

明 細 書

腫瘍細胞の作製方法

5 技術分野

本発明は、細気道上皮細胞をベースに、遺伝子導入により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

- 毎年 100 万人以上が肺がんを原因に死亡しており、肺がんは男女を通して最も身近な種類のがんであるといえる。非小細胞肺がんは、腺がんを伴う全ての種類の肺がんの 80% を占めており、多くの場合、病状が進行した段階で診断され、初期の検出及び治療方法が進歩しているにも関わらず、良好な予後を得ることが困難である（非特許文献 1 及び 2）。非小細胞肺がんの状態及び進行を分子的に理解することにより、治療法及び予防法を改善することが期待されるが、現段階では有効な治療法及び予防法は確立されていない。初期の検出及び治療介入に最も適した標的を見い出すに当たり、細胞の腫瘍化に伴う最小限かつ最重要な変化を同定することが不可欠となる。このような変化の同定のため、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は、未知の遺伝子異常を含んでいるために、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ことが報告されている（非特許文献 3 及び 4）。

ヒトの肺上皮細胞の不死化および癌化については、複数の研究グループが研究を行っている（非特許文献 5～7）。これらの研究では、レトロウィルスを用いた遺伝子操作により、大部分のヒト非小細胞肺がん認められる 3 種類の遺伝子変化、即ち、テロメラーゼ逆転写酵素遺伝子の導入並びに、pRB 経路及び p53 経路の不活化

、が検討されている。テロメラーゼの高発現は殆どの肺がんに共通して観察され（非特許文献8）、p53の機能喪失は、約50%の非小細胞肺がんで観察され、また、プロモーター領域のメチル化又はホモ接合型欠失によるp16タンパク質の発現不全が約70%の非小細胞肺がんで観察されている（非特許文献9）。

- 5 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、実際に肺がん患者から採取される肺がん組織と病理学的に高い類似性を示す肺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。

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、細胞株間で遺伝子異常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貢献を評価するための実験には適さない。

- 15 非特許文献 1 ; Meuwissen, R. et al., (2005). Genes Dev. 19,643-664
 非特許文献 2 ; Herbst, R.S.et al., (2008). Lung cancer. N. Engl. J. Med.
 359, 1367-1380
 非特許文献 3 ; Akagi, T. (2004). Trends Mol. Med. 10, 542-548
 非特許文献 4 ; Zhao, J.J.et al., (2004). Trends Mol. Med. 10, 344-350
 20 非特許文献 5 ; Lundberg, A.S. et al., (2002). Oncogene 21, 4577-4586
 非特許文献 6 ; Ramirez, R.D. et al., (2004). Cancer Res. 64, 9027-9034
 非特許文献 7 ; Sato, M. et al., (2006). Cancer Res. 66, 2116-2128
 非特許文献 8 ; Sekido, Y. et al., (2003). Annu. Rev. Med. 54, 73-87
 非特許文献 9 ; Herbst, R.S. et al., (2008). Lung cancer. N. Engl. J. Med.

25 359, 1367-1380

発明の開示

以上の状況に鑑み、遺伝子状態が特定されたがんモデル細胞の開発が待たれている。

本発明者らは、細気道上皮細胞に遺伝子操作を施すことにより、前記細胞を完

- 全に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化細胞は、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、遺伝子状態が特定されている。本発明者らがこれらの細胞を詳細に観察したところ、導入した遺伝子要素の組合せに応じて、分化型又は未分化型のヒト肺癌細胞の組織学的特徴を示すことが
- 5 判明した。さらに未分化型および分化型ヒト肺癌の癌幹細胞の性質を持つ細胞の作製にも成功した。

すなわち、本発明は以下に関する。

- [1] 不死化細気道上皮細胞に、がん関連遺伝子を導入することにより、腫瘍
- 10 細胞を作製する方法であって、

前記不死化細気道上皮細胞が、正常細気道上皮細胞に以下の (1) ~ (3) の処理を施すことにより作製されたものであり、

- (1) テロメラーゼ逆転写酵素遺伝子の強制発現
- (2) サイクリン依存性キナーゼ 4 遺伝子の強制発現
- 15 (3) p53 の機能喪失

前記がん関連遺伝子が、c-Myc 遺伝子、v-Src 遺伝子、KRAS 変異遺伝子、BCL2 遺伝子、PIK3CA 変異遺伝子、Cyclin D1 遺伝子及び LKB1 変異遺伝子、TP63 遺伝子及び EGFR 変異遺伝子から選択される 1 又は複数の遺伝子である、前記方法。

- 20 [2] 前記がん関連遺伝子が、c-Myc 遺伝子と v-Src 遺伝子との組み合わせである、前記 [1] に記載の方法。

[3] 前記がん関連遺伝子が、c-Myc 遺伝子と KRAS 変異遺伝子と BCL2 遺伝子との組み合わせである、前記 [1] に記載の方法。

- [4] 前記腫瘍細胞が、未分化型がん細胞である、前記 [2] 又は [3] に記載
- 25 の方法。

[5] 前記腫瘍細胞が、がん幹細胞である、前記 [4] に記載の方法。

[6] 前記がん関連遺伝子が、c-Myc 遺伝子と v-Src 遺伝子であり、前記 c-Myc 遺伝子が前記不死化細気道上皮細胞内で誘導発現される、前記 [1] に記載の方法。

[7] 前記腫瘍細胞が、低分化型肺がん細胞である、前記 [6] に記載の方法。

[8] 前記がん関連遺伝子が、KRAS 変異遺伝子と、PIK3CA 変異遺伝子、Cyclin D1 遺伝子又は LKB1 変異遺伝子から選ばれるいずれか 1 つの遺伝子との組み合わせである、前記 [1] に記載の方法。

5 [9] 前記がん関連遺伝子が、KRAS 変異遺伝子と Cyclin D1 遺伝子との組み合わせである、前記 [8] に記載の方法。

[10] 前記がん関連遺伝子が、KRAS 変異遺伝子と Cyclin D1 遺伝子と TP63 遺伝子との組み合わせである、前記 [8] に記載の方法。

10 [11] 前記がん関連遺伝子が、KRAS 変異遺伝子と PIK3CA 変異遺伝子との組み合わせである、前記 [8] に記載の方法。

[12] 前記がん関連遺伝子が、KRAS 変異遺伝子と LKB1 変異遺伝子との組み合わせである、前記 [8] に記載の方法。

[13] 前記がん関連遺伝子が、EGFR 変異遺伝子と Cyclin D1 遺伝子との組み合わせである、前記 [1] に記載の方法。

15 [14] 前記腫瘍細胞が、分化型肺がん細胞である、前記 [8] ～ [13] に記載の方法。

[15] 前記腫瘍細胞が、分化型肺がんのがん幹細胞である前記 [9] に記載の方法。

20 [16] 前記不死化細気道上皮細胞が、哺乳類または霊長類の細胞である、前記 [8] ～ [15] に記載の方法。

[17] 前記不死化細気道上皮細胞が、ヒトの細胞である、前記 [8] ～ [15] に記載の方法。

[18] 前記 [1] ～ [17] 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。

25 [19] 前記 [15] に記載の腫瘍細胞が移植された担癌モデル動物。

[20] 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 [18] に記載の腫瘍細胞に由来するサンプル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

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、遺伝子状態が特定されている。従って、本発明により、肺がんの発達における個々の遺伝子の貢献の評価に非常に有用なモデルシステムが提供される。また、本発明の方法により作製される腫瘍細胞のうち、がん関連遺伝子のみを導入することによって作製された細胞は、がん細胞の特性を忠実に表現した細胞であり、抗がん剤等の開発に非常に有効であると期待される。

