(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5352037号
(P5352037)
(45)発行日　平成25年11月27日(2013.11.27)　(24)登録日　平成25年8月30日(2013.8.30)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12N 5/095	(2010.01)	C12N	5/00	202V
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02	
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A
G01N 33/15	(2006.01)	G01N	33/15	Z

請求項の数 45　(全 80 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2002-517738 (P2002-517738)
(86)(22)出願日　平成13年8月2日 (2001.8.2)
(65)公表番号　特表2004-527211 (P2004-527211A)
(43)公表日　平成16年9月9日 (2004.9.9)
(86)国際出願番号　PCT/US2001/024243
(87)国際公開番号　WO2002/012447
(87)国際公開日　平成14年2月14日 (2002.2.14)
審査請求日　平成20年8月4日 (2008.8.4)
(31)優先権主張番号　60/222,794
(32)優先日　平成12年8月3日 (2000.8.3)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/240,317
(32)優先日　平成12年10月13日 (2000.10.13)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　503046404
ザ　リージェンツ　オブ　ザ　ユニバーシティ　オブ　ミシガン
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN
アメリカ合衆国，４８１０４－２５９２　ミシガン州，アン　アーバー，セカンド　フロア，サウス　ユニバーシティ　アベニュー　１２１４　テクノロジー　マネージメント　オフィス内
ｃ／ｏ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｍａｎａｇｅｍｅｎｔ Ｏｆｆｉｃｅ １２１４ Ｓ．Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ａｖｅ．，２ｎｄ Ｆｌｏｏｒ Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】充実腫瘍幹細胞の単離及び用途

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
上皮の充実腫瘍に由来する充実腫瘍幹細胞の富化された集団であり、
該集団は充実腫瘍幹細胞及び充実腫瘍細胞を含み、
該充実腫瘍幹細胞が
（ａ）未分画腫瘍細胞に比して少なくとも２倍富化されており；
（ｂ）腫瘍形成性であり；及び
（ｃ）ＣＤ４４を発現する、集団。
【請求項２】
前記充実腫瘍幹細胞のＣＤ２４の発現が検出不能であるレベル又は低いレベルである（ＣＤ２４$^{-/low}$）、請求項１記載の充実腫瘍幹細胞の富化集団。
【請求項３】
前記充実腫瘍幹細胞がＢ３８．１を発現する請求項１又は２に記載の充実腫瘍幹細胞の富化集団。
【請求項４】
前記充実腫瘍幹細胞がＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ１０、ＣＤ１４、ＣＤ１６、ＣＤ３１、ＣＤ４５、ＣＤ６４、及びＣＤ１４０ｂから成る群から選択される１以上のＬＩＮＥＡＧＥマーカーを発現しない請求項１～３のいずれか１項に記載の充実腫瘍幹細胞の富化集団。
【請求項５】
前記充実腫瘍幹細胞がさらに上皮特異性抗原（ＥＳＡ）を発現する請求項１～４のいず

れか１項に記載の充実腫瘍幹細胞の富化集団。
【請求項６】
前記集団が少なくとも５倍富化された、請求項３～５のいずれか１項に記載の充実腫瘍幹細胞の富化集団。
【請求項７】
前記集団が少なくとも１０倍富化された、請求項４又は５に記載の充実腫瘍幹細胞の富化集団。
【請求項８】
前記集団が少なくとも５０倍富化された請求項４又は５に記載の充実腫瘍幹細胞の富化集団。
【請求項９】
充実腫瘍幹細胞が、培地中に存在する、請求項１～８のいずれか１項に記載の充実腫瘍幹細胞の富化集団。
【請求項１０】
充実腫瘍幹細胞は増殖を低下させるよう処理されている、請求項１～９のいずれか１項に記載の充実腫瘍幹細胞の富化集団。
【請求項１１】
充実腫瘍幹細胞の集団を富化する方法であって、
（ａ）上皮の充実腫瘍のサンプルを、充実腫瘍幹細胞と充実腫瘍細胞との初期混合物へと解離させる工程；
（ｂ）解離した細胞を、ＣＤ４４を結合させる第一の試薬に接触させる工程；並びに
（ｃ）第一の試薬に結合する細胞を選別する工程であり、該選別された細胞が、前記実分画の腫瘍細胞の初期混合物と比べて少なくとも２倍富化されている工程、を含む方法。
【請求項１２】
充実腫瘍幹細胞の集団を富化する方法であって、
（ａ）上皮の充実腫瘍のサンプルを、充実腫瘍幹細胞と充実腫瘍細胞との初期混合物へと解離させる工程；
（ｂ）解離した細胞を、ＣＤ４４を結合させる第一の試薬とＣＤ２４を結合させる第二の試薬に接触させる工程；並びに
（ｃ）第一の試薬に結合し、第二の試薬に結合しない細胞を選別する工程であり、該選別された細胞が、前記未分画の腫瘍細胞の初期混合物と比べて少なくとも２倍富化されている工程、を含む方法。
【請求項１３】
充実腫瘍幹細胞の集団を富化する方法であって、
（ａ）上皮の充実腫瘍のサンプルを、充実腫瘍幹細胞と充実腫瘍細胞との初期混合物へと解離させる工程；
（ｂ）解離した細胞を、ＣＤ４４を結合させる第一の試薬と、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ１０、ＣＤ１４、ＣＤ１６、ＣＤ３１、ＣＤ４５、ＣＤ６４、及びＣＤ１４０ｂから成る群から選択される１以上のＬＩＮＥＡＧＥマーカーを結合させる第二の試薬と、ＣＤ２４を結合させる第三の試薬に接触させる工程；並びに
（ｃ）第一の試薬に結合し、第二及び第三の試薬に結合しない細胞を選別する工程であり、該選別された細胞が、前記未分画の腫瘍細胞の初期混合物と比べて少なくとも２倍富化されている工程、を含む方法。
【請求項１４】
第一、第二、又は第三の試薬が抗体である、請求項１１～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５】
第一、第二、又は第三の試薬は、蛍光色素又は磁性粒子と結合されている、請求項１１～１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】

細胞選別を、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別法、パンニング法、アフィニティーカラム分離法又は磁気選別法によって実施する、請求項１１～１５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７】
（ｄ）選別した充実腫瘍幹細胞を単離する工程
をさらに含む、請求項１１～１６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８】
充実腫瘍幹細胞が、乳癌幹細胞又は卵巣癌幹細胞である、請求項１１～１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９】
選別された細胞が、さらにＢ３８．１を発現する細胞で富化されている、請求項１１～１８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０】
選別された細胞が少なくとも１０倍富化されている請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
選別された細胞が、さらに上皮特異性抗原（ＥＳＡ）を発現する細胞で富化されている、請求項１１～２０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２】
選別された細胞が、少なくとも５０倍富化された請求項２１記載の方法。
【請求項２３】
請求項１１～２２のいずれか１項に記載の方法によって単離された充実腫瘍幹細胞の富化された集団。
【請求項２４】
外皮由来の充実腫瘍幹細胞の腫瘍形成を阻害する試験化合物の能力を分析する方法であって、
ａ）外皮の充実腫瘍サンプルから富化された充実腫瘍幹細胞を得る工程；
ここで、該充実腫瘍幹細胞は、
ｉ）未分画腫瘍細胞に比して少なくとも２倍富化されており；及び
ｉｉ）ＣＤ４４を発現する；
ａ１）前記得られた充実腫瘍幹細胞から第一のセットと第二のセットとを調製する工程；
ｂ）前記第一のセットの充実腫瘍幹細胞を試験化合物に接触させる工程；
ｃ）充実腫瘍幹細胞の第一のセットを、第一の非ヒトホスト動物に導入し、そして、充実腫瘍幹細胞の第二のセットを、第二の非ヒトホスト動物に導入する工程；並びに
ｄ）試験化合物が腫瘍の形成を阻害したかを決定するために、もし腫瘍が前記第一の非ヒト動物中に存在していれば、その腫瘍と、前記第二の非ヒト動物中に形成された腫瘍を比較する工程；を含む方法。
【請求項２５】
外皮由来の充実腫瘍幹細胞の腫瘍形成を阻害する試験化合物の能力を分析する方法であって、
ａ）外皮の充実腫瘍サンプルから富化された充実腫瘍幹細胞を得る工程、ここで、該充実腫瘍幹細胞は、
ｉ）未分画腫瘍細胞に比して少なくとも２倍富化されており；及び
ｉｉ）ＣＤ４４を発現する；
ｂ）充実腫瘍幹細胞を、第一及び第二の非ヒトホスト動物に導入する工程；
ｃ）第一の非ヒトホスト動物を試験化合物で処理し、第二の非ヒトホスト動物を試験化合物で処理しない工程；並びに
ｄ）試験化合物が腫瘍の形成を阻害したかを決定するために、もし腫瘍が第一の非ヒトホスト動物中に存在していれば、その腫瘍と、第二の非ヒトホスト動物中に形成された腫瘍を比較する工程；を含む方法。
【請求項２６】

外皮由来の充実腫瘍幹細胞の腫瘍形成を阻害する試験化合物の能力を分析する方法であって、
ａ）外皮の充実腫瘍サンプルから富化された充実腫瘍幹細胞を得る工程、ここで該充実腫瘍幹細胞は
ｉ）未分画腫瘍細胞に比して少なくとも２倍富化されており；及び
ｉｉ）ＣＤ４４を発現する；
ｂ）第一の非ヒトホスト動物を試験化合物で処理し、第二の非ヒトホスト動物を試験化合物で処理しない工程；
ｃ）充実腫瘍幹細胞を、第一及び第二の非ヒトホスト動物に導入する工程；並びに
ｄ）試験化合物が腫瘍の形成を阻害したかを決定するために、もし腫瘍が第一の非ヒトホスト動物中に存在していれば、その腫瘍と、第二の非ヒトホスト動物中に形成された腫瘍を比較する工程；を含む方法。

【請求項２７】
外皮由来の充実腫瘍幹細胞の腫瘍形成を阻害する試験化合物の能力を分析する方法であって、
ａ）外皮の充実腫瘍サンプルから富化された充実腫瘍幹細胞を得る工程、ここで、該充実腫瘍幹細胞は、
ｉ）未分画腫瘍細胞に比して少なくとも２倍富化されており；及び
ｉｉ）ＣＤ４４を発現する；
ｂ）充実腫瘍幹細胞を試験化合物に接触させる工程；
ｃ）前記接触させた充実腫瘍幹細胞を、非ヒトホスト動物に導入する工程；並びに
ｄ）非ヒトホスト動物中で腫瘍の存在又は非存在を確認する工程；を含む方法。

【請求項２８】
外皮由来の充実腫瘍幹細胞の腫瘍形成を阻害する試験化合物の能力を分析する方法であって、
ａ）外皮の充実腫瘍サンプルから富化された充実腫瘍幹細胞を得る工程、ここで、該充実腫瘍幹細胞は
ｉ）未分画腫瘍細胞に比して少なくとも２倍富化されており；及び
ｉｉ）ＣＤ４４を発現する；
ｂ）充実腫瘍幹細胞を、非ヒトホスト動物に導入する工程；
ｃ）非ヒトホスト動物を試験化合物で処理する工程；並びに
ｄ）非ヒトホスト動物中で腫瘍の存在又は非存在を確認する工程；を含む方法。

【請求項２９】
前記充実腫瘍幹細胞のＣＤ２４の発現が検出不能であるレベル又は低いレベルである（$CD24^{-/low}$）、請求項２４、２５、２６、２７、又は２８に記載の方法。

【請求項３０】
前記充実腫瘍幹細胞がＢ３８．１を発現する、請求項２４、２５、２６、２７、２８又は２９に記載の方法。

【請求項３１】
前記充実腫瘍幹細胞がＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ１０、ＣＤ１４、ＣＤ１６、ＣＤ３１、ＣＤ４５、ＣＤ６４、及びＣＤ１４０ｂから成る群から選択される１以上のＬＩＮＥＡＧＥマーカーを発現しない、請求項２４、２５、２６、２７、２８、２９又は３０に記載の方法。

【請求項３２】
前記充実腫瘍幹細胞がさらに上皮特異性抗原（ＥＳＡ）を発現する、請求項２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０又は３１に記載の方法。

【請求項３３】
前記集団が少なくとも５倍富化された、請求項３０に記載の方法。

【請求項３４】
前記集団が少なくとも１０倍富化された、請求項３１に記載の方法。

【請求項３５】
前記集団が少なくとも５０倍富化された、請求項３２に記載の方法。
【請求項３６】
充実腫瘍幹細胞が、結腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮細胞癌、子宮頸癌、肺癌、小細胞肺癌、及び膀胱癌からなる群から選択される充実腫瘍に由来する請求項２４、２５、２６、２７、２８、２９～３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３７】
充実腫瘍幹細胞を得る工程が、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別法、パンニング法、アフィニティーカラム分離法及び／又は磁気選別法により未分画の腫瘍細胞から充実腫瘍幹細胞を選別する工程を含む請求項２４、２５、２６、２７、２８、２９～３５又は３６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３８】
充実腫瘍サンプルに由来し、充実腫瘍幹細胞及び充実腫瘍細胞を含む細胞組成物であり、
該充実腫瘍幹細胞は、２倍に富化されており、ＣＤ４４を発現し、非ヒトホスト動物への充実腫瘍幹細胞の連続導入によって腫瘍形成性である、細胞組成物。
【請求項３９】
前記充実腫瘍幹細胞のＣＤ２４の発現が検出不能レベル又は低いレベルである（$CD24^{-/low}$）、請求項３８に記載の細胞組成物。
【請求項４０】
前記充実腫瘍幹細胞がＢ３８．１を発現する、請求項３８又は３９に記載の細胞組成物。
【請求項４１】
前記充実腫瘍幹細胞がＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ１０、ＣＤ１４、ＣＤ１６、ＣＤ３１、ＣＤ４５、ＣＤ６４、及びＣＤ１４０ｂから成る群から選択される１以上のＬＩＮＥＡＧＥマーカーを発現しない、請求項３８～４０のいずれか１項に記載の細胞組成物。
【請求項４２】
前記充実腫瘍幹細胞がさらに上皮特異性抗原（ＥＳＡ）を発現する、請求項３８～４１のいずれか１項に記載の細胞組成物。
【請求項４３】
充実腫瘍幹細胞が、少なくとも５倍富化された、請求項４０記載の細胞組成物。
【請求項４４】
充実腫瘍幹細胞が、少なくとも１０倍富化された、請求項４１記載の細胞組成物。
【請求項４５】
充実腫瘍幹細胞及び充実腫瘍細胞が体液から得られる、請求項３８～４４のいずれか１項に記載の細胞組成物。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
（技術分野）
本発明は、癌の診断及び治療に関する。
【０００２】
（背景となる技術）
癌は、米国における第２位の死因であり続けていて、毎年500,000を越える死亡を招いている。検出及び治療における進歩にもかかわらず、癌の死亡率は高い。癌の分子的基盤の理解における顕著な前進にもかかわらず、この知見は、いまだに効果的な治療方針へと翻訳されていない。
【０００３】
特に、乳癌は、米国人の女性には最も一般的な癌であって、ほぼ９人に１人が、その人生のうちに乳癌を発症する。不幸にも、転移性乳癌は、依然として不治の病である。転移性乳癌のほとんどの女性は、死に屈服する。

【０００４】
慣用の治療法の様式（放射線療法、化学療法及びホルモン療法）は、役立つ一方で、治療耐性の癌細胞の出現によって限定されている。明らかに、転移性乳癌、及び一般的に癌を治療するための標的を特定する、新たなアプローチが必要とされている。
【０００５】
（発明の開示）
本発明は、確立された充実腫瘍内の少ない割合の細胞が、「幹細胞」の特性を有するという発見に基づく。これらの充実腫瘍「幹」細胞は、より多くの充実腫瘍幹細胞と、腫瘍内の細胞の大多数、すなわち、広範囲の増殖の余地、及び新たな腫瘍を生じる能力を失った癌細胞との双方を生じる。したがって、充実腫瘍幹細胞の不均一性は、１個の充実腫瘍幹細胞から生じる様々な腫瘍細胞型の存在を反映している。
【０００６】
癌療法が結果を有意に改善することの従来の失敗は、部分的には、これらの療法が、充実腫瘍内の、広範囲の増殖の余地と、他のすべての充実腫瘍細胞型を生じる能力とを有する充実腫瘍幹細胞を標的とすることの失敗に起因している。本発明は、抗癌療法を、充実腫瘍幹細胞に対して、一般的に、かついまや特異的に、仕向けることができる方法を提供する。したがって、仕向けられる本発明の抗癌療法は、はるかに効果的かつ持続的な治療応答を招来する。
【０００７】
本発明の方法により、充実腫瘍内の細胞の表現型が不均一である集団を特性記述することができる。充実腫瘍から得られる細胞の集団は、蛍光標示式細胞分取法（ＦＡＣＳ）を用いて単離し、構造的に特性記述される。特に、腫瘍内の、広範囲の増殖という幹細胞特性、及び他のすべての腫瘍細胞型を生じる能力を有する、表現型が明確である細胞集団を特定し、単離し、かつ特性記述することができる。充実腫瘍幹細胞は、真に腫瘍形成性の細胞であって、治療後も腫瘍を再確立することができる。
【０００８】
本発明は、充実腫瘍幹細胞の機能と、充実腫瘍から単離された細胞の様々な集団による細胞の機能とのin vivo及びin vitroのアッセイを提供する。本発明は、充実腫瘍から単離された細胞の様々な集団（例えば充実腫瘍幹細胞が富化された細胞集団）を用いて、充実腫瘍幹細胞の増殖に影響する因子を特定し、充実腫瘍から単離された細胞の集団を遺伝子発現パターン又はタンパク質発現パターンについて分析し、新奇な抗癌薬の標的を特定し、既存の抗癌治療方式に対する個々の患者からの腫瘍の感受性を予測し、抗癌治療をモデル化し、新奇な治療化合物を試験し、新奇な診断マーカーを特定かつ試験し、腫瘍を治療し、遺伝学的に変更された充実腫瘍幹細胞を生成し、そして充実腫瘍幹細胞からポリヌクレオチドやポリペプチドのｃＤＮＡライブラリー及びマイクロアレーを調製する方法を提供する。
【０００９】
本発明は、充実腫瘍細胞をin vivoで一貫して増殖させる方法を提供する。本発明は、単細胞懸濁液としてか、又は小凝集体として存在する充実腫瘍細胞を増殖させる方法も提供する。その上、本発明は、充実腫瘍一次細胞から受容を確立することができ、これらの充実腫瘍細胞に由来する腫瘍を試験することができる、キメラ動物（異種移植片モデル）を提供する。さらに、本発明は、単一の充実腫瘍幹細胞に由来する腫瘍バンク（実質的数のバイオアッセイを実施するのに充分大きい）を提供する。
【００１０】
そのいくつかの態様で、本発明は、抗癌剤のスクリーニングに；抗癌療法の試験に；新たな経路を標的とする薬物の開発に；新規な奇抗癌療法の標的の特定に；病理学的標本における悪性細胞の特定及び診断に；充実腫瘍幹細胞の薬物感受性の試験及び検定に；薬物感受性を予測する特異的因子の測定に；患者のスクリーニングに（例えばマンモグラフィー補助剤として）役立つ方法を提供する。本発明は、公知治療法に対する患者の腫瘍の感受性を試験するためのモデルとして；癌治療の新規な治療標的の特定のためのモデルとし

て；癌治療用の新規な治療剤を試験するための腫瘍バンクを確立する体系として；腫瘍形成性の癌細胞を特定するための体系として用いることができる。

【００１１】

（本発明を実施する様式）

幹細胞及び充実腫瘍不均一性モデル

充実腫瘍は、不均一な細胞集団で構成される。例えば、乳癌は、癌細胞と、間葉（間質）細胞、炎症細胞及び内皮細胞を包含する正常細胞との混合物である。古典的なモデルは、表現型の明確な癌細胞集団には、すべて、増殖し、新たな腫瘍を生じる余地があると考える（図１Ａ）。古典的モデルでは、腫瘍細胞の不均一性は、環境的因子はもとより、腫瘍形成細胞の多様な集団を招来する、癌細胞内で進行中の突然変異の結果として生じ、細胞の集団は、すべて、類似の腫瘍形成能を有すると思われている［Pandis et al., Genes, Choromosomes & Cnacer, 12: 122-129 (1998)；Kuukasjarvi et al., Cancer Res., 57: 1597-1604 (1997)；Bonsing et al., Cancer, 71: 382-391 (1993)；Bonsing et al., Genes Chromosomes & Cancer, 82: 173-183 (2000)；Beerman. H. et al., Cytometry, 12(2): 147-54 (1991)；Aubele, M., & Werner, M., Analyt. Cell. Path., 19: 53 (1999)；Shen, L. et al., Cancer Res., 60: 3884 (2000)］。

