリン）、アデノシンデアミナーゼ (ADA) 阻害薬（例えば、ペントスタチン）、リボヌクレオチドレダクターゼ阻害薬 (リボヌクレオチドレダクターゼ阻害薬であるヒドロキシウレア)、ヌクレオチドアナログ（プリンアナログであるチオグアニン、リン酸フルダラビン及びクラドリビン、ピリミジンアナログであるシタラビン及びゲムシタビン）、L-アスパラギナーゼ、アルキル化剤（例えば、ナイトロジェンマスタードであるシクロホスファミド、メルファラン及びチオテパ、白金製剤であるシスプラチン、カルボプラチン及びオキサリプラチン、ニトロソウレアであるダカルバシン、プロカルバシン及びラニムスチン）抗腫瘍性構成物質（ザルコマイシン、マイトマイシン C、ドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、ブレオマイシン）、トポイソメラーゼ阻害剤（イリノテカン、ノギテカン、ドキソルビシン、エトポシド、レボフロキサシン、シプロフロキサシン）、微小管重合阻害剤（ビンブラスチン、ビンク
- 15
- 20
- 25

5 リスチン、ビデシン)、コルヒチン、微小管脱重合阻害薬 (パクリタキセル、ドセタキセル)、分子標的剤 (トラスツズマブ、リツキシマブ、イマチニブ、グゾイチニブ、ボルテゾミブ、エルロチニブ)、デキサメサゾン等のステロイド薬、フィナステリド、アロワタールゼ阻害剤及びタモキシフェン並びにこれらの組合せが挙げられるが、以上に限定されるものではない。

腫瘍細胞の増殖阻害効果については、同一の細胞数を同一の細胞密度で培養ディスプレイに播種した同一条件の培養系、あるいは同一の細胞数を同一の細胞密度で移植した同一系統の担瘤モデル動物を2系用意し、一方の系 (サソル) の細胞に前記候補物質を接触させ、他方の系 (コントロール) の細胞には前記候補物質を接触させずに、両系の腫瘍細胞の増殖を観察し、一定期間経過後に前記2系のそれぞれに含まれる腫瘍細胞数を測定し、比較することで増殖阻害効果を確認することができる。

15 本発明の腫瘍細胞を培養細胞など腫瘍細胞の形態でスクリーニングに用いる場合、上記サソル細胞に候補物質を接触させた後に、サソル細胞の細胞数とコントロール細胞の細胞数とをセルカウンター等で測定し、それぞれの細胞数を比較して腫瘍増殖効果を確認することができる。

20 本発明の腫瘍細胞をモデル動物に移植した形態でスクリーニングに用いる場合、サソル系のモデル動物に候補物質を投与した後に、サソル系及びコントロール系の動物から腫瘍組織を取り出し、該サソル系及びコントロール系の腫瘍組織に含まれる細胞数を測定及び比較することができる。あるいは、前記腫瘍組織を取り出して、該腫瘍組織の体積をサソル系とコントロール系の間で比較して、腫瘍増殖効果を確認することもできる。腫瘍の体積は、以下の式により求めることができる。

$$\text{腫瘍体積} = ab^2/2 \quad (a: \text{横幅}, b: \text{長さ})$$

あるいは、サソル系及びコントロール系の動物に候補物質を投与した後に、腫

瘍細胞の移植箇所に対し、計測可能な腫瘍塊が形成された割合をサンプル系とコントロール系の間で比較して、腫瘍増殖効果を確認することもできる。

モデル動物は、項目「3. 担癌モデル動物」で述べたモデル動物と同様である。

- 5 モデル動物への移植方法は特に限定されないが、移植した腫瘍細胞の再摘出の容易性から、皮下注射又は腹腔内注射が好ましい。

- サンプル系の腫瘍細胞の増加率が、コントロール系の腫瘍細胞の増加率よりも小さい場合には、用いた候補物質は、抗腫瘍効果を有するものと判断することができる。あるいは、本発明の腫瘍細胞に関し、既に一定の条件下での増加率について複数のデータが存在する場合には、そのデータを統計処理して得られる平均値、標準偏差等から導き出される基準値と比較して判断してもよい。
- 10

