

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7125347号
(P7125347)

(45)発行日 令和4年8月24日(2022.8.24)

(24)登録日 令和4年8月16日(2022.8.16)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12
A 0 1 K	67/027 (2006.01)	A 0 1 K	67/027
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50
		Z N A	
		Z	
		Z	
		請求項の数 15 (全57頁) 最終頁に続く	
(21)出願番号	特願2018-535662(P2018-535662)	(73)特許権者	000003311
(86)(22)出願日	平成29年8月21日(2017.8.21)		中外製薬株式会社
(86)国際出願番号	PCT/JP2017/029766		東京都北区浮間5丁目5番1号
(87)国際公開番号	WO2018/038046	(74)代理人	100102118
(87)国際公開日	平成30年3月1日(2018.3.1)		弁理士 春名 雅夫
審査請求日	令和2年8月3日(2020.8.3)	(74)代理人	100102978
(31)優先権主張番号	特願2016-161777(P2016-161777)		弁理士 清水 初志
(32)優先日	平成28年8月22日(2016.8.22)	(74)代理人	100160923
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		弁理士 山口 裕孝
前置審査		(74)代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74)代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一
		(74)代理人	100148699
			弁理士 佐藤 利光
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ヒトGPC3ポリペプチドを発現する遺伝子改変非ヒト動物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

内因性GPC3ポリペプチドの発現を欠損し、ヒトGPC3ポリペプチドを発現する遺伝子改変非ヒト動物であって、前記非ヒト動物の肺における上記ヒトGPC3ポリペプチドをコードするmRNAの発現量が、ヒト肺におけるヒトGPC3ポリペプチドをコードするmRNAの発現量を100とした場合に50-150%である、遺伝子改変非ヒト動物。

【請求項2】

遺伝子改変非ヒト動物の肺におけるトータルRNA中のヒトGPC3のmRNAのコピー数が、野生型非ヒト動物の肺におけるトータルRNA中の該非ヒト動物GPC3のmRNAのコピー数を100とした場合に50-150%である、請求項1に記載の遺伝子改変非ヒト動物。

【請求項3】

遺伝子改変非ヒト動物の肺におけるトータルRNA中の前記ヒトGPC3のmRNAのコピー数が、野生型サルの肺におけるトータルRNA中のサルGPC3のmRNAのコピー数、およびヒトの肺におけるトータルRNA中のヒトGPC3のmRNAのコピー数のいずれか、または両方を100とした場合に50-150%である、請求項1から2のいずれかに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

【請求項4】

ヒトGPC3ポリペプチドまたはその断片に対して免疫寛容を示す、請求項1から3のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

【請求項 5】

前記非ヒト動物が非ヒト哺乳動物、好ましくはげっ歯類である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

【請求項 6】

前記非ヒト動物がマウスである、請求項 1 から 5 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変非ヒト動物から単離された組織または細胞。

【請求項 8】

前記非ヒト動物が、ヒト G P C 3 ポリペプチドを発現するがん組織またはがん細胞を含む、請求項 1 から 6 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

【請求項 9】

がんの治療薬のスクリーニングに使用するための、請求項 8 に記載の遺伝子改変非ヒト動物。

【請求項 10】

5'側にエクソン・イントロン構造を含む塩基配列が付加され、かつ、3'側に非ヒト動物の G P C 3 遺伝子の 3'非翻訳領域が付加されたヒト G P C 3 遺伝子をコードする D N A を含む、D N A 構築物。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の D N A 構築物を保持するノックインベクター。

【請求項 12】

ヒト G P C 3 遺伝子をコードする D N A を保持するノックインベクターを宿主細胞に導入する工程を含むヒト G P C 3 ポリペプチドを発現する非ヒト動物の作製方法であって、前記ノックインベクターが請求項 11 に記載のノックインベクターである方法。

【請求項 13】

以下の工程；

(1) ヒト G P C 3 ポリペプチドに結合する抗原結合分子を、請求項 1 から 6、8、および 9 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変非ヒト動物に投与する工程

(2) 前記抗原結合分子を投与した遺伝子改変非ヒト動物における、がん細胞増殖抑制効果、安全性、薬物動態および生体内分布特性からなる群から選択される少なくとも 1 つの評価指標を測定する工程、および

(4) 工程 (3) で測定した評価指標が、対照の評価指標と比較して優れた抗原結合分子を選抜する工程、

を含む、がんの治療薬のスクリーニング方法。

【請求項 14】

前記抗原結合分子が抗体である、請求項 13 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 15】

非ヒト動物の内因性 G P C 3 遺伝子の同一読み取り枠に挿入された、5'側にエクソン・イントロン構造を含む塩基配列が付加され、かつ、3'側に該非ヒト動物の G P C 3 遺伝子の 3'非翻訳領域が付加されたヒト G P C 3 遺伝子をコードする D N A を含む、遺伝子改変非ヒト動物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト GPC3 ポリペプチドを発現する遺伝子改変非ヒト動物、及びヒト GPC3 ポリペプチドを発現する遺伝子改変非ヒト動物を用いた化合物の評価方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、抗体医薬など、分子標的に対する特異性の高い治療薬の開発が数多くなされてお

10

20

30

40

50

り、その前臨床評価をより適切に行うためにヒト化マウスなどのヒト化非ヒト動物の要望が高まっている。ヒト化マウスを作成する手法としては、マウス遺伝子をヒト遺伝子に置換するジーンターゲティング法がある。これまでに、ヒトのゲノム遺伝子をマウスホモログ遺伝子と置き換える方法が報告されているが、置き換えられたヒト遺伝子の発現量がマウスホモログ遺伝子の発現量と比べ低く、発現を制御する事が困難である（非特許文献1）。全長のヒト遺伝子のコード配列を標的のマウス遺伝子に挿入する場合には、転写されたmRNAにおいては、マウス遺伝子の終止コドンの遥かに上流に、挿入したヒト遺伝子の終止コドン（premature termination codon, PTC）が存在し、かつ、この終止コドンの下流にマウス遺伝子に由来するエクソン・エクソン結合部が存在するという構造となる。この構造が、ナンセンス変異依存mRNA分解機構（NMD機構）により認識されてmRNAが分解を受けるため、目的の遺伝子発現量が得られないことが多い。その対策として、例えば、任意の外来遺伝子をコードするDNAの3'側にhp7と呼ばれる配列を挿入する事により、NMD機構による当該外来遺伝子のmRNAの分解を回避し、マウスにおいて当該外来遺伝子を安定して発現される方法が報告されている（特許文献1）。Hp7の他に、NMDを回避する手段としては、任意の外来遺伝子のcDNA配列の直下にポリA付加シグナルを付加してマウスに挿入することが行われている。これにより、転写されるmRNAにおいて、PTCの下流に標的遺伝子由来のエクソン・エクソン結合部が生じない構造となるため、NMDは生じない。その他に、mRNAの安定性に関与するものとして3'非翻訳領域（3' untranslated region, 3' UTR）やスプライシング機構が挙げられる。3' UTRに存在するポリA付加シグナルがmRNAの安定性に寄与する事（非特許文献2）やadenine/uridine-rich elements（非特許文献3）やGU-rich elements（非特許文献4）の存在がタンパクの翻訳調整に寄与している事が報告されている。また、イントロンが存在しない遺伝子、つまり、スプライスアウトを経験しないmRNAの発現量は低下することが報告されている（非特許文献5）。一方で、エクソン・イントロン構造を有していても、遺伝子の長さが数十キロベースと短い場合、そのゲノム領域と挿入したいゲノム領域を置換する事は可能である。しかし、遺伝子の長さが数百キロベースを超えている場合、その領域での置換は困難である（非特許文献5）。このように、非ヒト動物内因性の遺伝子発現を抑え、かつ生理的に妥当なレベルで外来遺伝子を発現させることができる非ヒト動物の作成として汎用性のある方法は存在していない。

【0003】

このような状況において、非ヒト動物の内因性GPC3ポリペプチドの発現を欠損し、かつ生理的に妥当なレベルでヒトGPC3ポリペプチドを発現させることができる非ヒト動物は未だ存在せず、またその作製方法もまた不明であった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【文献】Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2011、Feb 8;108(6):2390-2395.

Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2008、40(11):2384-2396.

J. Cell. Biol. 2008. Apr 21;181(2):189-194.

RNA. Biol. 2008.Oct-Dec;5(4):201-207

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:836-840.

【特許文献】

【0005】

【文献】WO 2014042251 A1

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、上記のような状況に鑑みてなされたものであり、ヒトGPC3ポリペプチドを発現する遺伝子改変非ヒト動物、当該遺伝子改変非ヒト動物の作製方法、及び当該遺伝子改変非ヒト動物を用いた種々の疾患の治療薬のスクリーニング方法を提供することを目的

とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、非ヒト動物の内因性GPC3ポリペプチドの発現を欠損し、かつ生理的に妥当なレベルでヒトGPC3ポリペプチドを発現させることができる非ヒト動物を作製する方法について、鋭意研究を行った。その結果、驚くべきことに、エクソン・イントロン構造配列及び非ヒト動物の野生型GPC3遺伝子の3'非翻訳領域を用いることにより、生理的に妥当なレベルでヒトGPC3遺伝子を発現する非ヒト動物を作製することができた。

【0008】

また、本発明者らは、非ヒト動物の内因性GPC3ポリペプチドの発現を欠損し、かつ生理的に妥当なレベルでヒトGPC3ポリペプチドを発現させることができる非ヒト動物が、ヒトGPC3に対して免疫寛容を示すことを見出した。すなわち、当該非ヒト動物をモデルとして利用すれば、被験物質における、安全性、疾患の治療効果、薬物動態、体内分布などを正確かつ簡便に評価することが可能である。さらに、このような評価系を利用することにより、所望の活性を有する抗体などの開発を効率的に行うことが可能である。

【0009】

より具体的には、例えば、以下の発明が提供される。

【1】内因性GPC3ポリペプチドの発現を欠損し、ヒトGPC3ポリペプチドを発現する遺伝子改変非ヒト動物。

【2】生理的に妥当なレベルで前記ヒトGPC3ポリペプチドを発現する、【1】の遺伝子改変非ヒト動物。

【3】トータルRNA中のヒトGPC3のmRNAのコピー数が、野生型非ヒト動物におけるトータルRNA中の該非ヒト動物GPC3のmRNAのコピー数と同等である、【1】または【2】に記載の遺伝子改変非ヒト動物

【4】トータルRNA中の前記ヒトGPC3のmRNAのコピー数が、野生型サルにおけるトータルRNA中のサルGPC3のmRNAのコピー数、およびヒトにおけるトータルRNA中のヒトGPC3のmRNAのコピー数のいずれか、または両方、と同等である、

【1】から【3】のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

【5】ヒトGPC3ポリペプチドまたはその断片に対して免疫寛容を示す、【1】から【4】のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

【6】前記非ヒト動物が非ヒト哺乳動物、好ましくはげっ歯類である、【1】から【5】のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

【7】前記非ヒト動物がマウスである、【1】から【6】のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

【8】【1】から【7】のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物から単離された組織または細胞。

【9】前記非ヒト動物が、ヒトGPC3ポリペプチドを発現するがん組織またはがん細胞を含む、【1】から【7】のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

【10】がんの治療薬のスクリーニングに使用するための、【9】に記載の遺伝子改変非ヒト動物。

【11】5'側にエクソン・イントロン構造を含む塩基配列が付加され、かつ、3'側に非ヒト動物のGPC3遺伝子の3'非翻訳領域が付加されたヒトGPC3遺伝子をコードするDNAを含む、DNA構築物。

【12】【11】に記載のDNA構築物を保持するノックインベクター。

【13】以下の工程；（1）ヒトGPC3ポリペプチドに結合する抗原結合分子を、【1】から【7】、【9】、【10】のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物に投与する工程（2）前記被験物質を投与した遺伝子改変非ヒト動物における、がん細胞増殖抑制効果、安全性、薬物動態および生体内分布特性からなる群から選択される少なくとも1つの評価指標を測定する工程、および（4）工程（3）で測定した評価指標が、対照の評価指標と比較して優れた抗原結合分子を選抜する工程、を含む、がんの治療薬のスクリーニ

10

20

30

40

50

ング方法。

〔14〕前記抗原結合分子が抗体である、〔13〕に記載のスクリーニング方法。

〔15〕〔13〕または〔14〕に記載のスクリーニング方法により選抜された抗体のアミノ酸配列情報を取得し、当該アミノ酸配列をコードする遺伝子を宿主細胞に導入することを含む、抗体の生産方法。

〔0010〕

〔16〕前記宿主細胞が、CHO細胞である、〔15〕に記載の方法。

また、例えば、以下の発明が提供される。

〔17〕非ヒト動物の内因性GPC3遺伝子の同一読み取り枠に挿入された、5'側にエクソン・イントロン構造を含む塩基配列が付加され、かつ、3'側に該非ヒト動物のGPC3遺伝子の3'非翻訳領域が付加されたヒトGPC3遺伝子をコードするDNAを、含む、遺伝子改変非ヒト動物。

10

〔18〕前記DNAがcDNAである、〔17〕に記載の遺伝子改変非ヒト動物。

〔19〕前記エクソン・イントロン構造を含む塩基配列が、ベータグロビンの第2エクソン配列、同イントロン配列および同第3エクソン配列を含む配列である、〔17〕または〔18〕に記載の遺伝子改変非ヒト動物。

〔20〕前記ベータグロビンが前記非ヒト動物のベータグロビンである、〔17〕から〔19〕のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

〔21〕前記非ヒト動物のGPC3遺伝子の3'非翻訳領域が、ポリA付加シグナル配列を含む領域である、〔17〕から〔20〕のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

20

〔22〕ヒトGPC3ポリペプチドまたはその断片に対して免疫寛容を示す、〔17〕から〔21〕のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

〔23〕前記非ヒト動物が非ヒト哺乳動物、好ましくはげっ歯類である、〔17〕から〔22〕のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

〔24〕前記非ヒト動物がマウスである、〔17〕から〔23〕のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

〔25〕〔17〕から〔24〕のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物から単離された組織または細胞。

〔26〕前記非ヒト動物が、ヒトGPC3ポリペプチドを発現するがん組織またはがん細胞を含む、〔17〕から〔24〕のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

30

〔27〕がんの治療薬をスクリーニングするための、〔26〕に記載の遺伝子改変非ヒト動物。

〔0011〕

また、例えば、以下の発明が提供される。

〔28〕5'側にエクソン・イントロン構造を含む塩基配列が付加され、かつ、3'側に非ヒト動物のGPC3遺伝子の3'非翻訳領域が付加されたヒトGPC3遺伝子をコードするDNAを含む、DNA構築物。

〔29〕前記DNAがcDNAである、〔28〕に記載のDNA構築物。

〔30〕前記エクソン・イントロン構造を含む塩基配列が、ベータグロビンの第2エクソン配列、同イントロン配列および同第3エクソン配列を含む配列である、〔28〕または〔29〕に記載のDNA構築物。

40

〔31〕前記ベータグロビンがマウスベータグロビンである、〔28〕から〔30〕のいずれか1つに記載のDNA構築物。

〔32〕前記非ヒト動物のGPC3遺伝子の3'非翻訳領域が、ポリA付加シグナル配列を含む領域である、〔28〕から〔31〕のいずれか1つに記載のDNA構築物。

〔33〕組換え酵素基質配列、薬剤選択マーカー、および／またはその他の配列をさらに含む、〔28〕から〔32〕のいずれか1つに記載のDNA構築物。

〔34〕〔28〕から〔33〕のいずれか1つに記載のDNA構築物を保持するノックインベクター。

〔35〕前記DNA構築物の5'側に非ヒト動物のGPC3遺伝子の標的領域の5'側上流

50

領域と相同な塩基配列、前記DNA構築物の3'側に非ヒト動物のGPC3遺伝子の標的領域の3'側下流領域と相同な塩基配列を含むことを特徴とする、[34]に記載のノックインベクター。

[36] [35]に記載のノックインベクターが導入された、非ヒト動物細胞。

[37] 前記細胞が、胚性幹細胞(ES細胞)、人工多能性幹細胞(iPS細胞)、生殖系列幹細胞、または受精卵である、[36]に記載の非ヒト動物細胞。

[0012]

また、例えば、以下の発明が提供される。

[38] 以下の工程；(1) ヒトGPC3ポリペプチドを発現するがん組織またはがん細胞を含む、[1]から[7]、[9]、[10]、[17]から[24]、[26]、[27]のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物に、被験物質を投与する工程、(2) 該被験物質を投与した遺伝子改変非ヒト動物におけるがん細胞増殖抑制効果を測定する工程、および(3) (2)で測定したがん細胞増殖抑制効果が、対照と比較して有意に大きかった被験物質を選択する工程を含む、被験物質におけるがんの治療効果を評価する方法。

10

[39] 以下の工程；(1) [1]から[7]、[9]、[10]、[17]から[24]、[26]、[27]のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物に被験物質を投与する工程、(2) 該被験物質を投与した遺伝子改変非ヒト動物におけるサイトカインの放出を測定する工程、および(3) 工程(2)で測定したサイトカインレベルを、対照のサイトカインレベルと比較し、サイトカインレベルの変化によって生じる安全性リスクが示される工程を含む、被験物質の安全性を評価する方法。

20

[40] 前記非ヒト動物が、ヒトGPC3ポリペプチドを発現するがん組織またはがん細胞を含む、[39]に記載の方法。

[41] 以下の工程；(1) [1]から[7]、[9]、[10]、[17]から[24]、[26]、[27]のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物に被験物質を投与する工程、および(2) 該被験物質を投与した遺伝子改変非ヒト動物における、該被験物質の血中濃度の経時的な変化を測定する工程、を含む、被験物質の薬物動態特性を評価する方法。

[42] 前記非ヒト動物が、ヒトGPC3ポリペプチドを発現するがん組織またはがん細胞を含む、[41]に記載の方法。

30

[43] 以下の工程；(1) [1]から[7]、[9]、[10]、[17]から[24]、[26]、[27]のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物に被験物質を投与する工程、(2) 該被験物質を投与した遺伝子改変非ヒト動物における、被験物質の体内分布を測定する工程、および(3) 被験物質の局在によって被験物質の生体内分布特性が示される工程を含む、被験物質の生体内分布特性を評価する方法。

[44] 前記非ヒト動物が、ヒトGPC3ポリペプチドを発現するがん組織またはがん細胞を含む、[43]に記載の方法。

[45] 前記被験物質が、ヒトGPC3ポリペプチドに結合する抗原結合分子である、[38]から[44]のいずれか1つに記載の方法。

[46] 前記抗原結合分子が抗体である、[45]に記載の方法。

40

[0013]

また、例えば、以下の発明が提供される。

[47] 内因性のCD3ε、CD3δ及びCD3γからなる群より選ばれる少なくとも1種以上のCD3遺伝子がゲノム上で機能的に欠損し、ヒトCD3ε、CD3δ及びCD3γからなる群より選ばれる少なくとも1種以上のヒトCD3遺伝子を機能的に発現する、[1]から[10]、[17]から[24]、[26]及び[27]のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

[48] ヒトCD3ε、CD3δ及びCD3γからなるヒトCD3遺伝子を機能的に発現する、[47]に記載の遺伝子改変非ヒト動物。

[49] ヒトCD3ε、CD3δ及びCD3γからなる群より選ばれる少なくとも1種以上のヒ

50

トCD3遺伝子の全長塩基配列がゲノム上に挿入されている、[47] または [48] に記載の遺伝子改変非ヒト動物。

[50] 前記非ヒト動物が有するT細胞は、その細胞膜上で非ヒト動物由来のT細胞受容体とヒトCD3分子が複合体を形成することを特徴とする、[47] から [49] のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

[51] ヒト免疫チェックポイント遺伝子、ヒト癌特異的抗原遺伝子、及び／又はヒト免疫共刺激分子の遺伝子をさらに発現する、[47] から [50] のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

[52] 前記非ヒト動物が非ヒトほ乳動物である、[47] から [51] のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

[53] 前記非ヒトほ乳動物がマウスである、[52] に記載の遺伝子改変非ヒト動物。

[54] 悪性腫瘍性疾患又は自己免疫疾患の治療薬をスクリーニングするための、[47] から [53] のいずれか1つに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

[55] 前記非ヒト動物に癌細胞が移植されていることを特徴とする、悪性腫瘍性疾患の治療薬をスクリーニングするための、[54] に記載の遺伝子改変非ヒト動物。

[56] 前記癌細胞が肺癌、胃癌、肝癌、食道癌又は卵巣癌由来の細胞である、[55] に記載の遺伝子改変非ヒト動物。

[57] 以下の工程(1)～(2)：

(1) [47] から [56] のいずれかに記載の遺伝子改変非ヒト動物、その臓器、組織または細胞と被験物質を接触させる工程、及び

(2) 該遺伝子改変非ヒト動物個体、その臓器、組織または細胞に対する被験物質の薬効及び／又は毒性を指標として、候補被験物質を選択する工程、を含む、悪性腫瘍性疾患又は自己免疫疾患の治療薬のスクリーニング方法。

[58] 以下の工程(1)～(3)：

(1) ヒトCD3結合ドメイン及び癌特異的抗原結合ドメインを含む抗原結合分子のライブラリーのうち1つを被験物質として、[47] から [57] のいずれかに記載の第1の遺伝子改変非ヒト動物に投与する工程、

(2) 該癌特異的抗原を発現する細胞に対する該被験物質の細胞増殖抑制効果及び／又は薬物動態学的特性を測定する工程、及び

(3) 該被験物質の細胞増殖抑制効果及び／又は薬物動態学的特性を、該第1の非ヒト動物とは異なる第2の遺伝子改変非ヒト動物に投与された対照抗体の細胞増殖抑制効果及び／又は薬物動態学的特性と比較する工程、を含む、悪性腫瘍性疾患の治療薬のスクリーニング方法。

[59] 以下の工程(1)～(3)：

(1) 内因性GPC3ポリペプチドの発現を欠損し、ヒトGPC3ポリペプチドを発現する遺伝子改変非ヒト動物を作製する工程、

(2) 内因性のCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のCD3遺伝子がゲノム上で機能的に欠損し、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のヒトCD3遺伝子を機能的に発現する遺伝子改変非ヒト動物を作製する工程、

(3) 該ヒトGPC3ポリペプチドを発現する遺伝子改変非ヒト動物と該ヒトCD3遺伝子を機能的に発現する遺伝子改変非ヒト動物を交配する工程、を含む、ヒトGPC3ポリペプチドを発現し、かつヒトCD3遺伝子を機能的に発現する非ヒト動物の作製方法。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】 マウスグリピカン-3 (mGPC3) 遺伝子のゲノムDNAの構造(1)と、挿入されるノックインベクターver.1(2)、ver.2(3)、ver.3(4)との関係を模式的に示す図である。ノックインベクターver.1(2)は、ヒトグリピカン-3 (hGPC3) cDNA、hp7配列、ポリA付加シグナル(pA)、および組換え酵素Creの基質配列であるloPに挟

10

20

30

40

50

まれたネオマイシン耐性遺伝子 (neo) を有する。Creを作用させる事で、loxP間同士の部位特異的な組換えが起こり、loxPに挟まれたネオマイシン耐性遺伝子が除去される。ノックインベクターver.2 (3) はmGpc3遺伝子の標的領域の5'側上流領域約800塩基、マウスのベータグロビンの第2エクソン、イントロン、第3エクソン、hGPC3 cDNA、マウスベータグロビンの第3エクソン中のpolyA付加シグナル、loxP配列、neo遺伝子、mGpc3遺伝子の標的領域の3'側下流領域約800塩基を有する。ノックインベクターver.3 (4) は、ノックインベクターver.2 (3) のマウスベータグロビンの第3エクソン中のpolyA付加シグナルをmGpc3遺伝子の3'非翻訳領域に変えたものである。図1におけるaはマウスベータグロビンの第2エクソン、bはマウスベータグロビンの第2イントロン、cはマウスベータグロビンの第3エクソンおよびdはpolyA付加シグナルを含むマウスベータグロビンの第3エクソンを示している。

10

【図2】 mGpc3遺伝子のゲノムDNA (a) にノックインベクターver.1 (b) が相同組換えを起こして、挿入される過程 (c) を示したものである。その後、組換え酵素CreによりloxPに挟まれたネオマイシン耐性遺伝子 (neo) を除去する事でhGPC3ノックインアレル (d) を完成させる過程を示す。ノックインベクターver.2も同様の過程でneoが除去される。

【図3】 hGPC3ノックインベクターver.1およびhGPC3ノックインベクターver.2の相同組換えES細胞のスクリーニングを行ったPCRの代表例 [hGPC3ノックインベクターver.1 (a)、hGPC3ノックインベクターver.2 (b)]、およびhGPC3ノックインベクターver.3遺伝子を含むファウンダーマウスの検出を行ったPCRの代表例 (c) を示す。

20

【図4】 hGPC3ノックインマウスver.1およびhGPC3ノックインマウスver.2のneo遺伝子カセットの除去の検出を行ったPCRの代表例 [hGPC3ノックインマウスver.1 (a)、hGPC3ノックインマウスver.2 (b)] を示す。

【図5】 hGPC3ノックインマウスver.1、hGPC3ノックインマウスver.2およびhGPC3ノックインマウスver.3のホモ接合体およびヘミ接合体を検出したPCRの代表例 [hGPC3ノックインマウスver.1 (a)、hGPC3ノックインマウスver.2 (b)、hGPC3ノックインマウスver.3 (c)] を示す。hGPC3KI/hGPC3KI、hGPC3KI/-、hGPC3KI/+および+/+は、それぞれホモ型ノックインマウス、ヘミ型ノックインマウス、ヘテロ型ノックインマウスおよび野生型を示す。

【図6】 抗ヒトGPC3抗体を用いた時の、hGPC3ノックインマウスver.1および野生型マウスの肺におけるウェスタンブロットの結果を示す図である。ライセート濃度は、各レーンにアプライされた肺ライセートの総タンパク重量である。

30

【図7】 抗ヒトGPC3抗体を用いた時のhGPC3ノックインマウスver.2、hGPC3ノックインマウスver.3および野生型マウスの肺におけるウェスタンブロットの結果を示す図である。

【図8】 hGPC3ノックインマウスver.2、ver.3、野生型マウスおよびカニクイザルの肺におけるGPC3 mRNAの発現量を示したグラフである。(a) Universal Probe#46を使用した時の、hGPC3ノックインマウスver.2、ver.3およびカニクイザルの結果を示した図である。(b) Universal Probe#28を使用した時の、野生型マウス、ver.2およびver.3の結果を示した図である。