【００１２】

本発明は、充実腫瘍細胞不均一性の代替モデルに基づいており、充実腫瘍は、「充実腫瘍幹細胞」（又は充実腫瘍からの「癌幹細胞」）と、充実腫瘍幹細胞のその後の無秩序な発達との結果生じる。この幹細胞モデル（図１Ｂ）では、充実腫瘍は、大規模又は無限に増殖し、追加の充実腫瘍幹細胞を効率的に生じるという点で、正常な「幹細胞」の特性を共有する、細胞の明確で限定された（又はおそらく希な）サブセットを含む。確立された充実腫瘍内では、ほとんどの細胞が、大規模に増殖し、新たな腫瘍を形成できる能力を失っているが、充実腫瘍幹細胞は、大規模に増殖し、追加の充実腫瘍はもとより、腫瘍形成性能を欠くその他の腫瘍細胞も生じる。増殖し、最終的には致死的と判明するのは、この充実腫瘍幹細胞の集団である。

【００１３】

これらのモデルを区別するには、従来のクローン形成アッセイ（下記参照）を克服しなければならない。あらゆる細胞型に一定している低確率の腫瘍形成性ではなく、一貫した幹細胞集団の存在を証明するには、幹細胞を純化し、それらは、腫瘍形成性に極めて富むが、新生物細胞の残余は、そのような活性を奪われているのを示すことができなければならない。本発明は、その可能性を与える。

【００１４】

充実腫瘍内の細胞集団を、充実腫瘍幹細胞の、本明細書に記載の構造的特徴に基づいて単離かつ分析できる可能性は、腫瘍学又は幹細胞生物学の当業者が、図１に示された二つのモデルを区別するのを許す。本発明によって、充実腫瘍幹細胞、及び充実腫瘍からの細胞集団が単離かつ分析された。その上、これらの充実腫瘍幹細胞は、非常に高いか、又は無限定的な増殖能を有し、そのために、真に腫瘍形成性である集団を代表する。充実腫瘍幹細胞モデル、及び下記に与えられた結果（実施例を参照）によれば、これらの腫瘍形成細胞は、充実腫瘍のクローン形成細胞である。

【００１５】

正常な動物発生の際は、ほとんどか、又はすべての組織の細胞は、幹細胞と呼ばれる正常な前駆体に由来する［Morrison et al., Cell 88(3): 287-98 (1997); Morrison et al., Curr. Opin. Immunol. 9(2): 216-21 (1997); Morrison et al., Annu. Rev. Cell. Dev. Biol., 11: 35-71 (1995)］。用語「幹細胞」は、（１）細胞が、低下した増殖又はは発生能を有する１種類もしくはそれ以上の子孫を生成できる細胞であること；（２）細胞が、大規模な増殖能を有すること；及び（３）細胞が、自己更新又は自己維持できることを意味することが当技術に公知である［Potten et al., Development, 110: 1001 (1990)；米国特許第5,750,376号、第5,851,832号、第5,753,506号、第5,589,376号、第5,824,489号、第5,654,183号、第5,693,482号、第5,672,499号及び第5,849,553号明細書を参照

、すべて引用によって組み込まれる］。成体の動物では、いくつかの細胞（血液、腸、胸腺管系及び皮膚を包含する）は、各組織内の幹細胞の小集団から、絶えず補充される。したがって、（正常な生活であれ、損傷及び疾病に応答してであれ）組織の維持は、特定の発生上のシグナルに応答しての、前駆細胞からの組織の補充に依存する。

【００１６】

幹細胞の分化による成体細胞の更新の最も良く知られた例は、造血組織である［米国特許第5,061,620号、第5,087,570号、第5,643,741号、第5,821,108号、第5,914,108号明細書を参照、それぞれ引用によって組み込まれる］。発生的に未熟な前駆体（造血幹及び始原細胞）は、分子的シグナルに応答して、多様化された血液及びリンパ系の細胞型を次第に形成する。幹細胞は、上皮組織［Slack, Science, 287: 1431 (2000)を参照］及び間葉組織［米国特許第5,942,225号明細書を参照、引用によって組み込まれる］を包含する、その他の組織でも見出される。正常な乳房の発生では、正常な幹細胞が、分化した子孫を生じて、正常な管系を形成する［Kordon & Smith, Development, 125: 1921-1930 (1998)；米国特許第5,814,511号及び第5,650,317号明細書も参照］。

【００１７】

本発明により、正常な幹細胞生物学の原理が、充実腫瘍幹細胞を単離し、特性記述するのに適用された。充実腫瘍幹細胞を単離するか、又は本発明によれば富化することができる、充実腫瘍の例は、肉腫及び癌腫、例えば、これに限定されないが、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢腺癌、骨髄癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣癌、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、骨髄芽腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫瘍、乏突起神経膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫及び網膜芽細胞腫を包含する。本発明は、肉腫（図２２参照）及び上皮癌、例えば卵巣癌（図２１参照）及び乳癌（実施例参照）に適用できる。

【００１８】

充実腫瘍幹細胞は、下記に記載されたのと類似の方法及びアッセイを用いて、本明細書に記載のとおりに構造的及び機能的に定義することができる。腫瘍細胞は、追加の遺伝的突然変異が発生するにつれて、経時的に、表現型上及び機能的に発達することが知られているため、充実腫瘍幹細胞は、個々の患者においても、経時的に、表現型上及び機能的に変化し得る。にもかかわらず、本明細書に開示された、患者の大多数における充実腫瘍幹細胞の単離及び特定に一貫して役立つのマーカーを用いて、本発明の方法を用いることができる。

【００１９】

また、充実腫瘍幹細胞は、無秩序な発達の際に「自己更新」及び「分化」を遂げて、腫瘍を形成し、異常な細胞型を生じ、追加の遺伝的突然変異が発生するにつれて、経時的に変化し得る。充実腫瘍幹細胞の機能的特徴は、それらが腫瘍形成性であり、追加の腫瘍形成細胞を生じ（「自己更新」）、非腫瘍形成性腫瘍細胞を生じ得る（「分化」）ことである。

【００２０】

充実腫瘍幹細胞の発生上の起源は、充実腫瘍癌の異なる種類の間で変動し得る。充実腫瘍幹細胞は、正常な幹細胞の増殖及び分化を失調させる、遺伝的損傷の結果として［Lapidot et al., Nature 367(6464): 645-8 (1994)］か、又は正常な制約された始原細胞、もしくは正常な分化した細胞型の異常調節された増殖によって発生し得る。代表的には、充実腫瘍は、それらの発生上の起源ではなく、それらの位置に従って、視認され、最初に特定される。

【００２１】

対照的に、充実腫瘍からの非腫瘍形成細胞は、免疫障害性マウスへの移植に際して、触

診できる腫瘍を形成できない、集団からの細胞であって、分画されない、解離させた同数の腫瘍細胞を、同じ条件下で移植したならば、充実腫瘍幹細胞は、同じ期間で触診できる腫瘍を形成したであろう。したがって、非腫瘍形成細胞葉、動物モデルでは、腫瘍形成活性を奪われている。

【００２２】

「触診できる腫瘍」は、手で扱われるか、手に触れるか、又は感じられることができる腫瘍として当技術に公知である。

【００２３】

腫瘍形成性の変化は、腫瘍内の正常な環境から取り出された後でさえ、充実腫瘍幹細胞に固有であるため、本発明は、いくつかの新奇な用途を提供する：

（１）充実腫瘍幹細胞が発現する遺伝子及びタンパク質を特定することによって、その機能が腫瘍形成にに必要であり、新奇な薬物の標的を代表する、タンパク質を特定することができる；

（２）充実腫瘍幹細胞を表現型マーカーに基づいて充実腫瘍幹細胞を純化することによって、それらの遺伝子発現パターン及び機能を、はるかに直接的かつ効率的に調べることができる；

（３）充実腫瘍幹細胞の機能のin vitro及びin vivoアッセイを開発することによって、潜在的治療化合物の効果をより効果的に試験することができる。

（４）充実腫瘍幹細胞のマーカーを特定することによって、悪性細胞（腫瘍を作り出せる能力にとっては希である、環境的特徴性に依存しないものでさえ）の存在をより効果的に診断することができる；

（５）充実腫瘍幹細胞を、個々の患者から単離し、in vitro及びin vivoアッセイに移植することによって、それらに対する異なる薬物治療様式の効果を試験することができる。そのため、薬物感受性及び薬物耐性を予測することができる。

【００２４】

本発明のモデルの充実腫瘍幹細胞は、米国特許第6,004,528号明細書が提供する「癌幹細胞系」とは異なる。該特許では、「癌幹細胞系」は、それ自体は、僅かな突然変異を有するにすぎないが、その細胞の環境で発生する腫瘍形成性の変化の結果として、非対称的な細胞分裂ではなく、対称的なそれを行なう、緩慢に増殖する始原細胞型として定義される。したがって、この「癌幹細胞系」仮説は、甚だしく突然変異した、急速に増殖する腫瘍細胞は、おおむね、異常な環境の結果として生じるのであって、その環境が、比較的正常な幹細胞を集積させ、そうして、それらを腫瘍細胞にさせる突然変異を生じると提唱する。米国特許第6,004,528号明細書は、そのようなモデルは、癌の診断を強化するのに用いることができると提唱する。充実腫瘍幹細胞モデルは、「癌幹細胞系」モデルとは根本的に異なり、その結果、「癌幹細胞系」モデルが提供しない効用を示す。第一に、充実腫瘍幹細胞は、「突然変異が省かれて」いない。米国特許第6,004,528号明細書が記載する「突然変異が省かれた癌幹細胞系」は、前癌性病変であると考えてよいが、本発明記載の充実腫瘍幹細胞は、腫瘍形成の原因となる突然変異をそれ自体有する。すなわち、本発明の充実腫瘍幹細胞（「癌幹細胞」）は、米国特許第6,004,528号明細書の「癌幹細胞系」と区別される、甚だしく突然変異した細胞のうちに含まれることになる。第二に、癌へと導く遺伝的突然変異は、おおむね、環境的ではなく、むしろ充実腫瘍幹細胞そのものに固有である。充実腫瘍幹細胞モデルは、単離された充実腫瘍幹細胞が、移植した際に追加の腫瘍を生じることができることを予測する（こうして転移を説明する）が、「癌幹細胞系」モデルは、腫瘍形成性であるのは、異常な環境であることから、移植された「癌幹細胞系」の細胞は、新たな腫瘍を発生できないと予測することになる。実際、解離され、表現型上単離されたヒト充実腫瘍幹細胞をマウスに（正常な腫瘍環境とは非常に異なる環境へと）移植できて、依然として新たな腫瘍を形成することが、本発明を「癌幹細胞系」モデルから区別させる。第三に、充実腫瘍幹細胞は、対称的にも、非対称的にも同様に分裂するため、対称的細胞分裂は、無条件の特性ではない。第四に、充実腫瘍幹細胞は、多くの変動要因に応じて、急速又は緩慢に分裂するため、低い増殖率は、定義となる特徴性では

ない。

【００２５】

上記のとおり、充実腫瘍幹細胞は、細胞表面マーカーによって機能的に特徴付けることができる。これらの細胞表面マーカーは、それに特異的に結合する試薬によって認識することができる。例えば、充実腫瘍幹細胞の表面のタンパク質、炭水化物又は脂質は、その特定のタンパク質又は炭水化物に特異的な抗体によって、免疫学的に認識することができる［マーカーに対する抗体の構成及び使用については、Harlow, Using Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999)を参照；実施例も参照されたい］。充実腫瘍幹細胞（本発明の「癌幹細胞」）の細胞表面に存在する、一連のマーカーは、充実腫瘍幹細胞に特徴的である。そのため、充実腫瘍幹細胞は、細胞表面マーカーの肯定的及び否定的選別によって選別することができる。充実腫瘍幹細胞に結合する試薬は、「陽性マーカー」（すなわち、充実腫瘍幹細胞の細胞表面に存在するマーカー）であって、充実腫瘍幹細胞の肯定的選別に用いることができる。充実腫瘍幹細胞「陰性マーカー」（すなわち、充実腫瘍幹細胞の細胞表面には存在しないが、充実腫瘍から得られたその他の細胞の表面に存在するマーカー）に結合する試薬は、充実腫瘍幹細胞ではない集団内のこれらの充実腫瘍細胞の排除に（すなわち、充実腫瘍幹細胞ではない細胞の排除に）用いることができる。

【００２６】

一実施態様では、細胞表面マーカーの検出された発現に基づく、細胞間の識別は、対照細胞集団による平均的発現と比較した限りでの、細胞表面マーカーの検出された発現を比較することによってなされる。例えば、充実腫瘍幹細胞上のマーカーの発現は、同じ腫瘍から充実腫瘍幹細胞として派生したその他の細胞による、マーカーの平均的発現と比較することができる。マーカーの発現によって細胞同士を識別するその他の方法は、マーカー発現に基づくフローサイトメトリーによって、細胞を排除する方法を包含する［Givan A., Flow Cytometry: First Principles, (Wiley-Liss, New York, 1992)；Owens, M.A. & Loken, M.R., Flow Cytometry: Principles for Clinical Laboratory Practice, (Wiley-Liss, New York, 1995)を参照］。

【００２７】

充実腫瘍幹細胞陽性マーカーは、充実腫瘍幹細胞以外の細胞にも存在し得る。充実腫瘍幹細胞陰性マーカーは、充実腫瘍幹細胞以外の細胞にも不在であり得る。幹細胞を特定する単一のマーカーを特定することは希であるが、別の前後関係から、幹細胞を独自に特定し、その実質的な富化を許す、陽性及び陰性マーカーの組合せを特定できることは多かった［Morrison et al., Cell, 96(5): 737-49 (1999)；Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(22): 10302-6 (1995)；Morrison & Weissman, Immunity, 1(8): 661-73 (1994)］。

【００２８】

「試薬の組合せ」は、充実腫瘍幹細胞の表面に存在する（陽性マーカー）か、もしくは存在しない（陰性マーカー）かのいずれかの細胞表面マーカー、又は陽性及び陰性マーカーの組合せに結合する、少なくとも２種類の試薬である（実施例７及び８、表６を参照されたい）。充実腫瘍幹細胞表面マーカーに特異的な抗体の組合せを用いることは、肉腫、卵巣癌及び胸部腫瘍を包含する、様々な充実腫瘍からの充実腫瘍幹細胞の単離又は富化に役立つ、本発明の方法を招く。試薬の組合せの使用に対する指針は、ＰＣＴ特許願第WO01/052143号公報（Morrison & Anderson、引用により組み込まれる）に見出すことができる。

【００２９】

充実腫瘍から得られた細胞間の表現型の特徴性を選ぶことによって、いかなる動物の充実腫瘍、特にいかなる哺乳動物の充実腫瘍からも、充実腫瘍幹細胞を単離することができる。結合親和性のような因子を考慮すると、マーカーの種特異的な多様性を認識する抗体は、充実腫瘍幹細胞に富ませ、かつそれを選別するのに用いられることが認識されるであろう。ＣＤ４４、Ｂ３８．１、ＣＤ２４その他のマーカーの種特異的多様性を認識する抗

体は、充実腫瘍幹細胞を富化し、その種から単離するのに用いられるであろう（例えばマウスの充実腫瘍幹細胞についてはマウスＣＤ４４に対する抗体、サルの充実腫瘍幹細胞についてはサルＢ３８．１に対する抗体等々）。

【００３０】

ヒト乳癌の効率的異種移植片

本発明は、宿主動物への充実腫瘍幹細胞の注入によって腫瘍を確立する、異種移植片モデルを提供する。宿主動物は、線虫、ミバエ、ゼブラダニオのようなモデル生物、好ましくはマウス（ヌードマウス、ＳＣＩＤ系マウス、ＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウス、Beige／ＳＣＩＤ系マウス）、ラット、ウサギ又は霊長類のような研究用哺乳動物であることができる。重篤な免疫不全のＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスを受容者として選んで、注入された細胞の参加を最大化した。免疫不全マウスは、ヒトの組織を拒絶せず、ＳＣＩＤ及びＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスは、ヒトの造血及び組織生着のin vivo研究用宿主として用いられている［McCune et al., Science, 241: 1632-9 (1988)；Kamel-Reid & Dick, Science, 242: 1706-9 (1988)；Larochelle et al., Nat. Med., 2: 1329-37 (1996)］。加えて、Beige／ＳＣＩＤ系マウスも用いられている。

【００３１】

異種移植片の腫瘍は、今日まで試験された患者すべての乳房切除標本から確立されている（実施例７参照）。マウスの腫瘍は、悪性の胸水からも確立されている。加えて、腫瘍は、２種類の肉腫から得られた細胞の皮下注射によって確立されている。さらに、本発明者らが試みたすべての腫瘍について、単細胞懸濁液（又は少数の細胞凝集体のみ、例えば１００未満、好ましくは１０未満を有する懸濁液）を作成し、次いで、腫瘍に移転することができている。この異種移植片アッセイは、腫瘍形成性で、クローン形成性の充実腫瘍幹細胞を特性記述するための生物学的及び分子的アッセイに役立つ。

【００３２】

ＮＯＤ／ＳＣＩＤ又はBeige／ＳＣＩＤ系マウスは、ＶＰ－１６（実施例１及び３参照）、放射線療法、化学療法、又はその他の免疫抑制性の生物学的作用因を用いて、さらに免疫抑制することができる。

【００３３】

このin vivoアッセイは、乳癌、及びこの疾病の新たな治療の発展をより良く理解するのに特に好都合である。現在まで、原発性乳癌を必要とする生物学的及び分子的研究を実施するのは不可能であった。そのような研究は、細胞系に限定されていた。不幸にも、乳癌細胞の根本的特性の多くは、組織培養中に変化することが周知である［Fenhall et al., Brit. J. Cancer, 81: 1142-1149 (1999)］。この後者の問題は、細胞の継続的培養によって悪化するのみである。

【００３４】

対照的に、本発明の方法を用いると、乳癌細胞（好ましくは乳癌幹細胞に富ませた）は、免疫障害性マウスに注入されて、腫瘍を成長させる。一実施態様では、細胞は、マウスの乳房脂肪パッドに注入されるか、又はマウスに皮下注射される。さらに、腫瘍は、単細胞懸濁液（又は少数の細胞凝集体、例えば１００未満、好ましくは１０未満を有する懸濁液）から確立し、次いで、腫瘍を他のマウスに移転することができる。

【００３５】

充実腫瘍幹細胞の富化、及び充実腫瘍幹細胞の単離は、本発明を、米国特許第4,411,990号明細書で参照された「ヒト腫瘍幹細胞の一次アッセイ」から際立たせる［Hamburger et al., Blood, 47: 995 (1976)；Salmon et al., AACR Abstracts, 19: 231, Abstr. No. 922 (1978)も参照されたい］。従来の組織培養アッセイでは、小比率の腫瘍細胞のみが、in vitroクローン形成アッセイでコロニーを形成できたにすぎず、非常に多くの細胞（例えば骨髄腫及び造血細胞）は、代表的には、腫瘍をin vivoで形成するのに移植することを要した［Ogawa, M. et al., Cancer Res., 31(12): 2116-2119 (1971)；Ogawa, M. et al., Cancer Res., 33(12): 3172-3175 (1973)；Schlag, P. & Flentje, D., Cancer Treatment Reviews, 11, Suppl. A: 131-7 (1984)］。このことは、少数の腫瘍細胞のみが