図面の簡単な説明

図 1 : (A) c-Myc 及び v-Src 遺伝子を HSAE/4T53 細胞に導入して作製した細胞 (以下、4T53MS 細胞) の造腫瘍能を示す図である。(B) 4T53MS 細胞の腫瘍増殖能を示すグラフである。(C) 4T53MS 細胞由来腫瘍組織のヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色した結果、および腫瘍組織の免疫染色の結果を示す図である。

図 2 : (A) 4T53MS 細胞の *in vivo* における造腫瘍能を、移植する細胞数ごとに調べた結果を示す表である。(B) 4T53MS 細胞 10 個を NOD-SCID マウスに移植した 7 週間後の腫瘍形成を示す図である。

図 3 : (A) 誘導性 c-Myc 遺伝子と v-Src 遺伝子を HSAE/4T53 細胞に導入して作製した細胞 (以下、4T53mS 細胞 (m は小文字) と表記する) において、ドキシサイクリン (DOX) 処理によって、c-Myc 発現が誘導されることを、*in vitro* の実験系で示した図である。(B) 低分化型肺癌モデルの作製方法の簡略図である。4T53mS 細胞をヌードマウスに移植し、ドキシサイクリン (DOX) を投与し続け、腫瘍形成が見られた後に、ドキシサイクリン投与を停止する。(C) 4T53mS 細胞由来腫瘍組織の免疫染色 (サイトケラチン染色) の結果を示す図である。

図 4 : HSAE/4T53 細胞に、様々な癌関連遺伝子 (M: c-Myc、R: KRAS^{V12}、B: BCL2、P: PIK3CA^{H1047R}、D: Cyclin-D1、L: LKB1^{D194A}、E: EGFR^{T790M L858R}) の 1 種又は複数種を導入して樹立した細胞株の造腫瘍能を示す表である。

図 5 : HSAE/4T53 細胞に、図に表示される遺伝子 (M: c-Myc、R: KRAS^{V12}、B: BCL2) を導入し、4T53RM 細胞 (KRAS^{V12} 及び c-Myc を導入) と 4T53RMB 細胞 (KRAS^{V12}, c-Myc, BCL2 を導入) を作製し、このようにして作製した細胞を

ヌードマウスに移植して、H&E 染色（上段）、抗サイトケラチン染色（AE1/AE3：中段及び抗 VIMENTIN 染色（下段）を行った結果を示す図である。

図 6： 4T53RP（左欄）、4T53RD（中央欄）及び 4T53RL 細胞（右欄）由来の移植片切片の H&E 染色（上段）、抗サイトケラチン染色（AE1/AE3：中段）及び抗 VIMENTIN 染色（下段）の結果を示す図である。なお、4T53RP 細胞とは、HSAE/4T53 細胞に KRAS^{V12} と PIK3CA 変異遺伝子を導入した細胞である。4T53RD 細胞とは、HSAE/4T53 細胞に KRAS^{V12} と Cyclin D1 遺伝子を導入した細胞である。4T53RL 細胞とは、HSAE/4T53 細胞に KRAS^{V12} と LKB1 変異遺伝子を導入した細胞である。

図 7： 4T53 細胞に導入する遺伝子の組み合わせにより、様々なタイプの肺癌モデルを作製することが可能であることを示す概念図である。

図 8：（A）4T53RD 細胞のシングル細胞に由来する細胞クローンを皮下移植し、当該移植切片の抗 p63 染色（左パネル）、抗 TTF1 染色（中央パネル）、Alcian Blue 染色（右パネル）の結果を示す図である。（B）マウスの気道上皮の模式図である。

図 9： 4T53RD 細胞のシングル細胞に由来する細胞クローンの *in vivo* における腫瘍形成能を、移植する細胞数ごとに調べた結果を示す表である。

図 10：（A）4T53RD 細胞及び（B）4T53RD ΔNp63 細胞由来の移植片切片の H&E 染色の結果を示す図である。

図 11： 4T53ED 細胞由来の移植片切片の(A)H&E 染色の結果、(B)Alcian Blue 染色の結果、(C)抗サイトケラチン染色（AE1/AE3）の結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

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 年 5 月 31 日に出版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

2010-125256 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、不死化細気道上皮細胞に、がん関連遺伝子を導入することにより、
5 腫瘍細胞を作製する方法を提供する。

好ましくは、本発明の方法は、前記不死化細気道上皮細胞が、正常細気道上皮細胞に以下の (1) ~ (3) の処理を施すことにより作製されたものであり、

(1) テロメラゼ逆転写酵素遺伝子の強制発現

(2) サイクリン依存性キナーゼ 4 遺伝子の強制発現

10 (3) p53 の機能喪失

前記がん関連遺伝子が、c-Myc遺伝子、v-Src遺伝子、KRAS変異遺伝子、BCL2遺伝子、PIK3CA変異遺伝子、Cyclin D1遺伝子、LKB1変異遺伝子、TP63遺伝子及びEGFR変異遺伝子から選択される1又は複数の遺伝子であることを特徴とする。

15

がん関連遺伝子

本発明の方法において使用する、「がん関連遺伝子」とは、正常細胞内で発現させた場合に、前記細胞を腫瘍化又はがん化させることが可能な遺伝子、あるいは正常細胞内で発現させた場合に、前記細胞を腫瘍化又はがん化させることが可能な遺伝子の発現制御に関連する遺伝子を意味する。がん関連遺伝子の具体例としては、
20 myelocytomatosis oncogene (c-Myc) 遺伝子、v-Src遺伝子、RAS遺伝子、B-cell leukemia/lymphoma 2 (BCL2) 遺伝子、phosphatidyl inositol 3-kinase catalytic subunit (PIK3CA) 遺伝子、Cyclin D1遺伝子、Liver Kinase B1 (LKB1) 遺伝子、c-Abl遺伝子、c-Sis 遺伝子、epidermal growth factor receptor (EGFR) 遺伝子、
25 platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) 遺伝子、vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) 遺伝子、HER2/neu遺伝子、Rafキナーゼ遺伝子、サイクリン依存性キナーゼ遺伝子、Tumor protein p63 (TP63) 遺伝子及びこれらの変異遺伝子等が挙げられる。

本発明においては、c-Myc 遺伝子、v-Src 遺伝子、RAS 遺伝子、BCL2 遺伝子、

PIK3CA 遺伝子、Cyclin D1 遺伝子、LKB1 遺伝子、EGFR 遺伝子、TP63 遺伝子並びにこれらの変異遺伝子及びスプライシングアイソフォームを好適に用いることができる。

本発明においては、がん関連遺伝子の種別は特に問わないが、好ましくは哺乳類のがん関連遺伝子であり、より好ましくは霊長類のがん関連遺伝子であり、さらに好ましくは、ヒトのがん関連遺伝子である。

「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、即ち転写因子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),
10 Nature, 448, 445-451)。

「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であり、その配列は Mayer BJ et al.(J Virol., (1986),60, (3), 858-67)に記載されている。