40

【図9】 hGPC3ノックインマウスver.3およびヒトの肺におけるGPC3 mRNAの発現量を示したグラフである。

【図10】 ヒトGPC3タンパクの投与をday0,14,21,28,35,42,49に実施した時の野生型マウスおよびhGPC3ノックインマウスver.3の血漿中における抗ヒトGPC3抗体の濃度を示す図である。

【図11】 hGPC3ノックインマウスver.3における、hGPC3_mCD3抗体のLLC1/hGPC3移植モデルでの抗腫瘍効果を示す図である。

【図12】 hGPC3_mCD3抗体の投与後2時間後、1日後および7日後の、hGPC3ノックインマウスver.1およびhGPC3ノックインマウスver.3の血漿中におけるhGPC3_mCD3抗体濃度の推移を示す図である。

50

【図13】hGPC3_mCD3抗体の投与後、野生型マウス、hGPC3ノックインマウスver.1およびhGPC3ノックインマウスver.3の血漿中におけるIFN-gamma、IL-10、IL-17およびIL-2の濃度の経時的推移を示す図である。

【図14】hGPC3_mCD3抗体の投与後、野生型マウス、hGPC3ノックインマウスver.1およびhGPC3ノックインマウスver.3の血漿中におけるIL-4、IL-6およびTNFの濃度の経時的推移を示す図である。

【図15A】マウスCd3ε、Cd3δおよびCd3γ遺伝子を含むゲノムDNAの構造(1)と、当該遺伝子領域の全域を含むバクテリア人工染色体(BAC)クローンを改変することにより構築したマウスCd3遺伝子改変ベクター(2)、上述のベクターによってloxP配列およびRox配列を標的位置に挿入したゲノムDNAの構造(3)、さらに組換え酵素CreおよびDreの作用によるCd3ε、Cd3δおよびCd3γ遺伝子の欠損アレルの構造(4)を示すものである。

10

【図15B】ヒトCD3ε、CD3δおよびCD3γ遺伝子を含むBACクローン(a)、およびそのBACクローンを改変するための5'改変カセット(b)および3'改変カセット(c)、および、それらを用いた改変により構築したヒトCD3遺伝子領域導入ベクター(d)の構造を示す。

【図16】マウスCd3遺伝子改変ES細胞の樹立のための解析したPCRの代表例を示す。

【図17A】マウスCd3遺伝子改変ES細胞に、Cre発現ベクターおよびDre発現ベクターとともに、ヒトCD3遺伝子領域導入ベクターを導入し、得られたES細胞クローンの遺伝子型を解析したPCRの代表例を示す。図17AはマウスCd3遺伝子領域の欠損を検出するPCR結果の代表例を示す。

20

【図17B】ヒトCD3遺伝子領域の導入を検出するPCR結果の代表例を示す。

【図18】樹立した各ラインのヒトCD3遺伝子置換マウス、Cd3遺伝子欠損マウス、野生型およびヒトCD3ε遺伝子導入マウスから採取した胸腺の代表的なマクロ写真である。各遺伝子型とも12-13週齢の雄より摘出した胸腺である。

【図19】樹立した各ラインのヒトCD3遺伝子置換マウス、Cd3遺伝子欠損マウス、野生型およびヒトCD3ε遺伝子導入マウスから採取した脾臓および胸腺の組織重量を測定した結果を示している。体重あたりの組織重量比を算出し、個体毎に得られた値を黒点にてプロット、平均値をカラムにて表す。

30

【図20】樹立した各ラインのヒトCD3遺伝子置換マウス、Cd3遺伝子欠損マウス、野生型マウスおよびヒトCD3ε遺伝子導入(hCD3ε Tg)マウスにおける各ヒトCD3分子および各マウスCd3の遺伝子発現をRT-PCRによって検討した結果を示す。樹立したヒトCD3遺伝子置換マウスのラインのうちライン番号1C3および8I12においてhCD3ε、hCD3δおよびhCD3γに特異的なシグナルが検出された。ライン番号3B1および2A4には検出されなかった。

【図21】樹立した各ラインのヒトCD3遺伝子置換マウス(1C3、8I12および4HH3)の胸腺(A)および脾臓(B)について実施したCD3の組織免疫染色の代表例を示す。いずれの組織においても、野生型マウスと同様にT細胞ゾーンにのみ染色が認められた。また、Cd3遺伝子欠損マウスでは染色が認められておらず、ヒトCD3遺伝子置換マウスにおける染色は導入したヒトCD3遺伝子の発現によるものであることが示された。

40

【図22】樹立した各ラインのヒトCD3置換マウスの脾臓における成熟T細胞の存在比率をFACSにて解析した代表的な結果を示す。

【図23】ヒトCD3遺伝子置換マウス(1C3)、Cd3遺伝子欠損マウスと野生型マウスの脾臓細胞のマイトジェン刺激における細胞増殖活性を示す。樹立したヒトCD3遺伝子置換マウス(1C3)は野生型の90%の細胞増殖活性があることが示された。

【図24】ヒトCD3遺伝子置換マウス(1C3)、Cd3遺伝子欠損マウスと野生型マウスの脾臓細胞のマイトジェン刺激におけるサイトカイン産生を示す。樹立したヒトCD3遺伝子置換マウス(1C3)は、Cd3遺伝子欠損マウスにおいて機能欠失したサイト

50

カイン産生能を回復できていることが示された。

【図25A】図25A～Dは、ヒトCD3遺伝子置換マウス（1C3）、Cd3遺伝子欠損マウスと野生型マウスの脾臓細胞の抗CD3抗体刺激における細胞増殖活性（図11A、B）、およびサイトカイン産生（図11C、D）を示す。樹立したヒトCD3遺伝子置換マウス（1C3）は、抗ヒトCD3抗体の刺激に特異的に反応し、細胞増殖活性、およびサイトカイン産生が示された。

【図25B】図25A欄の説明を参照。

【図25C】図25A欄の説明を参照。

【図25D】図25A欄の説明を参照。

【図26】樹立した各ラインのヒトCD3置換マウスへのニワトリ卵白アルブミン（Ovalbumin, OVA）を免疫した際のOVA特異的IgG1およびIgEの血清中濃度を測定した結果を示す。個体毎のOVA特異的な血清中IgG1およびIgE濃度を棒グラフで示す。棒グラフの下の数字は個体番号を示す。

10

【図27】Hepa1-6/HER2細胞を移植したhCD3トランスジェニックマウスモデルにおける、HER2_CD3抗体を投与した際の腫瘍体積の変化を示す。矢印は抗体投与を示す（*: $P < 0.05$ (t-test)）。

【図28】Hepa1-6/hGPC3細胞を移植したhCD3トランスジェニックマウスモデルにおける、抗マウスCTLA-4抗体、抗マウスPD-1抗体、抗マウスPD-L1抗体を投与した際の腫瘍体積の変化を示す。矢印は抗体投与を示す。

【図29】Colon38細胞株を移植したマウスモデルにおける、MDX10//TR01H113、もしくはControlとしてのバッファを投与した際の腫瘍体積の変化を示す（図中、それぞれ「MDX10//TR001H1333」および「ベヒクル」）。各点是一群 $n=5$ の腫瘍体積の平均値を示す。最終計測点で平均値を比較したところ、MDX10//TR01H113投与群とバッファ投与群の2群間には有意な差が認められた（ $p=0.0021$ 、Studentのt検定）。

20

【図30】Hepa1-6/hGPC3細胞を移植したヒトGPC3ノックイン・ヒトCD3遺伝子置換マウスモデルにおける、hGPC3_hCD3抗体を投与した際の腫瘍体積の変化を示す。矢印は抗体投与を示す。*: $P < 0.05$ (Steel検定、JMPソフトウェア、SAS institute inc.)

【図31】Hepa1-6/hGPC3細胞を移植したヒトGPC3ノックイン・ヒトCD3遺伝子置換マウスモデルにおける、hGPC3_hCD3抗体投与前日、投与後6h、24h、二回目投与後6hの血漿中サイトカイン濃度の推移を示す。破線は検出限界を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0015】

1. 定義

その他に定義されない限り、本明細書において使用される技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する当技術分野の当業者らによって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書において記載されるものに類似するまたはそれと等価であるいかなる方法および材料も、本発明の実施または試験において使用することができるが、ここでは、特定の方法および材料が記載される。本明細書において言及される刊行物はすべて、それらの全体が参照によって本明細書において組み込まれる。

【0016】

40

本明細書においては、「1の」又は「複数の」といった数量を意味する限定を記載して用語の説明をしていない限り、本明細書に記載されている用語は、特に数量が限定されたものとしては解釈されず、「1又は複数の」という意味を有する用語であるものと理解される。

【0017】

「保存的置換」とは、アミノ酸のそれらの側鎖および化学的性質で関連性のあるアミノ酸ファミリー内で起こるものである。例えば、アミノ酸は、共通の側鎖特性によって群に分けることができる：

(1) 疎水性：ノルロイシン、メチオニン (Met)、アラニン (Ala)、バリン (Val)、ロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)；

50

- (2) 中性の親水性：システイン (Cys)、セリン (Ser)、トレオニン (Thr)、アスパラギン (Asn)、グルタミン (Gln)；
(3) 酸性：アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu)；
(4) 塩基性：ヒスチジン (His)、リジン (Lys)、アルギニン (Arg)；
(5) 鎖配向に影響する残基：グリシン (Gly)、プロリン (Pro)；
(6) 芳香族性：トリプトファン (Trp)、チロシン (Tyr)、フェニルアラニン (Phe)。

非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを、別のクラスのものに交換することをいう。非限定の一態様において、本発明は、本明細書中に記載したアミノ酸配列に保存的アミノ酸置換を含むヒトGPC3ポリペプチドを発現する遺伝子改変非ヒト動物を含む。

【0018】

「標的遺伝子」とは、外来性の遺伝子を挿入する対象となる非ヒト動物の内因性の遺伝子を含む。「標的領域」とは、外来性の遺伝子を挿入する対象となる非ヒト動物の内因性の遺伝子の特定の領域を含む。非限定の一態様において、標的領域とは、挿入された外来性の遺伝子の5'側及び3'側に接する内因性の遺伝子を含む領域をいう。別の一態様において、標的領域とは、外来性の遺伝子の挿入により発現が欠損する内因性の遺伝子の領域をいう。

【0019】

「内因性」とは、生物、組織または細胞内等に自然に由来する物質を含む。例えば、内因性の核酸又はペプチドは、細胞中にあり、組換え操作技術を用いて細胞に導入されたものではない核酸またはペプチドをいう。

【0020】

「外来性」とは、当該生物、組織または細胞以外の、他の生物、組織または細胞等に由来する物質を含む。例えば、「外来遺伝子」は、本発明の非ヒト動物に導入する遺伝子を含む。本発明における外来遺伝子は、由来する生物種を限定することなく使用することができるが、好ましくはヒト遺伝子である。また、外来遺伝子としては、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、 β -ガラクトシダーゼなどのレポーター遺伝子、薬剤 (ネオマイシン等) 耐性遺伝子などの選択マーカー遺伝子を使用することも可能である。外来遺伝子としては、2以上の遺伝子の組み合わせを使用することも可能である。また、外来遺伝子には、該遺伝子の発現を調節するエンハンサーなどが付加されていてもよい。外来遺伝子の形態は特に限定されず、例えば、cDNAであっても、ゲノムDNAであってもよい。

【0021】

「単離された」とは、そのもともとの環境の成分から分離されていることをいう。

【0022】

「機能的に連結された」とは、各遺伝子が目的とする機能を発揮することが可能な状態で連結している状態を含む。例えば、タンパク質をコードする核酸配列は、制御配列 (例えば、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー配列など) に作動可能に連結して、適切な転写調節を保持することができるが、そのように機能する限り、プロモーターは配列に連続している必要はない。ここで、「機能的に連結」の語は、「作動可能に連結」の語と交換可能に使用されてもよい。

【0023】

「ベクター」としては、バクテリオファージ、アデノウイルス、レトロウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、または人工染色体由来の、遺伝子操作されたプラスミドまたはウイルスが例示されるが、これらに限定されない。

【0024】

「非ヒト動物」とは、ヒト以外の動物であれば特に制限されず、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ヤギ、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、ネコ、サルが挙げられる。非ヒト動物は、好ましくは哺乳動物であり、げっ歯類に分類される動物であり、更に好ましくはマウスである。好ましいマウスの例としては、C57/BL/6、ICR、BALB/cが挙げられるが、これらに限定されない。

【0025】

10

20

30

40

50

「野生型」とは、自然界においてみられる通常の構造及び／又は活性を有していることを含む。野生型の核酸又はペプチドには、対立遺伝子変異等の複数の異なる形態及び多型が含まれる。また、「野生型」非ヒト動物は、場合によって、GPC3遺伝子に関して野生型である動物、すなわち、GPC3に関して遺伝的に操作されていない動物を含む。

【0026】

本明細書において、用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、所望の抗原結合活性を示す限りは、これらに限定されるものではないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）および抗体断片を含む、種々の抗体構造を包含する。

【0027】

「抗体断片」は、完全抗体が結合する抗原に結合する当該完全抗体の一部を含む、当該完全抗体以外の分子のことをいう。抗体断片の例は、これらに限定されるものではないが、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；ダイアボディ；線状抗体；単鎖抗体分子（例えば、scFv）；および、抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

【0028】

本明細書において、「がん(cancer)」、「癌(carcinoma)」、「腫瘍(tumor)」、「新生物(neoplasm)」等の用語は互いに区別されず、相互に交換可能であり、一般的に表現される「がんcancer」を意味するものとする。

【0029】

2. グリピカン3 (GPC3)

グリピカン3 (Glypican 3; GPC3) は、細胞表面上に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンのファミリーの1つであり、発生における細胞分裂や、がん細胞の増殖に関与している可能性があることが示唆されているが、その機能はまだよく解明されていない。非限定の一態様において、GPC3のポリペプチド配列の例としては、配列番号：1（ヒト、NCBI RefSeq: NP_004475.1）、配列番号：2（サル、NCBI RefSeq: XP_005594665.1）、配列番号：3（マウス、NCBI RefSeq: NP_057906.2）、DNA配列としては配列番号：4（ヒト、NCBI RefSeq: NM_004484.3）、配列番号：5（サル、NCBI RefSeq: XM_005594608.2）、配列番号：6（マウス、NCBI RefSeq: NM_016697.3）が挙げられる。非限定の一態様において、グリピカン3 (GPC3) またはGPC3ポリペプチドは、全長GPC3ポリペプチドおよびその断片を含み、アミノ酸変異を含んでいてもよい。

【0030】

非限定の一態様において、「GPC3遺伝子」は、GPC3ポリペプチドをコードする遺伝子であれば特に限定されず、ゲノムDNAであってもcDNAであってもよい。また、GPC3遺伝子は、その多型又は変異体を含む。

【0031】

3. ヒトGPC3ポリペプチドを発現する非ヒト動物

非限定の一態様において、本発明は、ヒトGPC3遺伝子をコードするDNAを含み、ヒトGPC3ポリペプチドを発現する非ヒト動物を提供する。別の一態様において、本発明の非ヒト動物は、ヒトGPC3遺伝子をコードするDNAを、非ヒト動物のゲノム上に存在する内因性GPC3遺伝子の同一読み取り枠に挿入したことを特徴とする非ヒト動物を含む。なお、上記ヒトGPC3遺伝子をコードするDNAは、ゲノムDNAであってもcDNAであってもよい。好ましくはcDNA、より具体的にはアミノ酸配列コード領域(CDS)を含むcDNAを挙げることができる。アミノ酸配列コード領域には、シグナル配列も含まれる。

【0032】

非限定の一態様において、「同一読み取り枠」とはmRNAがタンパク質に翻訳される際に読み取られる3塩基毎の塩基配列の単位を意味する。「同一読み取り枠に挿入」とは、非ヒト動物の内因性GPC3遺伝子の開始コドンATGとヒトGPC3遺伝子の開始コドンATGとが一致するように、ヒトGPC3遺伝子を挿入することを含む。また、ヒトGPC3遺伝子の開始コドンATGの5'側にエクソン・イントロン構造配列が付加され、非ヒト動物の内因性GPC3遺伝子の開始コドンATGと、該エクソン・イントロン構造の5'側末端とが一致するよ

10

20

30

40

50

うに、ヒトGPC3遺伝子を挿入する場合も、「同一読み取り枠に挿入」することに含まれる。

【0033】

これにより、非ヒト動物における内因性GPC3遺伝子のプロモーターと挿入したヒトGPC3遺伝子とが作動可能に連結し、当該プロモーターの活性化に応答してヒトGPC3遺伝子が発現するようになる。このような構成を採用した場合には、外来性のヒトGPC3が内因性のGPC3発現制御システムの下で発現するため、内因性のGPC3と同じようなタイミングや場所（組織）でヒトGPC3が発現するように制御できる。GPC3は、発生への関与も予想されている遺伝子である。したがって、上記構成を採用することによって、非ヒト動物の生存や発生における遺伝子改変の影響を小さくする作用が期待できる。

10

【0034】

別の一態様において、ヒトGPC3遺伝子の挿入の際には、破壊した内因性GPC3遺伝子が元来の読み枠にて再び翻訳される可能性をなくす観点から、内因性GPC3遺伝子のATG以降の配列について、3の倍数ではない塩基数の配列を欠損させることが好ましい。また、本発明においてヒトGPC3遺伝子は、内因性GPC3遺伝子の本来の翻訳開始点が存在するエクソンのみに挿入されている（すなわち、内因性GPC3遺伝子の標的エクソンのみと相同組換えが生じている）ことが好ましい。

【0035】

非限定の一態様において、本発明の非ヒト動物が保有するヒトGPC3遺伝子は、配列番号：4と、少なくとも50%、60%、70%、好ましくは75%以上、80%以上、85%以上、さらに好ましくは90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上相同である、ヒトGPC3遺伝子を含む。別の一態様において、当該ヒトGPC3遺伝子は、その多型又は変異体を含む。別の一態様において、当該ヒトGPC3遺伝子は、アミノ酸の挿入、欠失又は保存的アミノ酸置換がなされたヒトGPC3ポリペプチドをコードする遺伝子でもよい。

20

【0036】

非限定の一態様において、本発明の非ヒト動物が発現するヒトGPC3ポリペプチドは、配列番号：1と、少なくとも50%、60%、70%、好ましくは75%以上、80%以上、85%以上、さらに好ましくは90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上相同である、ヒトGPC3ポリペプチドを含む。別の一態様において、当該ヒトGPC3遺伝子は、その多型又は変異体を含む。別の一態様において、当該ヒトGPC3ポリペプチドは、アミノ酸の挿入、欠失又は保存的アミノ酸置換がなされていてもよい。本発明において、塩基配列やアミノ酸配列の相同性は、公知のアルゴリズムで決定することができる。複数の配列間の相同性を求めるアルゴリズムが公知である。配列情報の相同性(homology)は、塩基配列間の比較において同義コドンを考慮したり、あるいはアミノ酸配列間の比較において異なるアミノ酸残基の共通性を考慮して決定する場合と、これらの要素を考慮せず純粋に配列情報の比較に基づいて決定する場合がある。後者の比較結果は、好ましくは同一性(identity)で表すことができる。

30

【0037】

非限定の一態様において、本発明の非ヒト動物は、当該非ヒト動物の内因性GPC3ポリペプチドの発現を欠損し、かつ生理的に妥当なレベルでヒトGPC3ポリペプチドを発現することができる。本発明の非ヒト動物に挿入されたヒトGPC3遺伝子(mRNAを含む)または当該遺伝子から発現するヒトGPC3ポリペプチドは、当業者に周知の様々な方法、例えば、PCR、サザンブロット、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphis) 法、ウェスタンブロット、IHC、ELISA、等により検出することができる。

40

【0038】

非限定の一態様において、例えば、「内因性GPC3ポリペプチドの発現を欠損」としては、非ヒト動物における内因性のGPC3ポリペプチドが発現しない限り、特にその態様は限定されない。具体的には、例えば、相同組み換え技術やクリスパー・キャス(CRISPR/Cas9)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(Zinc Finger Nucleases)、あるいはテイレン

50

(TALEN)等のゲノム編集技術によるノックアウト技術を用いて、非ヒト動物のゲノム上で、内因性のGPC3遺伝子を欠損(無効化)させてもよいし、siRNA等を用いて内因性のGPC3遺伝子の発現を完全に抑制させる手法を用いてもよい。また、内因性のGPC3ポリペプチドが発現しない限り、例えば、ノックイン技術を用いて、非ヒト動物ゲノム上のGPC3遺伝子の位置に外来遺伝子を挿入してもよい。

【0039】

非限定の一態様において、「生理的に妥当なレベルでヒトGPC3ポリペプチドを発現」するとは、例えば、非ヒト動物におけるヒトGPC3ポリペプチド又はヒトGPC3 mRNAの発現量が、次の(i)-(iii)からなる発現量から選択されるいずれかの発現量と同等であることを含む：

- (i) 野生型マウスにおけるマウスGPC3ポリペプチド又はマウスGPC3 mRNAの発現量、
- (ii) 野生型サルにおけるサルGPC3ポリペプチド又はサルGPC3 mRNAの発現量、及び、
- (iii) ヒトにおけるヒトGPC3ポリペプチド又はヒトGPC3 mRNAの発現量。

また、例えば、非ヒト動物の1つ又は複数の臓器におけるヒトGPC3ポリペプチド又はヒトGPC3 mRNAの発現量が、次の(i)-(iii)からなる発現量から選択されるいずれかの発現量と同等であることを含む：

- (i) 野生型マウスの当該臓器におけるマウスGPC3ポリペプチド又はマウスGPC3 mRNAの発現量、
- (ii) 野生型サルの当該臓器におけるサルGPC3ポリペプチド又はサルGPC3 mRNAの発現量、及び
- (iii) ヒトの当該臓器におけるヒトGPC3ポリペプチド又はヒトGPC3 mRNAの発現量。

好ましくは、本発明の非ヒト動物の1つ又は複数の臓器におけるヒトGPC3ポリペプチド又はヒトGPC3 mRNAの発現量は、ヒトの当該臓器におけるヒトGPC3ポリペプチド又はヒトGPC3 mRNAの発現量と同等である。ここで、臓器には、肺及び気管が含まれるが、これらに限定されない。本発明において、通常、一方の発現量を100とした場合に、他方の発現量が50-150%、たとえば70-130%、より具体的には80-120%である場合に、発現量を同等と見なすことができる。またポリペプチドやmRNAの発現量の比較は、共通の組織や細胞の間で比較することが望ましい。

【0040】

非限定の一態様において、GPC3ポリペプチドの発現量は、総タンパク重量あたりのGPC3ポリペプチド重量として表すことができ、また、GPC3 mRNAの発現量は、トータルRNA中の該GPC3 mRNAのコピー数として表すことができる。RNAのコピー数を定量的に評価する方法は公知である。具体的には、たとえばリアルタイムPCR法により、RNA量が既知の標準試料をサンプルとして増幅反応を行い、一定のシグナル強度に達するまでに要した反応サイクル数に基づいて検量線(スタンダードカーブ)を描くことができる。一方、定量すべきRNA試料についても同様の増幅反応を行って、同じシグナル強度に達する反応サイクル数を測定すれば、得られた結果を予め作成した検量線に当てはめることでRNA量を決定することができる。一方、トータルRNAの量は、電気泳動法や吸光度の測定により決定する方法が公知である。なお本発明において、トータルRNAとは、トータルmRNAであっても良い。

【0041】

また、別の一態様においては、ヒトGPC3ポリペプチドを発現する遺伝子改変非ヒト動物にヒトGPC3に結合する抗体を投与し、当該抗体の血中半減期等の薬物動態学的特性が、ヒトに当該抗体を投与した場合と類似していることをもって、「生理的に妥当なレベルでヒトGPC3ポリペプチドを発現」していると判断してもよい。

【0042】

非限定の一態様において、ヒトGPC3ポリペプチドを発現する遺伝子改変非ヒト動物は、ヒトGPC3ポリペプチドに対して免疫寛容を示す。すなわち、生体は、生体(自己)にとって異物である抗原に対しては獲得免疫応答システムを作動させるため、非ヒト動物にヒトGPC3ポリペプチドを投与し又はヒトGPC3ポリペプチドを発現した細胞を移植すると

10

20

30

40

50

、当該ヒトGPC3ポリペプチド又はヒトGPC3ポリペプチドを発現した細胞を異物として認識し、排除してしまう。しかしながら、本発明の遺伝子改変非ヒト動物は、ヒトGPC3ポリペプチドを発現するため、ヒトGPC3ポリペプチドを自己の生体成分とみなし、これに対しては免疫応答を示さなくなる。本発明の遺伝子改変非ヒト動物が、ヒトGPC3に対して免疫寛容を示すかどうかは、当業者に公知の様々な方法、例えば、当該非ヒト動物にヒトGPC3ポリペプチド又はその断片を投与し、当該非ヒト動物の体内における抗ヒトGPC3抗体価を測定することによって確認することができる。別の一態様において、本発明における、ヒトGPC3ポリペプチドを発現する非ヒト動物は、正常な免疫系を有する。

【0043】

非限定の一態様において、非ヒト動物がヒトGPC3ポリペプチドに対して免疫寛容を示すことは、非ヒト動物に、ヒトGPC3ポリペプチドまたはその断片を投与した後に、当該ヒト動物の血漿中の抗ヒトGPC3抗体の抗体価を測定することにより確認できる。このとき、ヒトGPC3ポリペプチドまたはその断片と共にアジュバンドを投与してもよい。抗体価の測定は、例えば、ヒトGPC3ポリペプチドまたはその断片を投与した日から数えて0日目、14日目、21日目、28日目、35日目、42日目、および／または49日目に行うことができる。例えば、ヒトGPC3ポリペプチドを発現する遺伝子改変非ヒト動物の血漿中の、抗ヒトGPC3抗体の抗体価が、野生型非ヒト動物の抗ヒトGPC3抗体の抗体価より有意に低い場合には、当該遺伝子改変非ヒト動物が、ヒトGPC3ポリペプチドに対して免疫寛容を示すと評価することができる。

【0044】

本発明において、遺伝子改変非ヒト動物が、ヒトGPC3ポリペプチドに対して免疫寛容であることは、当該動物において、ヒトGPC3に対する抗原結合分子の種々の特性を評価するときに有利な特徴である。たとえば本発明の遺伝子改変非ヒト動物にヒトGPC3を発現するがん細胞を移植したモデル動物において、抗原結合分子の特性を評価する場合を想定する。このときに、もしも宿主動物がヒトGPC3に免疫応答してヒトGPC3に対する抗体を産生すると、産生された抗体が抗原結合分子の作用の評価を妨げかねない。たとえば、免疫不全動物移植モデルを利用すれば、宿主の免疫応答の問題は無いかもしれない。しかし、免疫システムを欠損した免疫不全動物における評価系では、抗原結合分子の例えば免疫系に関与する作用を評価することはできない。一方、本発明の遺伝子改変非ヒト動物であれば、免疫システムを備えているので、このような制限はない。