、実際に腫瘍形成性であるにすぎないとの仮説へと導いた。しかし、技術的限界のために、細胞のこの腫瘍形成性分画は、非腫瘍形成細胞から単離することができず、そのため、腫瘍細胞の本質的に異なるサブセット、すなわち、実質的な増殖の潜在的能力を有するいくつか、及び限定された潜在的能力を有するその他が存在することが、証明できなかった。すなわち、腫瘍形成細胞を純化し、非腫瘍形成細胞から区別できない限り、すべての腫瘍細胞が、いかなるアッセイにおいても、クローン形成活性を示す類似の低い確率を有することが可能であり続ける。その上、細胞の腫瘍形成性分画（腫瘍幹細胞）を特定かつ単離できることなしには、米国特許第4,411,990号明細書は、この発明に記載された効用を欠く。例えば、腫瘍形成細胞を単離するためのマーカーなしには、その遺伝子発現パターン、又は診断マーカーのその発現、又は治療剤に対するその応答を研究することは、不可能である。いくつかの技術的問題は、従来の発明が腫瘍形成細胞又は腫瘍幹細胞を単離するのを妨げた。第一に、in vitroアッセイは、いくつかの初期コロニー形成を生じたが、通常、細胞は、培養において増殖を停止し、連続的に成長できなかった［Salmon, S.E. & Hamburger, A,W., Science, 197: 461-463 (1977)；Schlag, P. et al., Cancer Treatment Reviews, 11, Suppl. A: 131-7 (1984)；Salmon, S.E., Recent Results in Cancer Research, 94: 8 (1984)］。また、多くの腫瘍は、in vitroではコロニーを全く形成できなかった［Carney, D.N. et al., Stem Cells, 1: 149-164 (1981)］。同様に、ほとんどの充実腫瘍から単離された、解離した細胞は、免疫不全マウスモデルで、腫瘍を形成することが希でしかなかった［Sakakibara, T. et al., Cancer J. Si. Am. 2: 291-300 (1996)；Mueller, B. & Reisfeld, R.A., Cancer Metastasis Rev., 10: 193-200 (1991)］。不死化された組織培養の癌細胞系の特定のクローンのみが、in vivoモデルで腫瘍を形成できたとの所見は、この問題をさらに具体的に示す［Hamilton, T.C. et al., Cancer Res., 44(11): 5286-90 (1984)］。こうして、アッセイにおける制約は、コロニーが、in vitroで増殖できるその余地を失った幹細胞から生じるのか、又は限定された増殖能を有する非腫瘍形成細胞から生じるのか、あるいはin vitroでコロニーを形成できる少数の細胞は、その腫瘍内の「幹細胞」集団によるのか、又はin vitroで増殖できる希な細胞によるのかを決定することを不可能にしている。さらに、表現型上異なる細胞集団を区別することができなかった：本発明以前には、非常に限定された使用が、充実腫瘍細胞の表現型上明確な集団をフローサイトメトリーによって分離かつ分析するのに、フローサイトメトリーのような手法になされなかったためである。実際、従来の技術に用いられたクローン形成アッセイは、個々の患者の腫瘍の挙動を予測せず、認められなかった［von Hoff, D.D. et al., Cancer, 67(1): 20-7 (1991)；Federico, M. et al., Gynecologic Oncology, 55(3 Pt.2): S156-63 (1994)］。こうして、細胞分離手法、及び従来の技術に用いられたアッセイにおける限界は、それらが腫瘍形成細胞を純化するのを不可能にした。そのため、仮説的な腫瘍幹細胞の存在を証明することは、不可能であった。

【００３６】

乳癌におけるNotchの役割

受容体のNotchファミリーは、幹細胞の発生及び分化に関与している［Morrison et al., Cell, 101(5): 499-510 (2000)；Artavanis-Tsakonas et al., Science, 284: 770 (1999)；及びArtavanis-Tsakonas et al., Science, 268: 225-232 (1995)；米国特許第6,090,922号明細書（引用により組み込まれる）を参照されたい］。Notchは、本来は、ショウジョウバエ属で、他の細胞型を費やして多過ぎるニューロンを形成する、機能喪失突然変異から特定された［Poulson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 23: 133 (1937)］。試験されたすべての動物モデルで、Notch受容体における突然変異は、発生上の異常を招く。カエノラーブディティス・エレガンスCaenorhabditis elegans（Ｃ．エレガンス）では、Notchは、生殖細胞系幹細胞の自己更新に必要とされる［Berry et al., Development, 124(4): 925-36 (1997)］。ラットでは、Notchは、神経冠幹細胞の分化を調節する［Morrison et al., Cell, 101(5): 499-510 (2000)］。一過性のNotch活性化は、神経冠幹細胞による神経組織発生から神経膠発生への不可逆的切り換えを始動する。

【００３７】

隣接する細胞が、Notch受容体及びリガンドを発現できるため、一つの細胞は、隣接する細胞のNotchシグナリングを活性化することによって、隣接細胞の運命に影響を及ぼすことができる。

【００３８】

Jagged［Shimizu et al., Journal of Biological Chemistry, 274(46): 32961-9 (1999)；Jarriault et al., Molecular and Cellular Biology, 18: 7423-7431 (1998)］、Serrate及びDelta（及びそれぞれの変異型、例えばDaltal、Delta2、Delta3、Delta4及びJagged2、Ｃ．エレガンスのＬＡＧ－２ならびにＡＰＸ－１）のようなナイフエッジ名を有するタンパク質は、Notch受容体に結合し、隣接細胞が神経冠始原細胞になるのを阻害する、下流シグナリング経路を活性化する。最近特定されたリガンドは、Dll4であって、動脈内皮で発現される、DeltaファミリーのNotchリガンドである［Shutter et al., Genes Dev., 14(11): 1313-8 (2000)］。

【００３９】

Notchリガンドは、Notchファミリー受容体を無差別に結合かつ活性化し得る。Fringeファミリーの成員［Panin et al., Nature, 387(6636): 908-912 (1997)］のような、その他の遺伝子の発現は、Notchリガンドと Notch受容体の相互作用を変更し得る。Numbファミリーの成員も、Notchシグナリングを細胞内で変更し得る。

【００４０】

Notchへのリガンドの結合は、Notchを切断する、プレセニリン１依存性γ－セクレターゼ様タンパク質の活性化を招く［De Strooper et al., Nature, 398: 518-522 (1999)；Mumm et al., Molecular Cell., 5: 197-206 (2000)］。細胞外領域での切断は、フリン様転換酵素を必要とし得る［Logeat et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 95: 8108-8112 (1998)］。細胞内ドメインは、放出され、ＤＮＡ結合タンパク質のＲＢＰ－Ｊと会合することによって、遺伝子をトランス活性化する［Kato et al., Development, 124:4133-4141 (1997)］。Notch１、Notch２及びNotch４は、スプリットエンハンサー（ＨＥＳ）ファミリーの成員のような遺伝子をトランス活性化するが、Notch3のシグナリングは、阻害的であり得ると考えられている［Beatus et al., Development, 126: 3925-3935 (1999)］。最後に、Fringeファミリーの分泌されるタンパク質は、Notch受容体に結合し、それらの機能を変更する［Zhang & Gridley, Nature, 394 (1998)］。

【００４１】

哺乳動物では、公知のNotchファミリーの成員が４種類存在する。Notch４は、マウスの乳癌に役割を演じる、マウスｉｎｔ－３というの癌遺伝子のヒトオーソログである［Gallahan et al., Cancer Res., 56(8): 1775-85 (1996)；Uyttendaele et al., Development, 2122: 251 (1996)；Imatani & Callahan, Oncogene, 19(2): 223-31 (2000)］。

【００４２】

本発明は、Notch４が、正常なヒト乳腺の発生と腫瘍形成との双方に役割を演じることの発見に基づく。個々の腫瘍内では、腫瘍形成細胞の小さい下位集団のみが、高レベルのNotch４を発現するにすぎない。Notch４を認識する抗体は、乳癌腫瘍細胞の増殖をin vitro及びin vivoで遮断する（実施例２、５、１２及び１５を参照されたい）。一実施態様では、抗体は、Notch４の細胞外ドメインに結合する。特定の実施態様では、抗体は、ペプチド領域：

【００４３】

LLCVSVVRPRGLLCGSFPE
（LeuLeuCysValSerValValArgProArgGlyLeuLeuCysGlySerPheProGlu）（SEQ ID No.）
に結合する。

【００４４】

しかし、Notch活性化を阻害する、いかなる抗Notch４抗体も、腫瘍の生存を損なうのに用いることはできない。

【００４５】

Notchのシグナリングの阻害剤（例えばNumb及びNumb様；又はNotch活性化を遮断する抗体もしくは小分子）を本発明の方法に用いて、充実腫瘍幹細胞を阻害することができる。このようにして、Notch経路を変更して、充実腫瘍幹細胞を死滅させるか、又はその増殖を阻害する。

【００４６】

対照的に、Notchリガンドである、可溶性Delta［Han et al., Blood, 95(5): 161625 (2000)］を用いたNotchの刺激が、腫瘍細胞の増殖及び生存をin vitroで促進することが、従来見出されていた。こうして、Notch経路の刺激は、癌細胞の増殖及び生存を促進することが、従来見出されていた。

【００４７】

本発明は、米国特許第5,780,300号明細書で提供された、Notch経路を用いた、非末端分化細胞の操作とは異なる。米国特許第5,780,300号明細書は、癌細胞ではなく、正常細胞の変更を指向している。該特許は、Notch機能の作用薬を用いて非末端分化させた細胞（正常な前駆細胞）を、細胞の分化を、増殖（有糸分裂活性）を阻害せずに阻害することによって拡大する方法を対象としているため、非末端分化した細胞の拡大された集団が得られた。これらの拡大された細胞は、細胞置換療法に用いることができるが、それは、本発明におけるNotchのシグナリングを変更することによって、充実腫瘍幹細胞を死滅させるか、又はその増殖を阻害するという、目標とは両立し得ない用途である。

【００４８】

本発明の治療的態様

本発明の充実腫瘍幹細胞モデルの当然の結果は、癌を効果的に治療し、より高い治癒率を達成するには、抗癌療法は、充実腫瘍幹細胞を対象としなければならないということである。現在の治療法は、大集団を対象とすることから、それらは、充実腫瘍幹細胞を根絶するには効果的ではない可能性がある。現在の癌療法の限界は、充実腫瘍幹細胞を効果的に死滅させることができないことから派生する。充実腫瘍幹細胞の特定は、この細胞集団に対する治療剤の特異的な標的化を許して、より効果的な癌治療が、結果的に得られる。この概念は、癌治療に対する我々のアプローチを根本的に変えるであろう。

【００４９】

現代のバイオテクノロジーにおける進歩は、癌治療のための新たな治療標的の特定を促進した。ゲノム学における進歩は、個々の細胞型で発現される10,000～30,000の遺伝子の配列決定及び特定を可能にした。ヒトゲノムが配列決定されている。これは、増殖、細胞死及び不死化のような無数の生物学的過程に関与する、新奇なタンパク質の特定を招いて、薬物干渉のための標的を提供している。ゲノム学は、癌細胞内の薬物の標的を特定するための強力な手段を提供するが、これらの標的は、標的が腫瘍形成細胞集団内に存在する場合にのみ、有効であるにすぎない。効果的であるには、ゲノム学は、腫瘍を構成する不均一な細胞内の、腫瘍形成性成長の原因となる個別的集団に絞り込まれなければならない。充実腫瘍では、これらは、充実腫瘍幹細胞である。加えて、ゲノム学は、癌性組織に由来する純化された細胞集団で発現される遺伝子を特定するためには、未だに用いられていない。

【００５０】

新奇な癌治療剤を特定する際の主要な問題の一つは、大規模な配列決定プロジェクトで特定された、無数の遺伝子のどれが、臨床的に最も重要な薬物標的であるかということである。このことは、充実腫瘍が多くの種類の正常細胞と、腫瘍細胞の不均一な集団との混合物からなるため、とくに困難にされる。この複雑さを軽減する一つの方途は、充実腫瘍を精細解剖して、腫瘍細胞を富化した後に、ｃＤＮＡを作成することである（下記を参照）。この手法は、腫瘍細胞を解剖する病理学者は、どの細胞が腫瘍形成性であるかを外見に基づいて予測できるという仮定に基づく。しかし、細胞は、形態学的には類似していても、機能的には不均一なままであり得る。その上、精細解剖によって得られた細胞は、生存できず、そのため、そのような細胞の機能的特性は、試験又は確認することができない。

【００５１】
これに代えて、本発明の方法によって、フローサイトメトリー（ＦＡＣＳのような）、及び本発明の異種移植片の動物モデルを用いて、特定の細胞集団を富化することができる。この手法は、生存できる正常及び腫瘍細胞の表現型上純粋な集団を、分子的分析のために同時に単離することができるという利点を有する。
したがって、フローサイトメトリーは、細胞集団の機能を試験し、それらを生物学的アッセイに用い、加えて、その遺伝子発現の様相を研究するのを許す。さらに、そのような細胞は、生物学的アッセイで特性記述することもできる。例えば、間葉（間質）細胞を、成長因子、礎質タンパク質及びプロテアーゼの産生について分析し、内皮細胞を、充実腫瘍の成長支援（例えば血管新生）に関与する特異的因子の産生について分析し、かつ充実腫瘍からの腫瘍細胞の異なるサブセットを単離し、腫瘍形成性、薬物耐性及び転移可能性について分析することができる。
【００５２】
細胞の富化された集団におけるような、「富化された」は、細胞の分画されたセトにおける、特定のマーカーを有する細胞の数の、細胞の未分画セットにおける該マーカーを有する細胞の数に比しての増加に基づいて定義することができる。しかし、用語「富化された」は、好ましくは、試験マウスにおいて限界希釈頻度で腫瘍を形成する、細胞の最小数としての腫瘍形成機能によって定義することができる。したがって、５００の腫瘍幹細胞が、試験動物の６３％に腫瘍を形成するが、５，０００の未分画腫瘍細胞が、試験動物の６３％に腫瘍を形成するのに必要とされるならば、この充実腫瘍幹細胞集団は、腫瘍形成活性について１０倍富化されている（実施例を参照）。充実腫瘍幹細胞モデル（図１Ａ）は、（表現型及び機能上の）富化のこれら二つの定義の間の関連を与える。
【００５３】
ＣＤ４４のみを用いたＦＡＣＳ方は、充実腫瘍幹細胞を少なくとも２倍富化することができる（実施例１及び３を参照）。追加のマーカーを用いた富化は、１０倍又はそれ以上富化することができ、充実腫瘍幹細胞を単離するのに用いることができる。
【００５４】
「単離された」は、その天然の環境（例えば充実腫瘍内）から取り出され、隔離又は分離された細胞であって、少なくとも約７５％、最も好ましくは約９０％が、天然にはともに存在するが、該細胞がそれに基づいて単離されるマーカーを欠く、その他の細胞から遊離している、細胞を意味する。
【００５５】
充実腫瘍からの癌細胞サブセットの純化（富化又は単離）は、腫瘍学の当業者が、癌の古典的モデルと充実腫瘍幹細胞モデルとを区別するのを許す（図１）。少数の充実腫瘍細胞が、実際に、幹細胞の特性を有するならば、腫瘍増殖及び薬物耐性に必要な遺伝子を効率的に特定するには、ゲノム学を、幹細胞集団に集束させなければならない。しかし、ゲノム学を、充実腫瘍細胞ではなく、大集団に標的化するならば、最も有望な薬物標的が、腫瘍内の大規模増殖の余地を保有しない、その他の細胞が発現するその他の遺伝子の大海の中で、曖昧になるか、又は失われてしまう。
【００５６】
実施例のいくつかで、本発明者らは、乳癌からの腫瘍形成細胞に的を絞った。充実腫瘍内の細胞の個々の集団に的を絞ることは、新奇な癌治療に的を絞り、薬物発見のための新奇なひょてきを特定する方法の、より明瞭な理解を与える。加えて、充実腫瘍幹細胞（例えば乳癌腫瘍形成細胞）の純化は、薬物感受性についてふるい分け、腫瘍形成又は転移の能力を予測するマーカーを特定するための材料を提供する。
【００５７】
充実腫瘍幹細胞のin vivo増殖
充実腫瘍幹細胞のin vivo増殖は、充実腫瘍幹細胞を、動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウスのような齧歯類（実験用齧歯類に注入するのに当技術に開発された予測可能な方法のため）、最も好ましくは免疫弱化されたマウス、例えばＳＣＩＤ系マウス

、Beige／ＳＣＩＤ系マウス又はＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウス（実施例を参照）への注入によって達成することができる。ＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスは、様々な数の細胞を注入し、腫瘍形成について観察する。注入は、当技術に公知のいかなる方法によって実施することもでき、注入された細胞集団の充実腫瘍幹細胞についての富化を追跡する。

【００５８】

特定の実施態様では、ＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスモデルにヒト乳癌腫瘍を確立するために、８週齢の雌のＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスを、ケタミン／キシラジン（４ｍｌの体積中キシラジン２０ｍｇと併せたケタミン３００ｍｇ）０．２ｍｌの腹腔内注射によって麻酔した。次いで、この溶液０．０２ｍｌを、ＨＢＳＳに希釈し、マウス２０ｇあたりで用いた。次いで、マウスにＶＰ－１６（エトポシド）を、腹腔内注射（１ｋｇあたりエトポシド３０ｍｇ、無血清ＨＢＳＳに希釈して最終注入体積を０．２ｍｌとした）によって投与した。同時に、エストロゲンペレットを、マウスの頸部背側の皮下に、トロカールを用いて入れた。次いで、マウスを、暖め、覚醒した後にケージに戻した。腫瘍注入／移植は、すべて、この操作の３～３日後に実施した。

【００５９】

新鮮な標本を移植するため、ヒト乳癌腫瘍のサンプルは、術後１時間以内に受領した。これらの腫瘍を、鋏で小片に裁断し、次いで、小片を、剃刀で寸断して、２ｘ２ｍｍの大きさの片を得た。寸断は、氷上の無菌条件下で、２０％ウシ胎児血清を補った無菌のＲＰＭＩ１６４０培地中で実施した。次いで、腫瘍片を、無血清ＨＢＳＳで洗浄し、直ちに移植した。次いで、中腹部に２ｍｍの切開を施し、トロカールを用いて、１～２個の小腫瘍片を、上右側及び上左側の乳腺脂肪パッド（両側の２番目の乳首の直下）に移植した。６－０縫合糸を、ＭＦＰ－乳首に２回り施して、移植片を定位置に保持させた。縫合糸は、５日後に除去した。Nexabanを用いて、切開を密封し、腫瘍成長についてマウスを毎週追跡した。

【００６０】

胸水、又は解離した充実腫瘍細胞を注入するため、細胞を、手術直後に受領し、無血清ＨＢＳＳで洗浄した。次いで、細胞を、無血清ＲＰＭＩ／Matrigel混合物（１：１体積）に懸濁し、次いで、左右の乳腺パッドに１８Ｇの針を用いて注入した。これを実施するには、望みの数の細胞を、０．２ｍｌ中に懸濁し、注入した。針注入の部位は、Nexabanで密封して、いかなる細胞の漏れも防いだ。

【００６１】

消化された腫瘍細胞を注入するには、患者からの腫瘍（充実腫瘍）、又はマウスで（本発明の方法によって）成長させた腫瘍を、小片に裁断し、次いで、無菌の剃刀を用いて完全に寸断した。次いで、得られた片を、ＨＢＳＳ溶液中の超純粋コラゲナーゼIIと混合し（コラゲナーゼ２００～２５０Ｕ／ｍｌ）、３７℃で３～４時間温置を許し、１５～２０分毎に、１０ｍｌ入りピペットで採取した。温置の終点で、細胞を、４５ミクロンのナイロンメッシュ越しに濾過し、ＲＰＭＩ－２０％ＦＢＳで洗浄し、次いで、ＨＢＳＳで２回洗浄した。次いで、注入しようとする細胞を、ＨＢＳＳ／Matrigel混合物（１：１体積）に懸濁し、上記のとおり、哺乳動物の脂肪パッド又は皮下に注入した。Nexabanは、注入部位を密封するのに用いることができる。

【００６２】

異種移植片腫瘍を分析するため、充実腫瘍を、マウスから取り出し、単細胞懸濁液とした。当技術に公知の方法を用いて、細胞を、染色し、フローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）によって分析した［Morrison & Weissman, Immunity, 1(8): 661-73 (1994)］。腫瘍形成細胞の表現型は、すべての腫瘍で$CD44^{+}CD24^{-/lo}$であり、ほとんどの腫瘍で、Ｂ３８．１$CD44^{+}CD24^{-/lo}$である。次いで、これらのマーカーの発現に基づくＦＡＣＳによって、単離された細胞の限界希釈分析を実施した。次に、乳癌幹細胞をさらに純化した。細胞を、７ＡＡＤ（死細胞を染色）、抗Ｈ２Ｋ－ＰＥ（マウス細胞を染色）、及び癌細胞による不均一発現パターンを有する、抗Ｂ３８．１、抗アネキシンＶ、抗Notch４、抗ＣＤ９、抗ＣＤ２４、抗ＭＵＣ１、抗ＣＤ４９Ｆ、抗ＣＤ６２Ｐ、抗Ｐ－糖タンパ

ク質、抗Notch１、抗５２０Ｃ９、抗２６０Ｆ９及び抗３１７Ｇ５を包含する、抗体の組合せで染色した。ＦＡＣＳを用いて、示差的に発現された抗原の一つを発現するか、又はしないヒト生存細胞を単離した。マーカーの組合せは、腫瘍形成細胞の最大の富化を許す。限界希釈アッセイのために、各集団の１００、１，０００、10,000及び100,000の細胞をin vivoで分析した。

【００６３】

ＳＣＩＤ系マウス、ＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウス又はBeige／ＳＣＩＤ系マウスに、様々な数の細胞を注入し、腫瘍について観察した。形成されるいかなる腫瘍も、病理学的検査及びＦＡＣＳ分析のために取り出した。試験を繰り返して（例えば約１０回）、結果を確認した。