- 腫瘍の増殖率の平均値、標準偏差等は、種々の統計方法によって得ることができるが、具体的には、培養細胞であれば、播種した時点の初期細胞数及び細胞密度をパラメーターとし、あるいは移植細胞であれば使用したモデル動物の移植時の体重及び移植した腫瘍細胞の細胞数をパラメーターとして、IBM SSPS Statistics 18 (SSPS) 等の統計解析ソフトで two-way ANOVA 解析することにより求めることができる。本発明の方法の実施により得られた腫瘍細胞の増殖率を新たなデータとして統計解析用の母集団に加えて母数を大きくすることにより、さらに解析の精度を向上させることができる。
- 15

- 20 本発明の腫瘍細胞は、患者から採取された乳がん細胞と病理学的に酷似した特徴を示すことから、本発明のスクリーニング方法で腫瘍細胞の増殖抑制効果が確認された抗腫瘍剤は、実際にがん患者、特に乳がん患者（例えば、トリプルネガティブ型乳がん）の治療に用いた場合にも抗腫瘍効果を奏すると期待される。

- 以下、実施例を用いて本発明を詳細に説明するが、本発明は実施例に記載された態様に限定されるものではない。
- 25

#### [実施例]

本実施例では、正常 HME 細胞に、表 1 に示す遺伝子の組合せを導入することにより腫瘍細胞を作製した。

以下の記載において、HME 細胞に導入した遺伝子の種類に応じて、作製した各腫瘍細胞を下記の表に示すように表記する。

表 2

| HME 細胞に導入した遺伝子                                                 | 腫瘍細胞の表記                                     |
|----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| ドミナントネガティブ TP53(p53CT)遺伝子                                      | HME/53 細胞                                   |
| ドミナントネガティブ TP53 遺伝子及び v-Src 遺伝子                                | HME/53/v-Src 細胞                             |
| ドミナントネガティブ TP53 遺伝子及び Cdk4 遺伝子                                 | HME/53/Cdk4 細胞                              |
| ドミナントネガティブ TP53 遺伝子、Cdk4 遺伝子及び v-Src 遺伝子                       | HME/53/Cdk4/v-Src 細胞                        |
| ドミナントネガティブ TP53 遺伝子及び c-Myc 遺伝子                                | HME/53/c-Myc 細胞                             |
| ドミナントネガティブ TP53 遺伝子及び EGFR <sup>T790.L858R</sup> 遺伝子           | HME/53/EGFR <sup>T790.L858R</sup> 細胞        |
| ドミナントネガティブ TP53 遺伝子、EGFR <sup>T790.L858R</sup> 遺伝子及び c-Myc 遺伝子 | HME/53/EGFR <sup>T790.L858R</sup> /c-Myc 細胞 |

- 5 以下に、本実施例で行った実験の手順を記載する。

#### 細胞培養

- 10 HME 細胞は、30 歳の白人女性に由来する正常ヒト乳腺上皮細胞を Lonza 社 (Walkersville, MD, USA) から購入した。この細胞を、コラーゲンコーティングしたディッシュ上で、Lonza 社から提供された種々の増殖因子を添加した血清不含 MEGM medium (MEGM Bullet Kit; Lonza) 中にて培養した。細胞は、湿潤インキュベーター内で低酸素環境下 (3% O<sub>2</sub> 及び 5% CO<sub>2</sub>) で 37℃ にて維持し、これを本実施例において使用する HME 細胞として使用した。

- 15 レトロウィルスベクターの作製及び該レトロウィルスベクターの HME 細胞への導入

表 1 に示した遺伝子のうち、v-Src、Cdk4、ドミナントネガティブ TP53、

EGFR<sup>T790.L858R</sup> 及び c-Myc をそれぞれ以下の表に示すベクターに組み込むことにより、レトロウイルス発現用ベクターを作製した。

表 3

| インサート遺伝子                   | 発現ベクター                                              |
|----------------------------|-----------------------------------------------------|
| v- <b>Src</b>              | pCX4pur ベクター<br>(GenBank Accession No: AB086386)    |
| <b>Cdk4</b>                | pCX4bsr ベクター<br>(GenBank Accession No: AB086384)    |
| ドミナントネガティブ TP53            | pCX4.1hisD ベクター<br>(GenBank Accession No: AB086389) |
| EGFR <sup>T790.L858R</sup> | pCX4pur ベクター<br>(GenBank Accession No: AB086386)    |
| c-Myc                      | pCX4bleo ベクター<br>(GenBank Accession No: AB086388)   |