【0045】

4. DNA、ノックインベクター

非限定の一態様において、本発明は、ヒトGPC3ポリペプチドを発現する非ヒト動物を作製するためのDNA構築物、前記DNA構築物を保持するノックインベクターおよび前記ノックインベクターが導入された形質転換細胞又はその子孫細胞を提供する。

【0046】

非限定の一態様において、本発明のDNA構築物は、5'側にエクソン・イントロン構造配列が付加され、かつ、3'側に非ヒト動物のGPC3遺伝子の3'非翻訳領域が付加されたヒトGPC3遺伝子をコードするDNAを含む、DNA構築物を含む。別の一態様において、本発明のDNA構築物は、さらに、組換え酵素基質配列（例えば、Creの基質配列であるloxP配列）、薬剤選択マーカー（例えば、neo遺伝子）及び／又はその他の配列を含んでも良い。

【0047】

非限定の一態様において、本発明のDNA構築物は、5'側にエクソン・イントロン構造配列が付加され、かつ、3'側に非ヒト動物のベータグロビンの3'非翻訳領域が付加されたヒトGPC3遺伝子をコードするDNAを含む、DNA構築物を含む。別の一態様において、本発明のDNA構築物は、さらに、組換え酵素基質配列（例えば、Creの基質配列であるloxP配列）、薬剤選択マーカー（例えば、neo遺伝子）及び／又はその他の配列を含んでも良い。

【0048】

非限定の一態様において、「エクソン・イントロン構造配列」とは、スプライシング反応により除去されないエクソンと、同反応により除去されるイントロンの両方を含む配列

10

20

30

40

50

を意味する。エクソン・イントロン構造配列としては、エクソンおよびイントロンの両方を含み、スプライシングによりイントロンが除去される配列であれば何でもよい。本発明のエクソン・イントロン構造配列としては、ベータグロビンの第2エクソン配列、同イントロン配列および同第3エクソン配列を含む配列、が挙げられるがこれらに限定されない。
【0049】

非限定の一態様において、本発明のDNA構築物は、5'側にベータグロビンの第2エクソン、同イントロンおよび同第3エクソンが付加され、かつ、3'側に非ヒト動物のGPC3遺伝子の3'非翻訳領域が付加されたヒトGPC3遺伝子をコードするDNAを含む、DNA構築物を含む。また、別の一態様において、本発明のDNA構築物は、5'側にベータグロビンの第2エクソン、同イントロンおよび同第3エクソンが付加され、かつ、3'側に非ヒト動物のGPC3遺伝子の3'非翻訳領域、薬剤選択マーカーおよび組換え酵素基質配列が付加されたヒトGPC3遺伝子をコードするDNAを含む、DNA構築物を含む。前記ベータグロビンは、特に限定されないが、好ましくは、当該遺伝子改変非ヒト動物由来のベータグロビンである。例えば、遺伝子改変非ヒト動物がマウスである場合、マウスベータグロビンであることが好ましいが、他のベータグロビン（例えばラビットのベータグロビン等）でもよい。3'側に付加する非ヒト動物のGPC3の3'非翻訳領域の長さは、好ましくは約800bp、あるいはそれ以上である。他方、本発明のノックインベクターにおいて、ヒトGPC3遺伝子をコードするDNAは、通常、cDNAであることができる。ヒトGPC3のcDNAは、好ましくはそのコーディング配列からなることができる。たとえば、配列番号：10に示す塩基配列は、ヒトGPC3のcDNA中、開始コドン(atg)から終止コドン(tga)を含み、ヒトGPC3の全長アミノ酸配列（シグナル配列を含む580アミノ酸）をコードしている。

【0050】

非限定一態様において、本発明のDNA構築物は、5'側にベータグロビンの第2エクソン、同イントロンおよび同第3エクソンが付加され、かつ、3'側にベータグロビンの3'非翻訳領域が付加されたヒトGPC3遺伝子をコードするDNAを含む、DNA構築物を含む。また、別の一態様において、本発明のDNA構築物は、5'側にベータグロビンの第2エクソン、同イントロンおよび同第3エクソンが付加され、かつ、3'側に非ヒト動物のベータグロビンの3'非翻訳領域、薬剤選択マーカーおよび組換え酵素基質配列が付加されたヒトGPC3遺伝子をコードするDNAを含む、DNA構築物を含む。前記ベータグロビンは、特に限定されないが、好ましくは、当該遺伝子改変非ヒト動物由来のベータグロビンである。例えば、遺伝子改変非ヒト動物がマウスである場合、マウスベータグロビンであることが好ましいが、他のベータグロビン（例えばラビットのベータグロビン等）でもよい。

以上のようなDNA構築物の構造の例として、次のような塩基配列を含むDNA構築物を示すことができる；

5'-hGPC3)のコーディング配列（配列番号：10）-hp7配列（配列番号：11）-polyA付加シグナル（配列番号：12）-3'；

あるいは

5'-マウスのベータグロビンの第2エクソン（配列番号：14）-イントロン（配列番号：15）、第3エクソン（配列番号：16）-hGPC3遺伝子のコーディング配列（配列番号：10）-マウスベータグロビンの第3エクソン中のpolyA付加シグナル-3'。

更に上記の構造において、その5'側上流にはマウスGPC3遺伝子の5'側上流配列を配置することもできる。マウスGPC3遺伝子の5'側上流配列には、たとえば翻訳開始点の上流800bpを用いることができる。一方、上記構造の3'側下流にも同様に、マウスGPC3遺伝子の3'側下流配列を配置することもできる。マウスGPC3遺伝子の3'側下流配列には、たとえば終止コドンの下流領域の800bpを用いることができる。

【0051】

本発明における配列特異的に作用する組換え酵素としては、例えば、Cre、Dre、Flpなどを使用することができる。ゲノム領域に挿入する基質配列に合わせて、特異的な組換え酵素を使用する。すなわち、Creに対してはloxP配列、Dreに対してはRox配列、Flpに対してはFrt配列を使用する。ここで、「loxP配列」はATAACTTCGTATAGCATACATTATACG

AAGTTATの塩基配列（配列番号：7）、「Rox配列」はTAACTTTAAATAATTGGCATTATTTAAAGTTAの塩基配列（配列番号：8）、「Frt配列」はGAAGTTCCTATTCTCTAGA AAGTATAGGAACTTCの塩基配列（配列番号：9）を利用することができるが、これに限定されるものではない。

【0052】

本発明における薬剤選択マーカーとしては、例えば、ポジティブ選択用として例えばネオマイシン耐性遺伝子(neo)、ハイグロマイシンBホストトランスフェラーゼ遺伝子などを使用することができ、ネガティブ選択用として例えば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遺伝子などを使用することができる。

【0053】

非限定の一態様において、本発明の「DNA構築物を保持するノックインベクター」とは、前記非ヒト動物を作製するためのDNA構築物を、相同組換えによって、宿主中の標的遺伝子領域に挿入する能力を有するベクターであり、前記非ヒト動物を作製するためのDNA構築物の5'側に5'アーム（標的領域の5'上流の塩基配列と相同な塩基配列）が配置され、3'側に3'アーム（標的領域の3'下流の塩基配列と相同な塩基配列）が配置されている。本発明においてノックインベクターは、前記非ヒト動物を作製するためのDNA構築物が、宿主中の標的遺伝子の同一読み取り枠に挿入されるように構築される。一態様において、ノックインベクターにおいて、任意の外来遺伝子は、その翻訳開始点が、標的遺伝子の翻訳開始点と一致するように、当該翻訳開始点が含まれるエクソン内に挿入されていることが好ましい。この場合、ノックインベクターにおいて、任意の外来遺伝子の翻訳開始点の5'側には、標的遺伝子の翻訳開始点よりも上流の塩基配列が配置されていることが好ましい。別の一態様において、ノックインベクターの任意の外来遺伝子の5'側にエクソン・イントロン構造配列が付加されている場合には、当該エクソン・イントロン構造の5'側末端が、標的遺伝子の翻訳開始点と一致するように、当該翻訳開始点が含まれるエクソン内に挿入されていることが好ましい。この場合、ノックインベクターにおいて、前記エクソン・イントロン構造の5'側末端の5'側上流には、標的遺伝子の翻訳開始点よりも上流の塩基配列が配置されていることが好ましい。

【0054】

また、本発明のノックインベクターは、宿主細胞内において複製する能力を有することが好ましい。このようなベクターは、例えば、前記非ヒト動物を作製するためのDNAを公知のベクターに挿入することにより構築することができる。ノックインベクターは遺伝子工学に利用されるベクターであれば特に限定されず、公知のベクターとしては、例えば、プラスミドベクター、コスミドベクター、細菌人工染色体（BAC）ベクター、酵母人工染色体（YAC）ベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターその他のウイルスベクター等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0055】

非限定の一態様において、本発明の「ノックインベクターが導入された形質転換細胞」は、前記非ヒト動物を作製するためのDNAを保持するノックインベクターが導入された細胞である。別の一態様において、本発明の形質転換細胞は、5'側にエクソン・イントロン構造配列が付加され、かつ、3'側に非ヒト動物のGPC3遺伝子の3'非翻訳領域が付加されたヒトGPC3遺伝子をコードするDNAが、非ヒト動物のゲノム上に存在する内因性GPC3遺伝子の同一読み取り枠に挿入されている細胞である。

【0056】

さらに別の一態様において、本発明の形質転換細胞は、5'側にエクソン・イントロン構造配列が付加され、かつ、3'側に非ヒト動物のベータグロビンの3'非翻訳領域が付加されたヒトGPC3遺伝子をコードするDNAが、非ヒト動物のゲノム上に存在する内因性GPC3遺伝子の同一読み取り枠に挿入されている細胞である。ノックインベクターが導入される宿主細胞は、前記非ヒト動物の細胞または前記非ヒト動物の細胞に分化可能な細胞（細胞の集団を含む）である。このような宿主細胞としては、目的に応じて種々の細胞を用いることができ、例えば、胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能性幹細胞（iPS細胞）などの多能性

10

20

30

40

50

幹細胞、精子幹細胞などの生殖細胞へ分化する能力を有する生殖系列幹細胞、受精卵が挙げられる。前記宿主細胞への前記ノックインベクターの導入は、エレクトロポレーション法などの公知の方法で行うことができる。あるいは本発明は、本発明のノックインベクターで形質転換された細胞、当該細胞から発生した遺伝子改変非ヒト動物、そして更に当該遺伝子改変非ヒト動物にがん細胞を移植または発がんを誘導したモデル動物を提供する。また本発明は、これらの遺伝子改変非ヒト動物やモデル動物によって、抗原結合物質や、がんの治療作用を評価するための被験物質の、細胞増殖抑制作用、安全性、あるいは薬物動態等の特性を評価する方法に関する。

【0057】

5. ヒトGPC3ポリペプチドを発現する非ヒト動物の作製方法

非限定の一態様において、ヒトGPC3ポリペプチドを発現する非ヒト動物の作製方法は、ヒトGPC3遺伝子をコードするDNAを保持するノックインベクターを宿主細胞に導入することを含む。ヒトGPC3遺伝子をコードするDNAを保持するノックインベクターの導入の方法は、特に限定されないが、ノックインベクターの受精卵前核への顕微注入、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞、精子幹細胞等の生殖系列幹細胞への電気穿孔（エレクトロポーション）法、リポフェクション法、ウイルス感染および形質転換等による導入など、公知の手法を適宜用いることが可能である。

【0058】

非限定の一態様において、上記ノックインベクターは、ゲノム上の標的領域に特異的な標的配列に結合して切断するZinc Finger Nuclease(ZFN)、Transcription Activator-like Effector Nuclease(TALEN)などの人工ヌクレアーゼやClustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat(CRISPR)/Cas9などとともに宿主細胞へ注入する。

【0059】

非限定の一態様においては、ノックインベクターが導入された多能性幹細胞をマイクロインジェクション法などの公知の方法で初期胚に注入し、これを仮親に移植して発生させることにより、キメラ動物を得ることができる。また、このキメラ動物を繁殖させることにより、その後代から、ノックインアレルがホモ接合体化された個体を得ることができる。

別の一態様において、生殖系列幹細胞を用いる場合には、公知の方法にてノックインベクターを導入して標的組換えを行なった細胞を、動物の生殖巣に移植して生殖細胞に分化させ、その動物を交配することにより、あるいは、動物より採取した生殖細胞を利用して、ノックイン動物を作出することが可能である（Kanatsu-Shinohara, M. et al.(2008) Biol.Reprod. 79, 1121-1128）。

【0060】

別の一態様において、受精卵を用いる場合には、人工ヌクレアーゼ等とともにノックインベクターが注入された受精卵を、仮親に移植して発生させることにより、ノックイン動物を作製することが可能である。ZFNおよびTALENを用いた方法に関しては、それぞれ文献（Cui, X. et al.(2011) Nat.Biotechnol. 29, 64-67）および文献（Li, T. et al. (2011) Nucleic Acids Res. 39, 6315-6325）に記載されている。CRISPR/Cas9を用いた方法に関しては、文献（Yang, H. et al.(2013) Cell.in press.）に記載されている。

さらに、別の一態様において、動物の精巣あるいは卵巣にノックインベクターを注入して、エレクトロポレーション等の手法により生殖細胞を、直接、遺伝子組換えし、その後、交配を行うことなどによりノックインアレルを有する個体を得ることも可能である（Ni u, Y. et al.(2008) J.Genet.Genomics. 35,701-714）。

【0061】

本発明において、遺伝子改変非ヒト動物は、ノックインアレルをホモで有するホモ接合体(homozygous)であることも、1コピーのノックインアレルを有するヘミ接合体(hemizygous)であることもできる。繁殖において、改変した形質を安定に保存するためには、ホモ接合体であることが好ましい。なお、GPC3はX染色体上に位置するため、メス(XX)の場合はホモ接合体となりえるが、オス(XY)の場合はヘミとなる。一方メスのヘミ接合体は、ノックインアレルの存在によってヒトGPC3を発現するが、内因性のGPC3アレルを欠損

10

20

30

40

50

した状態にあるので、その発現も抑制される。

【0062】

あるいは本発明は、以下の工程を含むヒトGPC3ポリペプチドを発現する非ヒト動物の製造方法に関する：

- (A) 非ヒト動物の幹細胞に本発明のノックインベクターを導入して非ヒト動物の幹細胞ゲノムの内因性GPC3アレルにヒトGPC3をコードする遺伝子を組み込む工程；
- (B) 工程(A)の非ヒト動物幹細胞を同じ非ヒト動物の初期胚に移植する工程；
- (C) 工程(B)の初期胚を仮親の非ヒト動物の子宮に移植して発生させ、体細胞にノックインベクターが導入されたゲノムを有する非ヒト動物のキメラ動物を得る工程；および
- (D) 工程(C)のキメラ動物を繁殖させて、その後代から、ノックインアレルがホモ接合体化された個体を得る工程。

10

【0063】

あるいは本発明は、以下の工程を含むヒトGPC3ポリペプチドを発現する非ヒト動物の製造方法に関する：

- (A) 非ヒト動物の受精卵に本発明のノックインベクターを導入して非ヒト動物の受精卵ゲノムの内因性GPC3アレルにヒトGPC3をコードする遺伝子を組み込む工程；
- (B) 工程(A)の非ヒト動物受精卵を仮親の非ヒト動物の子宮に移植して発生させ、体細胞にノックインベクターが導入されたゲノムを有する非ヒト動物を得る工程；および
- (C) 工程(B)の非ヒト動物を繁殖させて、その後代から、ノックインアレルがホモ接合体化された個体を得る工程。

20

本発明の製造方法において、ノックインベクターは、通常、ヒトGPC3のcDNAを発現可能に保持し、かつヒトGPC3のcDNAとその発現制御領域を含む発現カセットを非ヒト動物のゲノム上の内因性GPC3アレルに組み込むための組み換え領域に挟まれている。

【0064】

6. ヒトGPC3ポリペプチドを発現する非ヒト動物を用いた被験物質の評価方法

非限定の一態様において、本発明の非ヒト動物は、被験物質における、安全性、疾患の治療効果、薬物動態、体内分布など種々の評価に利用することが可能である。従って、本発明は、このような本発明の非ヒト動物を利用した被験物質の評価方法をも提供する。別の一態様において、本発明は、被験物質における、安全性、疾患の治療効果、薬物動態、体内分布など種々の評価および/またはスクリーニングに用いるための非ヒト動物を含む。さらに別の一態様において、本発明は、被験物質における、安全性、疾患の治療効果、薬物動態、体内分布など種々の評価および/またはスクリーニングに用いるための、本発明の非ヒト動物の使用をも含む。

30

【0065】

本発明の評価方法に用いる「被験物質」としては、特に限定されるものではなく、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出物などが挙げられる。好ましくはヒトGPC3に対する抗体であり、例えば、WO2003/000883, WO2004/022739, WO2006/006693, WO2007/047291, WO2006/046751, WO2009/041062, 及びWO2016/047722等に記載される公知の抗体が挙げられる。被験物質の非ヒト動物への投与は、例えば、尾静脈投与、皮下投与、腹腔内投与、経口投与、経鼻投与、経皮投与、経肺投与などで行うことができるが、これらに限定されない。

40

【0066】

被験物質の評価の態様としては、以下が挙げられる。例えば、本発明の非ヒト動物に、被験物質を投与し、血漿中のサイトカイン（例えば、IFN-gamma、IL-10、IL-17、IL-2、IL-4、IL-6およびTNFが含まれるが、これらに限定されない。）の濃度を測定することにより、被験物質の生体に対する安全性を評価することができる。より具体的には、サイトカインレベルを、対照における同じサイトカインのレベルと比較して、両者に違いが見られた場合に、被験化合物の安全性のリスクが示される。ここで「安全性のリスク」とは、サイトカインレベルの変化によって、生体において何らかの不利益をもたらす生体反応

50

が予測されることをいう。先に例示したIFN-gamma、IL-10、IL-17、IL-2、IL-4、IL-6あるいはTNF等に代表されるサイトカインの、生体内における役割はよく知られていて、疾患の治療における各サイトカインレベルの変化と、生体反応の関連についても多くの情報が蓄積されている。したがって当業者であれば、サイトカインレベルの変化によって示唆される安全性のリスクを予測することができる。このとき、当該非ヒト動物の1つまたは複数の臓器におけるヒトGPC3遺伝子の発現レベルが、マウス、サル又はヒトと同等である場合、当該非ヒト動物を用いた安全性試験結果を、マウス、サル又はヒトに外挿し、マウス、サル又はヒトにおける影響を予測することも可能となる。別の一態様において、当該非ヒト動物は、ヒトGPC3を発現するがん細胞を含んでいてもよい。

【0067】

また、ヒトGPC3ポリペプチドを発現するがん細胞を含む本発明の非ヒト動物に、被験物質を投与し、がん細胞の増殖が抑制されたか否かを測定することにより、当該被験物質の治療効果を評価することができる。ここで、治療効果は、抗腫瘍効果又は細胞傷害活性と言い換えても良い。非ヒト動物に含まれるがん細胞の増殖が抑制されたか否かは、がん細胞のサイズ及びその変化を計測することにより評価することが可能である。

【0068】

ヒトGPC3ポリペプチドを発現するがん細胞を含む本発明の非ヒト動物は、ヒトGPC3ポリペプチドを発現するがん細胞を移植した非ヒト動物を含む。前述のとおり、非限定の一態様において、ヒトGPC3ポリペプチドを発現する非ヒト動物は、ヒトGPC3ポリペプチドに対して免疫寛容を示す。したがって、本発明のヒトGPC3ポリペプチドを発現する非ヒト動物に、ヒトGPC3ポリペプチドを発現するがん細胞を移植しても、当該非ヒト動物が当該がん細胞に免疫応答を示すことはない。そのため、本発明の非ヒト動物をモデルとして使用することにより、被験物質の治療効果をより正確に評価することが可能となる。

【0069】

別の一態様において、ヒトGPC3ポリペプチドを発現するがん細胞を含む本発明の非ヒト動物は、がんを発症した本発明の非ヒト動物である。当該がんは、自然発症したもので、人為的に発症を誘導させたものでもよい。がんの発症を誘導する非ヒト動物モデル及びその作製方法は公知である。具体的には、例えば、非ヒト動物にインスリン抵抗性を惹起し、高脂肪食負荷を行うことによって、肝炎、肝線維化、肝硬変へと進行する病態を発症し、かつ当該病態進行に付随する肝がんを発症する動物モデルおよびその作製方法（WO2011013247 A1）が知られている。また、CDAHFD（Choline-deficient, L-amino acid-defined high fat diet containing 0.1% methionine）を給餌することによって、肝炎、肝線維化、肝硬変へと進行する病態を発症する動物モデルおよびその作製方法（International Journal of Experimental Pathology, 2013 Apr;94(2):93-103.）が知られており、当該動物モデルへのCDAHFDの給餌をさらに継続することで、肝がんを発症させることも可能である。

【0070】

したがって本発明は、被験化合物によるがんの治療効果を評価するためのモデル動物を提供する。本発明に基づくがんの治療効果を評価するためのモデル動物は、本発明の遺伝子改変非ヒト動物を利用して製造することができる。すなわち本発明は、次の工程を含む、被験化合物によるがんの治療効果を評価するためのモデル動物の製造方法に関する：

（A）非ヒト動物の幹細胞に本発明のノックインベクターを導入して非ヒト動物の幹細胞ゲノムの内因性GPC3アレルにヒトGPC3をコードする遺伝子を組み込む工程；

（B）工程（A）の非ヒト動物幹細胞を同じ非ヒト動物の初期胚に移植する工程；

（C）工程（B）の初期胚を仮親の非ヒト動物の子宮に移植して発生させ、体細胞にノックインベクターが導入されたゲノムを有する非ヒト動物のキメラ動物を得る工程；

（D）工程（C）のキメラ動物を繁殖させて、その後代から、ノックインアレルがホモ接合体化された個体を得る工程；および

（E）工程（D）のホモ接合体個体にがん細胞を移植しまたはがんの発症を誘導して、がんの治療効果を評価するためのモデル動物とする工程。

【0071】

また、本発明は、被験化合物によるがんの治療効果を評価するための、別のモデル動物も提供する。本発明に基づくがんの治療効果を評価するためのモデル動物は、本発明の遺伝子改変非ヒト動物を利用して製造することができる。すなわち本発明は、次の工程を含む、被験化合物によるがんの治療効果を評価するためのモデル動物の製造方法に関する：

(A) 非ヒト動物の受精卵に本発明のノックインベクターを導入して非ヒト動物の受精卵ゲノムの内因性GPC3アレルにヒトGPC3をコードする遺伝子を組み込む工程；

(B) 工程(A)の非ヒト動物受精卵を仮親の非ヒト動物の子宮に移植して発生させ、体細胞にノックインベクターが導入されたゲノムを有する非ヒト動物を得る工程；および

(C) 工程(B)の非ヒト動物を繁殖させて、その後代から、ノックインアレルがホモ接合体化された個体を得る工程；および

(D) 工程(C)のホモ接合体個体にがん細胞を移植しまたはがんの発症を誘導して、がんの治療効果を評価するためのモデル動物とする工程。

【0072】

非限定の一態様において、本発明の非ヒト動物に移植されるがん細胞としては、例えば、卵巣がん、前立腺がん、乳がん、食道がん、腎臓がん、子宮がん、肝がん、肺がん、膵臓がん、胃がん、膀胱がん又は大腸がん細胞等が好適に挙げられる。なお、本明細書に記載の「がん」は、卵巣がん、胃がん等の上皮性の悪性腫瘍のみならず、慢性リンパ性白血病やホジキンリンパ腫等の造血器がんを含む非上皮性の悪性腫瘍も意味するものとする。また本発明における移植がん細胞は、GPC3を標的とする薬剤の作用を評価するために、GPC3を発現しているがん細胞であることが望ましい。

【0073】

本発明において遺伝子改変非ヒト動物に移植するがん細胞は、任意の動物に由来するがん細胞であることができる。中でも、宿主となる非ヒト動物と共通の種に由来するがん細胞は、移植がん細胞として好ましい(同種移植)。更に、実験動物用のマウスやラットのような、系統が管理された種を遺伝子改変非ヒト動物として利用することによって、種のみならず、同じ系統に由来するがん細胞を移植することもできる(同系移植)。このように、できるだけ遺伝的な共通性が高いがん細胞を移植がん細胞とすることにより、細胞自身に対する宿主の免疫応答等の被験化合物に起因しない作用が抑制され、被験化合物のがんに対する治療効果をより特異的に評価することができる。本発明において、がん細胞は、たとえば皮下などに移植することができる。あるいは特定の組織内に移植することによって、被験化合物の組織への移行性を評価することもできる。

【0074】

また、被験物質を投与した本発明の非ヒト動物において、被験物質の血中濃度を測定することにより、被験物質の有効血中濃度または薬物動態学的特性を評価することもできる。ここで「薬物動態学的特性」とは、動物の体内における被験物質の血中半減期や消失速度等の特性を意味する。例えば、非限定の一態様においては、有効血中濃度が低い、血中半減期が長い、または消失速度が遅い物質ほど、薬物動態学的特性は優れていると判断される。被験物質の血中濃度の測定の手法については特に限定されるものではない。被験物質がタンパク質(抗体を含む)である場合には、例えば、ELISA法が挙げられ、被験物質が低分子化合物である場合には、例えば、液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)法が挙げられる。血中濃度から薬物動態学的特性を評価する方法論については、文献(Igawa et al. (2010) Nat. Biotechnol. 28:1203-1207)を参照のこと。上記本発明の被験物質の評価方法を利用することにより、所望の活性を有するヒトGPC3標的治療剤を効率的に選抜することが可能である。従って、本発明は、このような抗体の選抜方法をも提供する。

【0075】

また、被験物質を投与した本発明の非ヒト動物において、被験物質の体内分布を観察することにより、当該被験物質の目的部位への到達度や生体内分布特性を評価することもできる。例えば、ヒトGPC3を発現するがん細胞を移植した本発明の非ヒト動物に、被験物