【００６４】

細胞の処方及び注入のその他の一般的手法は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed. (Mack Publishing Co., Easton, PA)に見出し得る。適切な経路は、筋内、皮下（上記参照）、脊髄内注射はもとより、鞘内、直接脳室内、静脈内、腹腔内、鼻内又は眼内注射を包含する、非経口送達を包含し得るが、これらは僅かを指名したにすぎない。注入には、本発明の薬剤を、水溶液中、好ましくは、ハンク液、リンゲル液、又は生理食塩水緩衝液のような、生理学的に適格である緩衝液中に処方する。そのような経粘膜投与には、浸透させようとする障壁に適切な浸透剤を処方物中に用いる。そのような浸透剤は、当技術に一般的に公知である。

【００６５】

充実腫瘍幹細胞が富化された細胞集団を用いることによって、本発明は、Mueller及びReisfeld［Cancer Metastasis Rev., 10: 183-200 (1991)］（多数のヒト腫瘍、特に血液学的疾患及び悪性黒色腫に対する散剤性成長を許す、ＳＣＩＤ系マウスを用いた）、及びSakakibaraら［Cancer J. Sci. Am., 2: 291-300 (1996)］（重篤な合併免疫不全（ＳＣＩＤ）のマウスの大腹部（生殖腺）脂肪パッドに内植された乳癌の外科標本の成長及び転移能を研究）の方法にまさる改良である。Sakakibaraらは、生殖腺脂肪パッド内へのヒト乳腫瘍の定置が、急速又は緩慢いずれかに成長するか、又は全く成長しない腫瘍を生じ得ることを観察した。調べた４８例の腫瘍のうち、３個のリンパ節由来腫瘍の一つを包含する１２例（２５％）が、移植されたマウスのいくつか又はすべての中で充分急速に成長して（すなわち、腫瘍は、２～６ヶ月以内に２～３ｃｍの直径に達した）、反復的な継代を許した。

【００６６】

対照的に、充実腫瘍幹細胞の注入は、回数の７５％を越える、好ましくは回数の８０％、より好ましくは８５％、９０％、又は９５％を越える、腫瘍の成功裡の確立を一貫して生じることができる。本発明者らは、試験した５例の腫瘍はもとより、３例の胸水からも、腫瘍の１００％の成功裡の確立を達成した（実施例を参照）。その上、本発明は、Sakakibaraら［Cancer J. Sci.Am., 2: 291-300(1996)］の方法を用いては、確立に到達できない部域である、乳腺脂肪パッドで充実腫瘍（特に乳癌幹細胞からの腫瘍）の好都合な確立を与える。

【００６７】

充実腫瘍幹細胞のin vitro増殖

細胞は、個々の細胞の解離によって、充実腫瘍組織から得ることができる。特定の腫瘍からの組織を、無菌手順を用いて取り出し、トリプシン、コラゲナーゼなどのような酵素による処理を包含する、当技術に公知のいかなる方法［Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989)；Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds, (Wiley Interscience, New York, 1989)；及びMolecular Biology Lab Fax, Brown, ed. (Academic Press, 1991)を参照］を用いても、又は直截的な機器によるような、解離の物理的方法によっても、細胞を解離させる。解離の方法は、異なる濃度の酵素を、異なる時間試験して、細胞生存率、細胞表面マーカーの保持、及び培養中の生存能力を最大化することによ

って最適化する［Worthington Enzyme Manual, von Worthington, ed. (Worthington Biochemical Corporation, 2000)］。解離させた細胞は、２００～２，０００rpm、通常、約１，０００rpm（２１０xG）の低速度で遠心分離し、継いで、培地に再懸濁する。細胞培養の方法への指針については、Spector et al., Cells: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1998を参照されたい）。

【００６８】

解離した細胞は、細胞代謝に要する補強物、例えばグルタミンその他のアミノ酸、ビタミン、無機質、及びトラスフェリンなどの有用なタンパク質を含有する、ＨＥＭ、ＤＭＥＭ、ＲＰＭＩ、Ｆ－１２などを包含する、細胞増殖を支援できる公知のいかなる培地にも入れることができる。培地は、酵母、細菌及び真菌による汚染を防ぐために、ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシンなどのような抗生物質を含有してもよい。ある場合には、培地は、ウシ、ウマ、ニワトリなどに由来する血清を含有してもよい。しかし、充実腫瘍幹細胞の増殖に好適な実施態様は、規定された低血清培地を用いることである。充実腫瘍幹細胞に好適な培地は、ハムのＦ１２、２％ウシ胎児血清、及び定義されたホルモン及び塩類混合物、インスリン、トラスフェリン、ならびにセレン又はＢ２７補強物の混合物を含む、規定培地である［Brewer et al., J. Neuroscience Res., 35: 567 (1993)］。

【００６９】

培地は、培養中の腫瘍幹細胞の増殖を許すための分裂促進因子及び生存因子としての、ウシ胎児血清又はニワトリ胚エキス（ＣＥＥ）で補強された、化学的に規定された培地であることができる。幹細胞の増殖に効果的な、１種類又はそれ以上の所定の成長因子、例えば、当業者には公知のＮ２補強物又はＢ２７補強物を含有する、その他の無血清培地を用いて、充実腫瘍幹細胞を他の鳥類及び哺乳動物の種、例えばヒトから単離かつ繁殖させることができる［米国特許第5,750,376号、第5,851,832号及び第5,753,506号明細書；Atlas et al., Handbook of Microbiological Media (CRC Press, Boca Raton, Louisiana, 1993)；Freshney, Culture on Animal Cells, A Manual of Basic Technique, 3rd Edition (Wiley-Liss, New York, 1994)を参照、すべて、引用により本明細書に組み込まれる］。

【００７０】

充実腫瘍幹細胞の増殖用培地は、こうして、充実腫瘍幹細胞、及び増殖した後代の増殖を支援する。「増殖した後代」は、充実腫瘍幹細胞を包含する未分化の腫瘍細胞であるが、それは、充実腫瘍幹細胞は、培養中に大規模に増殖する能力を有するからである。

【００７１】

培養の条件は、生理学的条件に近くなければならない。培地のｐＨは、生理学的ｐＨ、好ましくはｐＨ６～８、より好ましくは約ｐＨ７～７．８に近くなければならなず、ｐＨ７．４が最も好ましい。生理学的温度は、約３０～４０℃にわたる。細胞は、好ましくは約３２～約３８℃、より好ましくは約３５～約３７℃の温度で培養する。同様に、細胞は、空気中のO_2濃度に比して比較的低下させたレベルのO_2中で培養する結果、O_2濃度が、空気中の２０％のO_2ではなく、生理学的レベル（１～６％）に匹敵してよい。

【００７２】

特定の患者の充実腫瘍幹細胞は、in vitroで増殖させさえずれば、分析し、ふるい分けることができる。in vitroで増殖させた充実腫瘍幹細胞は、当技術に公知の手法を用いて、遺伝的に改変することもできる［下記を参照；またSambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989)；Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds, (Wiley Interscience, New York, 1989)も参照されたい］。in vitro遺伝的改変は、一定の状況では、遺伝学的材料による感染に優る、より以上の制御が必要とされるときに、in vivo遺伝的改変より望ましいことがある。

【００７３】

充実腫瘍幹細胞及び幹細胞後代は、当技術に公知の何らかの方法によって必要とされる

までは、凍結保存することができる。細胞は、等張溶液、好ましくは、特定の凍結保存剤を含有する、細胞培養液中に懸濁させることができる。そのような凍結保存剤は、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、グリセリンなどを包含する。これらの凍結保存剤は、５～１５％、好ましくは８～１０％の濃度で用いる。細胞は、－１５～－１５０℃、好ましくは－２０～－１００℃、より好ましくは－１５０℃の温度まで徐々に凍結させる。

【００７４】

充実腫瘍幹細胞のin vitro培養についてのそれ以上の指針は、実施例９及び図９に与えられる。

【００７５】

充実腫瘍幹細胞及び充実腫瘍幹細胞後代の遺伝的改変

未分化の状態では、充実腫瘍幹細胞は、急速に分裂し、そのため、遺伝的改変の絶好の標的となる。本明細書に用いられる限りでの用語「遺伝的改変」は、外来ＤＮＡの意図的な導入による、前駆細胞の遺伝子型の安定的又は一過的変化を意味する。ＤＮＡは、合成によるか、又は天然に派生してもよく、遺伝子、遺伝子の一部、その他の役立つＤＮＡ配列を含んでよい。本明細書に用いられる限りでの用語「遺伝的改変」は、天然に生じる変更、例えば天然のウイルス活動、天然の遺伝子組換えなどを通じて発生するものを包含することは意味しない。真核細胞の遺伝的改変の一般的方法は、当技術に公知である［Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989)；Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds, (Wiley Interscience, New York, 1989)を参照］。

【００７６】

ベクターを細胞又は組織内に導入するための多くの方法が利用でき、in vivo、in vitro及びex vivoでの充実腫瘍幹細胞による使用に等しく適する。ベクターは、患者から採取した造血幹細胞に導入し、クローン的に繁殖させてよい。本発明の方法によって、そのような方法は、充実腫瘍幹細胞に拡張される。

【００７７】

本明細書に用いられる限りでの「形質転換」又は「遺伝的改変された」は、外来ＤＮＡを、受容細胞に進入し、それを変化させる方法を記載する。形質転換は、天然のか、又は当技術に周知の様々な方法による人為的な条件下で発生してよく、外来核酸配列を原核又は真核宿主細胞に挿入するための、公知のいかなる方法にも依拠してよい。形質転換の方法は、形質転換しようとする宿主細胞の種類に基づいて選び、ウイルス感染、電気穿孔、熱ショック、リポフェクション及び粒子衝撃を包含するが、これらに限定されない。用語「形質転換された」細胞は、安定的に形質転換された細胞であって、挿入されたＤＮＡが、自発的に複製するプラスミド、又は宿主染色体の一部のいずれかとして複製できる細胞はもとより、挿入ＤＮＡ又はＲＮＡを限定された時間だけ発現する、一過的に形質転換された細胞も包含する。

【００７８】

原発性腫瘍細胞の遺伝子操作は、Patelら［Human Gene Therapy 5: 577-584 (1994)］によって以前に記載されている。細胞の遺伝的改変は、遺伝子療法の分野に周知の一つ又はそれ以上の手法を用いて達成され得る［Mulligan, R.C., Human Gene Therapy 5: 543-563 (1993)］。ウイルス形質導入法は、感染した標的細胞に対するタンパク質の発現を推進又は阻害する、核酸配列を含む組換えＤＮＡ又はＲＮＡウイルスの使用を含み得る。本発明に用いるのに適するＤＮＡウイルスは、アデノウイルス（Ａｄ）、アデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス又はポリオウイルスを包含するが、これらに限定されない。本発明に用いるのに適するＲＮＡウイルスは、レトロウイルス又はシンドビスウイルスを包含するが、これらに限定されない。本発明に用いるのに適すると思われる、いくつかのそのようなＤＮＡ及びＲＮＡウイルスが存在する。

【００７９】

アデノウイルスベクターは、ワクチン開発のための真核細胞への遺伝子導入に特に役立つことが判明している［Graham, F.L. & Prevec., L., in Vaccins: New Approaches to

Immunological Problems, Ellis, R.V., ed., 363-390 (Butterworth-Heineman, Boston, 1992)］。

【００８０】

充実腫瘍幹細胞の遺伝的改変に特定した指針は、実施例１３及び図１５～１８に与えられる。

【００８１】

遺伝子療法に使用又は提唱されている、「非ウイルス性」送達手法は、ＤＮＡリガンド複合体、アデノウイルス－リガンド－ＤＮＡ複合体、ＤＮＡの直接注入、$CaPO_4$沈降、遺伝子銃の手法、電気穿孔、及びリポフェクションを包含する［Mulligan, R.C., Science 260: 926-932 (1993)］。これらの方法のいずれも、当業者には広く利用可能であり、本発明に用いるのに適すると思われる。その他の適切な方法は、当業者に利用可能であり、本発明は、トランスフェクションの利用できる方法のいずれを用いて達成してもよい。リポフェクションは、単離ＤＮＡ分子をリポソーム粒子内に封入し、リポソーム粒子を標的細胞の細胞膜に接触させることによって達成してよい。リポソームは、自己集合性のコロイド粒子であって、その中に、ホスファチジルセリン又はホスファチジルコリンのような、両親媒性分子で構成される脂質二重層が、周囲の培地の一部を、脂質二重層が親水性の内部を囲むように封入している。単層又は多層のリポソームは、内部が、望みの化学物質、薬物、又は本発明におけるように、単離ＤＮＡ分子を収　容するように構成することができる。トランスフェクション、リポソーム注入、又はポリカチオン性アミノ重合体による送達は、当技術に周知の方法を用いて達成してよい［例えば、Goldman, C.K. et al., Nature Biotechnology 15: 462-466 (1997)］。

【００８２】

特に問題とされる、２種類の改変された充実腫瘍幹細胞は、欠失突然変異体、及び過剰発現突然変異体である。欠失突然変異体は、単一の遺伝子、通常はタンパク質コーディング遺伝子が実質的に欠失するよう遺伝的に改変された、野生型細胞である。欠失突然変異体は、遺伝子が、通常、検出できるｍＲＮＡ又は生物活性タンパク質が該遺伝子から全く発現されないよう、破壊されているが、それでも遺伝材料の多少の部分が存在し得る、突然変異体も包含する。加えて、いくつかの実施態様では、欠失、又は二つ又はそれ以上の活性を有するタンパク質の（しばしば、あるタンパク質ドメインに相当する）一つの活性を除去又は不活性化する突然変異を有する突然変異体が用いられ、用語「欠失突然変異体」に包含される。過剰発現突然変異体は、改変された充実腫瘍幹細胞内の少なくとも一つの、唯一であることが最も多い遺伝子が、遺伝子が改変されていない細胞に比して、より高いレベルで発現されるように遺伝的に改変された、野生型細胞である。

【００８３】

遺伝的に改変された充実腫瘍幹細胞は、当技術に公知の組織培養プロトコルに付すことができる［米国特許第5,750,376号及び第5,851,832号明細書；Spector et al., Cells: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1998)を参照］。腫瘍幹細胞は、培養の際に、分化、細胞死又は免疫原性を促進するよう、遺伝的に改変することができる。例えば、腫瘍幹細胞は、患者の充実腫瘍に対する免疫応答を誘導する産物の発現を促進するよう改変することができる。これに代えて、充実腫瘍幹細胞は、遺伝的改変の前に、様々な増殖プロトコルにin vitroで付すことができる。用いられるプロトコルは、遺伝的に改変される充実腫瘍幹細胞、又は望みの充実腫瘍幹細胞後代の種類に依存する。細胞を分化のプロトコルに付したならば、それらを、望みのタンパク質の発現について再び検定することができる。望みの表現型を有する細胞は、単離し、遺伝的に改変された細胞が発現するタンパク質又は生物学的活性分子の必要に応じて、受容者に移植することができる。そのような分子は、腫瘍の退縮を促進するか、又は腫瘍の拡大を阻害することができる。

【００８４】

充実腫瘍発生のin vitroモデル、in vivoモデル、及び充実腫瘍幹細胞に対する薬物の効果をスクリーニングする方法

in vitro（実施例９参照）又はin vivo（本発明の異種移植片モデル）での充実腫瘍幹細胞、及び培養された充実腫瘍幹細胞後代は、可能性のある治療組成物のスクリーニングに用いることができる。充実腫瘍の治療のためのこれらの組成物は、培養内のこれらの細胞に様々な用量で適用することができ、これらの細胞の応答を、様々な時間にわたって追跡することができる。これらの細胞の物理的特徴性は、細胞を顕微鏡で観察することによって分析することができる。酵素、受容体その他の細胞表面分子のようなタンパク質の、新たな、又は上昇したレベルでの発現の誘導は、そのような分子のレベルの変化を特定できる、当技術に公知のいかなる手法によっても分析することができる［Clarke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 11024-11028 (1995)を参照］。これらの手法は、そのような分子に対する抗体を用いた免疫組織化学（実施例を参照）、又は生化学的分析を包含する。そのような生化学的分析は、タンパク質アッセイ、受容体結合アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、電気泳動分析、高性能液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）による分析、ウエスタンブロット分析、及び放射線免疫アッセイ（ＲＩＡ）を包含する。ノーザンブロット分析のような核酸分析は、これらの分子をコードしているｍＲＮＡのレベル、又はＰＣＲを調べるのに用いることができる［実施例１４を参照されたい］。

【００８５】

これに代えて、これらの製剤組成物で処理された細胞を、動物に移植し（例えば本発明の異種移植片モデル）、それらの生存、腫瘍を形成する能力、及び生化学的かつ免疫学的特徴性を調べることができる。

【００８６】

本発明の充実幹細胞及び充実腫瘍幹細胞後代は、充実腫瘍細胞に対する生物学的作用因の効果を決定する方法に用いることができる。用語「生物学的作用因」又は「試験化合物」は、腫瘍細胞に対する効果を（そのような効果が有害、有益又は別途であろうと否と）有し得るいかなる作用因（ウイルス、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、炭水化物、核酸、ヌクレオチド、薬物、抗体、プロドラッグその他の物質）を意味する。

【００８７】

可能性のある試験化合物の充実腫瘍幹細胞に対する効果を決定するには、腫瘍幹細胞に由来する前駆細胞の培養体を、被験者、例えば、腫瘍その他の癌性疾患、例えば上皮癌又は乳癌を有する患者の組織から得ることができる。充実腫瘍幹細胞、又は他の望みの細胞集団を被験者から得たならば、細胞をin vitroで培養する。培養の選択は、試験しようとする特定の試験化合物、及び研究室の人員が達成したいと欲する診断効果に依存する。

【００８８】

様々な生物学的作用因が、充実腫瘍幹細胞及び充実腫瘍幹細胞後代の数及び性質を増加、減少、又は他の何らかの方法で改変できる能力を、ふるい分けることができる。例えば、充実腫瘍幹細胞の増殖能力を低下させる試験化合物についてふるい分けることが可能であって、抗癌治療剤の特定に役立つと思われる。これらのアッセイでは、適切な細胞を、問題の試験化合物の存在下で培養し、発生する増殖又は細胞死の度合いについて検定する。

【００８９】

充実腫瘍幹細胞及びその後代の大規模な増殖に対する試験化合物、又は試験化合物の組合せの効果を決定することができる。大規模に増殖できる能力を失うよう、スクリーニングの前に既に誘導された、非腫瘍形成性充実腫瘍細胞をふるい分けることが可能である。増殖過程に対する試験化合物の効果を、それらを充実腫瘍幹細胞に適用することによって決定することもできる。一般的には、試験化合物を可溶化し、培地に加えるか、又はin vivoアッセイではマウスに様々な濃度で与えて、各用量での試験化合物又は作用因の効果を決定する。培地は、２日毎に、試験化合物又は生物学的作用因を、該作用因の濃度を多少とも一定に保つような量で補充してよい。同様に、試験化合物は、異なる時間的間隔でマウスに再投与して、化合物の効果を経時的に査定することができる。

【００９０】

増殖の変化は、形成される細胞の数の増加もしくは減少、あるいはin vitroでの病巣の大きさ、又はin vivoでの腫瘍の大きさの増加もしくは減少によって観察する（それが、増殖の速度、及び細胞死の速度の反映であって、病巣あたりの細胞数、又はマウスにおける腫瘍の大きさによって決定される）。腫瘍幹細胞に対する試験化合物の効果は、試験化合物の投与後の、培養体、又はin vivoでのマウス中に存続する腫瘍幹細胞の数を決定することによって測定する。腫瘍幹細胞の数の決定に加えて、腫瘍幹細胞の細胞周期、及びマーカー発現に対する試験化合物の効果も、フローサイトメトリーによって決定する。

【００９１】

培地に添加されたか、又はマウスに注入された試験化合物又は生物学的作用因は、約１０ｐｇ／ｍｌ～１μｇ／ｍｌ、好ましくは約１ｎｇ／ｍｌ（又は１ｎｇ／血液１ｃｃ）～１００ｎｇ／ｍｌ（又は１００ｎｇ／血液１ｃｃ）の範囲内の最終濃度であることができる。

【００９２】

試験化合物又は生物学的作用因の効果は、発現された表現型、細胞生存率、増殖率、腫瘍幹細胞の数、in vivoでの移植に対する腫瘍幹細胞活性、培養における移植に対する腫瘍幹細胞の活性、腫瘍細胞の細胞周期の分布、及び遺伝子発現における変化のような基準に関して、対照培養体に対する有意差に基づいて特定する。