- 5 上記のレトロウイルス発現用のベクターと、Takara Bio 社 (Shiga, Japan)より購入した pGP および pE-eco プラスミドを 293T 細胞に導入することで、ウイルスベクターを作製した。その後に、Ecotropic receptor (Eco VR) を発現させた HME 細胞に上記ウイルスベクターを感染させた。

- 10 上記ウイルスベクターに感染した細胞は、puromycin、bleocine の存在下で 2 週間培養することによりセレクションを行った。いずれの薬剤でセレクションを行う場合でも、培養細胞は、感染細胞のポリクローナルな増殖集団から選択した。

なお、Ecotropic receptor (Eco VR) を発現させた HME 細胞は以下の手順で作製した。

- 15 以下のプライマーを用いて Mouse Ecotropic retrovirus receptor (Slc7a1, NM\_007513) の全コーディング領域を含む cDNA を RT-PCR によりクローニングした。

FW プライマー： 5' -GATCCTCCCCAGTGAGAAGT-3' (配列番号 7)

RV プライマー： 5' -CTCACTAGCCATCTGGAGTG-3' (配列番号 8)

- 20 上記 RT-PCR の増幅産物を pCX4hyg ベクター (GenBank Accession No: AB086387) に組み込んだ。該ベクターと、Takara Bio 社 (Shiga, Japan)より購入した pGP 及び pE-Ampho プラスミドとを 293T 細胞に導入することで、ウイルスベクターを作

製し、該ウィルスベクターを HME 細胞に感染させ、hygromycin の存在下で 2 週間培養することにより感染細胞のセレクションを行った。

#### イムノブロット法

- 5      タンパク質の測定、SDS-PAGE 及びイムノブロッティングは、先の文献 (Akagi, T. et al., (2002). Mol. Cell Biol. 22, 7015-7023) の記載に従って行った。免疫反応陽性タンパク質のシグナルは、SuperSignal WestFemto reagent (Pierce 社) を用いてケミルミネセンスにより可視化した。抗 Src 抗体、抗リン酸化 Src (Tyr 416) 抗体及び抗 p53 抗体は、Cell Signaling Technology 社より、抗リン酸化チロシン
- 10    抗体(4G10)は Millipore 社より入手した。

#### 異種移植片増殖実験

- マウスを用いて異種移植片増殖実験を行った。具体的には、表 1 に示す遺伝子の組合せを発現させた HME 細胞を  $1 \times 10^6$  個含む細胞懸濁液
- 15    (single-cell-suspension) を、50% MATRIGEL™ (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) に懸濁し、週齢 6 又は 7 のメスの胸腺欠損ヌードマウス (BALB/c nu/nu; Japan SLC, Hamamatsu, Japan) または、NOD-SCID マウスのわき腹に皮下注射した。移植後、目視で腫瘍塊の形成の有無を確認した。腫瘍塊の形成に際しては、移植後 12 週経過時に指でつまめる程度の体積の腫瘍塊の形成が認められない場合
- 20    には、陰性と判断した。また、移植後、ノギスを用いて腫瘍の寸法を測定し、以下の式に基づいて腫瘍の体積を計算し、造腫瘍能として見積もった。

$$\text{腫瘍体積} = ab^2/2 \quad (a : \text{横幅}, b : \text{長さ})$$

- 25      また、各がん関連遺伝子が導入された HME 細胞の移植箇所に対し、計測可能な腫瘍塊が形成された割合を腫瘍形成率として算出し、造腫瘍能として見積もった。

#### 組織学的分析及び免疫組織化学染色

異種移植片増殖実験において、移植した異種移植片を、移植後 20 日目に取り出

した。当該移植片を、ホルマリン固定及びパラフィン包埋した後に切片化し、通常のプロトコルに従ってヘマトキシリン・エオジン（H&E）染色を行った。先の文献（Sasai, K. et al., (2008). Am. J. Surg. Pathol. 32, 1220-1227）の記載に従い、以下の抗体を用いて免疫組織化学染色を行った：サイトケラチン 5/6（CK5/6; 5 DAKO, M7237）、エストロゲン受容体（ER; DAKO, M7040）、プロゲステロン受容体（PgR; DAKO, M3569）、HER2（DAKO, K5204）。