質としてイメージング剤を結合したヒトGPC3標的治療薬を投与し、当該イメージング剤を検出することで、被験物質の体内分布を観察することができる。イメージングに使用される放射性核種には、SPECTイメージング用のI-131、I-123、In-111およびTc-99m、ならびにPETイメージング用のF-18、I-124、Cu-64、Y-86などがあるが、これらに限られない。非限定の一態様において、イメージング剤検出の結果、当該被験物質のがん細胞への集積度が高い場合には、当該被験物質はがん細胞への特異性が高いと評価される。

【0076】

非限定の一態様として、本発明は、さらに、以下の工程（１）～（２）：

（１）本発明の非ヒト動物、その臓器、組織または細胞と被験物質を接触させる工程、及び
（２）該非ヒト動物個体、その臓器、組織または細胞に対する被験物質の薬効及び毒性のいずれか、または両方を指標として、候補被験物質を選択する工程、を含む、悪性腫瘍性疾患又は自己免疫疾患の治療薬のスクリーニング方法を提供する。別の一態様において、当該非ヒト動物は、ヒトGPC3を発現するがん細胞を移植されていてもよい。

【0077】

非限定の一態様において、本発明の非ヒト動物個体、その臓器、組織または細胞に対する被験物質の治療効果（薬効）及び／又は安全性（毒性）を測定し、薬効が認められたまたは高い被験物質を選択したり、毒性が低いまたは無い被験物質を選択したりすることができる。また、比較対照として薬効を有する物質を使用して同様に測定を実施し、対照に比べて薬効が高い、または毒性が低い被験物質を選択することもできる。薬効としては、特に制限されるものではないが、例えば細胞増殖抑制作用、細胞傷害作用、または腫瘍増殖抑制作用などが挙げられる。

【0078】

例えば、本発明は、以下の工程（１）～（３）：

（１）ヒトGPC3結合ドメインを含む抗原結合分子を被験物質として、ヒトGPC3を発現するがん細胞を移植された本発明の非ヒト動物の第１の個体に投与する工程、

（２）該がん細胞に対する該被験物質の細胞増殖抑制効果及び薬物動態学的特性のいずれか、または両方を測定する工程、及び

（３）該被験物質の細胞増殖抑制効果及び薬物動態学的特性のいずれか、または両方を、前記第１の個体とは異なる、ヒトGPC3を発現するがん細胞を移植された本発明の非ヒト動物の第２の個体に投与された対照抗体の細胞増殖抑制効果及び薬物動態学的特性のいずれか、または両方と比較する工程、を含む、悪性腫瘍性疾患の治療薬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工程は、更に付加的に、（４）前記工程（３）の結果、細胞増殖抑制効果及び薬物動態特性のいずれか、または両方が優れた被験物質を選択する工程、を含むことができる。本発明において、対照抗体の細胞増殖抑制効果及び薬物動態特性は、必ずしも両方を同時に満足するものでなくても良い。むしろ、いずれかにおいて、一定の評価を得ているものを利用して候補をスクリーニングする過程を繰り返すことによって、結果的に、両者の特性においてより優れた作用を持つ被験物質を効率的にしばりこむことができる。

【0079】

上記本発明の被験物質の評価方法を利用することにより、所望の活性を有するヒトGPC3に対する抗体を効率的に生産することが選抜である。従って、本発明は、このような抗体の選抜方法をも提供する。

【0080】

ヒトGPC3を発現するがん細胞株を移植し、次いで被験物質としてのヒトGPC3に対する抗体を投与した非ヒト動物において、がん細胞株の増殖が抑制されたか否かを測定し、がん細胞の増殖を抑制する抗体を選抜することにより、ヒトGPC3を発現するがん細胞の増殖を効率的に阻害する抗体を取得することができる。また、ヒトGPC3に対する抗体を投与した非ヒト動物において、該抗体の血中濃度を測定し、所望の血中濃度を有する抗体を選抜することにより、所望の体内動態を有する、ヒトGPC3に対する抗体を取得することができる。こうして活性の評価および選抜を行った抗体がマウスモノクローナル抗体など

である場合には、当該抗体をキメラ化またはヒト型化して、ヒトに投与した場合に抗原性が少なく、ひいては副作用の少ない抗体を取得することができる。そして、このようにして得られた抗体はGPC3を発現するがんの治療に有用な治療薬に用いることができる。

【0081】

非限定の一態様において、上記方法により評価、スクリーニング又は選抜された治療薬の対象となるがんは、標的となるGPC3が高発現しているがんであればどのようながんも該当する。そのようながんの一例として、乳がん、子宮頸がん、大腸がん、子宮体がん、頭頸部がん、肝臓がん、肺がん、悪性カルチノイド (Malignant carcinoid)、悪性神経膠腫 (Malignant glioma)、悪性リンパ腫 (Malignant lymphoma)、悪性黒色種 (Malignant melanoma)、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、腎臓がん、皮膚がん、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、尿路上皮がん等から選択されるがんが例示される。

10

【0082】

7. CD3

T細胞受容体 (T-cell Receptor, TCR) 複合体は、主にT細胞上に発現する抗原受容体分子である。抗原と結合するTCR α 鎖および β 鎖 (あるいは δ 鎖および γ 鎖) と、主に細胞内へのシグナル伝達機能を有する複数のCD3分子 (CD3イプシロン (ϵ)、CD3デルタ (δ)、CD3ガンマ (γ)) およびCD247から構成される。

【0083】

ここで遺伝子名の記述方法に関し、一般的に、生物種によってはCD3 ϵ をCD3E、CD3 δ をCD3D、CD3 γ をCD3Gなどと表記することもあるが、本明細書においては、生物種に依存することなく、CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 γ という遺伝子表記を用いる。すなわち本発明においてCD3 ϵ にはCD3EおよびCD3eが含まれ、CD3 δ にはCD3DおよびCD3dが含まれ、CD3 γ にはCD3GおよびCD3gが含まれる。例えば、本明細書で「ヒトCD3 ϵ 」と記載するときはヒト遺伝子のCD3イプシロンを意味し、「マウスCd3 ϵ 」と記載するときはマウス遺伝子のCd3イプシロンを意味する。また、本明細書で「ヒトCD3 δ 」と記載するときはヒト遺伝子のCD3デルタを意味し、「マウスCd3 δ 」と記載するときはマウス遺伝子のCd3デルタを意味する。さらに、本明細書で「ヒトCD3 γ 」と記載するときはヒト遺伝子のCD3ガンマを意味し、「マウスCd3 γ 」と記載するときはマウス遺伝子のCd3ガンマを意味する。

20

30

【0084】

本発明において、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ およびCD3 γ からなる群より選択される1種以上のCD3としては特に制限はないが、例えばヒトCD3 ϵ であってよい。また、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ およびCD3 γ からなる群より選択される2種以上のCD3であってもよく、例えばヒトCD3 ϵ およびCD3 δ 、あるいはヒトCD3 ϵ およびCD3 γ 、あるいはヒトCD3 δ およびCD3 γ であってもよい。また、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ 、およびCD3 γ からなるCD3、すなわち3種すべてであってもよい。

【0085】

8. ヒトCD3遺伝子を機能的に発現する非ヒト動物

本発明はまた、内因性のCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のCD3遺伝子がゲノム上で機能的に欠損し、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のヒトCD3遺伝子を機能的に発現する遺伝子改変非ヒト動物に関する。

40

【0086】

本発明における「内因性の遺伝子がゲノム上で機能的に欠損する」とは、非ヒト動物ゲノム上における内因性の標的遺伝子 (例えば、CD3 ϵ 、CD3 δ 又はCD3 γ) がその機能を発現しない限り、特にその態様は限定されず、非ヒト動物ゲノム上における内因性の標的遺伝子 (例えば、CD3 ϵ 、CD3 δ 又はCD3 γ) または蛋白質が発現しないものであってよい。例えば、相同組み換え技術やクリスパー・キャス (CRISPR/Cas9)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Zinc Finger Nucleases)、あるいはテイレン (TALEN) 等のゲノム編

50

集技術によるノックアウト技術を用いて、非ヒト動物のゲノム上で、標的とした遺伝子を欠損（無効化）させてもよいし、siRNA等を用いて標的とした遺伝子の発現を完全に抑制させる手法を用いてもよい。また、内因性の標的遺伝子が発現しない限り、例えば、ノックイン技術を用いて、非ヒト動物ゲノム上の標的遺伝子の位置に外来遺伝子を挿入してもよい。

【0087】

本発明における非限定の一態様において、内因性のCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のCD3遺伝子がゲノム上で機能的に欠損する動物は、ヒトCD3遺伝子などの外来CD3を発現させない場合、成熟T細胞の分化および生成が阻害される。ここで成熟T細胞とは、例えばCD4またはCD8のどちらか一方（両方ではなく）が陽性のT細胞（それぞれCD4単一陽性細胞、CD8単一陽性細胞という）である。より具体的には、ヒトCD3遺伝子などの外来CD3を発現しない場合、内因性のCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のCD3遺伝子がゲノム上で機能的に欠損する動物の脾臓におけるCD4単一陽性細胞およびCD8単一陽性細胞の合計は、野生型のレベル、または通常正常とされるレベルに比べ、例えば70%以下、好ましくは60%以下、より好ましくは50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下、5%以下、3%以下、または1%以下である。成熟T細胞の計数を行う発達ステージは、野生型において成熟T細胞が生成するステージである限りいずれでもよいが、一般にアダルト（繁殖可能）となる齢であることが好ましく、例えばマウスであれば8～12週齢、例えば12週齢であってよい。

【0088】

また本発明における非限定の一態様において、内因性のCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のCD3遺伝子がゲノム上で機能的に欠損する動物は、ヒトCD3遺伝子などの外来CD3を発現しない場合、抗体産生が阻害される。ここで抗体の型は特に限定されず、例えばIgG（例えばIgG1）の産生が阻害されることであってもよく、および/または、IgEの産生が阻害されることであってもよい。抗体産生が阻害されているかどうかは、外来抗原を接種して、抗体が産生されるか否か、あるいは抗体産生量を測定することにより決定することができる。外来抗原としては特に制限はなく、例えばニワトリ卵白アルブミン（OVA）などの所望の抗原を用いて抗体産生を確認することができる。ヒトCD3遺伝子などの外来CD3を発現しない場合、内因性のCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のCD3遺伝子がゲノム上で機能的に欠損する動物における抗体価は、野生型のレベルまたは通常正常とされるレベルに比べ、例えば70%以下、好ましくは60%以下、より好ましくは60%以下、50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下、5%以下、3%以下、または1%以下である。抗体産生を測定する発達ステージは、野生型において抗体が生成するステージである限りいずれでもよいが、一般にアダルトとなる齢であることが好ましく、例えばマウスであれば8～12週齢、例えば12週齢であってよい。

【0089】

本発明において、機能を欠損させる内因性CD3遺伝子は、CD3 ϵ 、CD3 δ およびCD3 γ からなる群より選択される1種以上のいずれでもよいが、例えば内因性CD3 ϵ 遺伝子を少なくとも機能的に欠損しているものであってよい。また、2種以上を機能的に欠損するものも好ましく、例えば内因性CD3 ϵ およびCD3 δ 、あるいは内因性CD3 ϵ およびCD3 γ 、あるいは内因性CD3 δ およびCD3 γ を少なくとも機能的に欠損している。また、内因性CD3 ϵ 、CD3 δ およびCD3 γ をすべて機能的に欠損しているものであってよい。

【0090】

本発明における「ヒトCD3遺伝子を機能的に発現する」とは、非ヒト動物のT細胞上にヒトCD3分子が発現しているが、該非ヒト動物において、T細胞を含めた免疫担当細胞が正常な機能を維持している状態を意味する。ここで、免疫担当細胞が正常な機能を維持しているかどうかは、例えば、該非ヒト動物のT細胞の分化過程、T細胞の成熟過程、胸腺重量、胸腺細胞数、脾臓における機能的T細胞のCD4及びCD8陽性細胞の比率等を指標に

判断することができる。

本発明の遺伝子改変非ヒト動物は、好ましくは成熟T細胞を分化・生成する能力を有する。すなわち本発明においてヒトCD3遺伝子を機能的に発現するとは、当該動物において成熟T細胞が生成されることであってもよい。例えば、本発明の遺伝子改変非ヒト動物がマウスの場合、T細胞の分化および成熟過程が影響を受けず、胸腺重量や胸腺細胞数が正常なマウスと同等であることが望ましい。ここで、正常なマウスにおける胸腺細胞数と同等であるとは、遺伝子改変非ヒト動物の胸腺細胞数が少なくとも 1×10^4 個以上、好ましくは 1×10^5 個以上、 5×10^5 個以上、 1×10^6 個以上、 5×10^6 個以上、 1×10^7 個以上、特に好ましくは 5×10^7 個以上であり、遺伝子改変非ヒト動物の胸腺細胞数が $5 \sim 6 \times 10^7$ 個の範囲であることが最も好ましい。

10

また、機能的T細胞の表面マーカーであるCd4あるいはCd8の陽性細胞の比率も、正常なマウスと同等であることが望ましい。ここで、正常なマウスにおける成熟T細胞のCd4およびCd8陽性細胞の比率と同等であるとは、脾臓において評価した場合に、成熟T細胞全体の細胞数におけるCd4陽性細胞の比率が、好ましくは、 $10 \sim 40\%$ 、 $12 \sim 38\%$ 、 $14 \sim 36\%$ 、 $16 \sim 34\%$ 、 $18 \sim 32\%$ 、特に好ましくは $20 \sim 30\%$ の比率である。また、成熟T細胞全体の細胞数におけるCd8陽性細胞の比率が、好ましくは、 $5 \sim 30\%$ 、 $7 \sim 28\%$ 、 $9 \sim 26\%$ 、 $11 \sim 24\%$ 、 $13 \sim 22\%$ 、特に好ましくは $15 \sim 20\%$ の比率である。

非ヒト動物の胸腺重量および胸腺細胞数および末梢でのCD4陽性細胞、CD8陽性細胞の存在比率の評価方法としては、例えば、後述する実施例に記載の解析方法等、周知の解析方法を当業者が適宜用いることによって評価することができる。

20

ヒトCD3置換マウスのT細胞を含めた免疫担当細胞は、マイトジェン刺激後の細胞増殖能が、野生型マウスと比較して同等であることが望ましい。同等であるとは、マイトジェン刺激後のチミジン取り込み、プロモデオキシウリジンの取り込み、MTSアッセイ、CFSE [5-(and 6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester]アッセイ等による評価値が、好ましくは野生型の $65\% \sim 135\%$ 、 $70\% \sim 130\%$ 、 $75\% \sim 125\%$ 、 $80\% \sim 120\%$ であり、特に好ましくは $85 \sim 115\%$ である。

【0091】

また本発明における非限定の一態様において、本発明の遺伝子改変非ヒト動物は、ヒトCD3遺伝子を発現しない対照（当該動物と同じ組み合わせで内因性のCD3遺伝子を欠損する動物）と比較して、成熟T細胞の生成能が上昇している。より具体的には、脾臓におけるCD4単一陽性細胞およびCD8単一陽性細胞の合計が、当該対照に比べ、例えば1.3倍以上、好ましくは1.5倍以上、より好ましくは1.6倍以上、2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、50倍以上、または100倍以上である。成熟T細胞の計数を行う発達ステージは、本発明の動物において成熟T細胞が生成するステージである限りいずれでもよいが、一般にアダルトとなる齢であることが好ましく、例えばマウスであれば8～12週齢、例えば12週齢であってよい。

30

【0092】

また、本発明の遺伝子改変非ヒト動物は、例えば外来抗原に対する抗体を産生する能力を有する。抗体の型は特に限定されず、例えばIgG（例えばIgG1）であってもよく、あるいはIgEであってもよい。外来抗原は特に限定されず、ニワトリ卵白アルブミン（OVA）などの所望の抗原を用いて抗体産生を確認することができる。

40

【0093】

また本発明における非限定の一態様において、本発明の遺伝子改変非ヒト動物は、ヒトCD3遺伝子を発現しない対照（当該動物と同じ組み合わせで内因性のCD3遺伝子を欠損する動物）と比較して、高い抗体産生能を有する。ここで抗体の型は特に限定されず、例えばIgG（例えばIgG1）であってもよく、IgEであってもよい。抗体産生能が上昇しているかどうかは、外来抗原を接種して抗体が産生されるか否か、あるいは抗体産生量を測定することにより決定することができる。外来抗原としては特に制限はなく、例えばニワトリ卵白アルブミン（OVA）などの所望の抗原を用いて抗体産生を確認することができる。本

50

発明の遺伝子改変非ヒト動物は、当該対照動物に比べ、抗体価が例えば1.3倍以上、好ましくは1.5倍以上、より好ましくは1.6倍以上、2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、50倍以上、または100倍以上である。抗体産生を誘導させる発達ステージは、本発明の動物において抗体が生成するステージである限りいずれでもよいが、一般にアダルトとなる齢であることが好ましく、例えばマウスであれば8～12週齢、例えば12週齢であってよい。抗原の感作や抗体の測定時期は適宜設計してよいが、例えば感作は4週間間隔にて2回行い、100 μ gの抗原を、1回目は完全フロイント・アジュバンドを用いて背部皮下に感作し、その4週間後に不完全フロイント・アジュバンドを用いて同様に背部皮下に感作し、2回目の感作の1週間後に採血して抗体価を測定することができる。

10

【0094】

また本発明における非限定の一態様において、T細胞を含めた免疫担当細胞が正常な機能を維持している状態とは、遺伝改変非ヒト動物の獲得免疫に関する機能（液性免疫、細胞性免疫）が正常な機能を維持している状態を含む。

【0095】

本発明における非限定の一態様において、本発明の遺伝子改変非ヒト動物は、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のヒトCD3遺伝子の全長塩基配列がゲノム上に挿入されている、遺伝子改変非ヒト動物である。ゲノム上に挿入される全長塩基配列に関し、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ およびCD3 γ からなる群より選択される1種以上のCD3としては特に制限はないが、例えばヒトCD3 ϵ の全長塩基配列であってよい。また、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ およびCD3 γ からなる群より選択される2種以上のCD3であってもよく、例えばヒトCD3 ϵ の全長塩基配列およびCD3 δ の全長塩基配列、あるいはヒトCD3 ϵ の全長塩基配列およびCD3 γ の全長塩基配列、あるいはヒトCD3 δ の全長塩基配列およびCD3 γ の全長塩基配列であってもよい。また、ヒトCD3 ϵ の全長塩基配列、CD3 δ の全長塩基配列、およびCD3 γ の全長塩基配列からなるCD3、すなわち3種すべてであってもよい。本発明における非限定の一態様において、CD3遺伝子の「全長塩基配列」とは、細胞外領域、膜貫通領域、及び細胞質領域を含む、CD3分子（CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 γ ）をコードする塩基配列であり、さらに発現調節領域（プロモーター）を含む塩基配列であってもよい。

20

【0096】

本発明の非限定の一態様として、上述した遺伝子改変非ヒト動物が有するT細胞の細胞上で、非ヒト動物由来のT細胞受容体とヒトCD3分子が複合体を形成することを特徴とする、遺伝子改変非ヒト動物を提供する。

30

ここで、CD3 ϵ は、CD3 δ あるいはCD3 γ との二量体を形成し、さらにそれらの二量体がT細胞受容体（TCR） α 鎖、TCR β 鎖とともに複合体を形成することにより、機能的なTCR複合体を形成する。特定の理論に拘束されることは意図しないが、本発明の遺伝子改変非ヒト動物においては、該非ヒト動物のT細胞の細胞上で、非ヒト動物由来のTCR α 鎖、 β 鎖とともに、ヒト由来のCD3 ϵ 、CD3 δ 及び/又はCD3 γ が複合体を形成することができる。

【0097】

40

本発明における非限定の一態様において、上述した本発明の遺伝子改変非ヒト動物は、ヒト癌特異的抗原遺伝子、ヒト免疫チェックポイント遺伝子、及び／又はヒト免疫共刺激分子の遺伝子をさらに発現する、遺伝子改変非ヒト動物であってもよい。ヒト癌特異的抗原とは、癌細胞と健常細胞を区別することを可能とする、癌細胞が発現する抗原を意味し、例えば、細胞の悪性化に伴って発現する抗原、細胞が、がん化した際に細胞表面やタンパク質分子上に現れる異常な糖鎖が含まれる。「免疫チェックポイント」とは、免疫担当細胞上に発現し、リガンドと結合することによって、当該免疫担当細胞に対し免疫応答を阻害するシグナルを伝達する分子をいう。免疫チェックポイントおよびそのリガンドには、例えば、PD-1、CTLA-4、TIM3、LAG3、PD-L1、PD-L2、BTLA2、B7-H3、B7-H4、CD48、CD80、2B4、BTLA、CD160、CD60、CD86、またはVISTA等の分子が含まれるが

50

、これらに限定されない。「免疫共刺激分子」とは、免疫担当細胞上に発現し、リガンドと結合することによって、当該免疫担当細胞に対し免疫応答を活性化するシグナルを伝達する分子をいう。免疫共刺激分子として、例えば、CD28、ICOS、CD137、CD137L、CD40、CD40L、OX40、OX40L、CD27、CD70、HVEM、LIGHT、RANK、RANKL、CD30、CD153、GITR、GITRL等の分子が含まれるが、これに限定されることはない。ヒト癌特異的抗原遺伝子、ヒト免疫チェックポイント遺伝子、及び／又はヒト免疫共刺激分子をさらに発現する上記遺伝子改変動物は、これに限定されることはないが、ヒトCD3遺伝子を発現する遺伝子改変動物とヒト癌特異的抗原遺伝子、ヒト免疫チェックポイント遺伝子及び／又はヒト免疫共刺激分子を発現する遺伝子改変動物を交雑する等、当業者公知の方法を適宜用いることによって作製することができる。

10

【0098】

非限定の一態様において、本発明のヒトCD3遺伝子を機能的に発現する非ヒト動物として、WO2017/010423またはWO2016/085889に開示される遺伝子改変非ヒト動物が例示される。ヒトCD3遺伝子を機能的に発現する非ヒト動物の作成方法もまた、WO2017/010423またはWO2016/085889に開示される方法が例示される。

【0099】

9. ヒトGPC3ポリペプチドを発現し、かつヒトCD3遺伝子を機能的に発現する非ヒト動物

本発明はまた、ヒトGPC3ポリペプチドを発現し、かつヒトCD3遺伝子を機能的に発現する非ヒト動物に関する。

【0100】

非限定の一態様において、本発明の、ヒトGPC3ポリペプチドを発現し、かつヒトCD3遺伝子を機能的に発現する非ヒト動物は、

- (i) 内因性GPC3ポリペプチドの発現を欠損し、ヒトGPC3ポリペプチドを発現し、かつ、
 - (ii) 内因性のCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のCD3遺伝子がゲノム上で機能的に欠損し、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のヒトCD3遺伝子を機能的に発現する、
- 遺伝子改変非ヒト動物である。

【0101】

非限定の一態様において、本発明の、ヒトGPC3ポリペプチドを発現し、かつヒトCD3遺伝子を機能的に発現する非ヒト動物は、本明細書において開示されるヒトGPC3ポリペプチドを発現する非ヒト動物と、本明細書において開示されるヒトCD3遺伝子を機能的に発現する非ヒト動物を交配することによって得ることができる。このとき、目的の非ヒト動物が得られているかどうかは、ヒトGPC3ポリペプチドを発現する非ヒト動物と、ヒトCD3遺伝子を機能的に発現する非ヒト動物を交配し、得られた次世代の個体の遺伝子型を解析し、ヒトGPC3ノックインアレル、非ヒトCD3遺伝子領域欠損アレル、かつヒトCD3遺伝子領域を有するアレルが伝達していることを確認することによって、判断することができる。

30

【0102】

10. ヒトGPC3ポリペプチドを発現し、かつヒトCD3遺伝子を機能的に発現する非ヒト動物を用いた被験物質の評価方法

40

本発明の非限定の一態様として、以下の工程(1)～(2)：

- (1) 非限定の一態様において、本発明の、ヒトGPC3ポリペプチドを発現し、かつヒトCD3遺伝子を機能的に発現する非ヒト動物は、被験物質における、安全性、疾患の治療効果、薬物動態、体内分布など種々の評価に利用することが可能である。従って、本発明は、このような非ヒト動物を利用した被験物質の評価方法をも提供する。別の一態様において、本発明は、被験物質における、安全性、疾患の治療効果、薬物動態、体内分布など種々の評価および/またはスクリーニングに用いるための非ヒト動物を含む。さらに別の一態様において、本発明は、被験物質における、安全性、疾患の治療効果、薬物動態、体内分布など種々の評価および/またはスクリーニングに用いるための、ヒトGPC3ポリペプチドを発現し、かつヒトCD3遺伝子を機能的に発現する非ヒト動物の使用をも含む。

50

【0103】

上記評価方法に用いる被験物質としては、特に限定されるものではないが、好ましくはヒトGPC3に結合するペプチド、たんぱく質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生成物、細胞、細胞抽出物、抗体もしくは抗体断片、または、ヒトCD3に結合するペプチド、たんぱく質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生成物、細胞、細胞抽出物、抗体もしくは抗体断片である。好ましくは、ヒトGPC3に結合する抗体、またはヒトCD3に結合する抗体であり、さらに好ましくは、ヒトGPC3及びヒトCD3に結合する多重特異性抗体である。ヒトGPC3及びヒトCD3に結合する多重特異性抗体の例として、WO2016/047722に記載される公知の抗体が挙げられる。

【0104】

また、本明細書において、「ヒトGPC3ポリペプチドを発現する非ヒト動物を用いた被験物質の評価方法」として開示される種々の評価方法を、ヒトGPC3ポリペプチドを発現し、かつヒトCD3遺伝子を機能的に発現する非ヒト動物を用いて実施することも、当然に可能である。

【0105】

1.1. 抗原結合分子

本明細書における「抗原結合分子」とは、抗原結合ドメインを含む分子であれば特に限定されず、さらに、5アミノ酸程度以上の長さを有するペプチドやタンパク質が含まれていてもよい。生物由来のペプチドやタンパク質に限定されず、例えば、人工的に設計された配列からなるポリペプチドであってもよい。また、天然ポリペプチド、あるいは合成ポリペプチド、組換えポリペプチド等のいずれであってもよい。

【0106】

非限定の一態様において、抗原結合分子の好ましい例として、抗体のFc領域に含まれるFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子を挙げることができる。生体内に投与されたタンパク質の血中半減期を延ばす方法として、目的タンパク質に抗体のFcRn結合ドメインを付加し、FcRnを介したリサイクリング機能を利用する方法が良く知られている。別の一態様において、抗原分子の好ましい例として、抗体を挙げることができる。