「RAS 遺伝子」は、細胞の分化及び増殖に関与するシグナルを伝達する低分子
15 GTP アーゼをコードする遺伝子であり、これらのシグナル伝達の異常により細胞ががん化することが知られている (Goodsell, D.S., (1999), Oncologist, 4, (3), 263-264)。また、非小細胞肺がんの 20-30%で RAS 遺伝子の変異が報告されている(Aviel-Ronenv, S. et al., (2006), Clin Lung Cancer, 1, 30-38)。本発明において、RAS 遺伝子は、好ましくは、KRAS 変異遺伝子である。本発明において、KRAS
20 変異遺伝子は、野生型 KRAS 遺伝子に変異した KRAS 遺伝子であり、例えば、12番目のグリシン残基がバリニン残基に置換した変異体 KRAS^{V12}(配列番号 6)をコードする遺伝子が挙げられる。KRAS^{V12}をコードする遺伝子の詳細については、Sato, M. et al. (Cancer Res. (2006),, 66, (4),2116-2128) に記載されている。

「BCL2 遺伝子」は、アポトーシス抑制活性を持つがん関連遺伝子であり、メラ
25 ノーマ、前立腺がん、乳がん及び肺がんとの関連性が示唆されている (Chao, D.T., Korsmeyer, S.J., (1998), Annu. Rev. Immunol, 16, 395-419)。

「PIK3CA遺伝子」は、クラスI型のPI 3-kinase catalytic subunitをコードする遺伝子であり、乳がん、大腸がん及び肺がんとの関連が報告されている ((Nature Reviews Cancer, (2005), 5, 921-929、Sci Transl Med, (2010), 2, 26-25)。また、

PIK3CA遺伝子は、子宮頸がんの発達においてがん関連遺伝子として機能することが示唆されている (Ma, Y.Y. et al., (2000), *Oncogene*, 19, (23), 2739-2744)。本発明において、PIK3CA遺伝子は、好ましくはPIK3CA変異遺伝子である。PIK3CA変異遺伝子は、野生型が変異したPIK3CA遺伝子であり、例えば、1047番目のヒスチジン残基がアルギニンで置換されたPIK3CA^{H1047R}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。

「Cyclin D1 遺伝子」は、細胞周期調節因子をコードする遺伝子であり、Cyclin D1 遺伝子の過剰発現は、副甲状腺腺腫、乳がん、前立腺がん、大腸がん、リンパ腫、メラノーマ及び肺がんの発達に関与している (Morgan, D.O., (2008), *Cell*, 135, 764-794, *Lung Cancer*, (2007), 55, 1-14)。

「LKB1 遺伝子」は、Liver Kinase B1 をコードする遺伝子であり、LKB1 遺伝子の変異と肺がん、子宮頸がん、乳がん、精巣がん、膵がん及び皮膚がんの発達との関連性が示唆されている (Katajisto, P. et al., (2007), *Biochem. Biophys. Acta*, 1775, (1), 63-75)。本発明においては、LKB1 遺伝子は、好ましくは LKB1 変異遺伝子である。LKB1 変異遺伝子は、野生型が変異した LKB1 遺伝子であり、例えば、LKB1 のドミナントネガティブ型変異体 (LKB1-DN) をコードする遺伝子を好適に使用することができる。ドミナントネガティブ型 LKB1 変異体の例としては、194 番目のアスパラギン酸がアラニンで置換された LKB1^{D194A}(配列番号 16) が挙げられる。

「EGFR 遺伝子」は、上皮成長因子受容体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。また、肺腺がんでは EGFR 遺伝子の変異が高率で見つかることも知られている。(Sharma SV et al., (2007), *Nat Rev Cancer*, 7, (3), 169-81)。本発明において、EGFR 遺伝子は、好ましくは、EGFR 変異遺伝子である。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残基で、858 番目のロイシン残基がアルギニン残基で置換された EGFR^{T790M L858R} 変異タンパク質 (配列番号 18) をコードする遺伝子が挙げられる。

「TP63遺伝子」は、 TP53がん抑制遺伝子の類縁遺伝子であるが、がんを抑制

する場合も促進する場合もあることが知られている。頭頸部、肺、食道など様々な臓器由来の扁平上皮がんでTP63遺伝子の発現上昇が報告されている。(Deyoung MP et al., (2007), *Oncogene*, 26, 5169-5183)。本発明においてTP63遺伝子は、好ましくはTP63のスプライシングアイソフォームをコードする遺伝子である。TP63
5 のスプライシングアイソフォームをコードする遺伝子として、例えば、N末端側のトランス活性化ドメインを欠損したTP63のスプライシングアイソフォーム（配列番号20）をコードするTP63^{ΔN}遺伝子が挙げられる。

ヒトのc-Myc、BCL2及びCyclin D1 遺伝子の各ヌクレオチド配列は、NCBIデータベースに下記のAccession Numberで登録されている。KRAS^{V12}、
10 PIK3CA^{H1047R}及びLKB1^{D194A}遺伝子の各ヌクレオチド配列の詳細は、NCBIデータベースに下記のAccession Numberで登録されている野生型の遺伝子配列並びにMcCoy, M. S. et al (*Mol. Cell. Biol.*, (1984), 4,1577-1582)、Samuels, Y et al (*Science*, (2004), 304, 554)、及びScott, K. D. et al (*Cancer Res*, (2007), 67, 5622-5627) を参照することができる。

15

表 1

遺伝子名	NCBI Accession No	Species	配列番号 (遺伝子)	配列番号 (タンパク質)
v-src 遺伝子	—	Rous sarcoma virus	1	2
c-Myc 遺伝子	V00568	Homo sapiens	3	4
KRAS 遺伝子	NM_004985	Homo sapiens	—	—
KRAS ^{V12} 遺伝子	—	Homo sapiens	5	6
BCL2 遺伝子	NM_000633	Homo sapiens	7	8
PIK3CA 遺伝子	NM_006218.2	Homo sapiens	—	—
PIK3CA 遺伝子	NM_174574.1	Bos taurus	—	—
PIK3CA ^{H1047R} 遺伝子	—	Homo sapiens	9	10
PIK3CA ^{H1047R} 遺伝子	—	Bos taurus	11	12
Cyclin D1 遺伝子	NM_053056.2	Homo sapiens	13	14
LKB1 遺伝子	NM_000455.4	Homo sapiens	—	—
LKB1 ^{D194A} 遺伝子	—	Homo sapiens	15	16
EGFR 遺伝子	NM_005228.3	Homo sapiens	—	—
EGFR ^{T790M L858R} 遺伝子	—	Homo sapiens	17	18
TP63 遺伝子	NM_003722.4	Homo sapiens	—	—
TP63 ^{ΔN} 遺伝子	NM_001114980.1	Homo sapiens	19	20

不死化細気道上皮細胞

本発明において、「不死化細気道上皮細胞」とは、細気道上皮細胞に由来する不死化細胞であれば特に限定されるものではないが、好ましくは、哺乳類の細気道上皮細胞に由来する細胞であり、より好ましくは、霊長類の細気道上皮細胞に由来する細胞であり、さらに好ましくは、ヒトの細気道上皮細胞に由来する不死化細胞である。これらの細気道上皮細胞に由来する不死化細胞のうち、さらに好ましくは、正常な細気道上皮細胞に由来する不死化細胞である。ここで、「正常」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を意味する。

不死化ヒト細気道上皮細胞

本発明において、「不死化ヒト細気道上皮細胞」とは、ヒトの細気道上皮細胞に由来する不死化細胞であれば特に限定されるものではないが、好ましくは、

5 正常ヒト細気道上皮細胞に由来する不死化細胞である。「正常ヒト細気道上皮細胞」とは、健常人のヒトの細気道上皮細胞などを意味するものであり、例えば、検出可能な疾患又は異常を有しない状態にあるヒトの細気道上皮細胞である。

上述の不死化細気道上皮細胞または不死化ヒト細気道上皮細胞は、正常な細気道上皮細胞または正常ヒト細気道上皮細胞に以下の (1) ~ (3) の処理のいずれか又はその組み合わせを施すことにより作製することができるが、処理 (1)