具体的には、以下の手順で免疫組織化学染色を行った。厚さ 4  $\mu\text{m}$  の組織切片をキシレンで脱パラフィン化した後にエタノールで脱水した。圧力鍋にて、10 mM クエン酸バッファー（pH 6.0）中で 2 分間加熱することにより、抗原を賦活させた。0.01% Tween20 含有リン酸干渉生理食塩水（PBST）で組織切片を再水和させ、0.3%過酸化水素とインキュベートさせることで、内在性のペロキシダーゼを不活化させた。組織切片を、適切な希釈濃度の 1 次抗体で 4°C にて一晩インキュベートし、PBST で洗浄した後、室温にて Envision Dual Link solution (Dako, Glostrup, Denmark) で 30 分間インキュベートした。次に、ジアミノベンジジン（Dako）で切片を処理して抗原抗体反応部位を可視化させ、ヘマトキシリン処理を 90 秒間行って核染色を行った。組織切片のスライドを Entellan Neu reagent (Merck, Whitehouse Station, NJ) でマウントした後にカバーガラスで封入し、観察に供した。

## 20 実験結果

### [1] HME 細胞へ導入した遺伝子の発現確認

イムノブロッティングを行い、HME 細胞へ導入された遺伝子の発現を確認した。HME/453/v-Src 細胞及び HME/53/v-Src 細胞に導入したドミナントネガティブ TP53 遺伝子及び v-Src 遺伝子が発現していることを、抗リン酸化 Src 抗体及び 25 抗 p 53 抗体を用いた抗体抗原反応により確認した（それぞれ図 3A 及び図 3B）。また、v-Src 遺伝子の機能により、チロシンのリン酸化が増強していることを抗リン酸化チロシン抗体により確認し、目的とする遺伝子が導入され、かつ発現していることを確認した（図 3C）。

## [2] 作製された腫瘍細胞の造腫瘍能の確認

作製された腫瘍細胞をヌードマウスに皮下移植し、移植された腫瘍片の造腫瘍能を確認した（図 4、7 及び 8）。

図 7 に示すように、HMEC 細胞に対してドミナントネガティブ TP53 遺伝子の導入が行われた細胞（HME/53 細胞）及びドミナントネガティブ TP53 遺伝子及び Cdk4 遺伝子の導入が行われた細胞（HME/53/Cdk4 細胞）では、腫瘍塊の形成が確認されなかった。

図 4 及び 7 に示すように、HMEC 細胞に対してドミナントネガティブ TP53 遺伝子及び v-Src 遺伝子の導入が行われた細胞（HME/53/Cdk4/v-Src 細胞及び HME/53/v-Src 細胞）では、指でつまめる程度以上の腫瘍塊の形成が確認され、100%の腫瘍形成率を示した。また、図 4A 及び図 4B に示すように、HME/53/Cdk4/v-Src 細胞及び HME/53/v-Src 細胞は、従来利用されているヒト乳がん細胞株 MDA-MB231 細胞と比べて短期間でより大きな腫瘍を形成することから、高い増殖能を有することが明らかになった。

図 7 に示すように、ドミナントネガティブ TP53 遺伝子が導入された HMEC 細胞（HME/53 細胞）に対し、EGFR<sup>T790.L858R</sup> 遺伝子又は c-Myc 遺伝子のいずれかを単独で導入した HME/53/EGFR<sup>T790.L858R</sup> 及び HME/53/c-Myc 細胞では、腫瘍塊が形成されなかった。

一方、ドミナントネガティブ TP53 遺伝子、EGFR<sup>T790.L858R</sup> 遺伝子及び c-Myc 遺伝子の組み合わせを導入した HME/53/EGFR<sup>T790.L858R</sup>/c-Myc 細胞では、腫瘍塊の形成が確認され、100%の腫瘍形成率を示した。

## [3] 作製された腫瘍細胞の表現型の確認

異種移植片増殖実験により得られた腫瘍組織の表現型を確認するために種々のがんマーカーで免疫染色し、観察した。HME/53/v-Src 細胞の皮下移植により形成した腫瘍の組織切片を、臨床で診断に使用されているマーカーで染色したところ、図 5 で示したように ER(-), pgr(-), HER2(-)であり、且つベーサル型の乳癌のマーカーである CK5/6(+)であったことから、HME/53/v-Src 細胞は、最も治療の困難な種類の乳癌であるトリプルネガティブ型且つベーサル型の乳癌と病理学的に