【0107】

1.2. 抗体

本明細書において、抗体とは、天然のものであるかまたは部分的もしくは完全合成により製造された免疫グロブリン、又はその断片をいう。抗体はそれが天然に存在する血漿や血清等の天然資源や抗体を産生するハイブリドーマ細胞の培養上清から単離され得るし、または遺伝子組換え等の手法を用いることによって部分的もしくは完全に合成され得る。抗体の例としては免疫グロブリンのアイソタイプおよびそれらのアイソタイプのサブクラスが好適に挙げられる。ヒトの免疫グロブリンとして、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgMの9種類のクラス（アイソタイプ）が知られている。本発明において抗体には、これらのアイソタイプのうちIgG1、IgG2、IgG3、IgG4が含まれ得る。

【0108】

非限定の一態様において、本明細書で提供される抗体は、キメラ抗体である。特定のキメラ抗体が、例えば、米国特許第4,816,567号；および、Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984) に記載されている。一例では、キメラ抗体は、非ヒト可変領域（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサルなどの非ヒト霊長類に由来する可変領域）およびヒト定常領域を含む。さらなる例において、キメラ抗体は、親抗体のものからクラスまたはサブクラスが変更された「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体は、その抗原結合断片も含む。

【0109】

非限定の一態様において、本明細書で提供される抗体は、ヒト化抗体である。ヒト化抗体およびその作製方法は、例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)において総説されており、当該技術分野において知られる種々の手法によっ

10

20

30

40

50

て製造され得る。

【0110】

非限定の一態様において、本明細書で提供される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当該技術分野において知られる種々の手法によって製造され得る。ヒト抗体は、例えば、van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) および Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008) に、概説されている。

【0111】

本発明の抗体は、所望の1つまたは複数の活性を伴う抗体についてコンビナトリアルライブラリをスクリーニングすることによって単離してもよい。例えば、ファージディスプレイライブラリの生成や、所望の結合特性を備える抗体についてそのようなライブラリをスクリーニングするための、様々な方法が当該技術分野において知られている。そのような方法は、例えば、Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) において総説されている。

【0112】

特定の態様において、本明細書で提供される抗体は、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）である。多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる部位に結合特異性を有する、モノクローナル抗体である。多重特異性抗体を作製するための手法は、これらに限定されるものではないが、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖ペアの組み換え共発現 (Milstein and Cuellar, Nature 305: 537 (1983)、WO93/08829、およびTraunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991) 参照)、およびknob-in-hole技術（例えば、米国特許第5,731,168号参照）を含む。多重特異性抗体は、Fcヘテロ二量体分子を作製するために静電ステアリング効果 (electrostatic steering effects) を操作すること (WO2009/089004A1)；2つ以上の抗体または断片を架橋すること（米国特許第4,676,980号およびBrennan et al., Science, 229: 81 (1985)参照）；ロイシンジッパーを用いて2つの特異性を有する抗体を作成すること (Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992) 参照)；「ダイアボディ」技術を用いて二重特異性抗体断片を作製すること (Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) 参照)；および、単鎖Fv (scFv) 二量体を用いること (Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994) 参照)；および、例えばTutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991) に記載されるように三重特異性抗体を調製すること、によって作製してもよい。

【0113】

「オクトパス抗体」を含む、3つ以上の機能的抗原結合部位を伴う改変抗体も、本明細書では抗体に含まれる（例えば、米国特許出願公開第2006/0025576号A1参照）。

【0114】

本明細書で抗体または断片は、特定の抗原と、当該抗原とは別の異なる抗原とに結合する1つの抗原結合部位を含む、「デュアルアクティングFab」または「DAF」も含む（例えば、米国特許出願公開第2008/0069820号参照）

【0115】

特定の態様において、抗体または抗体断片は、参照配列に対して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含み、また、当該配列の翻訳後修飾を含む。翻訳後修飾は、重鎖又は軽鎖N末端のグルタミン又はグルタミン酸のピログルタミル化によるピログルタミン酸への修飾を含むが、これに限定されない。

【実施例】

【0116】

次に、実施例により、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0117】

【実施例1】 ヒトGPC3ノックインマウスの作出

(1) ノックインインベクターの構築

hGPC3ノックイン (hGPC3KI) ベクター-ver.1は、マウスグリピカン-3遺伝子 (mGpc

10

20

30

40

50

3) のゲノム領域がクローニングされている人工染色体 (BAC) クローン上の、Gpc3 遺伝子の標的領域にヒトグリピカン-3 遺伝子 (hGPC3) のコーディング配列 (配列番号: 10)、hp7 配列 (配列番号: 11)、polyA 付加シグナル (配列番号: 12)、loxP 配列 (配列番号: 7)、ネオマイシン耐性 (neo) 遺伝子 (配列番号: 13) を Red/ET システム (GeneBridge) を利用して相同組換えにより導入した。導入の際、mGpc3 の翻訳開始点の直下に、hGPC3 の翻訳開始点を合わせる形で挿入した。ベクターの構成を図 1 (2) に示す。

hGPC3KI ベクター ver.2 は、プラスミドベクターに、mGpc3 遺伝子の標的領域の 5' 側上流領域約 800bp、マウスのベータグロビンの第 2 エクソン (配列番号: 14)、イントロン (配列番号: 15)、第 3 エクソン (配列番号: 16)、hGPC3 遺伝子のコーディング配列、マウスベータグロビンの第 3 エクソン中の polyA 付加シグナル、loxP 配列、neo 遺伝子、マウス Gpc3 遺伝子の標的領域の 3' 側下流領域約 800bp を挿入した。ベクターの構成を図 1 (3) に示す。

hGPC3KI ベクター ver.3 は、プラスミドベクターに、mGpc3 遺伝子の標的領域の 5' 側上流領域約 800bp、マウスのベータグロビンの第 2 エクソン、イントロン、第 3 エクソン、hGPC3 遺伝子のコーディング配列、mGpc3 遺伝子の 3' 非翻訳領域 (配列番号: 17)、mGpc3 遺伝子の標的領域の 3' 側下流領域約 800bp を挿入した。ベクターの構成を図 1 (4) に示す。

【0118】

(2) ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) の設計

mGpc3 遺伝子の翻訳開始点付近で遺伝子二本鎖切断 (Double strand Break、DSB) が起こるように ZFN の設計を行った。ZFN とは任意の配列に結合が可能なタンパクと遺伝子を二本鎖切断する事が可能なヌクレアーゼが連結した融合タンパクである。ZFN は任意の配列に結合する事で、繰り返しその箇所の DSB を引き起こす。相同組換えは DSB が起こる事で生じる為、標的領域に DSB が繰り返し起こる事で、外来遺伝子の標的領域への挿入効率を上げる事が可能となる。

【0119】

(3) hGPC3KI ベクター ver.1 および hGPC3KI ベクター ver.2 の ES 細胞への導入

hGPC3KI ベクター ver.1 を C57BL(B6) の ES (Embryonic stem) 細胞へエレクトロポレーションにより導入し、G418 による選択培養後に得られた薬剤耐性クローンより相同組換え体を PCR にてスクリーニングした。

hGPC3KI ベクター ver.2 の ES 細胞への導入は、標的配列を切断する ZFN プラスミドベクターもしくは ZFN mRNA と共にエレクトロポレーションにより行い、G418 による選択培養後に得られた薬剤耐性クローンより相同組換え体を PCR にてスクリーニングした。

スクリーニングには、上記の薬剤耐性クローンより抽出したゲノムを PCR のテンプレートとして用いた。

hGPC3KI ベクター ver.1 をスクリーニングする為の PCR 反応液組成は、サンプル 1 micro-l、2xGC 緩衝液 12.5 micro-l、dNTP (2.5mM) 4 micro-l、プライマー (各 50 micro-M) 各 0.1 micro-l、LA Taq (TAKARA) 0.25 micro-l、および蒸留水 7.05 micro-l (全 25 micro-l) とした。また、PCR 条件は、94℃にて 5 分間の前加熱、94℃にて 30 秒間、58℃にて 30 秒間、72℃にて 5 分 30 秒間の増幅サイクル 35 サイクル、並びに 72℃にて 7 分間の複加熱とした。プライマーとしては、フォワードプライマー [5'-AGATGGCTGCCTGTGACATTTCTGGAAGTGT-3' (配列番号: 18)] およびリバースプライマー [5'-CTGAATTAGTTCCCTTCTTCGGCTGGATAA-3' (配列番号: 19)] を使用した。当該プライマーを用いた場合、hGPC3KI ベクター ver.1 がマウス内因性 GPC3 遺伝子の同一読み取り枠に挿入されていれば、約 5.5kb のサイズにバンドが増幅されることが予想された。

hGPC3KI ベクター ver.2 をスクリーニングする為の PCR 反応液組成は、hGPC3KI ベクター ver.1 をスクリーニングする為の PCR 反応液組成と同様とした。PCR 条件は、94℃にて 5 分間の前加熱、94℃にて 30 秒間、58℃にて 30 秒間、72℃にて 3 分間の増幅サイクル 35

サイクル、並びに72℃にて7分間の複加熱とした。プライマーとしては、フォワードプライマー [5'-ATGAGACCCAGCAAGCTACACGGGCT-3' (配列番号: 20)] およびリバースプライマー [5'-ACTTGAGCTCCATACTTGCAGACT-3' (配列番号: 21)] を使用した。当該プライマーを用いた場合、hGPC3KIベクターver.2がマウス内因性GPC3遺伝子の同一読み取り枠に挿入されていれば、約2kbのサイズにバンドが増幅されることが予想された。

上記のPCR反応により、hGPC3KIベクターver.1の相同組換えを起こしたES細胞のサンプルでは、約5.5kbのサイズにバンドが増幅された [図3 (a)]。また、hGPC3KIベクターver.2の相同組換えを起こしたES細胞のサンプルでは、約2kbのサイズにバンドが増幅された [図3 (b)]。

【0120】

(4) hGPC3KIマウスver.1およびhGPC3KIマウスver.2の作出

hGPC3KIベクターver.1およびhGPC3KIベクターver.2の相同組換えESクローンをトリプシン処理により浮遊させ、ES細胞培地で洗浄した。48時間間隔で5IUのウマ絨毛ゴナドトロピン (eCG) およびヒト絨毛ゴナドトロピン (hCG) を腹腔内投与することにより、過剰排卵処理を施したBALB/cの雌マウスを同系統の雄マウスと交配した。雌マウスのプラグが確認された日を0.5日とし、妊娠3.5日に子宮を灌流し、回収した胚盤胞を宿主胚として10~15個のES細胞を注入した。注入後の胚は、偽妊娠2.5日齢のICR系の受容雌の子宮内に移植し、産仔を得た。ES細胞の胚盤胞への注入によりキメラマウスを得た。雄キメラマウスは性成熟後にB6雌マウスと交配し、ノックインアレルの次世代マウスへの伝達を、PCR法により確認した。PCRは実施例1 (3) に記載した方法にて実施した。その結果、hGPC3KIマウスver.1では約5.5kb、hGPC3KIマウスver.2では約2kbのシグナルが検出された個体が得られ、これら個体にはノックインアレルが伝達していることが確認された。

【0121】

(5) hGPC3KIマウスver.3の作出

hGPC3KIベクターver.3を用いたノックインマウスの作出は、受精卵へKIベクターver.3およびZFNを導入する事で行った。B6マウスから採取した前核期受精卵にKIベクターver.3及びZFN mRNAをマイクロインジェクション法によって注入した。KIベクターver.3およびZFNを注入した受精卵のうち、2細胞期胚にまで発生したものを、ICR (レシピエントマウス) の卵管内に移植した。得られたマウスにhGPC3KIベクターver.3遺伝子を含むファウンダーマウスをPCR法により判別した。PCR反応組成は実施例1 (3) と同様の組成で実施し、プライマー及びPCR条件は実施例1 (3) に記載のhGPC3KIベクターver.2のスクリーニングと同様の方法で実施した。その結果、約2kbのシグナルが検出されたファウンダーマウスを得た [図3 (c)]。得られたファウンダーマウスは性成熟後にB6雄マウスと交配し、ノックインアレルの次世代マウスへの伝達を確認した。

【0122】

(6) neo遺伝子の除去

ノックインアレルの伝達が確認されたhGPC3KIマウスver.1およびhGPC3KIマウスver.2の個体の繁殖により得た受精卵の前核に環状の組換え酵素Cre発現ベクターを顕微注入することによって、neo遺伝子カセットを除去した。すなわち、一過性にCreを発現させることによって、ノックインアレルに配置した2ヶ所のloxP間の組換えが誘導され、neo遺伝子カセットが除去される (図2参照)。Cre発現ベクターの顕微注入後の受精卵は、偽妊娠0.5日のICR系受容雌の卵管内に移植し、19日後に産仔を得た。neo遺伝子カセットの除去の確認は、離乳後の産仔より得たゲノムDNAを用いてPCR法によって実施した。PCR反応組成は実施例1 (3) と同様の組成で実施した。また、PCR条件は、94℃にて5分間の前加熱、94℃にて30秒間、58℃にて30秒間、72℃にて2分間の増幅サイクル35サイクル、並びに72℃にて7分間の複加熱とした。プライマーとしては、フォワードプライマー [5'-TGATGATGAAGATGAGTGCATTGGA-3' (配列番号: 22)] およびリバースプライマー [5'-TGGCCAGAACTACGGGTCCAGCT-3' (配列番号: 23)] を使用した。

hGPC3KIマウスver.1に関して、ノックインアレルに由来する増幅産物として約2.5kbのシグナルが検出されるのに対して、neoカセットが除去された個体のサンプルでは約1kbのシグナルが検出された〔図4(a)〕。一方、hGPC3KIマウスver.2においては、ノックインアレルに由来する増幅産物として約3kbのシグナルが検出されるのに対して、neoカセットが除去された個体のサンプルでは約1.6kbのシグナルが検出された〔図4(b)〕。

【0123】

(7) hGPC3KIマウスver.1、hGPC3KIマウスver.2およびhGPC3KIマウスver.3の樹立neo遺伝子カセットの除去が確認されたhGPC3KIマウスver.1およびhGPC3KIマウスver.2の繁殖により、ノックインアレルをホモ接合体化およびヘミ接合体化した個体を得た。同様に、hGPC3KIマウスver.3もノックインアレルの次世代への伝達を確認されたマウス同士の交配により、ノックインアレルをホモ接合体化およびヘミ接合体化した個体を得た。ホモ接合体およびヘミ接合体の確認はPCR法にて実施した。PCR反応組成は実施例1(3)と同様の組成で実施した。

hGPC3KIマウスver.1のPCR条件は、94℃にて5分間の前加熱、94℃にて30秒間、58℃にて30秒間、72℃にて15秒間の増幅サイクル35サイクル、並びに72℃にて7分間の複加熱とした。hGPC3KIマウスver.2のPCR条件は、94℃にて5分間の前加熱、94℃にて30秒間、58℃にて30秒間、72℃にて2分間の増幅サイクル35サイクル、並びに72℃にて7分間の複加熱とした。hGPC3KIマウスver.3のPCR条件は、94℃にて5分間の前加熱、94℃にて30秒間、58℃にて30秒間、72℃にて20秒間の増幅サイクル35サイクル、並びに72℃にて7分間の複加熱とした。

プライマーとしては、hGPC3KIマウスver.1およびhGPC3KIマウスver.3ではフォワードプライマー1〔5'-AGGGCCCTGAGCCAGTGGTCAGT-3' (配列番号: 24)〕、フォワードプライマー2〔5'-TAGCGGCTCCTCTCTTGCTCTGT-3' (配列番号: 25)〕およびリバースプライマー〔5'-GCCCCGGGGCATGTGGACAGAGTCCCATACT-3' (配列番号: 26)〕を使用した。hGPC3KIマウスver.2は、実施例1(3)でhGPC3KIベクターver.2のスクリーニングに使用したプライマーを用いた。

hGPC3KIマウスver.1のホモ接合体もしくはヘミ接合体ではノックインアレルに由来する約1.3kbのシグナルは検出されるが、野生型アレル由来の約0.5kbのシグナルは検出されないことを指標として、ホモ接合体およびヘミ接合体を確認した〔図5(a)〕。一方、hGPC3KIマウスver.2はヘミ接合体を約2kbで検出するプライマーで確認した〔図5(b)〕。hGPC3KIマウスver.3のホモ接合体およびヘミ接合体ではノックインアレルに由来する1kbのシグナルは検出されるが、野生型アレル由来の0.5kbのシグナルは検出されないことを指標として、ホモ接合体およびヘミ接合体を確認した〔図5(c)〕。

【0124】

〔実施例2〕 hGPC3KIマウスの発現解析

(1) 蛋白の発現確認

hGPC3KIマウス及び野生型マウスの肺ライセートを用いてウェスタンブロット法により、各GPC3蛋白の発現を確認した。hGPC3KIマウス及び野生型マウスの肺ライセートは片肺より調製した。各肺ライセートにサンプル緩衝液(nacalai、カタログ番号)を添加後、95℃、5分間の加熱し1レーンあたり総タンパク量が50~450 micro-gとなるように希釈してSDS-PAGEのサンプルとした。SDS-PAGEにより分画した後、メンブレンにトランスファーした。抗ヒトGPC3抗体を一次抗体、HRP標識抗ヒトIgG抗体を二次抗体として用いて検出を行った。ライセートの内部標準をTubulin alphaとし、抗Tubulin alpha抗体を一次抗体、HRP標識抗ラットIgG抗体を二次抗体として用い、検出した。

hGPC3KIマウスver.1において、肺ライセート50 micro-gではhGPC3蛋白のシグナルはほぼ検出されなかったが、ライセートの濃度を増やす事で、ライセートの濃度依存的に検出されるシグナルの強度が増加していった(図6)。一方、hGPC3KIマウスver.2およびver.3の肺ライセートでは、30 micro-gでhGPC3蛋白のシグナルを検出した(図7)。GPC3は通常、プロセッシングを受ける為、数種類の分子量の蛋白が存在する。その内、

一次抗体として使用した抗ヒトGPC3抗体を用いた際は、GPC3蛋白は約20kDaと約60kDa付近に検出される。野生型マウスでは、60kDa付近でPositive controlと同等のサイズに弱いシグナルが検出されたが、20kDa付近ではシグナルが検出されなかった事より、60kDa付近で検出されたシグナルは非特異的シグナルである可能性が高い。hGPC3KIver.2とver.3を比較すると、60kDa、20kDaのシグナル共に、hGPC3KIver.2の方がver.3に比べて発現量が高い事を示した。一方で、hGPC3KIver.1の発現量は、hGPC3KIver.2およびver.3に比べて著しく低かった。

【0125】

(2) mRNAの発現確認

hGPC3KIマウス、野生型マウス、カニクイザル及びヒトの肺totalRNAを用いてリアルタイムPCR法により、各グリピカン-3 mRNAの発現量を解析した。hGPC3KIマウス及び野生型マウスは片肺よりtotalRNAを調製した。カニクイザルは肺の細気管支の一部分totalRNAを調製した。また、hGPC3KIマウスver.3とヒトとを比較する際は、ver.3の肺を副肺葉、肺前葉、肺中葉、肺後葉および左肺に分けてtotalRNAを調製した。得られた各トータルRNAの量は、260nmにおける吸光度を測定することによって決定した。ヒトの肺totalRNAはClontech社より購入したものを使用した。

hGPC3KIマウスとサル【図8(a)】、および、野生型マウスとhGPC3KIマウス【図8(b)】を比較する際に使用したcDNAは、各2.5 micro-gのトータルRNAを鋳型として、SuperScriptIII First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) により、逆転写反応で合成した。hGPC3KIマウス ver.3とヒト【図9】を比較する際に使用したcDNAは、各0.5 micro-gのトータルRNAを鋳型として、SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) により、逆転写反応で合成した。合成したcDNAを鋳型としてリアルタイムPCRによって、各グリピカン-3を検出した。

検出に用いたプライマーに関して、hGPC3KIマウス、サルおよびヒトを比較する場合は、蛋白コーディング領域にて設定した。フォワードプライマー [5'-GAAACCTTATCCAGCCGAAGA-3' (配列番号: 27)] およびリバースプライマー [5'-GCAAAGGGTGTCTGTTTCC-3' (配列番号: 28)] の組み合わせで実施した。hGPC3KIマウスと野生型マウスを比較する場合はmGpc3遺伝子の5'非翻訳領域にて設定した。フォワードプライマー [5'-CAGGTAGCTGCGAGGAACT-3' (配列番号: 29)] およびリバースプライマー [5'-CCGACAGAGCAAGAGAGGAG-3' (配列番号: 30)] の組み合わせで実施した。解析は絶対定量法にて行った。hGPC3KIマウスとサル、および、野生型マウスとhGPC3KIマウスの比較の際は、hGPC3 cDNAが挿入されているプラスミドを $2.2 \times 10^{16} \sim 2.2 \times 10^{23}$ の範囲で調整したものを用い、hGPC3KIマウス ver.3とヒトの比較の際は、hGPC3 cDNAが挿入されているプラスミドを $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$ の範囲で調整したものを用いて検量線を作成し、各肺組織におけるグリピカン-3 mRNAのコピー数を算定した。

リアルタイムPCR反応液の組成は、サンプル1 micro-l、FastStart Universal Probe Master (Roche) 5 micro-l、Universal Probe (Roche) 0.2 micro-l、プライマー (各10 micro-M) 各0.2 micro-lおよび蒸留水3.4 micro-l (全10 micro-l) とした。Universal Probeに関して、hGPC3KIマウス、サルおよびヒトを比較する場合は、Universal Probe #46 (Roche)、hGPC3KIマウスと野生型マウスを比較する場合はUniversal Probe #28 (Roche) を使用した。

PCR条件は、50℃にて2分間、95℃にて10分間の前加熱をした後、95℃にて15秒間、60℃にて1分間の増幅サイクル50サイクルとした。

hGPC3KIマウスver.2、ver.3およびカニクイザルの肺におけるGPC3 mRNAの発現量を比較した所、ver.2の発現量が最も高く、ver.3とカニクイザルの発現量はほぼ同等であった【図8(a)】。hGPC3KIマウスver.3の発現量は野生型マウスともほぼ同等である事が示された【図8(b)】。さらに、hGPC3KIマウスver.3の発現量がカニクイザルの発現量とほぼ同等であった事から、ver.3とヒトの肺における発現量も比較した所、ヒトとほぼ同等の発現量を示した(図9)。

【0126】

(3) 発現量の比較

蛋白の発現量の結果から、hGPC3KIマウスver.2およびver.3は、ver.1に比べて高い発現量を示した。hGPC3KIマウスver.2およびver.3は、エクソン・イントロン構造を挿入した為、スプライスアウト（スプライシングによってイントロンが除かれること）を起こす設計になっている。その為、それがmRNAの安定性に寄与し、結果として、hGPC3蛋白の安定した合成に繋がったと考えられる。また、hGPC3KIマウスver.2のmRNA量の発現量と比較して、hGPC3KIマウスver.3の発現量はヒトとサルの発現量に近い事が示された。一方で、ver.2の発現量は野生型の発現量よりも高い発現を示した。これはトランスジーンに使用する3'非翻訳領域（3'UTR）の選択により、トランスジーンを発現量をコントロール出来る事を示し、且つ、mGpc3遺伝子の3'UTRを利用する事で、トランスジーンを発現量をヒトもしくはサルの発現量に調節できることが示された。mRNAの発現量は上述のように、様々な要因によってコントロールされており、一概に決まった方法で遺伝子改変マウスを作製しても、目的のレベルの発現量を呈するマウスを作製する事はとても困難である。しかし、我々はこれらの困難を克服し、目的のレベルの発現量を呈するhGPC3KIマウスver.3を樹立する事ができた。

ヒトの発現量に最も近い発現量示すことから、hGPC3KIマウスver.3を中心に以降の機能解析に使用した。

【0127】

〔実施例3〕 ヒトGPC3ポリペプチドに対する免疫寛容

(1) 抗原の免疫

hGPC3KIマウスver.3および野生型マウスにアジュバント（ゲルブアジュバント10:Gerbu GmbH製）と混合した可溶性ヒトGPC3タンパクを0.1 mg/0.1 mlで皮下に投与した。投与は初回投与をday0として、day14, 21, 28, 35, 42, 49, 56に実施した。なお、可溶性ヒトGPC3タンパクは、当業者公知の方法に従って作製された。

【0128】

(2) 抗体価の測定

初回投与をday0として各投与の前にヘパリン処理にて採血し、血漿を得た。血漿中の抗ヒトGPC3抗体の濃度測定は可溶性ヒトGPC3（shGPC3）を固相化した酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）で測定した。4 micro-g/mL shGPC3溶液（pH9.6）を96well plateに固相化した。各wellを0.05% tween20含有PBS溶液で洗浄した後、サンプルを添加した。2次抗体としてGoat HRP-Anti Mouse IgG（Sigma-Aldrich）を用い、発色試薬としてテトラメチルベンゼン（TMB）基質溶液（SurModics）を用い、1N 硫酸で反応を停止した。UV plateリーダーを用い、吸収波長450 nmにおける吸光度を測定した。結果、野生型マウスに比べて、hGPC3KIマウスver.3において、抗ヒトGPC3抗体価の上昇抑制が観察され、ヒトGPC3に対する免疫寛容が確認された（図10）。野生型マウスにとってhGPC3は免疫原となる為、自己の免疫機能により移植したヒトGPC3を発現したがん細胞を排除してしまう可能性がある。一方で、ヒトGPC3に対する免疫寛容が成立しているhGPC3KIマウスver.3において、ヒトGPC3は内因性の免疫のターゲットとはならない。その為、マウス内でヒトGPC3を発現したがん細胞を移植した担がんモデルを使用した検体の評価を行う場合、より正確な薬効の評価を行う事ができる。

【0129】

〔実施例4〕 hGPC3KIマウスver.3を用いた抗ヒトGPC3抗マウスCD3二重特異性抗体の抗腫瘍試験

(1) 細胞株

LLC1細胞（ATCCから入手可能。ATCC number: CRL-1642）にヒトGPC3を強制発現させた、LLC1細胞（LLC1/hGPC3）を用いた。LLC1/hGPC3細胞は10%FBS（BIONET社製）、0.5 mg/mL G418（ナカライテスク社製）を含むDulbecco's Modifid Eagle's Medium培地（SIGMA社製）にて維持継代した。