10 ~ (3) の全てを施すことが好ましい。なお、処理 (1) ~ (3) の処理の順番は特に問わない。

- (1) テロメラーゼ遺伝子の強制発現
- (2) サイクリン依存性キナーゼ遺伝子の強制発現
- 15 (3) アポトーシス誘導タンパク質の機能喪失

操作 (1) について：テロメラーゼは、真核生物の染色体末端の特異的反復配列を伸張させる酵素であり、テロメラーゼは、それぞれ異なる遺伝子座にコードされるテロメア逆転写酵素、テロメア RNA コンポーネント(TERC)、ジスケリン及び

20 テロメラーゼ関連タンパク質 1 (TEP1)等のサブユニットから構成される。操作 (1)において強制発現させるテロメラーゼ遺伝子としては、テロメア逆転写酵素、TERC、ジスケリン及び TEP1 をコードする各遺伝子が挙げられるが、本発明においては、特にテロメラーゼ逆転写酵素遺伝子（以下、TERT 遺伝子という）を好適に用いることができる。

25 操作 (2) について：サイクリン依存性キナーゼ (CDK) は、細胞周期の回転に関与し、そのファミリーは、CDK1~13 から構成される。操作 (2) において強制発現させるサイクリン依存性キナーゼ (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)。

操作 (3) について：アポトーシス誘導タンパク質の例としては、p53、カスパーゼ-3、-8~10、12等が挙げられる。操作 (3) において機能喪失させるタンパク質は、p53、カスパーゼ-3、-8~10、12のいずれのタンパク質であってもよいが、本発明においては、好ましくは、p53である。p53の機能を喪失させる方法としては、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をコードする遺伝子であるTP53遺伝子のノックアウト、RNA干渉によるノックダウン、ドミナントネガティブ型TP53遺伝子の強制発現等が挙げられる。

- 10 TP53遺伝子のRNA干渉によるノックダウンの報告例として、Sato M et al (Cancer Res, (2006),66, 2116-2128) が挙げられる。Sato M et alは、TP53遺伝子のRNA干渉によるノックダウンを行ってヒト気管上皮細胞を不死化させている。

- 15 なお、上記の処理 (1) ~ (3) において、強制発現する遺伝子および機能消失するタンパク質の種別は特に問わないが、好ましくは哺乳類の遺伝子またはタンパク質であり、より好ましくは霊長類の遺伝子またはタンパク質であり、さらに好ましくは、ヒトの遺伝子またはタンパク質である。

- 20 本発明において、特に好適に使用できる不死化細気道上皮細胞は、正常な細気道上皮細胞 (以下、SAE 細胞という) に、TERT 遺伝子(以下、TERT 遺伝子という)及び Cdk4 遺伝子を強制発現させ、かつ p53 の機能を損失させることにより不死化能を獲得した細胞である。より好適な例としては、SAE 細胞に、TERT 遺伝子、Cdk4 遺伝子、及びドミナントネガティブ型 TP53 遺伝子を導入して強制発現させることにより不死化能を獲得した細胞である。

- 25 さらに好適に使用できる不死化ヒト細気道上皮細胞は、正常なヒト細気道上皮細胞 (以下、HSAE 細胞という) に、hTERT 遺伝子及び Cdk4 遺伝子を強制発現させ、かつ p53 の機能を損失させることにより不死化能を獲得した細胞である。より好適な例としては、HSAE 細胞に、hTERT 遺伝子、Cdk4 遺伝子、及びドミナントネガティブ型 TP53 遺伝子を導入して強制発現させることにより不死化能を獲得した細胞 (以下、HSAE/4T53 細胞という) である。hTERT 遺伝子及び Cdk4 遺伝子及び TP53 遺伝子のヌクレオチド配列は、NCBI に以下の

Accession Number で登録されている。ドミナントネガティブ型 TP53 遺伝子のヌクレオチド配列は Shaulian, E. et al (Mol. Cell. Biol, (1992), 12, 5581) を参照することができる。

5 表 2

遺伝子名	NCBI Accession No	Species	配列番号 (遺伝子)	配列番号 (タンパク質)
hTERT 遺伝子	NM_198253.2	Homo sapiens	21	22
Cdk4 遺伝子	NM_000075.2	Homo sapiens	23	24
TP53 遺伝子	NM_000546.4	Homo sapiens	—	—
ドミナントネガティブ型 TP53 遺伝子	—	Homo sapiens	25	26

SAE 細胞は、哺乳類から採取したものを用いてもよく、あるいは市販の細胞 (CELLnTEC 社: Bern, Switzerland) を用いてもよい。

10 HSAE 細胞は、ヒトから採取したものを用いてもよく、あるいは市販の細胞 (Lonza 社 : Walkersville, MD, USA) を用いてもよい。

正常な細気道上皮細胞または正常なヒト細気道上皮細胞への遺伝子導入の方法は、以下で述べる不死化ヒト細気道上皮細胞への遺伝子導入の方法と同様である。

遺伝子導入方法

15 本発明において、がん関連遺伝子を不死化ヒト細気道上皮細胞に導入する場合、がん関連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、該ベクターで不死化ヒト細気道上皮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) 不死化ヒト細気道上皮細胞で転写可能なプロモーター ;
- 20 (ii) 該プロモーターに結合したがん関連遺伝子 ; 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

不死化ヒト細気道上皮細胞で転写可能なプロモーターの例としては、CMV、CAG、LTR、EF-1a、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、形質転換された不死化ヒト細
5 気道上皮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
10 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、これらに限定されない。

形質転換された不死化ヒト細気道上皮細胞は、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
15 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。

不死化ヒト細気道上皮細胞へのがん関連遺伝子の導入に使用可能な発現ベク
20 ターは、例えば細胞へ遺伝子導入可能な既存の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。発現ベクターの例として 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
25 イクロインジェクション、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、ウイルス感
染等、公知の遺伝子導入法により不死化ヒト細気道上皮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。

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する。腫瘍細胞の例としては、(1) 骨肉腫や軟部組織肉腫等の肉腫、(2) 乳がん腫、肺がん腫、膀胱がん腫、甲状腺がん腫、前立腺がん腫、結腸がん腫、結腸直腸がん腫、膵臓がん腫、胃がん腫、肝臓がん腫、子宮がん腫、子宮頸がん腫、卵巣がん腫等のがん腫、(3) ホジキンや非ホジキンリンパ腫等のリンパ腫、(4) 神経芽細胞腫、(5) メラノーマ、(6) ミエローマ、(7) ウィルムス腫瘍、(8) 急性骨髄性白血病 (AML)、慢性骨髄性白血病 (CML)、急性リンパ性白血病 (ALL) 及び慢性リンパ性白血病 (CLL) 等の白血病、(9) グリオーマ、(10) 網膜芽細胞腫等に含まれる細胞が挙げられる。

「腫瘍細胞」の例としては、分化の程度の観点から、分化型がん細胞及び未分化型がん細胞を挙げることできる。本発明のある実施態様では、腫瘍細胞の好ましい形態は、未分化型がん細胞及び分化型肺がん細胞が挙げられる。分化型肺がん細胞は、さらに低分化型肺がん細胞及び分化型肺がん細胞に分類することができる。低分化型肺がん細胞の例としては、大細胞がん様細胞が挙げられる。一方、分化型肺がん細胞の例としては、扁平上皮がん細胞及び腺がん細胞が挙げられる。