酷似した腫瘍を形成することが判明した。また、HME/53/Cdk4/v-Src 細胞の皮下移植により形成した腫瘍の組織切片も、図 6 に示すように ER (-), pgR (-), HER2 (-) であったことから、同様にトリプルネガティブ型の乳癌と病理学的に酷似した腫瘍を形成することが示された。また、HME/53/EGFR<sup>T790.L858R</sup>/c-Myc 細胞の皮下移植により形成した腫瘍の組織切片も、図 8 に示すように、ER(-), pgR(-), HER2(-)であり、且つベーサル型の乳癌のマーカーである CK5/6(+)であったことから HME/53/EGFR<sup>T790.L858R</sup>/c-Myc 細胞は、最も治療の困難な種類の乳癌であるトリプルネガティブ型且つベーサル型の乳癌と病理学的に酷似した腫瘍を形成することが判明した。

10

以上の結果が示すように、正常な乳腺上皮細胞に、TP53 変異遺伝子と v-Src 遺伝子の組み合わせ、TP53 変異遺伝子と v-Src 遺伝子と Cdk4 遺伝子の組み合わせ又は TP53 変異遺伝子と EGFR2 変異遺伝子と c-Myc 遺伝子の組み合わせを遺伝子導入することにより、従来では腫瘍細胞の作成に必須とされていた hTERT 遺伝子を用いずに腫瘍細胞を作製することが可能となった。また、本発明では、ヒト乳がん患者から採取される乳がん組織と酷似したヒト乳がんモデル、特にトリプルネガティブ型乳がんモデルを作製することが可能となった。

15

#### 産業上の利用可能性

本発明により、ヒトの乳がん細胞と同様の病理学的特徴を示す腫瘍細胞が提供される可能性を有する。このような腫瘍細胞は、乳がんの生物学的機構の研究、乳がん治療のターゲット分子の同定、並びに抗癌剤のスクリーニング及び試験に有用である可能性を有する。

20

#### 25 配列表フリーテキスト

配列番号 7 : 合成 DNA

配列番号 8 : 合成 DNA

#### 配列表

30

## 請求の範囲

1. 正常乳腺上皮細胞に、以下の処理 (1) 及び (2) を施すことにより、腫瘍細胞を作製する方法。
  - 5 (1) p53 の機能損失
  - (2) v-Src 遺伝子の導入
2. サイクリン依存性キナーゼ遺伝子の強制発現がさらに施される、請求項 1 に記載の方法。
3. 前記サイクリン依存性キナーゼ遺伝子が、Cdk4 遺伝子である、請求項 10 2 に記載の方法。
4. 正常乳腺上皮細胞に、以下の処理 (1) ~ (3) を施すことにより、腫瘍細胞を作製する方法。
  - (1) p53 の機能損失
  - (2) EGFR 変異遺伝子の導入
  - 15 (3) c-Myc 遺伝子の導入
5. 前記腫瘍細胞が、エストロゲン受容体の発現が陰性かつプロゲステロン受容体の発現が陰性かつ ERBB2 の発現が陰性である、請求項 1~4 のいずれか 1 項に記載の方法。
6. 前記正常乳腺上皮細胞が哺乳類、霊長類またはげっ歯類由来の細胞である、請求項 1~5 のいずれか 1 項に記載の方法。
  - 20 7. 請求項 1~6 のいずれか 1 項に記載の方法により製造された腫瘍細胞。
  8. 以下の工程を含む、腫瘍の治療剤のスクリーニング方法。
    - (a) 請求項 7 に記載の腫瘍細胞と候補物質とを接触させる工程
    - (b) 腫瘍細胞の増殖阻害効果を検出する工程
  - 25 9. 請求項 7 に記載の腫瘍細胞が移植された担癌モデル動物。
  10. 以下の工程を含む、腫瘍の治療剤のスクリーニング方法。
    - (a) 請求項 9 に記載の担癌モデル動物と候補物質とを接触させる工程
    - (b) 腫瘍細胞の増殖阻害効果を検出する工程