(2) LLC1/hGPC3移植モデルの作製

LLC1/hGPC3細胞をDulbecco's Modifid Eagle's Medium培地（SIGMA社製）で1

10

20

30

40

50

×10⁷個/mLになるように調製した。hGPC3KIマウスver.3の腹部皮下へこの細胞懸濁液 100 micro-L (1×10⁶個/マウス) を移植した。腫瘍体積は以下の式にて算出し、腫瘍体積が150~200mm³程度となった時点でモデル成立とした。

$$\text{腫瘍体積} = \text{長径} \times \text{短径} \times \text{短径} / 2$$

(3) 投与薬剤の調製

抗ヒトGPC3 (hGPC3) 抗体と抗マウスCD3 (mCD3) 抗体を組み合わせた、hGPC3/mCD3二重特異性抗体 (hGPC3_mCD3) を作製した。hGPC3側として、配列番号: 3 1 で表される重鎖及び配列番号: 3 2 で表される軽鎖を用いた。また、mCD3側として、配列番号: 3 3 で表される重鎖及び配列番号: 3 4 で表される軽鎖を用いた。hGPC3_mCD3抗体はPBS(-)を用いて、0.5 mg/mL (5 mg/kg投与群) および0.1 mg/mL (1 mg/kg投与群) になるように調製した。

(4) 薬剤投与

上記(2)で作製したLLC1/hGPC3移植モデルに対し、腫瘍体積を似て群分けし、上記(3)で調製した抗体試料を10 mL/kgにて、尾静脈より投与した。陰性対照として、PBS(-) (Vehicle) を同様に10 mL/kgにて、尾静脈より投与した。

(5) 抗腫瘍効果の評価

hGPC3_mCD3抗体のLLC1/hGPC3移植モデルにおける抗腫瘍効果については移植後19日目の腫瘍体積で評価した。その結果、hGPC3_mCD3抗体の投与により、腫瘍の増殖抑制が有意に認められた(図11)。

(6) 血漿中抗体濃度測定

上記抗体の投与後2時間後、1日後、7日後のhGPC3KIマウスver.3およびver.1より、30 micro-L程度血液をヘパリン処理にて採取した。採取した血液は遠心分離にて血漿を分離した。血漿中のhGPC3_mCD3抗体濃度の測定は可溶性ヒトGPC3 (shGPC3) を固相化した酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) で測定した。1 micro-g/mL shGPC3溶液 (pH9.6) を96well plateに固相化した。各 wellを0.05% tween20含有TBS溶液で洗浄した後、サンプルを添加した。

2次抗体としてAnti-Human Kappa Light chain Goat IgG Biotin (免疫生物研究所) を添加後、Streptavidin-AP conjugate (Roche Diagnostics) を反応させた。発色試薬としてBlue Phos Microwell phosphatase Substrate System (Kirkegaard&Perry Laboratories) を用い、UV plateリーダーで吸収波長650 nmにおける吸光度を測定した。結果、hGPC3KIマウスにおいて、hGPC3_mCD3抗体は抗原依存的な消失を示し、hGPC3の発現が高いver.3ではver.1に比べて血漿中からの早い消失が確認された(図12)。

【0130】

〔実施例5〕 hGPC3_mCD3抗体投与におけるサイトカイン放出

実施例4と同様に、hGPC3_mCD3抗体を調製し、hGPC3KIマウスver.1、hGPC3KIマウスver.3および野生型マウスへ投与を行った。投与前日、投与後2h、6h、24h、48h後に30 micro-L程度血液をヘパリン処理にて採取し血漿を得た。得られた血漿を用い、IFN-gamma、IL-10、IL-17A、IL-2、IL-4、IL-6およびTNFの濃度をBDTMcytometric bead array (CBA) mouse Th1/Th2/Th17 cytokine kit (BD Bioscience社製) にて測定した。その結果、hGPC3抗原に依存したサイトカインの放出がhGPC3KIマウスver.3およびver.1で確認され、ver.1よりもver.3で高い放出量を示した。一方で、hGPC3_mCD3抗体はマウスGPC3には結合しないため、hGPC3が発現していない野生型マウスではサイトカイン放出はほとんど認められなかった(図13、14)。サイトカインの上昇は、組織に発現したhGPC3にhGPC3_mCD3抗体が結合し、T細胞が活性化する事で起こる。hGPC3KIマウスver.3におけるサイトカインの上昇は、ノックインしたhGPC3遺伝子が膜上に発現するなど、本来のGPC3の発現の特徴を反映している事を示す。また、抗ヒトGPC3抗ヒトCD3二重特異性抗体をサルに投与した際も、サイトカインの上昇が確認された事から、hGPC3KIマウスver.3はヒト、サルと同様に薬理作用を示すマウスであると考えられ、それらの薬理作用の評価に有用であり、ヒト由来の疾患関連分子に特異的に作用する

薬剤の開発に利用できることが示唆された。

【0131】

[実施例6] ヒトCD3遺伝子置換マウスの作出

(1) マウスCd3遺伝子領域改変ベクターの構築 (図15A)

マウスCd3ε、Cd3δおよびCd3γ遺伝子が配置するゲノム領域がクローニングされている大腸菌人工染色体(BAC)クローンを用いた。このBAC上のマウスCd3εをコードする遺伝子領域の5'上流、約3.5kbの位置にloxP配列を挿入するとともに、さらに上流のゲノム領域を約3.1kb残して除去した。その際、loxP配列をネオマイシン耐性(neo)遺伝子カセットとともに導入し、Red/E-Tシステム(GeneBridges)を利用して相同組換えにて挿入した。その際、カナマイシン添加培地にて生育できた大腸菌クローンの中から、さらにpolymerase Chain Reaction(PCR)法により増幅が正しくなされたクローンを選抜した。次いで、BAC上のCd3γ遺伝子の3'下流にloxP配列およびRox配列を配置した。すなわち、loxP配列およびRox配列を、ハイグロマイシン耐性(Hyg)遺伝子カセットとともに導入し、Red/E-Tシステムにより相同組換えにて挿入した。その際、ハイグロマイシン添加培地にて生育できた大腸菌クローンの中から、PCR法により、loxP配列およびRox配列が期待通り、挿入できたクローンをPCR法にて選抜した。次いで、Hyg遺伝子カセットより3'下流のゲノム領域を約3.4kb残して除去した。

【0132】

(2) マウス胚性幹細胞(ES細胞)へのマウスCd3遺伝子領域改変ベクターの導入 (図15A)

マウスES細胞(C57BL/6Nマウス由来)に上記のマウスCd3遺伝子領域改変ベクターをエレクトロポレーションにより導入し、G418による選択培養後に得られた薬剤耐性クローンより、相同組み換え体をPCR法によってスクリーニングした。エレクトロポレーションに用いたマウスCd3遺伝子領域改変ベクターは、60μgをNotIで直鎖状化、またはNotI未処理による環状のベクターを、フェノール/クロロホルム抽出後、エタノール沈殿させPBSに溶解して用いた。

スクリーニングで用いたES細胞は96穴プレートで培養し、1ウェルあたり200μlのPBS溶液で2回洗浄後、以下の組成の細胞溶解緩衝液(10×LA緩衝液II(TAKARA LA Taq用)5μl; 25mM MgCl₂ 5μl; 5% NP-40 5μl; プロテイナーゼK(TAKARA, 20mg/ml) 2μl; 蒸留水33μl)を加えて55℃2時間処理し、続いて95℃にて15分処理することで、プロテイナーゼKを失活させてPCRサンプルとした。

PCR反応混合物は、サンプル1μl、10×LA緩衝液II 2.5μl、25mM MgCl₂ 2.5μl、dNTP(2.5mM) 4μl、プライマー(各50μM)各0.1μl、LA Taq(TAKARA) 0.25μl、および蒸留水14.55μl(全25μl)とした。また、PCR条件は、94℃にて2分間の前加熱、98℃にて10秒間、68℃にて4分30秒間の増幅サイクル35サイクル、並びに68℃にて5分間の複加熱とした。

使用したプライマーは以下の通りである。プライマーは、Hyg遺伝子カセット内にHygF1474をフォワードプライマーとして配置し、g4989RをマウスCd3遺伝子改変ベクター上の3'側相同アームよりも3'下流側のマウスゲノム領域にリバースプライマーとして配置した(図16を参照)。相同組み換えを起こしたES細胞のサンプルでは、約4kbのバンドが増幅される。HygF1474(前方)5'-TATCAGAGCTTGGTTGACGG-3'(配列番号:35); g4989R(後方)5'-ACTCGTTGTGGCTTAGAAGCAGTAACAATACC-3'(配列番号:36)。さらに、上記のプライマーセットにより、増幅シグナルの得られたクローンを用いて、別プライマーセットにより確認した。すなわち、マウスCd3遺伝子改変ベクター上の5'側相同アームよりも5'上流側のマウスゲノム領域に、e27248Fをフォワードプライマーとして配置し、Neo遺伝子カセット内にNeo0635Rをリバースプライマーとして配

置した。相同組み換えを起こしたES細胞のサンプルでは、約4 kbのバンドが増幅される。e27248F（前方）5'-ACTGTAATCCTAGTACTTAGGAGGCTGAGG-3'（配列番号：37）；Neo0635R（後方）5'-AATCCATCTTGTTCAATGGCCGATCC-3'（配列番号：38）。

【0133】

（3）ヒトCD3遺伝子領域導入ベクターの構築（図15B）

ヒトCD3ε、CD3δおよびCD3γ遺伝子が配置するゲノム領域がクローニングされているBACクローンを用いた。このBAC上のヒトCD3εをコードする遺伝子領域の5'上流にloxP配列を挿入した。その際、loxP配列をHyg遺伝子カセットとともに導入し、Red/ETシステム（GeneBridges）を利用して相同組換にて挿入した。その際、ハイグロマイシン添加培地にて生育できた大腸菌クローンの中から、さらにPCR法により増幅が正しくなされたクローンを選抜した。次いで、BAC上のヒトCD3γ遺伝子の3'下流に、Frt配列で両端を挟まれたピューロマイシン耐性（Puro）遺伝子および、そのさらに下流にRox配列を配置すべく、Neo遺伝子カセットとともに導入し、Red/ETシステムにより相同組換にて挿入した。その際、カナマイシン添加培地にて生育できた大腸菌クローンの中から、PCR法により、Frt配列、Puro遺伝子、Rox配列およびNeo遺伝子が期待通り、挿入できたクローンをPCR法にて選抜した。

【0134】

（4）Cd3遺伝子領域改変したマウスES細胞へのヒトCD3遺伝子領域導入ベクターおよび組換え酵素発現ベクターの導入

上述の工程においてマウスCd3遺伝子領域の標的位置に正しくloxP配列およびRox配列を挿入できたES細胞クローン（1D4、5H1、6I5および3A5）に対して、ヒトCD3遺伝子領域導入ベクター、組換え酵素Cre発現ベクターおよび組換え酵素Dre発現ベクターをエレクトロポレーションにより導入し、ピューロマイシンによる選択培養の後、生育したES細胞クローンを遺伝子型解析した。

まず、CreおよびDreの作用により、マウスCd3遺伝子領域に配置したloxP配列およびRox配列間にて組換えが起こり、Cd3εからCd3γまでのゲノム領域を欠損したクローンを選別するためのPCRスクリーニングを実施した。スクリーニングで用いたES細胞は96穴プレートで培養し、1ウェルあたり200 μlのPBS溶液で2回洗浄後、以下の組成の細胞溶解緩衝液（10×LA緩衝液II（TAKARA LA Taq用）5 μl；25 mM MgCl₂ 5 μl；5% NP-40 5 μl；プロテイナーゼK（TAKARA, 20 mg/ml）2 μl；蒸留水33 μl）を加えて55℃2時間処理し、続いて95℃にて15分処理することで、プロテイナーゼKを失活させてPCRサンプルとした。

PCR反応混合物は、サンプル1 μl、10×LA緩衝液II 2.5 μl、25 mM MgCl₂ 2.5 μl、dNTP（2.5 mM）4 μl、プライマー（各50 μM）各0.1 μl、LA Taq（TAKARA）0.25 μl、および蒸留水14.55 μl（全25 μl）とした。また、PCR条件は、94℃にて2分間の前加熱、98℃にて10秒間、68℃にて4分30秒間の増幅サイクル35サイクル、並びに68℃にて5分間の複加熱とした。使用したプライマーは以下の通りである。プライマーは、マウスCd3ε遺伝子の5'側上流側のゲノム領域にe30230Fをフォワードプライマーとして配置し、マウスCd3γ遺伝子の3'下流側のゲノム領域にg1439Rをリバースプライマーとして配置した（図17A参照）。Cd3遺伝子領域を欠損したES細胞のサンプルでは、約0.7 kbのバンドが増幅される。e30230F（前方）5'-TAGCAGCCTTCAGATGAAGAGGTAGGACTC-3'（配列番号：39）；g1439R（後方）5'-TTGATGTGCCACCTCACTGCTGCACTGG-3'（配列番号：40）。

マウスCd3遺伝子領域を欠損しているES細胞クローンのうち、ヒトCD3遺伝子領域の導入されているクローンを選抜するためのPCRスクリーニングを実施した。スクリ

ーニングにはマウスC d 3 遺伝子領域の欠損を検出した際に用いたP C Rサンプルを用いた。P C R反応混合物は、サンプル1 μ l、1 0 × L A 緩衝液II 2 . 5 μ l、2 5 m M M g C l 2 2 . 5 μ l、d N T P (2 . 5 m M) 4 μ l、プライマー (各 5 0 μ M) 各 0 . 1 μ l、L A T a q (T A K A R A) 0 . 2 5 μ l、および蒸留水1 4 . 5 5 μ l (全 2 5 μ l) とした。また、P C R条件は、9 4 ° C にて2 分間の前加熱、9 4 ° C にて3 0 秒間、5 8 ° C にて1 分間、7 2 ° C にて5 分間の増幅サイクル3 5 サイクル、並びに7 2 ° C にて5 分間の複加熱とした。使用したプライマーは以下の通りである。プライマーは、ヒトC D 3 ε 遺伝子の5 ' 側上流側のゲノム領域にh C D 3 e _ 5 a r m _ F 2 をフォワードプライマーとして配置し、ヒトC D 3 ε 遺伝子の第2エクソン内にh C D 3 e _ e x 2 _ R 2 をリバースプライマーとして配置した (図17B参照)。ヒトC D 3 遺伝子領域が導入されたE S 細胞のサンプルでは、約5 . 5 k b のバンドが増幅される。h C D 3 e _ 5 a r m _ F 2 (前方) 5 ' - A A C T G A C A A T G G G A C A T C A G C T G A - 3 ' (配列番号 : 41) ; h C D 3 e _ e x 2 _ R 2 (後方) 5 ' - A T G G G A C T G T T A C T T T A C T A A G A T - 3 ' (配列番号 : 42) 。

【 0 1 3 5 】

(5) マウスC d 3 遺伝子欠損かつヒトC D 3 遺伝子導入マウスの作出

相同組換えE S クローンをトリプシン処理により浮遊させ、E S 細胞培地で洗浄した。4 8 時間間隔で5 I U のウマ絨毛ゴナドトロピン (e C G) およびヒト絨毛ゴナドトロピン (h C G) を腹腔内投与することにより、過剰排卵処理を施したB A L B / c の雌マウスを同系統の雄マウスと交配した。雌マウスのプラグが確認された日を0 . 5 日とし、妊娠3 . 5 日に子宮を灌流し、回収した胚盤胞期胚を宿主胚として1 0 ~ 1 5 個のE S 細胞を注入した。注入後の胚は、偽妊娠2 . 5 日齢のI C R 系の受容雌の子宮内に移植し、1 7 日後に産仔を得た。E S 細胞の胚盤胞への注入により得られた産仔の毛色での判別により、組換えE S 細胞 (黒色) と宿主胚盤胞由来の細胞 (アルビノ) の混在したキメラマウスが得られた。雄キメラマウスは性成熟後にC 5 7 B L / 6 N 雌マウスと交配し、ノックインアレルの次世代マウスへの伝達を、次世代マウスの組織より抽出したゲノムD N A を鋳型としてP C R 法により確認した。P C R は、上述のE S 細胞のスクリーニングの際に利用した方法にて実施した。その結果、ヒトC D 3 遺伝子領域特異的な5 . 5 k b のシグナル、およびマウスC d 3 遺伝子領域欠損に特異的な0 . 7 k b のシグナルが検出された個体を得られ、これら個体にはヒトC D 3 遺伝子領域アレルとともにマウスC d 3 遺伝子領域欠損アレルが伝達されたことが確認された。さらに、上述の遺伝子型のマウスの繁殖により、マウスC d 3 遺伝子領域についてホモ欠損型であり、かつヒトC D 3 遺伝子領域を有するマウス個体、すなわちヒトC D 3 遺伝子領域置換マウスを得た。なお、ヒトC D 3 ε のみを導入したトランスジェニックマウス (以下、h C D 3 ε T g マウス) をW a n g らの報告 (Wang et.al.(1994)PNAS.91:9402-9406) に従って作製し、以降の実験にて比較検討した。

【 0 1 3 6 】

(6) ヒトC D 3 遺伝子置換マウスの胸腺および脾臓重量

マウス (1 2 - 1 4 週齢、雄) より脾臓および胸腺を採取し、組織重量を測定した。図4 に示す通り、ヒトC D 3 置換マウスの胸腺には肉眼的な異常は認められなかった。解析には体重当たりの組織重量を算出した。各群4 匹の雄マウスについて、体重、および組織重量 (脾臓、胸腺) を測定しグラフに示した。体重あたりの組織重量比を算出し、個体ごとに得られた値を黒点にてプロット、平均値をカラムにて示す (図19) 。脾臓重量に関しては、C d 3 遺伝子欠損マウスにて他の遺伝子型のマウスと比較して増加の傾向が認められたが、顕著な差は認められなかった。一方、胸腺重量に関しては、C d 3 遺伝子欠損マウスでは野生型と比較して3 分の1 程度までの低下が認められた。このC d 3 遺伝子欠損マウスにヒトC D 3 遺伝子を導入したヒトC D 3 遺伝子置換マウスでは、胸腺重量の回復が認められ、特にライン番号1 C 3 の個体においては野生型マウスと同等の胸腺重量にまで回復が認められた。h C D 3 ε T g マウスでは、W a n g らの報告の通り、胸腺の委縮が認められた (Wang et.al.(1994)PNAS.91:9402-9406) 。

【0137】

(7) ヒトCD3遺伝子置換マウス各ラインにおけるヒトCD3およびマウスCd3の発現確認

ー血球RNAを用いたRT-PCR法での確認ー

血球RNAを用いてRT-PCR法によりヒトCD3ε、ヒトCD3δ、ヒトCD3γ、マウスCd3ε、マウスCd3δおよびマウスCd3γの発現を解析した。背中足静脈あるいは腹部大静脈より採取した血液より、Catrimox-14 RNA Isolation Kit (TaKaRa Bio) を用いてトータルRNAを調製した。各1μgのトータルRNAを鋳型として、SuperScript III First Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) により、Oligo dT (20) プライマーを用いて逆転写反応を行なうことによってcDNAを合成した。合成されたcDNAを鋳型としてPCRを行なうことによって、ヒトCD3ε、ヒトCD3δ、ヒトCD3γ、マウスCd3ε、マウスCd3δおよびマウスCd3γを検出した。いずれの遺伝子発現の検出にも蛋白コーディング領域に対するプライマーを設定した。ヒトCD3εの検出は、フォワードプライマーE0333F (5'-AAGAAATGGGTGGTATTACACAGACACC-3' (配列番号: 43)) およびリバースプライマーE0912R (5'-TGGGCCAGCGGGAGGCAGTGTCTCCAGAGG-3' (配列番号: 44)) の組合せを使用して実施した。ヒトCD3δの検出は、フォワードプライマーD0092F (5'-TAGTTCTGGTGACCTGGCTTTATCTACTGG-3' (配列番号: 45)) およびリバースプライマーD0685R (5'-ATGGCTGCTTCTAGAAAGCCACCAGTCTCAGG-3' (配列番号: 46)) の組合せを使用して実施した。ヒトCD3γの検出は、フォワードプライマーG0048F (5'-TGCTCCACGCTTTTGCCGGAGGACAG-3' (配列番号: 47)) およびリバースプライマーG0666R (5'-TAGGAGGAGAACACCTGGACTACTC-3' (配列番号: 48)) の組合せを使用して実施した。一方、マウスCd3εの検出は、フォワードプライマーe0065F (5'-AGCATCTTGAGAGGATGCGGTGGAACAC-3' (配列番号: 49)) およびリバースプライマーe0699R (5'-TGCTCGGAGGGCTGGATCTGGGTCCACAG-3' (配列番号: 50)) の組合せを使用して実施した。マウスCd3δの検出は、フォワードプライマーd055F (5'-TCATCCTGTGGCTTGCCTCTATTTGTTGC-3' (配列番号: 51)) およびリバースプライマーd651R (5'-TTGCTATGGCACTTTGAGAAACCTCCATC-3' (配列番号: 52)) の組合せを使用して実施した。マウスCd3γの検出は、フォワードプライマーg080F (5'-AATACTTCTACTGGAGAAGCAAAGAG-3' (配列番号: 53)) およびリバースプライマーg316R (5'-TAGTTGCATTTAGAGGACTTATTATGC-3' (配列番号: 54)) の組合せを使用して実施した。

PCR反応液の組成は、サンプル1μl、10×Ex緩衝液 2.5μl、dNTP (2.5mM) 2μl、プライマー (各50μM) 各0.1μl、Ex Taq (TAKARA) 0.25μl、および蒸留水19.05μl (全25μl) とした。また、PCR条件は、ヒトCD3δ、ヒトCD3γ、マウスCd3δおよびマウスCd3γに関しては、94℃にて2分間の前加熱、94℃にて30秒間、60℃にて30秒間、72℃にて2分間の増幅サイクル35サイクル、並びに72℃にて5分間の複加熱とした。ヒトCD3εおよびマウスCd3εに関しては、94℃にて2分間の前加熱、94℃にて30秒間、60℃にて30秒間、72℃にて2分間の増幅サイクル40サイクル、並びに72℃にて5分間の複加熱とした。ヒトCD3ε、ヒトCD3δおよびヒトCD3γの増幅産物は、それぞれ580bp、594bpおよび620bp、マウスCd3ε、マウスCd3δおよびマウスCd3γの増幅産物は635bp、597bpおよび237bpに検出されるようPCRプライマーを設計した。

Cd3遺伝子欠損マウスではマウスの各Cd3分子由来のPCRシグナルは検出されなかった。このCd3遺伝子欠損マウスに対して、ヒトCD3遺伝子領域が導入されたヒト

10

20

30

40

50

C D 3 遺伝子置換マウスのライン（ライン番号：1 C 3，3 B 1，8 I 1 2 および 2 A 4）のうち、ライン 1 C 3 および 8 I 1 2 に由来するサンプルではヒト C D 3 ϵ 、ヒト C D 3 δ および ヒト C D 3 γ のみが検出され、マウス C d 3 ϵ 、マウス C d 3 δ および マウス C d 3 γ はいずれも検出されなかった（図 20）。野生型マウス由来のサンプルからはヒト C D 3 ϵ 、ヒト C D 3 δ および ヒト C D 3 γ は検出されず、マウス C d 3 ϵ 、マウス C d 3 δ および マウス C d 3 γ が検出された（図 20）。この結果より、デザイン通りにマウス C d 3 ϵ 、C d 3 δ および C d 3 γ の代わりにヒト C D 3 ϵ 、C D 3 δ および C D 3 γ が発現するマウスが得られたことが確認された。なお、図 6 中のライン 4 H H 3 は、マウス C d 3 アレルが野生型で、ヒト C D 3 遺伝子が導入されている個体にて解析しており、ヒトの各 C D 3 分子とマウスの各 C d 3 分子の両方が検出されているが、その後、C d 3 欠損マウスとの繁殖により、マウス C d 3 アレルの欠損したヒト C D 3 遺伝子の発現ラインとして樹立した。

【 0 1 3 8 】

－組織免疫染色法による解析－

抗 C D 3 抗体を一次抗体として用い、その組織分布を検討した。C d 3 欠損マウスではいずれの組織においても C D 3 の染色は認められなかったが、C d 3 欠損マウスにヒト C D 3 遺伝子を導入したヒト C D 3 置換マウスでは、野生型マウスと同等の C D 3 特異的な染色が認められた。すなわち、胸腺（図 21 A）および脾臓（図 21 B）の T 細胞ゾーンにおいて特異的な染色が認められた。いずれの組織においても、野生型マウスと同様に T 細胞ゾーンにのみ染色が認められた。また、C d 3 遺伝子欠損マウスでは染色が認められておらず、ヒト C D 3 遺伝子置換マウスにおける染色は導入したヒト C D 3 遺伝子の発現によるものであることが示された。さらに、主要臓器における C D 3 の検出は野生型と同様であり、異所性の染色は認められなかった（表 1）。

10

20

30

40

50

hCD3, mCD3KOTG マウス
IACUC 14-074[illegible]

所見：－，ネガティブ；±，ベリースライト；＋，スライト；＋＋，モデルート；＋＋＋，シビア
IHC染色：－，ネガティブ；±，レア；＋，オケーションナル；＋＋，フリークエント；＋＋＋，コンスタント

(8) ヒトCD3遺伝子置換マウスにおける成熟T細胞の存在比率の評価

脾臓細胞を用いたFACS解析を実施した。マウス(12-14週齢、雄)より脾臓を採取し、70µmメッシュを用いて細胞を単離した。溶血剤(SIGMA社製)を添加して赤血球を溶解した。Fc Blocking溶液にてブロッキング後、 2×10^6 個の細胞に対して、FITC標識抗マウスCd3抗体、FITC標識抗ヒトCD3抗体、APC標識抗マウスCd4抗体、PE標識抗マウスCd8抗体を用い、各陽性細胞数をフローサイトメーターにて解析した。Cd3遺伝子欠損マウスにおいては、ほぼ完全に欠損していた成熟T細胞、すなわちCd4およびCd8単一陽性細胞が、ヒトCD3遺伝子置換マ

ウスにおいては野生型と同等の比率にて存在していることが示された。

【0140】

成熟T細胞の存在比率

【表2】

実験群	n数	mCd3	hCD3	mCd4	mCd8
ヒトCD3s置換マウス#1C3	n=4	ND.	38.8 (±3.1)	19.6 (±0.7)	16.1 (±3.6)
ヒトCD3s置換マウス#4HH3	n=2	ND.	29.8, 28.9	15.5, 13.9	17.5, 16.4
ヒトCD3s置換マウス#8I12	n=4	ND.	31.5 (±5.4)	15.5 (±3.1)	15.3 (±2.7)
hCD3E Tgマウス	n=4	19.5 (±3.76)	13.0 (±1.4)	7.4 (±0.6)	7.8 (±0.8)
Cd3s欠損マウス	n=4	ND.	ND.	1.8 (±1.3)	2.1 (±0.6)
C57BL/6N	n=4	40.4 (±8.42)	ND.	20.3 (±6.7)	12.7 (±2.1)

脾臓細胞あたりの、各マーカー陽性細胞の発現比率（単位%）を表に示した。ヒトCD3s置換マウス#4HH3を除く各実験群は4個体の平均を示し、ライン#4HH3については2個体の発現比率を示した。（括弧内は標準偏差を示す）

ND, not detected.