細胞の腫瘍化の確認は、不死化ヒト細気道上皮細胞または不死化ヒト細気道上皮細胞にがん関連遺伝子を導入して、前記細胞を数日培養した後に、前記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行うことができる。

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、ヌードマウス及びスキッ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。

細胞の腫瘍化を確認するための別の方法としては、がん関連遺伝子を導入した不死化ヒト細気道上皮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、不死化ヒト細気道上皮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である。ソフトアガーコロニー形成アッセイの詳細については、Tanaka, S. et al. (Proc. natl. Acad. Sci. USA, (1997), 94,2356-2361) を

参照できる。

腫瘍細胞の種類

- 5 本発明の方法では、導入するがん関連遺伝子の組み合わせにより、未分化型がん細胞、低分化型肺がん細胞又は分化型肺がん細胞のいずれかを選択的に作製することができる。

未分化型がん細胞

- 10 本発明の方法において、以下の (A) 又は (B) に示す遺伝子の組み合わせを不死化ヒト細気道上皮細胞に導入することにより、未分化型のがん細胞を作製することができる。

(A) c-Myc 遺伝子と v-Src 遺伝子

(B) c-Myc 遺伝子、KRAS 変異遺伝子および BCL2 遺伝子

- 15 本方法においては、c-Myc 遺伝子の代わりに N-Myc 遺伝子又は L-Myc 遺伝子を用いてもよく、KRAS 遺伝子の代わりに HRAS 遺伝子又は NRAS 遺伝子を用いてもよく、あるいは BCL2 遺伝子の代わりに BCL-X を用いてもよい。

- 20 上記の遺伝子の組み合わせにより作製された未分化型がん細胞（以下、「本発明の未分化型がん細胞」）は、免疫組織化学的分析において、大部分の細胞が、上皮細胞マーカーであるサイトケラチン（抗体のクローン名は AE1/AE3）について陰性または弱陽性であり、かつ間葉系マーカー（VIMENTIN）について陽性である（図 1C、図 5）。但し、AE1/AE3 で陽性かつ VIMENTIN で陰性の細胞が一部に含まれていてもよい（図 1C）。

また、本発明の未分化型がん細胞は、高い造腫瘍能を有することを特徴とする（図 2、図 4）。

- 25 上記(A)の遺伝子の組み合わせにより作製された未分化型がん細胞は、図 1B に示すように、NCI-H460 ヒト非小細胞肺癌細胞 (ATCC HTB-177) と比べて約 2 倍高い造腫瘍能を有し、免疫不全マウスの皮下に僅か 10 個の細胞を接種させた場合であっても腫瘍組織を形成することが可能である（図 2A）。この結果より、本発明の(A)の遺伝子の組み合わせにより作製された未分化型がん細胞は、非常に強い

tumor-initiating 能を有するという、がん幹細胞の特徴のひとつを有するものといえる。

上記(B)の遺伝子の組み合わせにより作製された未分化型がん細胞は、80%の高効率でヌードマウスに腫瘍を形成することが可能であり、高い腫瘍形成能を有している (図 4)。

低分化型肺がん細胞

本発明の方法において、以下の (C) に示す遺伝子の組み合わせを不死化ヒト細気道上皮細胞に導入し、c-Myc 遺伝子を誘導発現させることにより、低分化型の肺がん細胞を作製することができる。

(C) 誘導性 c-Myc 遺伝子と v-Src 遺伝子

ここで、「誘導性 c-Myc 遺伝子」とは、外的刺激により誘導発現が可能な c-Myc 遺伝子又はその発現系を意味する。「誘導性 c-Myc 遺伝子」は、前記「c-Myc 遺伝子」に含まれるものとする。また、「誘導発現」とは、発現誘導系により遺伝子発現を制御することを意味する。誘導発現は、(C) に示す遺伝子を不死化ヒト細気道上皮細胞に導入した後から開始すればよいが、好ましくは、不死化ヒト細気道上皮細胞に導入した後から腫瘍形成が確認されるまでの期間で行われる。

発現誘導系は、目的遺伝子 (c-Myc 遺伝子) の発現を人為的に制御できるものであれば特に限定されないが、具体例としては、デキサメタゾン及び mouse mammary tumor virus (MMTV) プロモーターを用いた発現誘導系、テトラサイクリン又はドキシサイクリン等及びテトラサイクリン応答性プロモーターを用いた発現誘導系 (Tet-on システム)、ニッケル、コバルト、マンガン、鉄等の金属イオンとメタロチオネインプロモーターを用いた発現誘導系、並びにヒートショックプロテインプロモーターを用いた発現誘導系が挙げられる。

c-Myc 遺伝子を強制発現させ、腫瘍形成が確認された時点で、c-Myc 遺伝子の発現を抑制する系 (例えば、Tet-off システム) 又は c-Myc タンパク質を分解する系 (Auxin-based degron system: Nishimura, K. et al., Nature Methods, vol.6, No.12, December (2009)) を用いて、c-Myc の機能を破壊してもよい。好

適には、Tet-on システムを用いることができ、感度の観点からドキシサイクリンを添加することが好ましい。

なお、本方法においては、c-Myc 遺伝子の代わりに N-Myc 遺伝子又は L-Myc 遺伝子を用いてもよい。

- 5 上記の遺伝子の組み合わせにより作製された低分化型の肺がん細胞（以下、「本発明の低分化型の肺がん細胞」）は、上皮細胞マーカーであるサイトケラチン（抗体のクローン名は AE1/AE3）が陽性であり、大細胞癌様の形態学的特徴を示す（図 3C）。

10 分化型肺がん細胞

本発明の方法において、以下の (D) ～ (H) のいずれかに示す遺伝子の組み合わせを不死化ヒト細気道上皮細胞に導入することにより、分化型肺がん細胞を作製することができる。

(D) KRAS 変異遺伝子と PIK3CA 変異遺伝子

- 15 (E) KRAS 変異遺伝子と Cyclin D1 遺伝子

(F) KRAS 変異遺伝子と LKB1 変異遺伝子

(G) KRAS 変異遺伝子、Cyclin D1 遺伝子および TP63 遺伝子

(H) Cyclin D1 遺伝子と EGFR 変異遺伝子

- 20 本方法においては、KRAS 遺伝子の代わりに HRAS 遺伝子又は NRAS 遺伝子を用いてもよく、あるいは Cyclin D1 遺伝子の代わりに Cyclin D2 遺伝子又は Cyclin D3 遺伝子を用いてもよい。

上記の遺伝子の組み合わせにより作製された分化型肺がん細胞（以下、「本発明の分化型肺がん細胞」）は、いずれも非常に高い造腫瘍能を有することを特徴とする（図 4）。

25

本発明の分化型肺がん細胞のうち、(D) 又は (H) の組み合わせで作製された細胞は、扁平上皮様細胞及び腺がん様細胞が混在した形態を示し、一方、(E) 又は (F) の組み合わせで作製された分化型肺がん細胞は、それぞれ腺がん様細胞の形態を示す。(G) の組み合わせで作製された細胞は、扁平上皮様細胞の形態を示す。

す。

また、免疫組織化学的分析において、(D)、(E) 又は (F) のいずれの組み合わせで作製された分化型肺がん細胞も、AE1/AE3 及び p63 について陽性である (図 6)。また、(H) の組み合わせで作製された分化型肺がん細胞は、AE1/AE3 について陽性であり (図 11C)、かつ Alcian Blue 染色で陽性である (図 11B)。