【００９３】

治療組成物及び方法

Notchリガンド、抗Notch抗体、又は他の、Notchシグナル導入／応答経路におけるタンパク質の作用薬もしくは拮抗薬として作用する治療剤を含有する製剤組成物を、いかなる効果的な方法によっても投与することができる。例えば、有効濃度の抗Notch治療剤を含有する、生理学的に適切な溶液を、局所的に、眼内、非経口、経口、鼻内、静脈内、筋内、皮下投与でか、又は他のいかなる効果的な手段によっても投与することができる。特に、抗Notch治療剤は、標的癌又は腫瘍組織に、針によって、該標的組織の腫瘍細胞を治療するのに効果的な量で直接注入してよい。これに代えて、目、消化管、生殖泌尿管（例えば膀胱）、肺及び気管支系などのような体腔内に存在する癌又は腫瘍は、有効濃度の抗Notch治療剤を含有する生理学的に適切な組成物（例えば、無菌である、生理食塩水もしくはリン酸緩衝液、懸濁液、又は乳濁液）を、針による直接注入を通じてか、又は癌もしくは腫瘍に冒された中空の器官に入れた、カテーテルその他の送達管を通じて、与えることができる。Ｘ線、ソノグラム又は光ファイバー視覚化装置系のような、効果的ないかなる造影装置も用いて、標的組織を定位し、針又はカテーテル管を案内してよい。もう一つの代替方法では、有効濃度の抗Notch治療剤を含有する生理学的に適切な溶液を、血液循環内に全身的に投与して、直接到達するか、又は解剖学的に単離することができない、癌もしくは腫瘍を治療することができる。

【００９４】

そのような操作は、すべて、抗Notch治療剤が腫瘍細胞に接触し、形質導入し、又はトランスフェクションするのに充分なだけ（作用因の性質に依存する）、抗Notch治療剤を標的腫瘍に接触させるという目標を共通して有する。一実施態様では、中空器官の上皮裏打ちに存在する充実腫瘍を、ベクター懸濁液を液体に満たされた中空器官内に注入することによってか、又は空気に満たされた中空器官内に吹き付けるか、もしくは噴霧することによって治療してよい。すなわち、腫瘍細胞（例えば充実腫瘍幹細胞）は、肺気管支樹の裏打ち、消化管の裏打ち、女子生殖管、生殖泌尿管、膀胱、胆嚢、その他の抗Notch治療剤との接触に到達できるいかなる器官組織の裏打ちの中もしくは間に存在し得る。もう一つの実施態様では、充実腫瘍は、例えば脊椎、脊髄根又は脳のような、中枢神経系の中にか、又は裏打ちに位置するため、脳脊髄液に注入された抗Notch治療剤が、その空間内の充実腫瘍の細胞に接触し、形質導入する（したがって、抗Notch治療剤は、当技術に公知の方法を用いて、脳血液障壁を横断するよう改質することができる）。腫瘍学の当業者は、抗Notch治療剤は、腫瘍へのベクター懸濁液の直接注入によって、充実腫瘍に投与されるため、抗Notch治療剤は、腫瘍内部の腫瘍細胞に接触かつ影響できることを理解するこ

とができる。

【００９５】

腫瘍学の当業者は、ベクターは、選ばれたベクターの形質導入又はトランスフェクション効率を維持し、安全な注入を促進するのに適した担体又は賦形剤とともにベクターを含む組成物として投与されることを理解することができる。そのような担体は、ｐＨ均衡させた生理学的緩衝液、例えばリン酸、クエン酸又は重炭酸緩衝液、生理食塩水溶液、徐放性組成物、その他、治療しようとする充実腫瘍幹細胞に抗Notch治療剤を安全かつ効果的に接触させるのに役立ついかなる物質であってもよい。

【００９６】

充実腫瘍を有する患者を治療する際は、治療有効量の抗Notch治療剤を投与する。治療有効量は、症状の改善、又は生存の延長を患者に招くのに充分な、化合物の量を意味する。そのような化合物の毒性及び治療効率は、細胞培養又は実験動物における、例えばLD_{50}（集団の５０％に致死的な用量）及びED_{50}（集団の５０％に治療上有効な用量）を決定するための、標準的な製剤手順によって決定することができる。毒性効果と治療効果との用量比は、治療指数であり、比LD_{50}／ED_{50}として表すことができる。大きい治療指数を示す化合物が、好ましい。これらの細胞培養アッセイ及び動物研究から得られたデータは、ヒトに用いるための投与量の範囲を処方するのに用いることができる。そのような化合物の投与量は、好ましくは、僅かにすぎないか、又は全くない毒性を伴うED_{50}を包含する循環濃度の範囲内にある。投与量は、採用される投与形態、及び利用される投与経路に応じて、この範囲内で変動し得る。本発明の方法に用いられるいかなる化合物についても、治療有効用量を、当初は、細胞培養アッセイから推算することができる。用量は、細胞培養で決定されたとおりのIC_{50}を包含する循環血漿濃度範囲を達成するよう、動物モデルで処方し得る。そのような情報は、ヒトに役立つ用量をより正確に決定するのに用いることができる。血漿中のレベルは、例えば、高性能液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）によって測定し得る。

【００９７】

的確な処方、投与経路及び投与量は、患者の状態に鑑みて、個々の内科医によって選ぶことができる［例えば、Fingl et al., in The Pharmacological Basis of Therapeutics, Chap. 1, pg. 1 (1975)を参照］。担当内科医は、毒性のために投与を終結、中断又は調整する方法及び時期を知っていると思われる。逆に、担当内科医は、臨床的応答が適切でないならば（毒性は別として）、より高いレベルに投与を調整することの知っているであろう。問題の臨床的疾患の管理における、投与される用量の大きさは、治療しようとする状態の重篤度、及び投与経路とともに変動する可能性がある［Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 12th ed. (CRC Press 1996)；Physicians' Desk Reference, 55th ed. (2000)を参照］。状態の重篤度は、例えば、適切な予後評価法によって、部分的には評価し得る。さらに、用量、及びおそらく用量頻度も、個々の患者の年齢、体重及び応答に応じて変動する。上記に考察されたそれに匹敵するプログラムを、獣医学においても用い得る。

【００９８】

治療しようとする特定の状態に応じて、薬剤を全身的又は局所的に処方かつ投与し得る。処方及び投与の手法は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed. (Mack Publishing Co., Easton, PA)に見出し得る。適切な経路は、経口、経直腸、経皮、経膣、経粘膜又は経小腸投与；筋内、皮下、脊髄内注射はもとより、鞘内、直接脳室内、静脈内、腹腔内、鼻内又は眼内注射を包含する、非経口送達を包含し得るが、これらは僅かを指名したにすぎない。

【００９９】

注入には、本発明の薬剤を、水溶液中、好ましくは、ハンク液、リンゲル液、又は生理食塩水緩衝液のような、生理学的に適格である緩衝液中に処方する。そのような経粘膜投与には、浸透させようとする障壁に適切な浸透剤を処方物中に用いる。そのような浸透剤は、当技術に一般的に公知である。

【０１００】
活性成分に加えて、これらの製剤組成物は、薬学的に使用できる製剤へと活性化合物を加工するのを助ける、賦形剤及び佐剤を含む、薬学的に許容され得る適切な担体を含有し得る。経口投与用に処方された製剤は、錠剤、カプセル剤又は溶液の形態であり得る。本発明の製剤組成物は、それ自体は公知である方式で、例えば、慣用の混合、溶解、造粒、研和、乳化、カプセル化、内包又は凍結乾燥の方法によって製造し得る。非経口投与向けの薬学的処方物は、水溶性形態の活性化合物の水溶液を包含する。加えて、活性成分の懸濁液を、適切な油状注射懸濁液として調製し得る。適切な親油性溶媒又は担体は、ゴマ油のような油脂、又は合成脂肪酸エステル、例えばオレイン酸エチルもしくはトリグリセリド、又はリポソームを包含する。水性の注射懸濁液は、懸濁液の粘度を上昇させる物質、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール又はデキストランを含有し得る。場合により、懸濁液は、適切な安定剤、又は化合物の溶解度を上昇させて、著しく濃縮された溶液の調製を許す薬剤を含有してもよい。

【０１０１】
充実腫瘍幹細胞から得られるポリヌクレオチド及びポリペプチド
「ポリヌクレオチド」は、ヌクレオチドの連鎖であって、核酸、核酸配列、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、又はそれらのいかなる断片であることもできる、連鎖を意味する。それは、ゲノムＤＮＡ、ｍＲＮＡ、ｃＤＮＡ、又は合成起源の、二本鎖もしくは一本鎖の、かつ炭水化物、脂質、タンパク質その他の、特定の活性を遂行するか、又は役立つ組成物を形成するための材料と組み合わされた、ＤＮＡもしくはＲＮＡであってもよい。「オリゴヌクレオチド」は、アンプリマー、プライマー、オリゴマー、要素及びプローブという用語と実質的に同等である。用語「プローブ」は、標的配列とハイブリダイズして、ポリヌクレオチドプローブ／標的複合体を形成できる、ポリヌクレオチド配列を意味する。「標的ポリヌクレオチド」は、ポリヌクレオチドプローブが、それとの塩基対合によってハイブリダイズすることができる、ヌクレオチドの連鎖を意味する。ある場合には、配列は、整列させたときに相補的である（誤対合がない）。別の場合には、１０％以内の誤対合が存在し得る。

【０１０２】
ＤＮＡ又はＲＮＡは、当業者には周知である数多くの方法のいずれによってもサンプルから単離することができる。例えば、核酸の精製法は、Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, pt. I. Theory and Nucleic Acid Preparation (Elsevier, New York, N.Y., 1993)に記載されている。「サンプル」は、その最も広い意味で用いられる。ポリヌクレオチド又はポリペプチドを含有するサンプルは、体液；細胞、染色体、細胞小器官、細胞から単離された膜からの抽出物；溶液中のか、又は基質に結合したゲノムＤＮＡ、ＲＮＡもしくはｃＤＮＡ；細胞；組織；組織プリントなどであることができる。

【０１０３】
総ＲＮＡは、TRIZOL試薬（Life Technologies, Gaithersburg, MD、米国）を用いて単離することができ、ｍＲＮＡは、オリゴｄ（Ｔ）カラムクロマトグラフィー又はガラスビーズを用いて単離することができる。これに代えて、標的ポリヌクレオチドがｍＲＮＡに由来するときは、ｍＲＮＡから逆転写されたｃＤＮＡ、該ｃＤＮＡから転写されたＲＮＡ、該ｃＤＮＡから増幅されたＤＮＡ、増幅されたＤＮＡから転写されたＲＮＡなどであることができる。標的ポリヌクレオチドがｍＲＮＡがＤＮＡに由来するときは、標的ポリヌクレオチドは、ＤＮＡから増幅されたＤＮＡ、又はＤＮＡから逆転写されたＲＮＡであることができる。

【０１０４】
いくつかの技術が、電気泳動分析、例えば二重制限酵素消化をプライマーの同調と組み合わせる方法［例えば、ヨーロッパ特許第0 534 858 A1号公報参照］、又は規定されたｍＲＮＡ末端に最近の部位を有する制限フラグメントを選ぶ方法［例えば、Prashar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 659-663 (1996)参照］向けの、限定された複雑性を

有する制限フラグメントのプールを形成する。その他の方法は、ｃＤＮＡを、例えば充分な塩基を（各ｃＤＮＡを特定するために多数のｃＤＮＡのそれぞれでか、又は規定されたｍＲＮＡ末端に関して公知の位置で生成された短いタグを配列決定することによって）配列決定することによって、統計的にサンプリングする［例えば、Velculescu, Science 270: 484-487 (1995)を参照されたい］。

【０１０５】

ＲＮＡの存在量及び活性を改変する方法は、現在、三つの分類群、すなわちリボザイム、アンチセンス種［ＰＣＴ特許第WO 88/09810号公報］、及びＲＮＡアプタマー［Good et al., Gene Therapy, 4: 45-54 (1997)］に属する。リボザイムは、ＲＮＡ切断反応を触媒できるＲＮＡである［ＰＣＴ特許第WO 90/11364号公報］。リボザイム法は、例えば、そのような小さいＲＮＡリボザイム分子に、細胞を接触させ、細胞での発現を誘導することなどを必要とする［Grassi & Marini, Annals of Medicine, 28:499-510 (1996)；Gibson, Cancer and Metastasis Reviews, 15:287-299 (1996)］。

【０１０６】

用語「アンチセンス」は、本明細書に用いられる限りで、特定の核酸配列の「センス」鎖に相補的である核酸配列を含むいかなる組成物も意味する。アンチセンス分子は、合成又は転写を包含する、いかなる方法によって生成してもよい。細胞内に導入されたならば、相補的ヌクレオチドが、細胞によって産生された天然の配列と組み合わせて、デュプレックスを形成し、転写又は翻訳のいずれかを遮断する。呼称「陰性の」は、アンチセンス鎖を意味することがあり、呼称「陽性の」は、センス鎖を意味することがある。

【０１０７】

オリゴヌクレオチドは、当技術に公知の標準的な方法によって、例えば、自動化されたＤＮＡ合成装置（例えばBiosearch, Applied Biosystems等々から商業的に入手できるもの）の使用によって合成してよい。

【０１０８】

「増幅」は、本明細書に用いられる限りで、核酸配列の追加的コピーの精製に関連する。増幅は、一般的には、当技術に周知のポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を用いて実施する。例えば、Dieffenbach, C.W. & Dveksler, G.S., PCR Primer, a Laboratory Manual, 1-5 (Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., 1995)を参照されたい。増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）、核酸配列依拠増幅（ＮＡＳＢＡ）又はＴ７依拠ＲＮＡ増幅であることができる。

【０１０９】

「ポリペプチド」は、天然に産すると、合成によるとを問わず、アミノ酸、アミノ酸配列、オリゴペプチド、ペプチド、又はタンパク質もしくはその部分を意味する。

【０１１０】

タンパク質活性を直接測定する方法は、当業者に周知である。そのような方法は、例えば、該タンパク質に対する抗体リガンドを有することに依存する方法、例えばウエスタンブロット分析を包含する［例えば、Burnette, A. Anal. Biochem., 112: 195-203 (1981)参照］。そのような方法は、最も良く研究されているタンパク質薬物標的のために利用できる。タンパク質の検出は、抗体によって達成することができる（実施例参照）。

【０１１１】

用語「抗原決定基」は、本明細書に用いられる限りで、特定の抗体と接触させる、分子のフラグメント（すなわちエピトープ）を意味する。タンパク質、又はタンパク質のフラグメントを用いて、宿主動物を感作するとき、タンパク質の非常に多くの領域が、抗体の生成を誘導し、それらが抗原決定基（タンパク質の与えられた領域又は三次元構造）に特異的に結合することがある。抗原決定基は、抗体との結合について、未処理抗原（すなわち、免疫応答を誘導するのに用いられる免疫原）と競合し得る。

【０１１２】

充実腫瘍幹細胞の富化された集団から単離されたか、又は充実腫瘍幹細胞から単離されたタンパク質は、二次元ゲル電気泳動系によって分離することができる。二次元ゲル電気

泳動は、当技術に周知であり、代表的には、一次元による等電点電気泳動、次いで二次元によるＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動を含む。例えば、Hames et al., Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach (IRL Press, New York 1990)；Lander, Science, 274: 536-539 (1996)を参照されたい。得られた電気泳動図は、質量分析法の手法、ポリクローナル及びモノクローナル抗体を用いる、ウエスタンブロット分析及び免疫ブロット分析、ならびに内部及びＮ末端微細配列決定を包含する、数多くの手法によって分析することができる。これらの手法を用いて、薬物に接触させた細胞（例えば充実腫瘍幹細胞）、又は例えば特定の遺伝子の欠失もしくは過剰発現によって改変された細胞を包含する、与えられた生理学的条件下で生成されたすべてのタンパク質の、実質的な画分を特定することができる。

【０１１３】

ｃＤＮＡライブラリー

純化された充実腫瘍幹細胞、充実腫瘍幹細胞後代、非腫瘍形成細胞、及び未分画腫瘍細胞は、潜在的な新奇薬物の標的を特定するために、当技術に公知の方法を用いて、アレー又はｃＤＮＡライブラリーを作成することができる［Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989)；Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds, (Wiley Interscience, New York, 1989)を参照されたい］。

【０１１４】

分子生物学は、核酸及びタンパク質の分析のための非常に様々な手法を含み、その多くは、臨床的診断アッセイの基盤を形成する。これらの手法は、核酸ハイブリダイゼーション分析、制限酵素分析、遺伝学的配列分析、ならびに核酸及びタンパク質の分離及び精製を包含する［Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989)］。多くの分子生物学的手法は、非常に多くのサンプルに対する数多くの操作を実施することを含む。本発明に役立つゲノム学その他の分子生物学的方法に対する指針については、Birren et al., Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, Vol. 1, Analyzing DNA (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1998)；Birren et al., Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, Vol. 4, Mapping Genomes (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999)を参照されたい。

【０１１５】

核酸ハイブリダイゼーション分析は、一般的には、大量の非標的核酸の間の非常に少数の特定の標的核酸（ＤＮＡ又はＲＮＡ）の、プローブによる検出を必要とする。複数サンプルの核酸ハイブリダイゼーション分析が、様々なフィルター及び固相支持体の体裁で実施されている。「ドットブロット」ハイブリダイゼーションは、標的ＤＮＡを、フィルターに非共有結合で付着させ、次いで標識化されたプローブとハイブリダイズすることを含む。「ドットブロット」ハイブリダイゼーションは、多重分析のため［ヨーロッパ特許第0 228 075号公報］、ならびに重複クローンの検出、及びゲノム地図の作成［米国特許第5,219,726号明細書］のためにさらに開発されている。もう一つの体裁、いわゆる「サンドイッチ」ハイブリダイゼーションは、オリゴヌクレオチドプローブを固相支持体に共有結合で付着させ、それを用いて、複数の核酸標的を捕捉かつ検出することを含む［米国特許第4,751,177号明細書；国際公開特許第90/01564号公報］。これらの体裁の多重項翻案は、「逆ドットブロット」と呼ばれる。

【０１１６】

感受性リポーター基（酵素、発蛍光団、放射性同位元素等々）、及び関連する検出系（フルオロメーター、ルミノメーター、光量子計、シンチレーション計数管等々）を用いた、シグナルを増幅する方法が、当技術に公知である。これらの方法を、増幅方法、例えばポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）と併用して、標的核酸配列を増幅することができる。例えば、PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, (Academic Press, 1990)を参照されたい。

【０１１７】
マイクロアレー
ある面ではin situハイブリダイゼーションを模倣して、ミクロ体裁とした多重又はマトリックス装置（例えばＤＮＡチップ）で複数サンプル核酸ハイブリダイゼーション分析を実施するための、新たな手法が開発されている［Barinaga, Science, 253: 1489 (1991)；Bains, Bio/Technology, 10: 757-758 (1992)参照］。マイクロアレーの使用についての指針は、Wang, E. et al., Nature Biotechnology, 18: 457-459 (2000)；Diehn, M. et al., Nature Genetics, 25: 58-62 (2000)によって与えられる。
【０１１８】
マイクロアレーは、当技術に公知であり、遺伝子産物（例えば、ｃＤＮＡ、オリゴヌクレオチド、ｍＲＮＡ、ｃＲＮＡ、ポリペプチド、及びそれらの断片）に配列が対応するプローブを特異的にハイブリダイズするか、又は既知の位置で結合する表面からなる。一実施態様では、マイクロアレーは、各位置が、遺伝子（例えば、タンパク質又はＲＮＡ）によってコードされる産物に対する不連続な結合部位を表し、結合部位が、生物のゲノム内の遺伝子の大半又はほとんどすべての産物に対して存在する、アレー（すなわちマトリックス）である。
【０１１９】
ポリヌクレオチド、ポリペプチド又は類似体を、ガラス、プラスチック（例えばポリプロピレン、ナイロン）、ポリアクリルアミド、ニトロセルロース、その他の材料から製造され得る、固相支持体又は基板に付着させる。「基板」は、ポリヌクレオチド又はポリペプチドを結合する、適切ないかなる剛体又は半剛体の支持体をも意味し、膜、フィルター、チップ、スライド、ウェーファ、繊維、磁性もしくは非磁性ビーズ、ゲル、毛細管その他の管材、プレート、重合体、及び微粒子を包含して、ウェル、溝、ピン、チャンネル及び細孔を包含する様々な表面形態を有する。ポリヌクレオチドは、当技術に公知のいかなる方法によっても、基板上に固定化することができる。好ましくは、基板は、光学的に透明である。
【０１２０】
生物学的高分子のアレー、例えば核酸分子又はタンパク質のアレーを製造するための、様々な方法が利用可能である。ＤＮＡの規則正しいアレーを多孔膜に作成する一つの方法は、「ドットブロット」又は「スロットブロット」法である。フラグメントの規則正しいアレーを作成するために用いられる、より効率的な手法は、ウェル、例えば微量滴定プレートの９６のウェルに浸漬した一連のピンを用いて、一連のサンプルを基板、例えば多孔膜に移転することである。核酸配列の規則正しいアレーを形成する、これに代わる方法は、米国特許第5,143,854号明細書（Pirrungに）、及びFodorら［Science, 251: 767-773 (1991)］が記載している。この方法は、異なる核酸配列を支持体の別個の異なる領域で合成する工程を含む。Khrapkoら［DNA Sequence, 1: 375-388 (1991)］は、ＤＮＡをポリアクリルアミドの薄層に、マイクロピペットを用いて手動で、オリゴヌクレオチドマトリックスを作成する方法を記載している。米国特許第5,807,522号明細書（（Brownらに、参照により組み込まれる）は、既知量の試薬をアレーの選ばれた位置のそれぞれに、規定量の液体を支持体に引き出すのに効果的な条件下で、毛細管の分与装置から支持体に取り出すことによって分与することによって、生物学的サンプルのマイクロアレーを製作する方法を記載している。
【０１２１】
スポッターは、ピン、インクジェットその他の技術を用いて、サンプルを支持体材料上に置くことができる。より一般的な方法のいくつかは、固体又はスプリットのいずれかであることができる、金属ピンを用いる。問題の化合物を含むウェルにピンを浸したとき、それぞれが、少量の材料を引き上げる。次いで、ピンを固相支持体に接触させ、ナノリットルの量を望みの位置に分与する。スプリットピン（別にキル：羽（ペン）として知られる）では、ピンの頭に切り込まれたスロットが、点滴しようとする化合物に対する貯留槽として機能する。キルピンは、ガラススライドとともに用いられることが最も多いが、固