【0141】

【実施例7】ヒトCD3遺伝子置換マウスにおける脾臓細胞の細胞増殖能の評価

マウス（12週齢、雄）より脾臓を採取し、70 μmメッシュを用いて細胞を単離した。溶血剤（SIGMA社製）を添加して赤血球を溶解した。単離した脾臓細胞にT細胞マイトジェンのPHA（phytohaemagglutinin, SIGMA社製）を添加し、5日間培養した後、細胞増殖アッセイ用試薬（CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent, Promega社製）を用いてMTSアッセイを実施した。各遺伝子型の細胞増殖活性について、マイトジェン非添加における活性を1とした場合の相対比率にて表した（図23）。

その結果、Cd3遺伝子欠損マウスの脾臓細胞では、マイトジェン刺激に対する細胞増殖活性は、マイトジェン非添加より低下の傾向が認められ、野生型マウスの約60%であった。一方、ヒトCD3遺伝子置換マウスと野生型マウスの脾臓細胞では、マイトジェン刺激により細胞増殖活性は増加し、その活性はヒトCD3遺伝子置換マウスでは野生型マウスと比較し約90%であることが示された。

【0142】

【実施例8】ヒトCD3遺伝子置換マウスの脾臓細胞におけるサイトカイン産生の評価

マウスより脾臓を採取し、70 μmメッシュを用いて細胞を単離し、溶血剤を添加して赤血球を溶解し、脾臓細胞を調製した。T細胞マイトジェンのPHA (phytohaemagglutinin)を終濃度1 μg/mL添加した培養液にて3日間培養した後、培養液中に産生されたサイトカインを測定した（図24）。

その結果、Cd3遺伝子欠損マウスの脾臓細胞では、マイトジェン刺激によるサイトカイン産生は認められないのに対し、ヒトCD3遺伝子置換マウスでは、サイトカイン産生が認められ、その機能は回復していることが示された。

【0143】

【実施例9】ヒトCD3遺伝子置換マウスの脾臓細胞におけるヒトCD3抗体に対する反応性の評価

マウスより脾臓を採取し、70 μmメッシュを用いて細胞を単離し、溶血剤を添加して赤血球を溶解し、脾臓細胞を調製した。抗ヒトCD3抗体にて固層化を施したプレートに細胞を播種し、培養3日後の細胞増殖活性を評価するためMTSアッセイを実施した（図25A、B）。また、培養液中に産生されたサイトカインを測定した（図25C、D）。

その結果、ヒトCD3遺伝子置換マウスは抗ヒトCD3抗体の刺激に特異的に反応し、

細胞増殖活性（図25B）、およびサイトカイン産生（図25D）が示された。そのレベルは、野生型マウスの抗マウスCD3抗体の刺激に対する反応性と同程度であった。この結果により、ヒトCD3遺伝子置換マウスは、正常な機能を有するヒトCD3を発現していることが示された。

【0144】

[実施例10]ヒトCD3遺伝子置換マウスの免疫機能評価

（1）外来抗原感作に対する特異的抗体産生能の検討

外来抗原に対して特異的な抗体を産生するためには、樹状細胞等、抗原提示細胞の表面に主要組織適合性抗原（Major Histocompatibility Complex, MHC）とともに提示された抗原ペプチドに結合できる機能的なヘルパーT細胞が存在し、抗体産生細胞に適切な抗体を産生させるための指令を出す機能を保有していなければならない。上述のヒトCD3遺伝子置換マウスが、正常な機能を持つヘルパーT細胞を持ち、外来抗原の感作に対して特異的抗体を産生することができるかどうかを検討した。感作抗原としては、ニワトリ卵白アルブミン（OVA）をフロイント・アジュバンドとともに感作した。OVAの感作は4週間間隔にて2回行った。すなわち、1匹当たり100 μ gのOVAを、1回目は完全フロイント・アジュバンドを用いて背部皮下に感作し、その4週間後に不完全フロイント・アジュバンドを用いて同様に背部皮下に感作した。ヒトCD3遺伝子置換マウスとしては、由来する改変ES細胞クローンの異なる2ライン（ライン番号1C3および8I12）を設定し、ヒトCD3 ϵ 過剰発現マウスと比較した。さらに、対照として、野生型マウスおよびCd3遺伝子欠損マウスを設定して同様の抗原感作を行った。

2回目の感作の1週間後に、イソフルラン吸入麻酔下にて開腹し、腹部大静脈より全採血および放血することによって安楽死処置を施した。採取した血液より血清を分離し、OVA特異的IgG1およびOVA特異的IgEの濃度を測定した（図26）。

その結果、マウスCd3欠損マウスの血清中からはOVA特異的抗体は、IgG1タイプもIgEタイプのいずれも検出されなかったのに対し、ヒトCD3遺伝子置換マウスは2ラインともOVA特異的IgG1およびIgEが検出され、そのレベルは野生型マウスと同等であった。この結果により、ヒトCD3遺伝子置換マウスは、外来抗原の感作に対して正常な抗体産生能を有していることが示された。

【0145】

[実施例11]ヒトHER2発現マウス肝細胞ガン株移植モデルにおける抗ヒトHER2抗ヒトCD3二重特異性抗体の抗腫瘍効果

（1）細胞株

ヒトHER2を強制発現させたHepa1-6細胞（Hepa1-6/HER2）を用いた。Hepa1-6/HER2細胞は10%FBS（BOVOGEN社製）、0.5 mg/mL Zeocin（ナカライテスク社製）を含むDulbecco's Modifid Eagle's Medium培地（SIGMA社製）にて維持継代した。

（2）Hepa1-6/HER2移植モデルの作製

Hepa1-6/HER2細胞をDulbecco's Modifid Eagle's Medium培地（SIGMA社製）とマトリゲルにて 1×10^8 個/mLになるように調製した。mCd3 KO homo, hCD3 Tg型マウス#1C3（19週齢）の腹部皮下へこの細胞懸濁液100 μ L（ 1×10^7 個/マウス）を移植した。腫瘍体積は以下の式にて算出し、腫瘍体積が160~234 mm³になった時点でモデル成立とした。

$$\text{腫瘍体積} = \text{長径} \times \text{短径} \times \text{短径} / 2$$

（3）投与薬剤の調製

Her2とCD3に対する二重特異性抗体（HER2_CD3抗体）はPBS（-）を用いて、0.5 mg/mL（5 mg/kg投与群）になるように調製した。HER2_CD3抗体（HER2結合H鎖可変領域：配列番号：55および56、HER2結合L鎖可変領域：配列番号：57および58、CD3結合H鎖可変領域：配列番号：59および60、CD3結合L鎖可変領域：配列番号：61および62）は、当業者公知の方法に従って作製された。

（4）薬剤投与

(2) で作製したHepa1-6/HER2移植モデルに対し、腫瘍体積にて群分けし、上記(3)で調製した抗体試料を10 mL/kgにて、尾静脈より投与した。陰性対照として、PBS(−)(Vehicle)を同様に10 mL/kgにて、尾静脈より投与した。

(5) 抗腫瘍効果の評価

HER2_CD3抗体のHepa1-6/HER2移植モデルにおける抗腫瘍効果については移植後28日目の腫瘍体積(図27)で評価した。統計解析にはJMP(SAS Institute Inc.)を用い、統計解析は最終測定日の腫瘍体積を用いて、Wilcoxon検定にて確認した。(有意水準は両側5%)その結果、HER2_CD3抗体の投与により、腫瘍の増殖抑制が有意に認められた。

【0146】

[実施例12]ヒトGlypican3(GPC3)発現マウス肝細胞ガン株移植モデルにおける免疫チェックポイント阻害剤の抗腫瘍効果

10

(1) 細胞株

ヒトGPC3を強制発現させたHepa1-6細胞(Hepa1-6/hGPC3)を用いた。Hepa1-6/hGPC3細胞は10%FBS(BOVOGEN社製)、0.6 mg/mL G418(ナカライテスク社製)を含むDulbecco's Modifid Eagle's Medium培地(SIGMA社製)にて維持継代した。

(2) Hepa1-6/hGPC3移植モデルの作製

Hepa1-6/hGPC3細胞をDulbecco's Modifid Eagle's Medium培地(SIGMA社製)とマトリゲルにて 5×10^7 個/mLになるように調製した。mCd3 KO homo, hCD3 Tg型マウス#1C3(20週齢)の腹部皮下へこの細胞懸濁液200 μ L(1×10^7 個/マウス)を移植した。腫瘍体積は以下の式にて算出し、腫瘍体積が160~300 mm³になった時点でモデル成立とした。

20

$$\text{腫瘍体積} = \text{長径} \times \text{短径} \times \text{短径} / 2$$

(3) 投与薬剤の調製

免疫チェックポイント阻害剤である、抗マウスCTLA-4抗体(clone:UC10-4F10-11, BioXcell社製)、抗マウスPD-1抗体(clone:RMP1-14, BioXcell社製)、抗マウスPD-L1抗体(clone:10F.9G2, BioXcell社製)はPBS(−)を用いて、1 mg/mL(0.2 mg/head投与)になるように調製した。

(4) 薬剤投与

(2)で作製したHepa1-6/hGPC3移植モデルに対し、腫瘍体積にて群分けし、上記(3)で調製した抗マウスCTLA-4抗体、抗マウスPD-1抗体、抗マウスPD-L1抗体を0.2 mL/mouseにて尾静脈より投与した。陰性対照として、PBS(−)(Vehicle)を同様に尾静脈より投与した。投与は腫瘍移植後7日(群分け当日)、12日(群分け5日後)の二回実施した。

30

(5) 抗腫瘍効果の評価

Hepa1-6/hGPC3移植モデルにおける抗腫瘍効果については腫瘍体積の推移(図28)で評価した。その結果、免疫チェックポイント阻害剤の投与により、腫瘍の増殖抑制が認められた。

【0147】

[実施例13]抗ヒトCTLA4/抗ヒトCD3二重特異性抗体による、in vivo薬効評価

13-1. ヒトCTLA4およびヒトCD3に特異的に結合する二重特異性抗体の発現と精製

40

抗ヒトCTLA4側として重鎖可変領域MDX10D1H(配列番号:63)および軽鎖可変領域MDX10D1L(配列番号:64)を用いた。この時定常領域はFc γ 受容体への結合を低減し、2つの重鎖がヘテロ会合化するように改変を加えた重鎖定常領域mF18mN4(配列番号:65)、軽鎖定常領域mk1(配列番号:66)を使用している。これら遺伝子を動物発現プラスミドに挿入した。

【0148】

また抗ヒトCD3側としては、重鎖可変領域TR01H113(配列番号:67)、軽鎖可変領域L0011(配列番号:68)、この時定常領域はFc γ 受容体への結合を低減し、2つの重鎖がヘテロ会合化するように改変を加えた重鎖定常領域mF18mP4(配列番号:69)、軽鎖定常領域mk1(配列番号:66)を使用している。これら遺伝子を動物発現プラスミドに挿

50

入した。

【0149】

抗ヒトCTLA4抗体および抗ヒトCD3抗体は以下の方法を用いて抗体を発現させた。FreeStyle 293 Expression Medium培地 (Invitrogen) に 1.33×10^6 細胞/mLの細胞密度で懸濁し、播種したヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株 (Invitrogen) に対して、リポフェクション法により調製されたプラスミドを導入した。CO₂インキュベーター (37℃、8%CO₂、90 rpm) で4日間培養した培養上清から、Hi TrapTM Protein G HPカラム (GE Healthcare) を用いて当業者公知の方法で抗体を精製した。分光光度計を用いて、精製した抗体溶液の280 nmでの吸光度を測定した。得られた測定値からPACE法により算出した吸光係数を用いて、精製した抗体の濃度を算出した (Protein Science (1995) 4, 2411-2423)。

10

【0150】

精製したそれぞれのホモ体は表3の組み合わせで、定常領域の電荷の違いを利用した当業者公知の方法 (W02015/046467) で混合し、目的の二重特異性抗体を作製した。

【表3】

No.	クローン名	抗体1	抗体2
1	MDX10//TR01H113	MDX10-mF18mN4	TR01H113/L0011-mF18mP4

【0151】

20

13-2. 同系腫瘍株移植マウスモデルにおける抗腫瘍効果の評価

13-2-1. 細胞株

Colon38細胞は (公財) がん研究会から譲渡されたものを使用した。Colon38細胞は10%FBS (SIGMA社製) を含む、RPMI1640 (SIGMA社製) にて維持継代した。

【0152】

13-2-2. 同系腫瘍株移植マウスモデルの作製

ヒトCD3遺伝子置換マウスをヒトCTLA4遺伝子置換マウス (Blood 2005 106:3127-3133) と交雑することにより、ヒトCD3遺伝子置換かつヒトCTLA4遺伝子置換マウスを樹立し、抗腫瘍効果評価用モデルマウスとして使用した。

マウスへ自家移植する腫瘍細胞株としてColon38を用いた。マウスの皮下に細胞を移植し、移植腫瘍の体積が100mm³程度以上になったものをモデル成立とした。

30

移植腫瘍の体積は以下の式にて算出した。

$$\text{腫瘍体積} = \text{長径} \times \text{短径} \times \text{短径} / 2$$

【0153】

13-2-3. 投与薬剤の調製

Colon38細胞移植モデルへの投与薬剤としては、13-1.で作製した抗ヒトCTLA4/抗ヒトCD3バイスペシフィックモノクローナル抗体 (MDX10//TR01H113) を用いた。媒体としてヒスチジンバッファー (150mM NaCl/20mM His-HCl buffer, pH 6.0、以下単にバッファーと表記) を用い1000μg/mLになるように調製した。

【0154】

40

13-2-4. 薬剤投与

Colon38細胞移植モデルでのMDX10//TR01H113抗体の評価においては、移植後12日目にMDX10//TR01H113を200μg/mouseもしくはControl群 (ベヒクル投与群) としてバッファーを0.2 mL/mouse、尾静脈より投与した。

【0155】

薬剤処置に関する詳細は表4に示した。

50

【表 4】

Colon38 細胞移植モデル (MDX10//TR01H113 投与実験)

群	匹数	薬剤	用量	投与法	投与日
1	5	バッファ	-	尾静脈	移植後12日
2	5	MDX10//TR01H113	200 μ g/mouse	尾静脈	移植後12日

【0156】

13-2-5. 抗腫瘍効果の評価

抗腫瘍効果については、8-2-2に記した計算式にて算出した腫瘍体積で評価した。統計解析にはJMPTM 11.2.1 (SAS Institute Inc.) を用いた。

その結果、抗マウスCTLA4/CD3バイスペシフィックモノクローナル抗体を投与すると、Control群と比較して、腫瘍の増殖抑制が有意に認められた (図29)。

【0157】

[実施例14] ヒトGPC3ノックイン・ヒトCD3遺伝子置換マウスの作出

ヒトGPC3ノックインマウスとヒトCD3遺伝子置換マウスを交配し、得られた次世代の個体の遺伝子型解析により、ヒトGPC3ノックインアレル、マウスCd3遺伝子領域欠損アレル、かつヒトCD3遺伝子領域を有するアレルが伝達しているマウス系統を樹立した。

【0158】

[実施例15] ヒトGPC3ノックイン・ヒトCD3遺伝子置換マウスを用いた抗ヒトGPC3抗マウスCD3二重特異性抗体の抗腫瘍試験

(1) 細胞株

Hepa1-6細胞 (ATCCから入手可能。ATCC number: CRL-1830) にヒトGPC3を強制発現させた、Hepa1-6細胞 (Hepa1-6/hGPC3) を用いた。Hepa1-6/hGPC3細胞は10% FBS (BIONET社製)、0.6 mg/mL LG418 (ナカライテスク社製) を含むDulbecco's Modifid Eagle's Medium培地 (SIGMA社製) にて維持継代した。

(2) Hepa1-6/hGPC3移植モデルの作製

Hepa1-6/hGPC3細胞をDulbecco's Modifid Eagle's Medium培地 (SIGMA社製) で 2×10^8 個/mLになるように調製し、等容量のMatrigelを添加した (1×10^8 個/mL)。ヒトGPC3ノックイン・ヒトCD3遺伝子置換マウスの腹部皮下へこの細胞懸濁液100 μ L (1×10^7 個/マウス) を移植した。腫瘍体積は以下の式にて算出し、腫瘍体積が160~360mm³程度となった時点でモデル成立とした。

腫瘍体積 = 長径 $\times$ 短径 $\times$ 短径 / 2

(3) 投与薬剤の調製

ヒトGPC3およびヒトCD3に対する二重特異性抗体 (hGPC3_hCD3抗体) はPBS(-)を用いて、0.5 mg/mL (5 mg/kg投与群)、0.1 mg/mL (1 mg/kg投与群、) 0.02 mg/mL (0.2 mg/kg投与群) になるように調製した。hGPC3_hCD3抗体は、抗ヒトCD3側として重鎖可変領域TR01H113 (配列番号: 67) および重鎖定常領域E2702sKsc (配列番号: 70)、抗ヒトGPC3側として重鎖可変領域GCH065 (配列番号: 71) および重鎖定常領域E2704sEpsc (配列番号: 72)、共通軽鎖として、軽鎖可変領域L0011 (配列番号: 73) および軽鎖定常領域k0 (配列番号: 74) を用いて、当業者公知の方法に従って作製された。

(4) 薬剤投与

上記(2)で作製したHepa1-6/hGPC3移植モデルに対し、腫瘍体積を似て群分けし、上記(3)で調製した抗体試料を10 mL/kgにて、尾静脈より投与した。陰性対照として、PBS(-) (Vehicle) を同様に10 mL/kgにて、尾静脈より投与した。

(5) 抗腫瘍効果の評価

hGPC3_hCD3抗体のHepa1-6/hGPC3移植モデルにおける抗腫瘍効果については移植後29日目の腫瘍体積で評価した。その結果、hGPC3_hCD3抗体の投与により、用量依存的な腫瘍の増殖抑制が認められた (図30)。

(6) hGPC3_hCD3抗体投与におけるサイトカイン放出

投与前日、初回投与後6h、24h、二回目投与前日及び6h後に30 µl程度血液をヘパリン処理にて採取し血漿を得た。得られた血漿を用い、IFN γ 、IL-10、IL-17、IL-2、IL-4、IL-6およびTNFの濃度をBDTMcytometric bead array (CBA) mouse Th1/Th2/Th17 cytokine kit 2 (BD Bioscience社製) にて測定した。その結果、hGPC3抗原に依存したサイトカインの放出がヒトGPC3ノックイン・ヒトCD3遺伝子置換マウスで確認された。しかし、二回目投与後のサイトカインの放出はほとんど認められなかった。(図31) サイトカインの上昇は、組織に発現したhGPC3にhGPC3_hCD3抗体が結合し、T細胞が活性化する事で起こる。ヒトGPC3ノックイン・ヒトCD3遺伝子置換マウスにおけるサイトカインの上昇は、hGPC3KIマウスと同様、ノックインしたhGPC3遺伝子が膜上に発現するなど、本来のGPC3の発現の特徴を反映している事を示す。また、抗ヒトGPC3抗ヒトCD3二重特異性抗体をサルに投与した際も、サイトカインの上昇が確認された事から、ヒトGPC3ノックイン・ヒトCD3遺伝子置換マウスもヒト、サルと同様に薬理作用を示すマウスであると考えられ、更に、ヒト、サルと交差するCD3アームをもつ抗体を評価することができるため、それらの薬理作用の評価に有用であり、ヒト由来の疾患関連分子に特異的に作用する薬剤の開発に利用できることが示唆された。

【産業上の利用可能性】

【0159】

本発明は、非ヒト動物の内因性GPC3ポリペプチドの発現を欠損し、かつ生理的に妥当なレベルでヒトGPC3ポリペプチドを発現する遺伝子改変非ヒト動物、当該非ヒト動物の作製方法、及び当該非ヒト動物を用いた被験物質の評価方法を提供するものである。したがって、本発明は、特に、ヒトGPC3ポリペプチドを発現するがんを含む疾患の治療薬の開発に利用可能である。

10

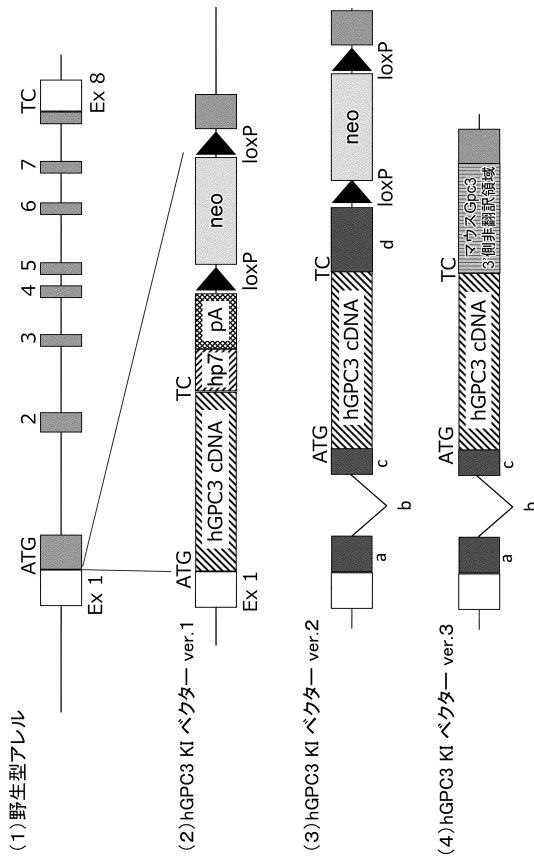
20

30

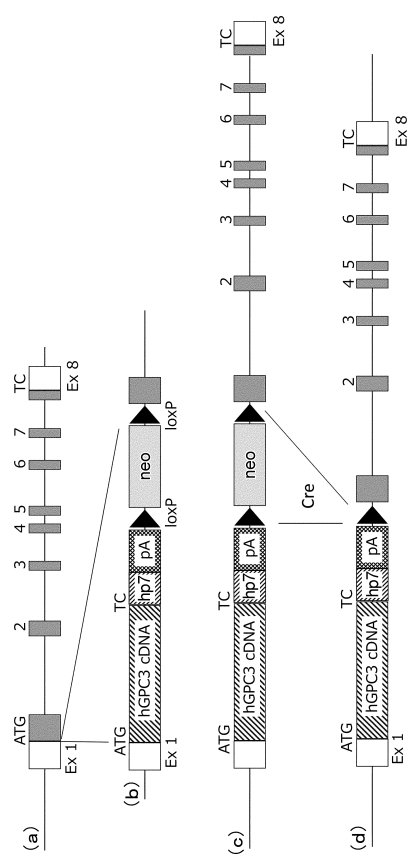
40

50

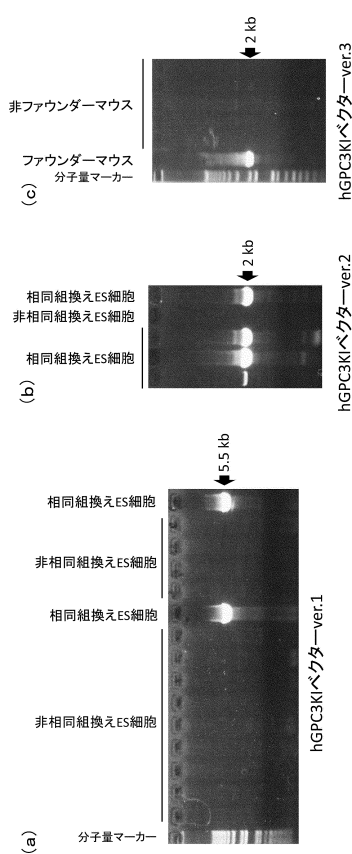
【図面】
【図 1】



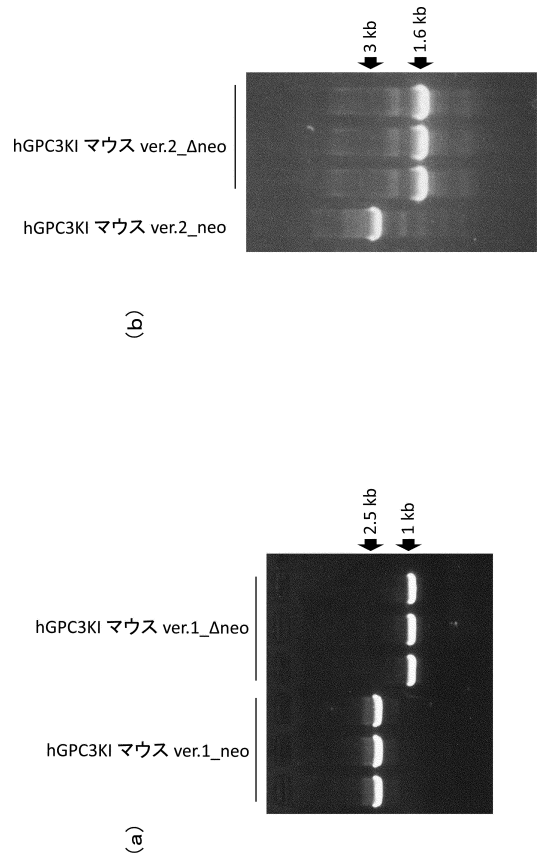
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

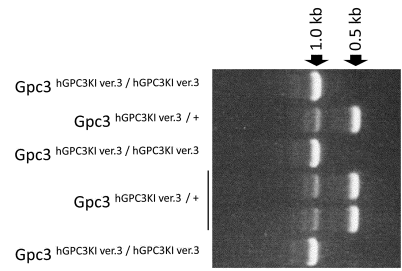
20

30

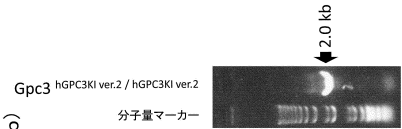
40

50

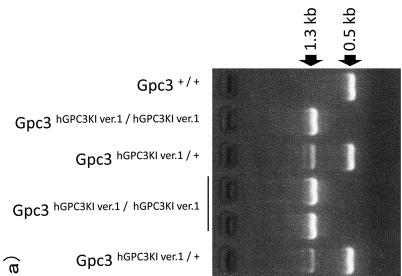
【図 5】



(c)