本発明の腫瘍細胞は、いずれも腫瘍発生率及び増殖能が高く、モデル動物に移植して腫瘍形成させた場合、がん関連遺伝子を導入する前の細気道上皮細胞が属する動物種で形成される腫瘍組織と病理学的に酷似した腫瘍を形成する。たとえばヒトの細気道上皮細胞を用いた場合にはがん患者から採取されたがん組織、特に、肺がん組織と病理学的に酷似した腫瘍を形成する。従って、本発明の腫瘍細胞は、肺がん細胞のリプログラミング、分化、生物学的機構の研究、肺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といった多種多様な肺がん研究に非常に有用である。

15

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、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、ヌードマウス及びスキッ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

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。また、移植の際に使用する腫瘍細胞はモデル動物に移植した際に腫瘍塊を形成させる限り、モデル動物と同じ種であってもよいし、異なる種であってもよい。

5 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

本発明は、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) 本発明の腫瘍細胞に由来するサンプルと候補物質とを接触させる工程
- 10 (b) 腫瘍細胞の増殖阻害効果を検出する工程

「腫瘍細胞に由来するサンプル」とは、腫瘍細胞または腫瘍組織あるいはこれらをスクリーニング方法の工程で使用しやすいように適宜調整したサンプルを意味する。

- 15 「腫瘍細胞に由来するサンプル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、培養細胞である場合、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、
- 20 腫瘍細胞が動物体内に移植されている場合、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、
- 25 好ましくは経口投与、腹腔内注射及び静脈内注射である。

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を潜在的に有する化合物、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、
- 5 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
- 10 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
- 15 C、ドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン)、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、ビンクリスチン、ビンデシン)、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、ゲフィチニブ、ボルテ
- 20 ズミブ、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、アロマトラー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
- 25 ッシュ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移植モデル動物を 2 系用意し、一方の系 (サンプル) 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。

本発明の腫瘍細胞を培養細胞の形態でスクリーニングに用いる場合、上記サンプル細胞に候補物質を接触させた後に、サンプ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
5 確認することができる。

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、サンプル系のモデル動物に候補物質を投与した後に、サンプ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、該サンプル系及びコントロール系の腫瘍組織に
10 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。腫瘍の体積は、以下の式により求めることができる。

15

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

あるいは、サンプ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。
20

モデル動物は、項目「2.腫瘍細胞」で述べたモデル動物と同様である。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。

25

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。

- 腫瘍の増加率の平均値、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加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。

10

本発明の腫瘍細胞は、患者から採取された肺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加抑制効果が確認された抗腫瘍剤は、実際にがん患者、特に肺がん患者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。

[実施例]

以下に、本実施例で行った実験の手順を記載する。

20

レトロウィルスベクター及びレトロウィルス媒介性遺伝子導入

- 表 1 に示した遺伝子のうち、v-*Src*(配列番号 1)、*KRAS*^{V12} (配列番号 5) に関しては、pCX4pur ベクター (GenBank#: AB086386) に組み込んだ。c-*Myc* (配列番号 3)、*PIK3CA*^{H1047R} (配列番号 11)、*Cyclin D1* (配列番号 13) 及び *LKB1*^{D194A} (配列番号 15) は、pCX4bleo ベクター (GenBank#: AB086388) に組み込んだ。BCL2 (配列番号 7) は、pCX4redEx ベクター (GenBank#: AB296084) に組み込んだ。EGFR^{T790M L858R} 遺伝子 (配列番号 17) は、pCX4pur ベクター (GenBank Accession No. AB086386) に組み込んだ。TP63^{ΔN} 遺伝子 (配列番号 19) は、pCX4hyg ベクター (GenBank Accession No. AB086387) に組み込んだ。表 2 に

示した遺伝子のうち、hTERT（配列番号 21）は pCX4neo ベクター（GenBank#: AB086385）に組み込んだ。CDK4（配列番号 23）は pCX4bsr ベクター（GenBank#: AB086384）に組み込んだ。ドミナントネガティブ TP53（配列番号 25）は pCX4.1hisD ベクター（GenBank#: AB086389）に組み込んだ。また、誘導性 c-Myc

5 遺伝子用に、テトラサイクリンによって発現を制御可能な pT-REx 誘導発現ベクター（Invitrogen 社）に c-Myc 遺伝子を組み込んだ誘導発現ベクターも調製した。上記のレトロウイルス発現用のベクター並びに pGP および pE-eco プラスミド（Takara Bio 社、Shiga, Japan）を 293T 細胞（ATCC, Manassas, USA）に導入することで、ウイルスを作製した。その後、Ecotropic receptor (Eco VR) を

10 発現させた HSAE 細胞にレトロウイルスを感染させた。上記ウィルスベクターに感染した細胞は、blasticidin S、G418、puromycin、zeocine、L-Histidinol の存在下で 2 週間培養することによりセクションを行った。いずれの薬剤でセ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。

15

細胞培養

19 歳の白人女性に由来する正常ヒト細気道上皮細胞を Lonza 社（Walkersville, MD, USA）から購入した。これらの細胞を、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 SAGM

20 medium（SAGM 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% O₂ 及び 5% CO₂）で 37°C にて維持した。

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、各がん関連遺伝子が

25 導入された 1×10^6 個の HSAE/4T53 細胞または HSAE 細胞を含む細胞懸濁液（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（チャールズリバー社）のわき腹に皮下注射した。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。

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

- 5 また、各がん関連遺伝子が導入された HSAE/4T53 細胞または HSAE 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発生率として算出し、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

- 10 異種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 : multi-cytokeratins (AE1/AE3; Dako, Glostrup, Denmark)、p63 (4A4; Dako)、TTF-1 (8G7G3/1; Dako)、p53 (DO7; Novocastra)、VIMENTIN (V9; Nichirei, Tokyo, Japan)。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 μm 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
- 15 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
- 20 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。

Alcian Blue 染色は、異種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、当該切片に対して、先の文献 (Steedman, H.F., Quarterly Journal of Microscopic Science, Vol 91, p477-479 (1950)) の記載に従い、行った。

イムノブロット法

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
5 陽性タンパク質のシグナルは、SuperSignal WestFemto reagent (Pierce, Rockford, IL, USA) を用いてケミルミネセンスにより可視化した。抗 c-Myc モノクローナル抗体は、Invitrogen 社(Carlsbad, CA, USA) より入手した。

限界希釈法によるクローニング

10 シングル細胞由来の細胞クローンの調製は、先の文献 (Quintana E et al., Nature. 2008 Dec 4;456(7222):593-8) の記載に従って行った。

実験結果

[1] v-Src 遺伝子及び c-Myc 遺伝子の導入によるがん細胞の作製

15 HSAE/4T53 細胞に c-Myc 遺伝子と v-Src 遺伝子を導入して作製した 4T53MS 細胞を 1×10^6 個ずつ胸腺欠損ヌードマウス (BALB/c nu/nu; Japan SLC, Hamamatsu, Japan) に皮下移植し、形成された腫瘍組織について異種移植片増殖実験、組織学的分析及び免疫組織化学染色を行った。4T53MS 細胞が移植されたマウスでは、腫瘍塊の形成が認められた (図 1A)。4T53MS 細胞は、非常に高
20 い造腫瘍能を有していた。造腫瘍能が高いことで知られている NCI-H460 肺がん細胞と比較しても、約 2 倍高い造腫瘍能を有していた (図 1B)。また、この腫瘍塊を取り出して、組織切片を調製し、ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色を行ったところ、分化度の非常に低く、分化形態を示さない癌組織像が示された。また、免疫染色の結果も、肺の上皮マーカーである p63 染色陰性であり、上皮細胞マ
25 カーであるサイトケラチン (抗体のクローン名は AE1/AE3) 染色でも陰性であった。一方で、間葉系細胞のマーカーである VIMENTIN は強陽性であった。以上より、4T53MS 細胞由来の腫瘍は未分化癌の性質を呈すると結論づけた (図 1C)。なお、v-Src または c-Myc の一方のみを HSAE/4T53 細胞に遺伝子導入して得られた細胞 (それぞれ 4T53S および 4T53M 細胞という) では、造腫瘍能が認められ