体ピンは、代表的には、膜を点滴するのに用いられる。Amersham、Pharmacia、Biotech、GeneMachinesその他の企業が、点滴用ロボットを提供している。

【０１２２】

インクジェットの技術は、マイクロアレーを点滴するもう一つの方法を提供する。印刷機業界から適応され、バイオテクノロジーの用途に用いるよう再設計されて、これは、圧電結晶発信器及び電極案内装置系を用いて、化合物をスライド又は膜上の精密な位置に置く。Cartesian Technologies及びProtoGene Laboratoriesのような企業がこの技術を用いている。

【０１２３】

核酸を表面に付着させる方法は、ＰＣＴ刊行物の国際公開特許第95/35505号公報；DeRisi et al., Nature Genetics, 14: 457-460 (1996)；Shalon et al., Genome Res., 6: 639-645 (1996)；及びSchena et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 10614-10619 (1995)によって一般的に記載されているとおり、ガラスプレートに印刷することによる。マイクロアレーを製作するもう一つの方法は、高密度オリゴヌクレオチドアレーを作成することによる。規定された配列に相補的な数千のオリゴヌクレオチドを含むアレーを、in situ合成向けの写真平版法の手法を用いて、ある表面の規定された位置に形成する手法が、公知である［Fodor et al., Science, 251: 767-773 (1991)；Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 5022-5026 (1994)；Lockhart et al., Nature Biotech, 14: 1675 (1996)；米国特許第5,578,832号及び第5,510,270号明細書（それぞれ、参照により組み込まれる）を参照されたい］。

【０１２４】

米国特許第6,110,426号明細書（Shalonらへの）は、大規模スクリーニングアッセイ向けの生物学的サンプルのマイクロアレー、例えば、遺伝学的研究及び診断的用途のためのＤＮＡハイブリダイゼーションアッセイに用いようとする、ＤＮＡサンプルのアレーを製作する方法及び装置を開示している。米国特許第6,221,674号明細書（Slukaらへの）は、空間的に規定された試薬部域を固相に適用するための、記載された方法を開示していて、それは、吸着性の結合試薬を含有する液体を、連続的な金属又は金属酸化物表面を基本的に含む、固相の空間的に規定された部域に、試薬と固相との吸着性結合の形成を可能にするのに適切な時間、接触させることを特徴とする。ＰＣＴ特許第WO 92/10092号公報には、光反応性化合物とマスクを用いた照射とによって、ガラス支持体上に異なる複数の構造を形成するのに用いることができる方法が記載されている。米国特許第4,877,745号明細書には、異なって官能化された斑点を、インクジェット法によってプラスチック支持体に与える方法が記載されている。

【０１２５】

マイクロアレー及びマイクロアレー技術の使用の販売者のうちには、Affymetrix, Inc.（米国）、NimbleGen Systems, Inc.（Madison, Wisconsin、米国）、及びIncyte Genomics（米国）：大型の産業及び学術的部門の中核施設向けのマイクロアレーを製造；Agilent Technologies（米国）及びGraffinity Pharmaceutical Design, GmbH（ドイツ国）：個人研究者が設計かつ使用する、印刷及び指紋採取用アレーのような特定の役務を提供）；ならびにCLONTECH Laboratories（Becton Dickinson Bioscience）及びBioRobotics, Ltd.（英国）：個人研究者が、印刷を包含する、マイクロアレー製造の全工程を実施するのに必要な基礎的手段を提供）がある。Gwynne, P. & Heebner, G.“DNA Chips and Microarrays”, Science (2001)を参照されたい。

【０１２６】

プラスチック表面とは対照的に、金属及び金属酸化物表面は、自己集合の手法によって、厳密に規定されたマトリックス層で塗装することができるという利点を有する。自己集合した単層（ＳＡＭ）は、例えば、有機アルキルチオールが金表面に吸着されたときに形成され、そのような稠密に充填された単層の自発的組織化は、支持材料と吸着剤との強い特異的相互作用に基づく［Nuzzo et al., J. Am. Chem. Soc., 105: 4481 (1983)］。このようにして、結合マトリックスの厳密に規定された単層を、例えば金又は銀のような金

属の表面に貼付することができる。さらに、自己集合した固相の特異的結合容量は、EP-A-0 515 615に記載されたような特異的固相反応物の希釈によって、さらに最適化することができる。

【０１２７】

自己集合した単層に基づく微細構造による金属表面の塗装も公知であり、充実腫瘍幹細胞から単離された構成要素を付着させるのに用いることができる。Whitesidesら［Langmuir, 10 (1994) 1498-1511］は、微細構造化した特別シリコーンスタンプを用いて、試薬を貴金属表面に押捺する方法を記載している。これは、微細構造化された単層が、互いに空間的に分離された帯域を有して生成されるのを可能にする。貴金属表面の自己集合した単層の微細構造は、その全域をチオールで塗装した基板をマスク越しに照射し、次いで洗浄することによって形成することができる［Hemminger et al., Langmuir, 10: 626-628 (1994)］。すべて同一に官能化された、空間的に分離された帯域も、この過程で形成される。試薬の斑点を形成できる追加的な可能性は、初めに、既に互いに空間的に分離された支持体に金の斑点を与え、次いで、試薬で塗装することである。

【０１２８】

本発明による官能化された固相マトリックスとの分析対象物の結合は、例えば共焦点スキャナー蛍光顕微鏡又はプラズモン共鳴分光学によって、検出することができる［Ruthenhausler, B. et al., Nature, 332:615-617 (1988)］。

【０１２９】

米国特許第6,228,659号明細書は、開示された、試薬領域の複数のアレーを形成する装置を記載している。装置中の分与集成材は、基板の異なるアレー部域の選ばれた位置に、試薬を蓄えるために隔てられた複数のヘッドを有する。

【０１３０】

転写体アレーは、細胞内の転写状態を分析し、特に等級付きレベルの問題の治療法、例えば、等級付きレベルの問題の薬物、又は等級付きレベルの問題の疾患状態に接触させた細胞の転写状態を測定するのに用いることができる。一実施態様では、細胞内に存在するｍＲＮＡ転写体を表す、検出できるように標識化されたポリヌクレオチド（例えば、総細胞ｍＲＮＡから合成された、蛍光標識化されたＤＮＡ）を、マイクロアレーとハイブリダイズすることによって、転写体アレーを生成する。これに代わる実施態様では、ｃＤＮＡ又はＲＮＡプローブは、検出できる標識の不在下で合成することができ、次いで、例えば、ビオチニル化ｄＮＴＰもしくはｒＮＴＰを組み込むことによってか、又は何らかの類似の手段（ＲＮＡとのビオチンのスポラレン誘導体の光架橋結合）によって、標識化し、次いで、標識化されたストレプトアビジン（例えばフィコエリトリンを結合したストレプトアビジン）もしくは等価物を加えてよい。プローブに対する標識は、ビオチン、蛍光体、放射性物質及び酵素の標識からなる群から選ばれる。蛍光標識化したプローブを用いるときは、フルオレセイン、リサミン、フィコエリトリン、ローダミン（Perkin Elmer Cetus）、Ｃｙ２、Ｃｙ３、Ｃｙ３．５、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、Ｃｙ７、Fluor X（Amersham）その他を包含する、適切な多くの発蛍光団が公知である［例えば、Kricka, Nonisotopic DNA Probe Techniques (Academic Press, San Diego, Calif., 1992)を参照］。発蛍光団の対は、明確な放射スペクトルを有するために、容易に識別されるよう選ぶことが、理解されると思われる。もう一つの実施態様では、蛍光標識以外の標識を用いる。例えば、明確な放射スペクトルを有する放射性標識、又は一対の放射性標識を用いることができる［Zhao et al., Gene, 156: 207 (1995)；Pietu et al., Genome Res., 6: 492 (1996)を参照；実施例２１も参照されたい］。例えば、^{32}Ｐを用いることができる。

【０１３１】

転写体を付着させるこれらの方法は、通常、特定のポリヌクレオチド配列を、固相支持体の非常に小さい特定の部域、例えばＤＮＡチップのマイクロウェルに付着させる。これらのハイブリダイゼーションの体裁は、慣用の「逆ドットブロット」及び「サンドイッチ」ハイブリダイゼーション系のミクロ規模の翻案である。ミクロ体裁のハイブリダイゼーションは、「ハイブリダイゼーションによる配列決定」を実施するのに用いることができ

る［Barinaga, Science, 253: 1489 (1991)；Bains, Bio/Technology, 10: 757-758 (1992)を参照］。ハイブリダイゼーションによる配列決定は、可能なすべてのｎ－ヌクレオチドオリゴマー（ｎ量体）を利用して、未知のＤＮＡサンプル中のｎ量体を特定し、次いで、アルゴリズム解析によって整列させて、ＤＮＡ配列を生成する［米国特許第5,202,231号明細書を参照；英国特許第88 10400号公報（1988）；Southern et al., Genomics, 13: 1008 (1992)；Fodor et al., Nature, 364: 555-556 (1993)；Fodor et al., Science, 251: 767-773 (1991)；米国特許第5,143,854号明細書も参照されたい］。

【０１３２】

プローブは、化学的なカップリングの手順、及び圧電式印刷装置、例えばＰＣＴ刊行物のWO 95/251116（Baldeschweiler et al.）に記載されたそれを用いて、全体としてか、又は部分として、基板の表面に合成することができる。これに代えて、プローブを、試薬をいつ加えるかを制御する自己指向性電子装置を用いて、基板表面に合成することもできる［米国特許第5,605,662号明細書］。

【０１３３】

さらに、プローブは、基板に直接結合する必要はなくて、リンカー基を介して基板に結合することができる。リンカー基は、代表的には、約６～５０原子長出会って、付着したポリヌクレオチドプローブとの接触を与える。好適なリンカー基は、エチレングリコールオリゴマー、ジアミン、二価酸などを包含する。基質表面の反応基は、リンカーの末端部分の一方と反応して、リンカーを基板に結合する。次いで、リンカーの他方の末端部分を、ポリヌクレオチドプローブを結合するよう官能化する。

【０１３４】

材料のアレーをチップ又は基板上に形成し、それを用いるための装置及びコンピュータシステムは、公知である。例えば、ＰＣＴ国際特許出願のWO 92/10588及びWO 95/11995（ともに、引用により本明細書に組み込まれる）は、核酸その他の材料の配列決定又は配列チェックの手法を記載している。これらの操作を実施するためのアレーは、例えば、米国特許第5,445,934号、第5,384,261号及び第5,571,639号明細書（それぞれ、引用により本明細書に組み込まれる）に開示された、先駆的な手法の方法によるアレーとして形成することができる。ペプチド、ポリヌクレオチドその他の重合体配列の高密度アレーを短時間のうちに形成する、改良された方法が、組合せ固相合成を用いて案出されている。超大規模固定化重合体合成（ＶＬＳＩＰＳ）技術は、組合せ固相重合体合成を大幅に進歩させ、GENECHIP（登録商標）の名称で販売されているもの［Kozal et al., Nature Medicine, 2: 753-759 (1996)］のような、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）アレーチップの臨床的応用への道を整備した。ＶＬＳＩＰＳ技術は、米国特許第5,143,854号明細書、ＰＣＴ国際特許出願のWO 90/15070、WO 92/10092及びWO 95,11995；ならびにFodor et al., Science, 251: 767-777 (1991)に開示されている。

【０１３５】

核酸ハイブリダイゼーション及び洗浄の条件は、プローブが特定のアレー部位に「特異的に結合する」か、又は「特異的にハイブリダイズする」ように、すなわち、プローブが、相補的核酸配列を有する配列アレー部位にハイブリダイズ、二本鎖化又は結合するが、相補的でない核酸配列を有する部位とはハイブリダイズしないように選ぶ。本明細書に用いられる限りで、一つのポリヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチドの不足が２５塩基以下ならば、標準的な塩基対合規則を用いて、誤対合が皆無であるか、ポリヌクレオチドの不足が、２５塩基より長いならば、５％を越える誤対合が皆無であるときに、もう一つに相補的であると考えられる。好ましくは、ポリヌクレオチドは、完全に相補的である（誤対合が皆無である）。特定のハイブリダイゼーション条件が、負の対照を含むハイブリダイゼーションアッセイを実施することによって特異的なハイブリダイゼーションを招くことは、容易に立証することができる。最適のハイブリダイゼーション条件は、標識化されたプローブ、及び固定化されたポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの長さ（例えば２００塩基より長いポリヌクレオチドに対してのオリゴマー）及び種類（例えばＲＮＡ、ＤＮＡ、ＰＮＡ）に依存するであろう。核酸に対する特定の（すなわち緊縮）ハイブリダ

イゼーション条件のための一般的パラメータは、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York 1987)に記載されている。役立つハイブリダイゼーション条件は、例えば、Tijessen, Hybridization With Nucleic Acid Probes, (Elsevier Science Publishers, B.V., 1993)及びKricka, Nonisotopic DNA Probe Techniques, (Academic Press, San Diego, Calif., 1992)でも与えられる。

【０１３６】

細胞のＲＮＡに相補的なｃＤＮＡを作成し、適切なハイブリダイゼーション条　件下でマイクロアレーとハイブリダイズしたときは、特定のいかなる遺伝子にも相当する、アレー内の部位とのハイブリダイゼーションのレベルは、該遺伝子から転写されたＲＮＡの細胞内での普及率を反映することになる。例えば、（例えば発蛍光団により）検出できるよう標識化された、総細胞ｍＲＮＡに相補的なｃＤＮＡを、マイクロアレーとハイブリダイズしたとき、細胞内で転写されない遺伝子（すなわち、該遺伝子の産物に特異的に結合できる）に相当する、アレー上の部位は、シグナル（例えば蛍光シグナル）を僅かしか、又は全く保有せず、それにコードされたｍＲＮＡが普及している遺伝子は、比較的強いシグナルを有することになる。

【０１３７】

米国特許第6,183,968号明細書（Bandmanらへの）は、マイクロアレーのハイブリダイズできるアレー要素として用いることができるポリヌクレオチドプローブを開示していて、ヌクレオチドプローブは、それぞれ、細胞増殖に関連するタンパク質、又は受容体をコードしている遺伝子の少なくとも一部を有する。

【０１３８】

蛍光標識化されたプローブを用いるときは、転写体アレーの各部位での蛍光放射を、好ましくは、走査共焦点レーザー顕微鏡によって検出することができる。一実施態様では、適切な励起ラインを用いて、用いられた２種類の発蛍光団のそれぞれについて、別個の走査を実施する。これに代えて、２種類の発蛍光団に特異的な波長での同時標本照明を許す、レーザーを用いることができ、２種類の発蛍光団からの放射を、同時に分析することができる［Shalon et al., Genome Reasearch, 6: 639-645 (1996)を参照］。シグナルは、コンピュータによって、商業的に入手できる方法を用いて記録し、好ましくは分析する。米国特許第5,840,484号明細書に記載された発明の存在量選別プログラムは、特定された遺伝子のそれぞれに対応するｍＲＮＡ転写体を、作表し、頻度によって分類するのに用いることができる。ポリヌクレオチド配列のいくつかは、発現レベルのみに基づいて特定されることから、充実腫瘍幹細胞における特定の遺伝子の機能を先験的に知ることは、不可欠ではない。

【０１３９】

転写体の画像の比較は、当業者には周知の方法によって得ることができる。転写体のレベル及び画像は、例えば、アレー化されたＤＮＡクローンの定量的ハイブリダイゼーション［Nguyen et al., Genomics, 29: 207-216 (1995)］、遺伝子発現の系統的分析（ＳＡＧＥ）の技術［Velculescu et al., Science 270: 484-487 (1995)］、ポリメラーゼ連鎖反応［Peng et al., Science, 257: 967-971 (1992)］、示差増幅プロトコル［米国特許第5,545,522号明細書］、又は電子的分析、例えば比較遺伝子転写体分析［米国特許第5,840,484号明細書］又はGEMTOOLS遺伝子発現解析プログラム（Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, Calif.、米国）に基づく、示差遺伝子発現アッセイによって、入手かつ比較することができる。好ましくは、二つ又はそれ以上の転写体像の比較は、電子的に実施する。

【０１４０】

米国特許第6,215,894号明細書は、バイオチップアレーを走査するためのシステムであって、各アレーについて記録される独自の画像アレー特定機構と、各特定機構に対応し、該特定機構によって特定されるアレー内の実験のパラメータを内容する、コンピュータ記憶された記録とを含むシステムを開示している。このシステムは、さらに、プロトコルラ

イブラリーにアクセスして、特定されたアレーに関連する走査プロトコルを検索し、次いで、それぞれのプロトコルに従ってアレーを走査するための手段を含む。得られた、スキャナーが生成した画像マップは、関連付けられた特定機構に対応する位置に記憶される。

【０１４１】

翻訳状態の測定は、いくつかの方法に従って実施し得る。例えば、タンパク質の全ゲノム追跡（すなわち「プロテオーム」）は、細胞ゲノムがコードしている複数のタンパク質種に特異的な、固定化された、好ましくはモノクローナルの抗体を結合部位が含む、マイクロアレーの構築によって実施することができる。

【０１４２】

マイクロアレーの使用

上記のマイクロアレーは、充実腫瘍癌の診断、予後及び治療の様式、薬物の発見及び開発、毒物学的及び発癌性研究、法医学、薬理ゲノム学などを包含する、いくつかの用途に用いることができる。

【０１４３】

一実施態様では、マイクロアレーは、疾患の進行を追跡するのに用いられる。内科医は、健康組織と癌性組織との遺伝子発現の相違を、患者からの充実腫瘍幹細胞と比較した遺伝子発現のパターンの変化を分析することによって、査定し、分類することができる。したがって、癌は、患者が発症する前の初期段階で診断することができる。本発明は、治療の効能を追跡するのに用いることもできる。公知の副作用を有するいくつかの治療に対して、マイクロアレーは、治療様式を「微調整する」のに用いられる。遺伝子発現パターンの、成功裡の治療を示す変化を生起する投与量が、確定される。望ましくない副作用に付随する発現パターンは、回避される。このアプローチは、患者が不適切な改善を示すか、副作用を表すのを待ってから、治療の経路を変更するよりも、敏感かつ迅速であり得る。

【０１４４】

これに代えて、疾患を模倣する、患者のではなく動物のモデルを用いて、特定の疾患又は状態に付随する発現プロファイルを特性記述することもできる。この遺伝子発現データは、患者における疾患の経路を診断かつ追跡すること、干渉のための遺伝子標的を決定すること、及び新奇な治療様式を試験することに役立つ可能性がある。

【０１４５】

また、研究者は、大量の候補薬物分子を迅速にふるい分け、既知の治療薬のそれに類似する発現プロファイルを形成するものを、同じ発現プロファイルを有する分子は、同様に、類似の治療効果を有するとの期待とともに待つために、マイクロアレーを用いることができる。すなわち、本発明は、薬物の分子的作用様式を決定するための手段を与える。

【０１４６】

米国特許第6,218,122号、第6,165,709号及び第6,146,830号明細書（すべてFriendらへの）は、（ｉ）野生型細胞に対する薬物の効果、（ii）野生型細胞に対する、推定される薬物の標的に対する改変の効果、及び（iii）推定される薬物の標的が改変された野生型細胞に対する、薬物の効果を比較することによって、細胞内の薬物の標的を特定する方法を開示している。様々な実施態様で、細胞に対する効果は、遺伝子発現、タンパク質存在量、タンパク質活性の測定、又はそのような測定の組合せによって決定することができる。様々な実施態様で、細胞内の推定される標的に対する改変は、該標的をコードしている遺伝子に対する改変、該標的をコードしているＲＮＡの存在量に対する改変、標的タンパク質の存在量に対する改変、又は標的タンパク質の活性に対する改変によって実施することができる。本発明は、より精密な薬物発見プログラムのための、薬物発見のこれらの方法の改良を、腫瘍形成性の充実腫瘍幹細胞を提供することによって提供する。