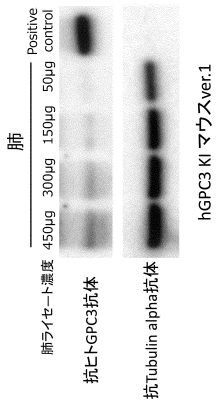
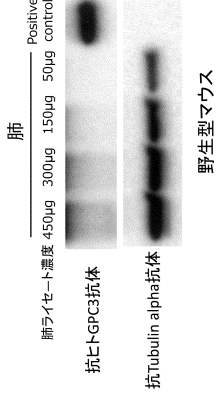


(b)

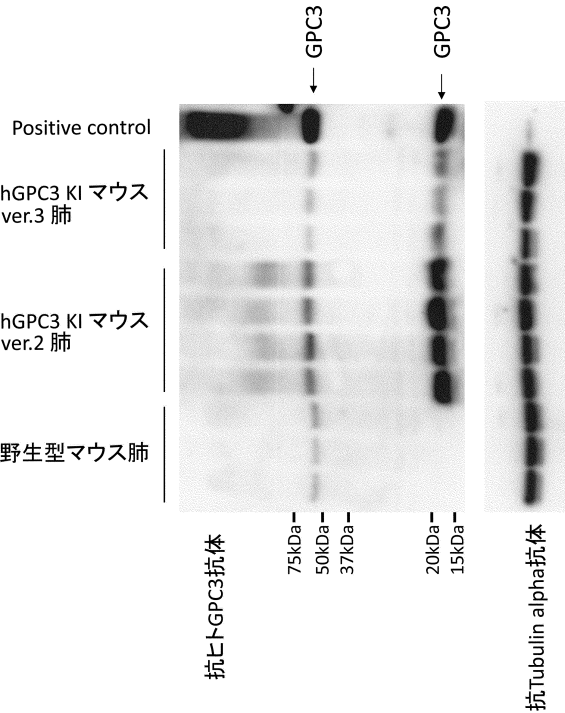


(a)

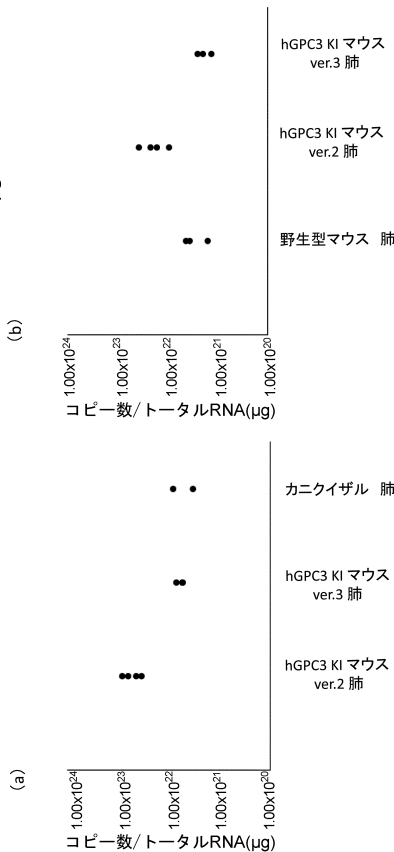
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

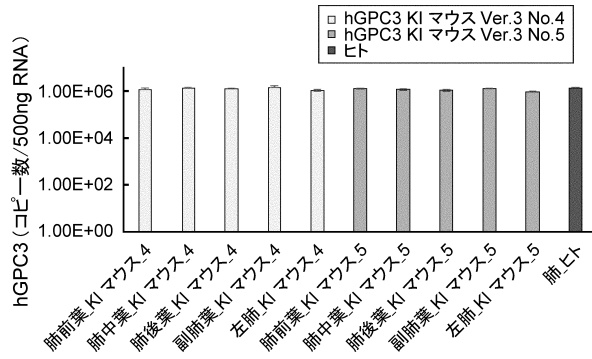
20

30

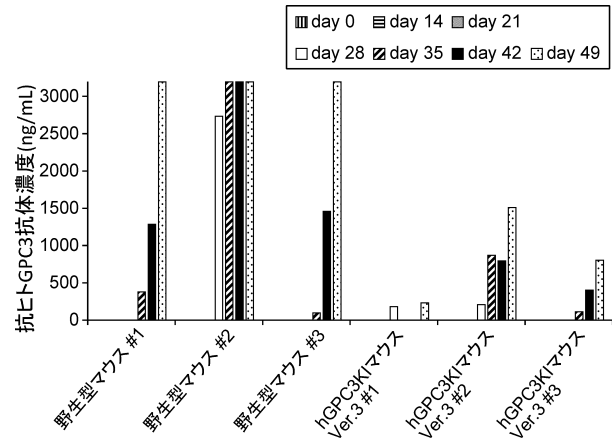
40

50

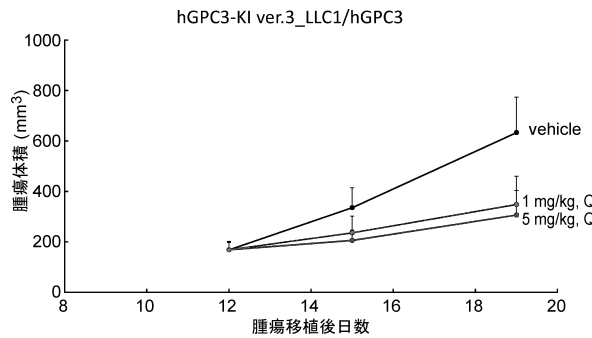
【図 9】



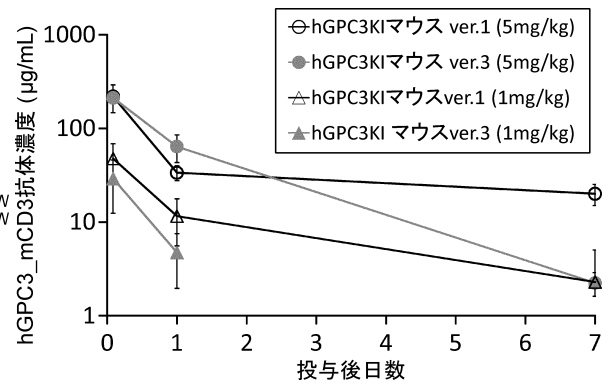
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

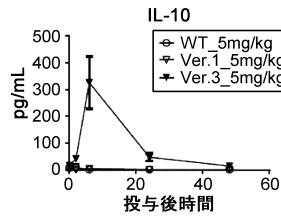
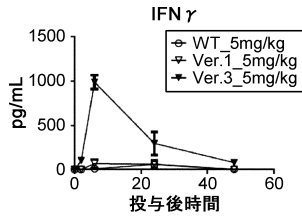
20

30

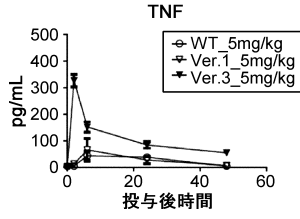
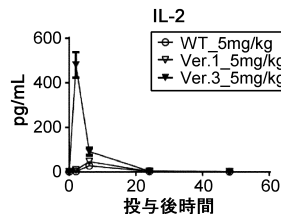
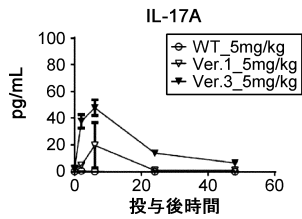
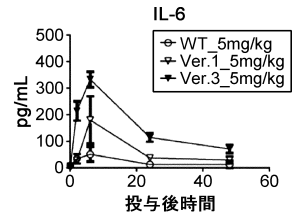
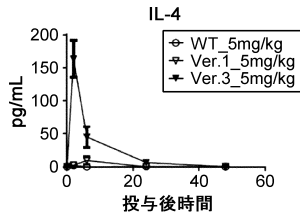
40

50

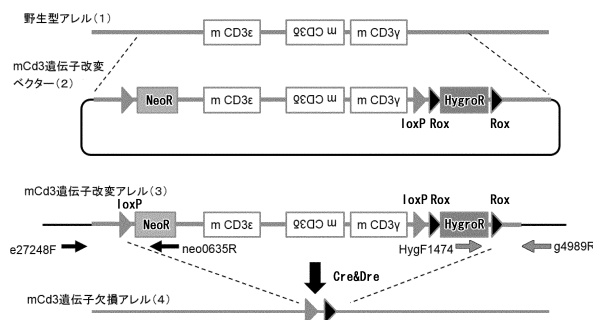
【図 1 3】



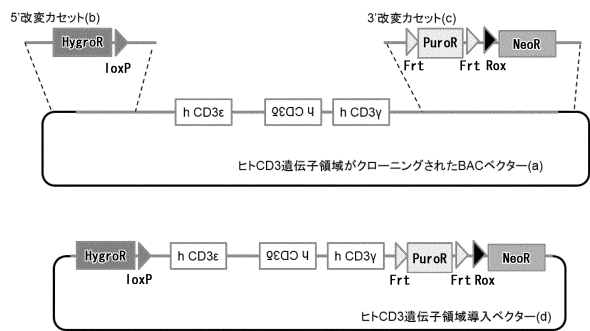
【図 1 4】



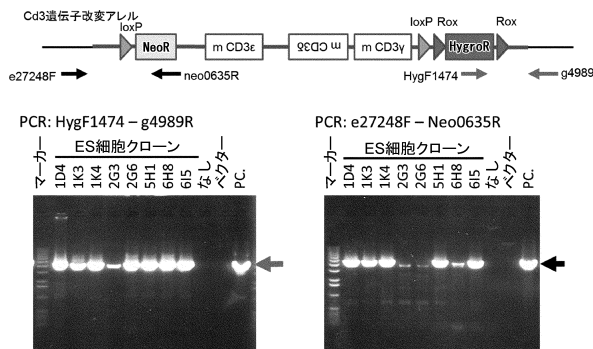
【図 1 5 A】



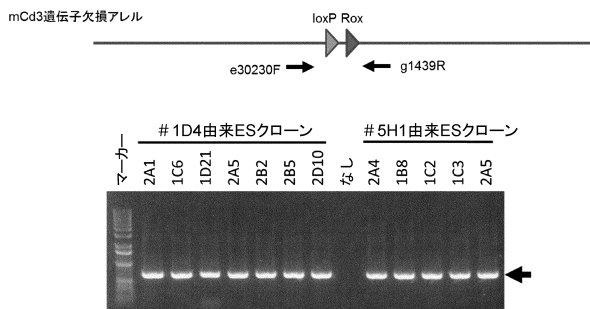
【図 1 5 B】



【図 1 6】



【図 1 7 A】



10

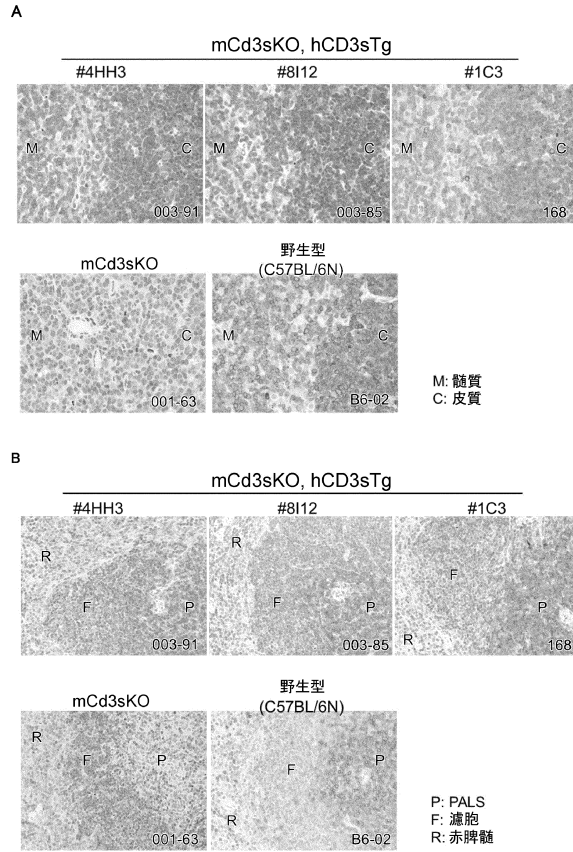
20

30

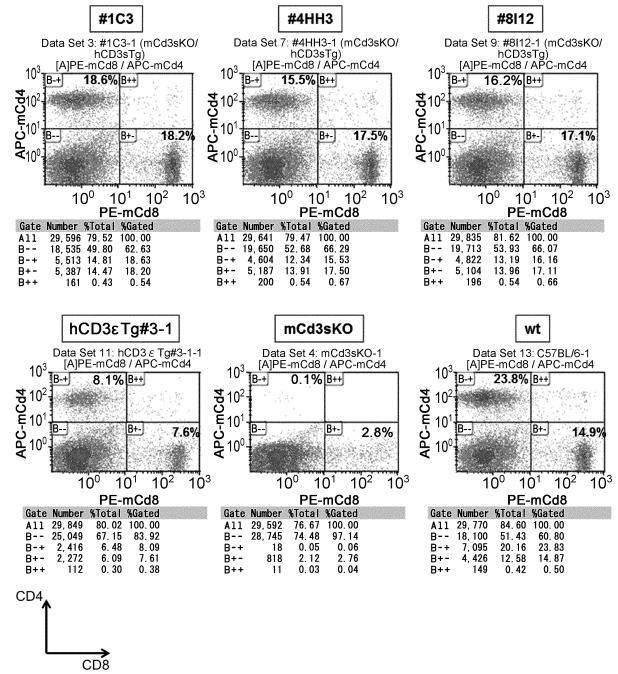
40

50

【図 2 1】



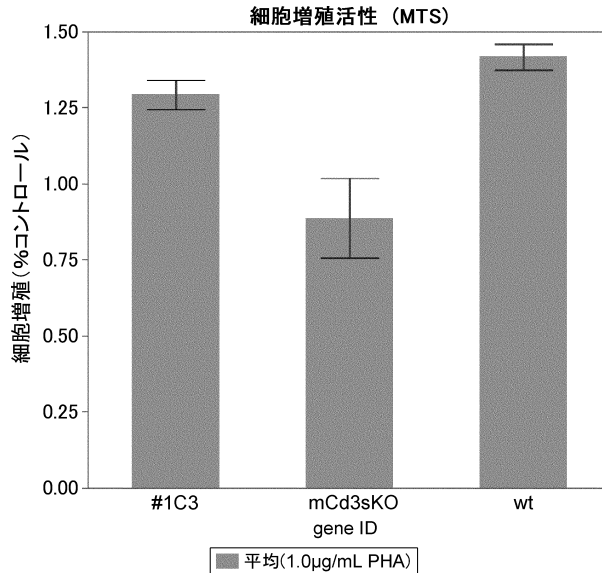
【図 2 2】



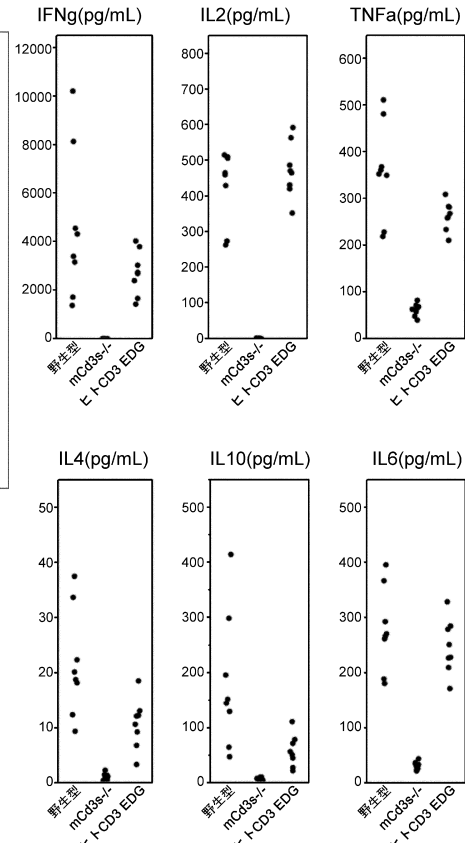
10

20

【図 2 3】



【図 2 4】

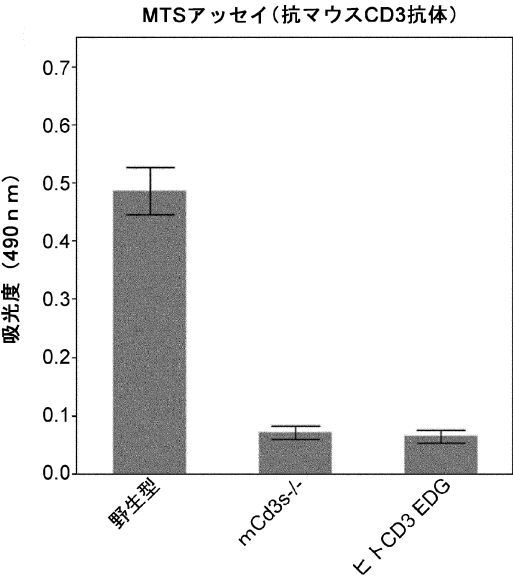


30

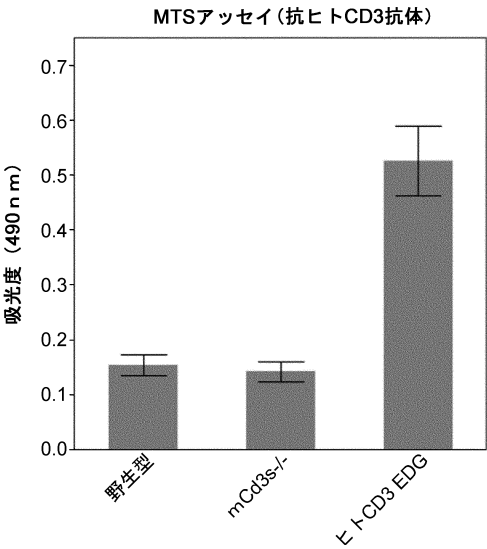
40

50

【図 2 5 A】

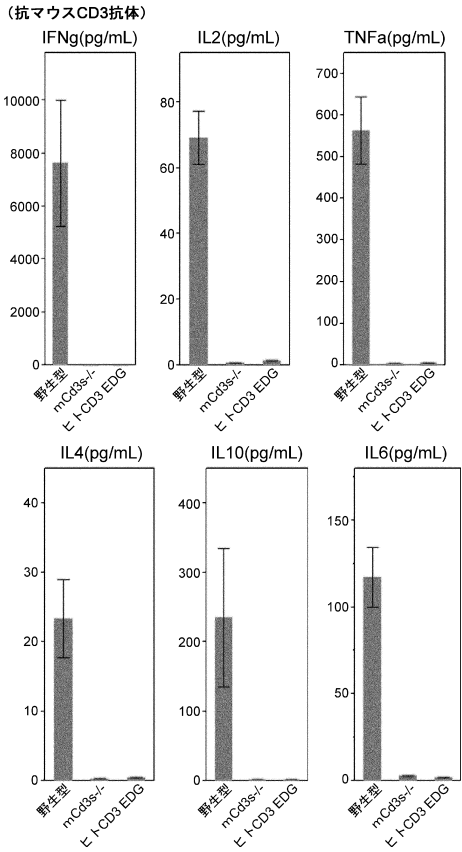


【図 2 5 B】

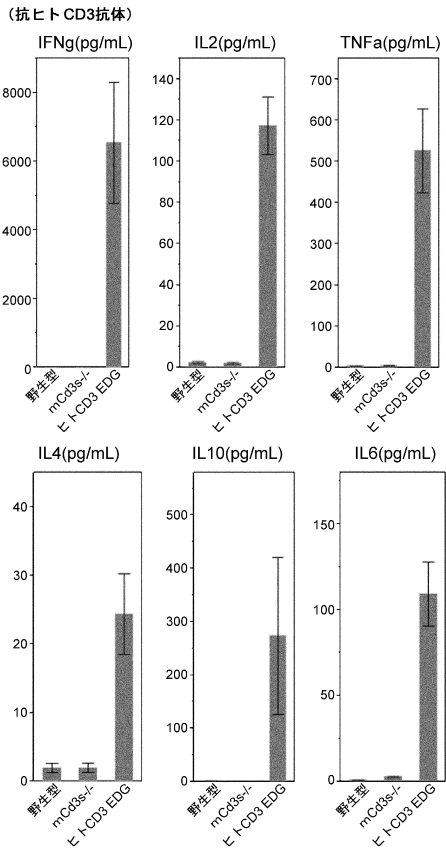


10

【図 2 5 C】



【図 2 5 D】



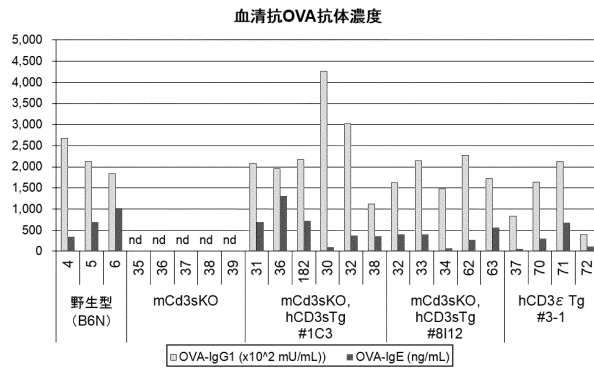
20

30

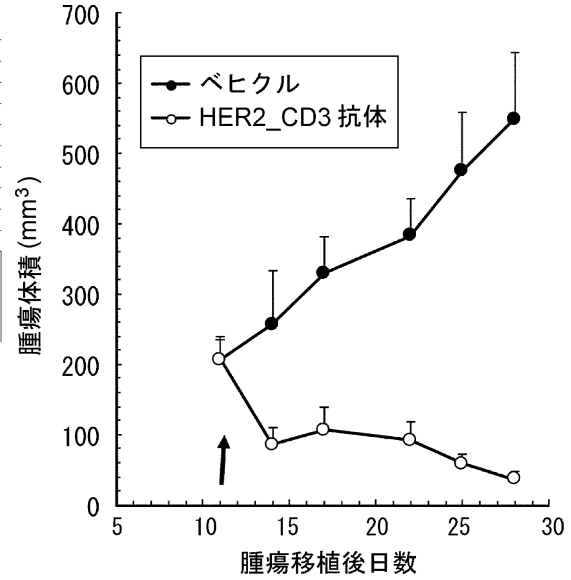
40

50

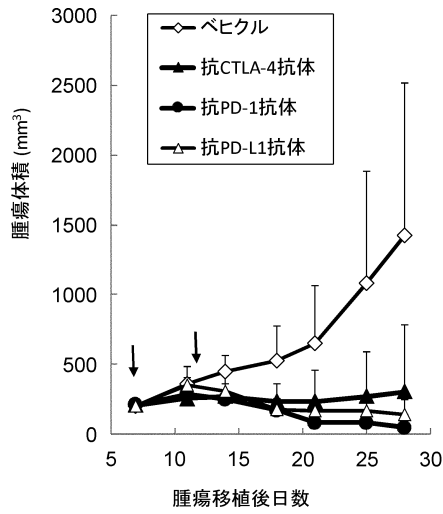
【図 2 6】



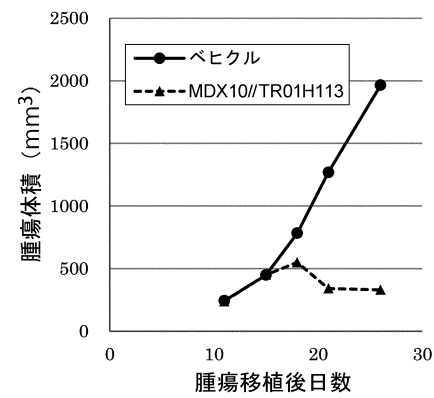
【図 2 7】



【図 2 8】



【図 2 9】



10

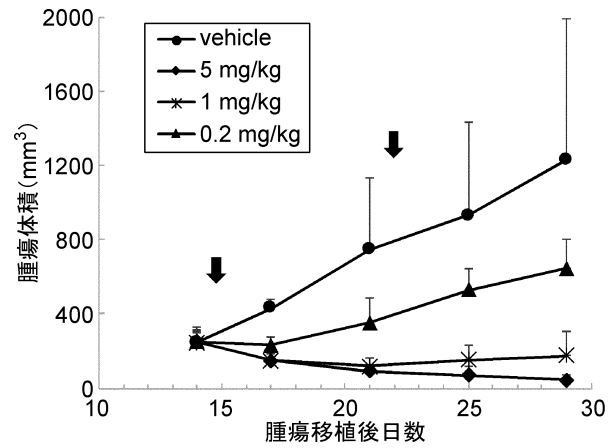
20

30

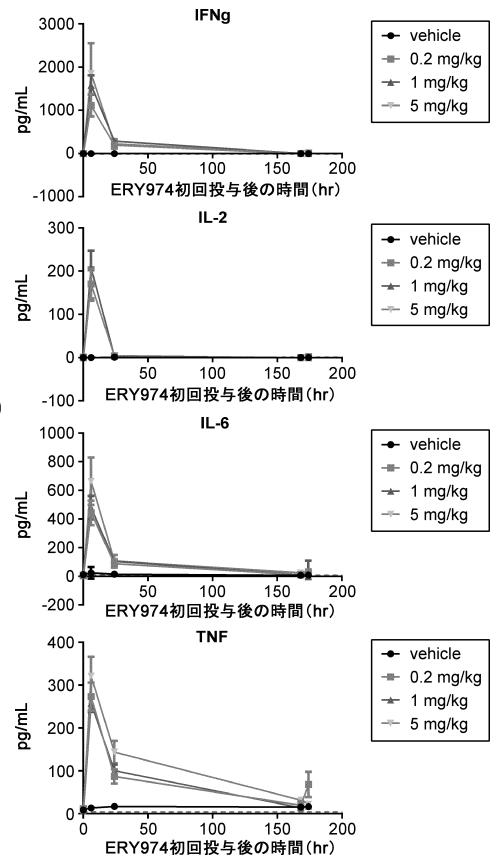
40

50

【図 3 0】



【図 3 1】



【配列表】

0007125347000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

G 0 1 N 33/15 (2006.01)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

F I

G 0 1 N 33/15 Z
C 1 2 Q 1/02

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 寺社下 浩一
静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内

(72)発明者 日野 裕司
静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内

(72)発明者 石黒 敬弘
東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号 中外製薬株式会社内

(72)発明者 木下 恭子
神奈川県鎌倉市梶原200番地 中外製薬株式会社内

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 国際公開第99/037764 (WO, A2)
Hepatology, 2010年, Vol.52, No.3, pp.1060-1067

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)
C 1 2 N 15/00-15/90
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)