なかった。

上記、4T53MS 細胞は、造腫瘍能が非常に強く、それぞれ 1×10^6 , 1×10^4 , 1×10^3 または 1×10^2 個の皮下移植によっても、100%の確率で NOD-SCID において腫瘍形成が認められた (図 2A)。更に、僅か 10 個の細胞移植によっても、50%の確率
5 で腫瘍形成が可能であることが分かった (図 2A、図 2B)。よって、4T53MS 細胞は、非常に高い造腫瘍能及び複数の系統の腫瘍細胞に分化するという特徴を有することから、癌幹細胞が有する特徴を持っていることが示された。

誘導性 c-Myc 遺伝子と v-Src 遺伝子 を HSAE/4T53 細胞に導入して作製した 4T53mS 細胞をドキシサイクリン (DOX) 処理することによって、in vitro の実験系で c-Myc 発現を誘導した (図 3A)。DOX 存在下で培養した 4T53mS 細胞をヌードマウスの皮下に移植し、DOX を投与し続け、腫瘍形成が見られた時点で、DOX 投与を停止した (図 3B)。(C)得られた腫瘍組織をサイトケラチンで染色すると、強陽性の腫瘍細胞と、陰性の間質細胞とに明瞭に区別された。しかしながら、腺癌・扁平上皮癌などにみられる特徴的な像は示さず、低分化型の大細胞癌様の腫瘍
15 瘍であることが判明した (図 3C)。

[2] ヒト由来遺伝子の導入によるがん細胞の作製

c-Myc 及び KRAS^{V12} の両方を遺伝子導入して得られた 4T53RM 細胞を胸腺欠損ヌードマウス (BALB/c nu/nu; Japan SLC, Hamamatsu, Japan) に皮下移植し、形成された腫瘍組織について異種移植片増殖実験、組織学的分析及び免疫組織化学染色を行った。4T53RM 細胞は、造腫瘍能を有していた。ただし、腫瘍発生率は 38% であった (図 4)。この 4T53RM 細胞に、BCL2 を導入した 4T53RMB 細胞を胸腺欠損ヌードマウス (BALB/c nu/nu; Japan SLC, Hamamatsu, Japan) に皮下移植し、形成された腫瘍組織について異種移植片増殖実験、組織学的分析及び免疫組織化学染色を行った。4T53RMB 細胞は、80% の高効率でヌードマウスに腫瘍を形成するようになった。
25

組織学的検査では、4T53RM細胞由来及び4T53RMB細胞由来の腫瘍の両者において、扁平上皮がん又は腺がん等の特徴を示さない組織像が観察された。これらの腫瘍は、免疫染色の結果、サイトケラチンについては弱い陽性反応しか示さなかつ

たが (AE1/AE3 : 図5)、VIMENTINについては強い陽性反応を示したことから、未分化癌と診断された。

HSAE/4T53細胞にKRAS^{V12}遺伝子を導入して4T53R 細胞を作製し、4T53R 細胞に、PIK3CA^{H1047R}、Cyclin-D1、LKB1^{D194A}のいずれかの遺伝子導入し、それぞれ4T53RP、4T53RD、4T53RL細胞を樹立した。胸腺欠損ヌードマウス (BALB/c nu/nu; Japan SLC, Hamamatsu, Japan) に4T53R、4T53RP、4T53RD、4T53RL細胞を皮下移植し、形成された腫瘍組織について異種移植片増殖実験、組織学的分析及び免疫組織化学染色を行ったところ、4T53R細胞では造腫瘍能は見られなかったが、4T53RP、4T53RD、4T53RL細胞では高い腫瘍発生率が観察された（それぞれ100%、100%、83% : 図4）。

4T53RP、4T53RD又は4T53RL細胞由来の腫瘍（異種移植片）の組織学的解析を行ったところ、実際のヒト肺がん組織に類似した組織像を示すことが判明した。4T53RP由来腫瘍では、腺がん様領域と扁平上皮癌様領域の両方を含む組織像が観察された（図6 : H&E）。一方、4T53RD及び4T53RL由来の腫瘍（異種移植片）は、環形成が認められ、腫瘍間質を豊富に含むことから、ヒト肺腺癌に類似した形態を有することが判明した（図6 : H&E）。いずれの腫瘍組織とも、上皮細胞マーカーであるサイトケラチン強陽性の細胞から構成されていた（図6:AE1/AE3）。また、肺上皮細胞のマーカーであるp63染色も陽性であった（図6:p63）。これらのマーカー発現は、4T53RP、4T53RD、4T53RL細胞由来の腫瘍がヒト肺腺癌に類似した分化型腫瘍であることを示している。なお、4T53RP細胞由来腫瘍については、扁平上皮癌様の領域をも含むことから、ヒト肺腺癌および扁平上皮癌の混在型 (adenosquamous cell carcinoma)であるものと診断された。

[3] 肺腺癌の癌幹細胞の性質を持った細胞の作製

KRAS^{V12} 及び CyclinD1 の両方の遺伝子を HSAE/4T53 細胞に導入して作製した 4T53RD 細胞由来の癌組織は、肺腺がんに類似したヘテロな細胞集団から成る腺構造を形成するが、このことは 4T53RD 細胞が複数の種類の細胞に分化する能力がある幹細胞の性質を持っている可能性を示唆している。

この可能性を証明する目的で、4T53RD 細胞を限界希釈法によってクローニン

グし、シングル細胞由来の細胞クローンを複数得た。この細胞クローンを
NOD-SCID マウスに皮下移植し、形成された腫瘍組織について異種移植片増殖実
験、組織学的分析及び免疫組織化学染色を行ったところ、シングル細胞由来の
4T53RD 細胞クローンも、腫瘍塊を形成し、親株の 4T53RD 細胞と同様にヒト肺
5 腺癌に類似した形態の腫瘍を形成した (図 8A)。

マウスの気道上皮は、図 8B に示すように p63 を発現する基底細胞、TTF1 を発
現するクララ細胞、粘液を産生するゴブレット細胞、繊毛細胞など複数の細胞集団
から構成されている。

シングル細胞由来の 4T53RD 細胞クローンが移植されて形成された腫瘍組織は
10 免疫組織化学染色の結果、マウス由来の基質と接している辺縁部には p63 陽性の
基底細胞が存在するが、その内側で腺構造を形成している部分は p63 が陰性で、
クララ細胞で発現する TTF1 陽性細胞や、alcian blue で染色される粘液を産生す
る細胞が存在していた (図 8A)。最近、Rock JR. et al. (Proc Natl Acad Sci U S A.
2009 Aug 4;106(31):12771-5) により p63 陽性の基底細胞が気管支において幹細胞
15 として機能することが示されたことを考慮すると、この結果は、シングル細胞由
来の 4T53RD 細胞クローンによってできた腫瘍では、p63 陽性の細胞が内側に向
かって増殖しながらクララ細胞や粘液を分泌する腺細胞に分化してヘテロな細胞
集団から成る癌組織を形成したと考えられる。

また、4T53RD 細胞クローンは、強い造腫瘍能を有しており、 1×10^4 、 1×10^3 、
20 1×10^2 、 1×10^1 個の細胞の皮下移植によって、それぞれ、100、80、60、13%の確
立で NOD-SCID マウスにおいて腫瘍形成が認められた (図 9)。