【０１４７】

「発現プロファイル」は、細胞の生物学的状態の態様を示す、複数の細胞成分の測定を含む。そのような測定は、例えば、ＲＮＡ又はタンパク質の存在量もしくは活性レベルを包含し得る。対象とされる細胞の生物学的状態の態様、例えば、転写状態、翻訳状態、又は活性状態を測定する。これらの、場合によりグラフで表された測定の収集は、「診断プ

ロファイル」と呼ばれる。細胞の、診断プロファイルで測定されたのと類似する生物学的状態の態様、例えば転写状態は、類似被験者、又は既知の相関する疾患状態に応答するか、又は治療効果を追跡しようとするならば、既知の相関する治療効果に応答する被験者で測定される。これらの、場合によりグラフで表された測定の収集は、本明細書では、「応答プロファイル」と呼ぶ。応答プロファイルを補間して、測定されたタンパク質活性の範囲内のすべてのタンパク質活性のレベルについて、応答プロファイルを予測する。治療効果を追跡しようとする場合、応答プロファイルは、有益な効果、不都合な効果、例えば毒性効果、又は有益と不都合との双方の効果と相関させ得る。

【０１４８】

一般的に認識されているとおり、タンパク質活性は、タンパク質存在量から得られ；タンパク質存在量は、ｍＲＮＡの翻訳から得られ（タンパク質分解と均衡させる）；ｍＲＮＡ存在量は、ＤＮＡの転写から得られる（ｍＲＮＡ分解と均衡させる）。そのため、細胞ＤＮＡ成分に対する遺伝子レベルの改変は、転写ｍＲＮＡの存在量、翻訳されたタンパク質の存在量、及び最終的にはタンパク質活性を変更する。ＲＮＡレベルの改変は、同様に、ＲＮＡ存在量、ならびにタンパク質の存在量及び活性を変更する。タンパク質レベルの改変は、タンパク質の存在量及び活性を変更する。最後に、タンパク質活性の改変は、最も標的とされる改変の方法である。一般的に認識されているとおり、細胞の形質転換及び効果を生じるのは、最終的には、タンパク質活性（及び触媒として活性を有するＲＮＡの活性）である。また、ほとんどの薬物は、タンパク質活性を変更することによって作用する。

【０１４９】

一実施態様では、異なる二つの型の細胞（一方は、本発明の充実腫瘍幹細胞）からのｃＤＮＡを、マイクロアレーの結合部位とハイブリダイズさせる。（例えば薬物に応答しての）治療効果の場合、一方の細胞を治療法に接触させ、同じ型の別の細胞は、治療法に接触させない。疾患状他の場合は、一方の細胞が、特定のレベルの疾患状態を示し、同じ型の別の細胞は、疾患状態（又はそのレベル）を示さない。二つの細胞型のそれぞれに由来するｃＤＮＡを、区別できるよう、異なって標識化する。例えば、一実施態様では、薬物を投与した（又は経路の混乱に接触させた）細胞からのｃＤＮＡを、フルオレセイン標識化ｄＮＴＰを用いて合成し、第二の、薬物接触させない細胞からのｃＤＮＡを、ローダミン標識化ｄＮＴＰを用いて合成する。２種類のｃＤＮＡを混合し、マイクロアレーとハイブリダイズさせ、ｃＤＮＡセットのそれぞれからのシグナルの相対強度を、アレーの各部位について決定し、特定のｍＲＮＡの存在量の相対的ないかなる差も検出する。二色の蛍光標識化、及び検出要綱を用いて、遺伝子発現における変更を定義することが、例えば、Shena et al., Science 27; 467-470 (1995)に記載されている。異なる２種類の発蛍光団で標識化したｃＤＮＡの利点は、二つの細胞状態にあるアレーに配列した遺伝子のそれぞれに応答するＭＲＮＡレベルの、制御された比較を直接、内部的に実施することができ、実験条件（例えばハイブリダイゼーション条件）の僅かな差による変動が、その後の分析に影響しないととである。追加の指針は、実施例２１に与えられる。

【０１５０】

癌細胞内の一定の配列の発現レベルを測定して、発現がアップ又はダウンレギュレーションされているか否かを決定するための、特定の配列のＤＮＡチップによる癌についての診断アッセイに向けての、米国特許第6,194,158号明細書（Kroesらへの）がある。ＤＮＡ配列のパネルの一つ又はそれ以上の成員とハイブリダイズできるヌクレオチド配列を含むＤＮＡチップは、一般的に利用できる手法を用いて合成し得る。ｍＲＮＡを、正常な、癌でない細胞と癌細胞とから単離し、パネルからの配列の一つ又はそれ以上の配列を含むＤＮＡチップとハイブリダイズさせる。次いで、利用できる方法のいずれかによって、ハイブリダイゼーションを検出する。そのようにして、癌細胞内で、正常細胞に比して過剰発現又は過少発現される配列が特定される。同様にして、ある化合物に接触させた癌細胞からのｍＲＮＡを、ＤＮＡチップ上の配列とハイブリダイゼーションさせて、該化合物が特定の配列の発現に影響するか否かを決定し得る。本発明は、ｍＲＮＡを単離することがで

きる「癌細胞」が、本発明の腫瘍形成性充実腫瘍幹細胞であるという点で、この方法に対する改良を提供する。

【０１５１】

純化された幹細胞の遺伝子発現プロファイルは、幹細胞の挙動の分子的機構についての手がかりを与えることができると思われる。Terskikh, A.V.ら［Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(14): 7934-7939 (2001)］は、造血幹細胞（ＨＳＣ）富化細胞を、正常組織及びマウス神経球（神経始原細胞を大幅に富化した集団）との、ｃＤＮＡマイクロアレーの手法、及びin situハイブリダイゼーションを用いた、末端分化した神経細胞との比較による比較によって分析して、潜在的な調節遺伝子候補を特定した。本発明は、本発明の充実腫瘍幹細胞の使用が、患者の正常組織（例えば、充実腫瘍の部域からのそれ）と比較したときか、又は充実腫瘍から得られたその他の細胞集団と比較したときに、薬物標的の明確なセットを与えることができるという点で、Terskikhの方法に優る、薬物発見の改良された方法を提供する。

【０１５２】

ＤＮＡチップを活用する、米国特許第5,744,305号；第5,733,729号；第5,710,000号；第5,631,734号；第5,599,695号；第5,593,839号；第5,578,832号；第5,556,752号；第5,770,456号；第5,753,788号；第5,688,648号；5,753,439号；第5,744,306号明細書（すべて、参照によって、その全体が組み込まれる）に記載された方法を包含する、その他いくつかの方法が公知である。米国特許第5,807,522号明細書（Brownらへの）は、細胞における、疾患状又は治療法のレベルと相関し、実際のタンパク質の機能又は活性の検出できる変化に先行する、初期変化を追跡する方法を開示している。

【０１５３】

その上、充実腫瘍幹細胞からのゲノムＤＮＡのマイクロアレーは、単一ヌクレオチド多型（ＳＮＰ）についてプローブで調べて、細胞を前癌性又は腫瘍形成性にさせる遺伝的突然変異の部位を定位することができる。そのような方法についての指針は、上記の商業的販売者から入手可能であり、一般的には、遺伝学方法の書籍、例えば本明細書に掲載されたものに見出し得る。

【０１５４】

ワクチン

本発明の充実腫瘍幹細胞は、抗癌細胞抗体を誘導するのに用いることができる。一実施態様では、この方法は、充実腫瘍幹細胞、又は単離された充実腫瘍幹細胞の富化された集団を得る工程と；画集団を細胞の複製を阻害するよう処理する（例えば照射によって）工程と；処理された細胞をヒト又は動物の被験者に、充実腫瘍幹細胞に対する免疫応答を誘導するのに有効な量で投与する工程とを含む。注入又は経口投与しようとする細胞の有効量に関する指針については、米国特許第6,218,166号、第6,207,147号、及び第6,156,305号明細書（引用により、本明細書に組み込まれる）を参照されたい。もう一つの実施態様では、この方法は、充実腫瘍幹細胞、又は単離された充実腫瘍幹細胞の富化された集団を得る工程と；腫瘍幹細胞を、in vitro培養で、抗体を誘導しようとするヒトの被験者又は宿主動物からの、免疫エフェクター細胞（当技術に公知の免疫学的方法に従って）と混合する工程と、免疫エフェクター細胞を培養体から取り出す工程と、免疫エフェクター細胞を、動物における免疫応答を刺激するのに効果的な用量で、宿主動物に移植する工程とを含む。

【０１５５】

充実腫瘍幹細胞に対するモノクローナル抗体は、培養内の連続細胞系による、抗体分子の産生を与えるいかなる手法も用いて製造し得る。これらは、ハイブリドーマの手法、ヒトＢ細胞ハイブリドーマの手法、及びＥＢＶ－ハイブリドーマの手法を包含するが、これらに限定されない［例えば、Kozbor, D. et al., J. Immunol. Methods, 81: 31-42 (1985)；Cote, R.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 2026-2030 (1983)；及びCole, S.P. et al., Mol. Cell. Biol., 62: 109-120 (1984)を参照されたい］。

【０１５６】

加えて、「キメラ抗体」の製造向けに開発された手法、例えばヒト抗体遺伝子に対するマウス抗体遺伝子をスプライスして、適切な抗原特異性及び生物学的活性を有する分子を得ることを用いることができる［例えば、Morrison, S.L. etal., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984) ；Neuberger, M.S. et al., Nature, 312: 604-608 (1984) ；及びTakeda, S. et al., Nature, 314: 452-454 (1985)を参照されたい］。

【０１５７】

望みの特異性を有する抗体を特定するスクリーニングには、様々な免疫アッセイを用いてよい。確定された特異性を有するポリクローナル又はモノクローナル抗体のいずれかを用いた、競合結合又はイムノラジオメトリックアッセイのための数多くのプロトコルが、当技術に周知である。

【０１５８】

抗体は、ヒト化抗体であることもできる。用語「ヒト化抗体」は、本明細書に用いられる限りで、非抗原結合領域のアミノ酸配列が、ヒトの抗体に、より密接に近似するよう変更されているが、その本来の結合能力をなおも保持する、抗体分子を意味する。抗体を、免疫原性がより弱くなり、そのため、患者に治療のために投与されたときに、より長く存続するよう、ヒト化する。

【０１５９】

ヒト抗体は、Abgenix（Fremont, Calif.、米国）からのXenoMouse（登録商標）の技術を用いて生成することができて、抗体療法に適切である基本的にすべての疾患標的に対する、高親和性の、完全にヒト的な抗体産物候補の生成及び選別を可能にする［米国特許第6,235,883号、第6,207,418号、第6,162,963号、第6,150,584号、第6,130,364号、第6,114,598号、第6,091,001号、第6,075,181号、第5,998,209号、第5,985,615号、第5,939,598号及び第5,916,771号明細書（それぞれ参照によって組み込まれる）；Yang, X-D. et al., Crit. Rev. Oncol. Hematol., 38(1): 17-23 (2001)；Chadd, H.E. & Chamow, S.M., Curr. Opin. Biotechnol., 12(2): 188-94 (2001)；Green, L.L., J. Immunological Methods, 231: 11-23 (1999)；Yang, X-D. et al., Cancer Res., 59(6): 1236-1243 (1999)；及びJakobovits, A., Advanced Drug Delivery Rev., 31: 33-42 (1998)を参照］。マウス抗体の遺伝子発現が抑制され、ヒト抗体の遺伝子発現と機能的に置き換えられているが、残余のマウス免疫系は、健全なままである、マウスの遺伝子操作された系統を用いて、完全にヒトタンパク質配列を有する抗体を生成する。

【０１６０】

その上、本発明の充実腫瘍幹細胞内又は上に存在するマーカーに対抗する抗体の生成は、薬物開発の標的を特定する方法として用いることができる。充実腫瘍幹細胞に免疫応答して誘導される抗体は、当技術に公知の方法を用いて、充実腫瘍幹細胞上の抗原性タンパク質を特定するのに用いることができ［Harlow, Using Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999)］、さらに、そのようなタンパク質をコーディングするポリヌクレオチドを特定するのに用いることができる［Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989)；Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds, (Wiley Interscience, New York, 1989)］。特定されさえすれば、タンパク質及びポリヌクレオチドは、癌に関与することが以前に特定された、別のタンパク質及びポリヌクレオチドと比較することができる。一実施態様では、完全にヒト的な抗体を生成するためのXenoMouseの技術を用いて、薬物開発標的に対抗させた抗体を生成することができる［Jeffrey Krasner, Boston Globe (July 25, 2001) at F4を参照］。本発明は、より精密な薬物開発プログラムに向けて、免疫応答をそれに対して誘導する、腫瘍形成性の充実腫瘍幹細胞を与えることによって、薬物発見のこれらの抗体に基づく方法に対する改良を提供する。

【０１６１】

マイクロアレーネットワーク

遺伝子発現パターンを体系的に研究するための、上記のｃＤＮＡライブラリー及びＤＮ

Ａアレーの手法に加えて、分子生物学の当業者は、マイクロアレー技術の使用についての指針をミシガン大学マイクロアレーネットワークから得ることができる（実施例９も参照）。さらに、ミシガン大学は、マイクロアレーデータの管理及び解析に特定して資金を提供し、それとともに大学のための新たな生物情報科学センターに資金を提供することによって、生物情報科学に大きく傾倒している。

【０１６２】

これに代えて、免疫応答を誘導する方法は、本発明の充実腫瘍幹細胞の「幹細胞」の質を利用することができる。動物に免疫応答を誘導するための、充実腫瘍幹細胞、充実腫瘍幹細胞タンパク質抽出物、充実腫瘍幹細胞から精製されたタンパク質、又は充実腫瘍幹細胞からのｃＤＮＡの発現に由来するタンパク質（充実腫瘍幹細胞の遺伝的改変については上記を参照されたい）。免疫応答は、標準的な免疫学的方法が示すとおり、癌細胞に対抗させることができる。例えば、充実腫瘍幹細胞（単離細胞の富化された集団）又はタンパク質を、培養内の樹状細胞、培養内の抗原提示細胞、又は培養内の抗原提示細胞及びＴ細胞に接触させる。次いで、抗原刺激された細胞を、患者に注入して戻す。

【０１６３】

これに代えて、本発明の充実腫瘍幹細胞は、腫瘍幹細胞に対する免疫応答を促進するよう遺伝的に加工することができる。例えば、造血幹細胞を、腫瘍幹細胞抗原を標的とするＴ細胞受容体を有するよう遺伝的に加工することができる（米国特許第5,914,108号明細書を参照、参照によって組み込まれる）。こうして、腫瘍幹細胞が発現する抗原を認識するＴ細胞受容体を、特定し、次いで、造血幹細胞にクローニングすることができる。そうして、加工された造血幹細胞を、患者に移植し、生着させて、腫瘍幹細胞を認識する受容体を発現する多数のＴ細胞を生じさせることができる。腫瘍幹細胞特異的Ｔ細胞の数を増加させることによって、抗腫瘍免疫応答を強化することができる。

【０１６４】

腫瘍幹細胞をワクチンの基盤として用いること、腫瘍幹細胞を抗原提示樹状細胞を刺激するために用いること、腫瘍幹細胞を抗腫瘍抗原を生成するための接種材料として用いることを包含する、その他の手段も、抗腫瘍免疫応答を増大させるために利用可能である。腫瘍幹細胞は、腫瘍幹細胞に対する免疫応答を生成することを目的として、患者の腫瘍幹細胞を、例えば照射によって死滅させ、死滅した幹細胞を、生理学的及び免疫学的に許容され得る担体中で患者に投与して戻すことによって、ワクチンとして用いることができる。抗体を乳癌細胞の膜小胞調製品に対して誘導する、米国特許第4,960,716号明細書；抗ヒト乳腺上皮抗体を、脱脂ヒト乳脂肪球の膜画分から製造する、米国特許第4,584,268号明細書を参照されたい、両特許とも、参照によって組み込まれる。

【０１６５】

患者からの樹状細胞は、in vitroで培養することができ、同じ患者からの死滅腫瘍幹細胞を、培養に加えて、樹状細胞を刺激することができる。活性化された樹状細胞は、腫瘍幹細胞抗原を提示するが、そうして、患者に再投与して、患者の抗腫瘍応答を刺激することができる。最後に、腫瘍幹細胞は、マウス、ラット、ハムスター、ヤギ、ヒツジ、ウサギ又はロバのような動物に投与して、腫瘍幹細胞に対する抗体を生成することができる。好ましくは、モノクローナル抗腫瘍幹細胞抗体は、マウス、ラット又はハムスターで作成する。次いで、このようにして作成されたモノクローナル抗体は、患者に投与するか、又は初めに（上記のとおりに）ヒト化し、次いで患者に投与して、該患者における腫瘍幹細胞に対する免疫応答を促進する。

【０１６６】

さらに、アデノウイルスベクターは、ワクチン開発のための真核細胞への遺伝子移入に特に役立つことが判明している［Graham, F.L. & Prevec, L., in Vaccines: New Approaches to Immunological Problems, Ellis, R.V. ed., 363-390 (Butterworth-Heinemann, Boston, 1992)］。

【０１６７】

マイクロアレーを走査するためのプローブ

ヒトゲノムの完全な配列決定は、細胞の特定の集団が発現する遺伝子の特定を可能にした。腫瘍幹細胞の富化された集団からのプローブを、当技術に公知の方法を用いて作成することができる［Wang et al., Nature Biotechnology 18: 457 (2000)を参照］。腫瘍幹細胞ならびに腫瘍幹細胞後代の集団についての遺伝子発現パターン及びタンパク質発現パターンの分析は、結果を、公知のGene Pattern Databases、又は公知のProtein Pattern Databases（例えば、ＰＲＯＳＩＴＥ、ＰＲＩＮＴＳ：Protein Motif Fingerprint Database、ＢＬＯＣＫＳ、ＰＦＡＭ、ＤＯＭＯ、ＰＲＯＤＯＭその他のデータベース）と比較することによって実施することができる。検索は、例えば、ＢＣＭ Search Launcher: General Protein Sequece/Pattern Searches（ベイラー医科大学ヒトゲノム配列決定センター、（One Baylor Plaza, Hyouston））を用いて、実施することができる。遺伝子及びタンパク質の分析のための商業的に入手できるプログラム（例えばＣＧＣ（Genetics Computer Group, Inc.より）及びＤＮＡ　ＳＴＲＩＤＡ）も利用できる。

【０１６８】

腫瘍幹細胞及び腫瘍幹細胞後代の増殖、分化もしくは生存、又は生物学的作用因に対するそれらの応答に関与する因子を、当技術に公知の手法を用いて、腫瘍幹細胞、又は腫瘍幹細胞、非腫瘍形成癌細胞、もしくは正常な腫瘍細胞から、ｃＤＮＡライブラリーを構成するか、又はマイクロアレーをプローブで調べるかのいずれかによって単離することができる。ｃＤＮＡを生物学的作用因又は薬物との接触後の異なる集団のいずれからも作成して、そのような操作に対する応答を決定することができる。一つの集団の細胞からのライブラリーを、異なる集団の細胞からのそれと比較して、発生の際の遺伝子発現の順序を決定し、様々な生物学的作用因の効果を明らかにするか、又は癌細胞における遺伝子発現を変更する新たな生物学的作用因を明らかにすることができる。ライブラリーを新生物組織から調製したときは、例えば、癌性組織からのライブラリーを正常組織からのそれと比較することによって、癌細胞増殖の原因に役割を果たす遺伝的要因を特定し得る。この情報は、抗癌療法の設計に用いることができる。加えて、様々な癌の診断に用いるためか、腫瘍発達の特定の段階にある細胞を特定するのに用いるための、プローブを特定することができる。

【０１６９】

腫瘍の診断及び予後の評価

腫瘍及び転移の診断及び予後の評価、ならびにそのような状態の素質を有する対象者の特定のために、様々な方法を用いることができる。当技術に周知の方法のうちには、骨走査、Ｘ線造影、ＭＲＩ試験、ＣＡＴ走査、及び腫瘍付随抗原についての血液試験がある［American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 1999: Selected Cancers (1999)；American Cancer Society, Breast Cancer Guidelines and Statistics (1999)；Kopans, Breast Imaging, 2nd ed. (J.B. Lippincott, Philadelphia, PA, 1998)；Potter & Partin, NCCN Practice Guidelines for Early Dedection of Prostate Cancer 13(11A) Oncology (November 1999)を参照］。追加の検出方法については、Franklin et al., Breast Cancer Research & Treatment, 41(1): 1-13 (1996)；Kufe et al., Cancer Research, 43(2): 851-7 (1983)を参照されたい。骨走査には、核医学造影を用いることができる。核医学は、一定の以上を特定するのを支援するために、乳房撮影法に追加して用い得る。核医学は、リンパ系、その他の器官及び骨格系への癌の転移を評価するための優れた手段でもある。腫瘍付随抗原は、例えば、BCA 225［米国特許第5,681,860号明細書］；膀胱腫瘍付随抗原［ＢＴＡ統計的検定、ARUP Laboratories, Salt Lake City, UT］；腫瘍付随抗原CA125［Wagner et al., Hybridoma, 16(1): 33-40 (1997)］；22-1-1 Ag、YH 206、GA 733、CA 125、癌胚性抗原及びシアリルＬｅ^{3}［Sonoda et al., Cancer, 77(8): 1501-1509 (1996)］を包含する。乳癌の予後のためには、癌性細胞を、患者の骨髄中に探すことができる。例えばBruan et al., New Engl. J. Med., (Feb. 24, 2000)を参照されたい。