これらの結果より、4T53RD 細胞は、① 1 つ細胞から in vivo で腫瘍を形成する
過程において複数種類の細胞へと分化していく能力を有するとともに、②少ない細
胞数でも腫瘍を形成することができる。という癌幹細胞がもつ 2 つの性質をそなえ
25 ていることが示された。

[4] 肺扁平上皮癌の性質を持った細胞の作製

KRAS^{V12}、Cyclin D1及びTP63^{ΔN}の遺伝子をHSAE/4T53 細胞に導入して作製
した4T53RDΔNp63細胞を胸腺欠損ヌードマウス (BALB/c nu/nu; Japan SLC,

Hamamatsu, Japan) に皮下移植し、形成された腫瘍組織について組織学的分析及び免疫組織化学染色を行った。

- 5 KRAS^{V12}及びCyclin D1の両遺伝子をHSAE/4T53 細胞に導入して作製した4T53RD細胞は、ヒト肺腺癌に類似した形態の腫瘍を形成する(図10A)のに対し、KRAS^{V12}及びCyclin D1に加えてさらにTP63^{ΔN}遺伝子を導入して作製した細胞は、組織学的解析により、扁平上皮癌様の腫瘍組織 (Squamous cell carcinoma) を形成することが示された(図10B)。

[5] EGFR変異遺伝子とCyclin D1による分化型肺がん細胞の作製

- 10 EGFR^{T790M L858R}及びCyclin D1の両遺伝子をHSAE/4T53 細胞に導入して作製した4T53 ED細胞を胸腺欠損ヌードマウス (BALB/c nu/nu; Japan SLC, Hamamatsu, Japan) に皮下移植し、形成された腫瘍組織について異種移植片増殖実験、組織学的分析及び免疫組織化学染色を行った。

- 15 4T53 ED 細胞は、100%の腫瘍発生率を示し (図 4)、高い造腫瘍能を有することが判明した。また、4T53 ED 細胞由来の腫瘍組織は、扁平上皮様細胞が主要で、一部、腺がん様細胞が混在した形態の特殊なタイプの分化型の腫瘍組織を形成した。(図 11A～図 11C)。

- 20 以上の結果が示すように、不死化ヒト細気道上皮細胞 (HSAE/4T53 細胞) に、がん関連遺伝子を導入することにより、腫瘍細胞の分化の程度を調節することが可能である。すなわち、図 7 に示すとおり、「c-Myc 遺伝子と v-Src 遺伝子 (4T53MS 細胞)」または「c-Myc 遺伝子、KRAS 変異遺伝子および BCL2 遺伝子 (4T53RMB 細胞)」の組み合わせで遺伝子を導入することにより未分化癌モデルを作製することが可能である。また、「誘導性 c-Myc 遺伝子と v-Src 遺伝子 (4T53mS 細胞)」の組み合わせで遺伝子を導入し、c-Myc 遺伝子を誘導発現させることにより、ヒト肺大細胞癌に類似する低分化型の肺癌モデルを樹立することが可能である。さらに、「KRAS 変異遺伝子と PIK3CA 変異遺伝子 (4T53RP 細胞)」、「KRAS 変異遺伝子と Cyclin D1 遺伝子 (4T53RD 細胞)」、「KRAS 変異遺伝子と LKB1 変異遺伝子 (4T53RL 細胞)」、「KRAS 変異遺伝子、Cyclin D1 遺伝子および TP63 遺伝子 (4T53RDΔNp63 細胞)」又は「EGFR 変

異遺伝子と Cyclin D1 遺伝子 (4T53ED 細胞)」のいずれかの組み合わせで遺伝子を導入することにより、腺癌若しくは扁平上皮癌（又はその混合型）に類似したヒト肺癌モデルを作製可能である。

5 産業上の利用可能性

本発明により、ヒトの肺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。このような腫瘍細胞は、肺がんの生物学的機構の研究、肺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。特にヒト由来がん関連遺伝子のみを導入することによって作製された腫瘍細胞は、細胞の特性を忠実に表現した細胞であり、抗がん剤等の開発に非常に有効であると期待される。

10

配列表

請求の範囲

1. 不死化細気道上皮細胞に、がん関連遺伝子を導入することにより、腫瘍細胞を作製する方法であって、
 - 5 前記不死化細気道上皮細胞が、正常細気道上皮細胞に以下の(1)～(3)の処理を施すことにより作製されたものであり、
 - (1) テロメア逆転写酵素遺伝子の強制発現
 - (2) サイクリン依存性キナーゼ4遺伝子の強制発現
 - (3) p53の機能喪失
 - 10 前記がん関連遺伝子が、c-Myc遺伝子、v-Src遺伝子、KRAS変異遺伝子、BCL2遺伝子、PIK3CA変異遺伝子、Cyclin D1遺伝子、LKB1変異遺伝子、TP63遺伝子及びEGFR変異遺伝子から選択される1又は複数の遺伝子である、前記方法。
2. 前記がん関連遺伝子が、c-Myc 遺伝子と v-Src 遺伝子との組み合わせである、請求項1に記載の方法。- 15 3. 前記がん関連遺伝子が、c-Myc遺伝子とKRAS変異遺伝子とBCL2遺伝子との組み合わせである、請求項1に記載の方法。
- 4. 前記腫瘍細胞が、未分化型がん細胞である、請求項2または3に記載の方法。
- 20 5. 前記腫瘍細胞が、がん幹細胞である、請求項4に記載の方法。
- 6. 前記がん関連遺伝子が、c-Myc遺伝子とv-Src遺伝子であり、前記c-Myc遺伝子が前記不死化ヒト細気道上皮細胞内で誘導発現される、請求項1に記載の方法。
- 7. 前記腫瘍細胞が、低分化型肺がん細胞である、請求項6に記載の方法。
- 25 8. 前記がん関連遺伝子が、KRAS変異遺伝子と、PIK3CA変異遺伝子、Cyclin D1遺伝子又はLKB1変異遺伝子から選ばれるいずれか1つの遺伝子との組み合わせである、請求項1に記載の方法。
- 9. 前記がん関連遺伝子が、KRAS変異遺伝子とCyclin D1遺伝子との組み合わせである、請求項8に記載の方法。

10. 前記がん関連遺伝子が、KRAS変異遺伝子とCyclin D1遺伝子とTP63遺伝子との組み合わせである、請求項8に記載の方法。
11. 前記がん関連遺伝子が、KRAS変異遺伝子とPIK3CA変異遺伝子との組み合わせである、請求項8に記載の方法。
- 5 12. 前記がん関連遺伝子が、KRAS変異遺伝子とLKB1変異遺伝子との組み合わせである、請求項8に記載の方法。
13. 前記がん関連遺伝子が、EGFR変異遺伝子とCyclin D1遺伝子との組み合わせである、請求項1に記載の方法。
14. 前記腫瘍細胞が、分化型肺がん細胞である、請求項8～13に記載の方法
- 10 。
15. 前記腫瘍細胞が、分化型肺がんのがん幹細胞である請求項9に記載の方法。
16. 不死化細気道上皮細胞が哺乳類または霊長類の細胞である、請求項8～15に記載の方法。
- 15 17. 請求項1～16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。
18. 請求項17に記載の腫瘍細胞が移植された担癌モデル動物。
19. 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17に記載の腫瘍細胞に由来するサンプルと候補物質とを接触させる工程
- 20 (b) 腫瘍細胞の増殖阻害効果を検出する工程