【０１７０】

そのような方法は、例えば、ＶＥＧＦヌクレオチド配列及びＶＥＧＦ抗体のような試薬

を利用し得る。具体的には、そのような試薬は、例えば、（１）非発癌性状態に対比してのＶＥＧＦｍＲＮＡの過発現の検出；（２）非発癌性状態に対比してのＶＥＧＦタンパク質の過存在量の検出；（３）腫瘍塊における低酸素状態の検出；（４）隣接する内皮組織におけるＶＥＧＦチロシンキナーゼ受容体その他の血管形成性受容体の発現の検出；及び（５）癌遺伝子の発現の検出に用い得る。これらの方法は、例えば、本明細書に記載の、少なくとも一つの特定のＶＥＧＦヌクレオチド配列又はＶＥＧＦ抗体試薬を含み、例えば臨床的設定において、腫瘍の血管形成及び転移の危険がある患者を診断するのに好都合に用い得る、予めパッケージ化された診断キットを利用することによって実施し得る。

【０１７１】

さらに、異なる癌遺伝子の対立遺伝子の発現を、これらの方法を用いて査定し得る。その他のマーカーの発現に関して得られた追加的情報は、特定の患者における癌の分子的段階に合わせて作成される、血管形成又は腫瘍増殖を阻害するのに適切な設計のための指針を与える。

【０１７２】

薬物の発見

本発明は、充実腫瘍を削減するための試験化合物を特定する方法を提供する。該方法の実施は、さらに、下記の実施例に与えられる指針を用いて決定することができる。該方法の工程は、生物学的作用因に対する腫瘍細胞の応答を検定し、腫瘍幹細胞に対する該生物学的作用因の効果を決定することを包含する。言い換えれば、本発明は、本発明の充実腫瘍幹細胞の使用による薬物発見の改良された方法を提供する。

【０１７３】

薬物発見に本発明の方法を用いる原理の証明は、実施例１１及び図１１における薬物発見で与えられるて、そこでは、表皮成長因子（ＥＧＦ）受容体（ＥＧＦ－Ｒ）及びＨＥＲ２／ｎｅｕというマーカー（癌に関与することが公知である）を、充実腫瘍幹細胞上に特定した。それにより、ＥＧＦ－Ｒ［例えば、Yang, X. et al., Crit. Rev. Oncol. Hematol., 38(1): 17-23 (2001)］、及びＨＥＲ２／ｎｅｕマーカー［Breast Disease, Vol. 11, HER2: Basic Research, Prognosis and Therapy, Y. Yarden, ed. (IOS Press, Amsterdam, 2000）を参照］に対抗させた治療法を、充実腫瘍幹細胞に効果的に標的化することができる。

【０１７４】

生物学的経路の特定は、近代的薬物発見法の重要な部分である。充実腫瘍から得られた充実腫瘍幹細胞その他の細胞集団における生物学的経路、特に薬物作用に関与する経路、すなわち、薬物標的（例えばタンパク質）を起源とする経路は、米国特許第5,965,352号明細書（参照によって本明細書に組み込まれる）が示すような使用に向けて特定することができる。

【０１７５】

一セットの方法では、薬物をふるい分けて、細胞の生物学的経路を活性化して、リポーターポリペプチドを発現させる、受容体との試験化合物の結合を決定する。しばしば、このリポーターポリペプチドは、組換えポリペプチド上でコードされていて、コーディングポリヌクレオチドは、プロモーターに機能的に結合されている。

【０１７６】

用語「機能的に付随する」又は「機能的に結合された」は、本明細書に用いられる限りで、機能的に関連付けられるポリヌクレオチドを意味する。プロモーターは、それが、コードされるポリペプチドの翻訳を制御するならば、コーディング配列に機能的に付随するか、又は機能的に結合されている。機能的に付随するか、又は機能的に結合された核酸配列は、隣接し、同じ読み枠内にあることができる一方で、一定の遺伝的要素、例えばリプレッサー遺伝子は、ポリペプチドをコードしている配列に隣接して結合されていないが、ポリペプチドの発現を制御するオペレーター配列には結合する。

【０１７７】

検出できるシグナルは、リポーターポリペプチドに応じて蛍光、吸光又は発光であるこ

とができて、リポーターポリペプチドは、例えば、ルシフェラーゼ（ホタルルシフェラーゼ、ビブリオ・フィスケリVibrio fisceriルシフェラーゼ、又はゼノラブダス・ルミニスケンスXenorhabdus luminescensルシフェラーゼ）、緑色蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質変種、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、β－グルクロニダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、グアニンキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ、チミジンキナーゼ、β－ラクタマーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、インベルターゼ、アミラーゼ（酵母に基づくアッセイに）、ヒト成長ホルモン（活性に基づくアッセイに）であることができる。蛍光性検出可能シグナルは、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）、生物発光共鳴エネルギー移動（ＢＲＥＴ）、時間分解蛍光（ＴＲＦ）又は蛍光分極（ＦＰ）であることができる。適切な場合、検出可能シグナルは、蛍光計、光度計、蛍光マイクロプレートリーダー、二重単色光分光器、マイクロプレート分光蛍光計、分光光度計、共焦点顕微鏡（レーザースキャナー）又は電荷結合素子（ＣＣＤ）のような機械によって検出する。検出可能シグナルは、リポーターポリペプチドが、腫瘍幹細胞内で発現されたときに生成されるシグナルの量を、リポーターポリペプチドが腫瘍幹細胞内で発現されないときに生成されるシグナルの量と比較することによって決定される。

【０１７８】

薬物スクリーニングのもう一つの方法は、化合物の高処理量スクリーニングである［例えば、ＰＣＴ刊行物のWO 84/03564を参照］。この方法では、異なる大量の試験小化合物を、固体基板、例えばプラスチックピンその他の何らかの表面に合成する。試験化合物を、充実腫瘍幹細胞又はその部分と反応させ、洗浄する。次いで、結合した充実腫瘍幹細胞を、当技術に周知の方法によって、商業的に入手できる機械類及び方法、例えば液体ハンドラーとのインターフェースを有して、アッセイを最適化する直接統計的解析を可能にする、自動化アッセイ最適化（ＡＡＯ）ソフトウェアプラットホーム（Beckman、米国）；CRS Robotics Corp.からのモジュラーシステム（Burlington, Ontario）、液体取扱システム、及びＰＯＬＡＲＡ（登録商標：ＣＲＳ）を用いる様々なインキュベーター、超高処理量スクリーニングシステム向けの開放構造研究室自動化ソフトウェア；ユーザーが新たな機器を接続することによって自動化プラットホームを再構成できるように設計された、３Ｐ（Plug & Play Peripherals）技術（ROBOCON, Vienna、オーストリア国）；ＨＴＳ、超ＨＴＳ及び高速プレート調製を包含する広範囲の発見応用を可能にする、Allegro（登録商標）システム又はStaccato（登録商標）ワークステーション（Zymark）；研究室自動化プログラミング及び統合のためのMICROLABベクターソフトウェア（Hamilton Co., Reno, Nev.、米国）を用いて検出する。

【０１７９】

これらの機械及び方法のいずれについても、アッセイは、試験化合物が有効であり得るとの検出できる証拠を与える、標的細胞（充実腫瘍幹細胞、又は遺伝的改変された充実腫瘍幹細胞）の応答を測定する。検出可能シグナルは、対照細胞、及び減算分析によって特定された検出可能シグナルと比較する。「標的化」及び「非標的化」アリコートの間の差の相対的存在量は、示差表示、表示的示差分析（ＲＤＡ）、ＧＥＭ（遺伝子発現マイクロアレー）［米国特許第5,545,531号明細書］、抑制減算ハイブリダイゼーション（ＳＳＨ）及び直接配列決定［ＰＣＴ刊行物WO 96/17957］のような「減算」分析（示差分析）手法を用いて、同時に比較する。減算分析は、示差表示、表示的示差分析（ＲＤＡ）、抑制減算ハイブリダイゼーション（ＳＳＨ）、遺伝子発現の系統的分析（ＳＡＧＥ）、遺伝子発現マイクロアレー（ＧＥＭ）、核酸チップ技術又は直接配列決定の方法を包含する。

【０１８０】

本発明の充実腫瘍幹細胞は、充実腫瘍幹細胞が、薬物開発の標的の限定され、富化されたセットを与えることから、薬物開発法に特に役立つ。合理的な薬物設計における最も重要な一工程は、標的、すなわち薬物自体が作用し合う分子の特定である。しばしば、標的は、腫瘍形成する充実腫瘍幹細胞の上又は中の受容体であることになる。

【０１８１】

同様に、本発明の遺伝的に改変された充実腫瘍幹細胞は、薬物開発に特に役立つ。例えば、遺伝的に改変された幹細胞は、プロモーターが、リポーターポリペプチドをコードしているに機能的に結合されたポリヌクレオチドを有することがある。リポーターポリペプチドは、腫瘍幹細胞の受容体が試験化合物との結合によって活性化されるか、又は試験化合物との結合によって不活性化された後で、腫瘍幹細胞内で発現される。そのような検出可能シグナルは、遺伝的に改変された充実腫瘍幹細胞を高処理量スクリーニング（ＨＴＳ）に用いるのに適切にする。

【０１８２】

検出可能シグナルは、正の選別又は負の選別の結果であることがある。正の選別は、特定の培養条件下で細胞が生存できる能力、特定の因子を発現できる能力、細胞培養における変化、又は差別的遺伝子発現を試験する操作を包含する。この選別は、充実腫瘍幹細胞、又は遺伝的に改変された充実腫瘍幹細胞が、下記のことができる能力に基づく：

（ａ）特定の培養条件、例えばin vitro細胞培養の下で増殖又は生存する；

（ｂ）測定することができる特定の因子を発現して、この測定が、選別に適合できる。この因子は、測定に接し得るいかなる因子であることもできて、分泌される分子、細胞表面分子、可溶性及び不溶正分子、結合活性、他の細胞の活性を誘導するか、又は他の有機もしくは無機化学反応を誘導する活性を包含するが、これらに限定されない；

（ｃ）示差沈降、示差光散乱、示差浮遊密度、ふるい分けによって選別される示差細胞体積のような物理的方法によって測定される、形態学的変化を包含する、細胞構造の変化；

（ｄ）直接測定することができる、細胞表面マーカーの変化、生化学的活性の変化、蛍光活性化セルソーター（ＦＡＣＳ）と結合して用い得る、蛍光標識化プローブの結合の変化の際に再選別できるであろういかなる変化、又は選別の根拠として用いるいかなる特性も包含する、遺伝子発現における差。リポーターポリペプチドを発現するポリヌクレオチドを有する、遺伝的に改変された充実腫瘍幹細胞は、ここで特に役立つ。

（ｅ）間接的に測定することができる、選別的マーカー（例えば薬物耐性マーカー、又はＦＡＣＳ選別に用い得る細胞表面マーカー）をコードしている合成遺伝子構成体によって測定される、転写因子活性の変化を包含する、遺伝子発現における差。この範疇は、ｍＲＮＡ安定性、ｍＲＮＡ局在性、ｍＲＮＡ翻訳制における変化も包含することになるであろう。これらの変化は、すべて、これらの調節性事象の一つによって制御され、容易に選別される遺伝子産物の発現を作動させる合成構成体を、構成できると思われるため、選別の根拠になり得る。

【０１８３】

薬理ゲノム学

本発明は、悪性に向かう傾向を確認し、化学療法その他の抗癌療法の進行を追跡し、癌の再発をスクリーニングするか、又は他の類似の、存在するか、もしくは潜在的な癌の検出の方法であって、そのような方法が、潜在的な癌細胞内で、患者から単離された充実腫瘍幹細胞、又は充実腫瘍幹細胞のコレクションから単離されたそれのいずれかと比較して、過剰又は過少発現される、少なくとも一つの遺伝子の発現について検出する、改良された方法を提供する。一実施態様では、この方法は、（充実腫瘍幹細胞との比較によって）有意である、ポリヌクレオチド転写体の転写を示すシグナルについて試験しようとする、生物学的サンプル（例えば患者からのそれ）を検定することである。加えて、生物学的サンプルのスクリーニングアッセイも企図されて、そのようなアッセイは、化学療法のみの途上でか、又は癌を治療する外科的干渉の後に、癌性細胞の持続する存在又は撤退について追跡する。

【０１８４】

本発明のその他の実施態様

本発明は、パッケージ化する材料と、該パッケージ材料内に収容される一次試薬とを含む、製造物（システム又はキット）を提供する。一次試薬は、上記の充実腫瘍幹細胞調製品である。パッケージ材料は、一次試薬を、充実腫瘍を削減する作用因を特定するのに用いることができることを示す、標識を包含する。

【０１８５】
また、本発明は、細胞内の特定のポリヌクレオチド又はタンパク質の活性レベルを決定するためのキットを提供する。そのようなキットは、（それが富化された集団、又は単離された）充実腫瘍幹細胞、そのような充実腫瘍幹細胞から抽出されたポリヌクレオチド、又はそのような充実腫瘍幹細胞から抽出から抽出されたタンパク質を固相、例えば表面を含む、アレーもしくはマイクロアレーを有する。該キットは、固相の既知の位置で充実腫瘍幹細胞の成分とハイブリダイズか、又は結合するプローブも含んでよい。これらのプローブは、既知の異なる配列の、それぞれ、ＲＮＡ種、又はそれに由来するｃＤＮＡ種とハイブリダイズできる、核酸からなる。特に、本発明のキットに収容されるプローブは、キットが追跡しようとする特定の疾患又は治療法に相関させた混乱に応答して増加もしくは減少する、ｍＲＮＡ種に由来する核酸配列と特異的にハイブリダイズできる、核酸である。本発明のキットに収容されるプローブは、好ましくは、キットが決定しようとする疾患状態又は治療効果の特定のレベルに相関させた混乱に応答して増加もしくは減少する、ＲＮＡ種とハイブリダイズする核酸を実質的に排除する。

【０１８６】
本発明の一つ又はそれ以上の実施態様の詳細を、上記に付随する記載中に説明してきた。本明細書に記載されたのと類似又は等価のいかなる方法及び材料も、本発明の実施もしくは試験に用いることができるが、好適な方法及び材料を、ここに記載する。本発明のその他の特徴、目的及び利点は、記載及びクレームから明白であると思われる。

【０１８７】
本明細書、及び付記されたクレームでは、単数形は、複数の被参照物を包含する。本明細書に別途定義されない限り、ここに用いられた技術用語及び学術用語は、すべて、本発明が属する当技術の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に引用されたすべての特許及び刊行物は、参照によって組み込まれる。

【０１８８】
下記の実施例は、本発明の好適実施態様をより充分に例示するために提示される。これらの実施例は、付記されたクレームによって定義されるとおりに、決して、本発明の対象範囲を限定するとして解釈してはならない。

【０１８９】
実施例１
乳癌幹細胞の単離
本実施例の目的は、乳癌幹細胞の構造及び細胞機能の特性記述を示すことである。

【０１９０】
本発明者らは、胸部腫瘍のクローン形成細胞を特定するための、組織培養及びマウスモデルの双方を開発した。マウスモデルでは、ＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウス［Lapidot et al., Nature, 367(6464): 645-8 (1994)］に、ＶＰ－１６（エトポシド）（商業的入手源、例えばMoravek, Biochemicals, Brea, CA、米国から入手できる）を投与し、ヒト原発性乳癌組織（乳房切除又は局所部分切除標本から得た）を移植した。この系で、原発性腫瘍５例中３例が腫瘍を形成した。

【０１９１】
患者２名から得た悪性胸水から単離した腫瘍細胞［Zhang et al., Invasion & Metastasis, 11(4): 204-15 (1991)を参照］を、Matrigel（登録商標：Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ、米国から入手可能）に懸濁させ、次いでマウスに注入した。注入されたマウスに、腫瘍が形成された。

【０１９２】
この方法によって、本発明者らは、ＦＡＣＳによる分析に充分な腫瘍細胞を形成することができた。細胞を特性記述するための生物学的アッセイを実施するのに充分な腫瘍細胞も得ることができた［造血サンプル中の希腫瘍細胞を検出するためのクローン形成アッセイに付いては、米国特許第5,674,694号明細書（参照によって組み込まれる）を参照されたい］。

【０１９３】
腫瘍細胞の表現型が明確なサブセットは、ＦＡＣＳを包含する、当技術に公知の適切ないかなる手段によっても、発蛍光団結合マーカー結合用試薬を用いて単離することができる。固相への付着、及びそれからの脱着を包含する、適切なその他の方法も、本発明の対象範囲内にある。分離の手順は、抗体被覆した磁気ビーズを用いる磁気分離、アフィニティークロマトグラフィー、及び抗体を固相マトリックス、例えばプレートに付着させた「パニング」による分離を包含し得る。正確な分離を与える手法は、蛍光活性化セルソーターを包含し、これは、様々な程度の複雑化、例えば多色チャンネル、ローアングル鈍角光散乱検出チャンネル、インピーダンスチャンネル等々を有することができる。死細胞は、死細胞に結合する染料（例えばヨウ化プロピジウム（ＰＩ）又は７－ＡＡＤ）による選別によって排除してよい。選ばれた細胞の生存率に不当に有害でない、いかなる手法を用いてもよい。

【０１９４】
マーカー結合試薬は、磁気試薬、例えば超常磁性微粒子（微粒子）に直接又は間接的に結合することができる。磁気粒子との直接結合は、当技術に公知のとおり、様々な化学的結合基の使用によって達成される。抗体は、側鎖アミノ又はスルフヒドリル基、及び異機能性架橋結合試薬によって、微粒子とカップリングすることができる。非常に多くの異機能性化合物が、実体との結合に利用できる。好適な結合基は、３－（２－ピリジルジチオ）プロピオン酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＳＰＤＰ）又は４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボン酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＳＭＣＣ）であって、反応性に富むスルフヒドリル基を抗体上に、及び反応性に富むアミノ基を磁気粒子上に有する。これに代えて、マーカー結合試薬を、磁気粒子に直接カップリングする。マーカー結合試薬は、ハプテンに直接結合し、ハプテン特異的な、第二期抗体を粒子に結合した。適切なハプテンは、ジゴキシン、ジゴキシゲニン、ＦＩＴＣ、ジニトロフェニル、アビジン、ビオチン等々を包含する。ハプテンをタンパク質に結合する方法は、当技術に公知であり、そのような結合のためのキットが、商業的に入手できる。蛍光色素標識した抗体は、ＦＡＣＳ分離、免疫磁気選別、特に高勾配磁気選別（ＨＧＭＳ）のための磁気粒子等々に役立つ。例示的な磁気分離装置は、ＰＣＴ刊行物WO 90/07380及びWO 96/09550、及びヨーロッパ特許第0 438 520号公報に記載されている。

【０１９５】
本発明者らは、原発性腫瘍の一つ、及び悪性胸水細胞の一つによって形成された腫瘍を大規模に研究した。本発明者らは、原発性乳癌細胞、及びマウス異種移植片から単離した細胞が、組織培養中で少なくとも１～３週間増殖する、低血清組織培養条件を特定した。in vitro組織培養モデルを用いて、特異的受容体の刺激が、乳癌細胞の増殖及び生存に影響を及ぼし得ることを見出した。

【０１９６】
本発明者らは、ヒト乳癌のin vitro（組織培養）及びin vivo（マウス異種移植片）モデルを用いた。マウスモデルで成長するヒト腫瘍を、ＦＡＣＳによって採集し、単細胞懸濁液にさせ、分析した。本発明者らは、腫瘍細胞の表面マーカーの発現の不均一性を見出した。初めに、悪性胸水から単離した乳癌細胞を、ＣＤ４４の発現に基づいて群に分離した。細胞を、マーカーである５２０Ｃ９及びＣＤ４４の発現について分析した（図２を参照）。５２０Ｃ９は、ｃ－ｅｒｂＢ－２（ＨＥＲ－２／ｎｅｕ）を認識することが公知である［Ring et al., Molecular Immunology, 28: 915 (1991)］。ヒト乳癌細胞に選択的に結合するマウスモノクローナル抗体を開示する、米国特許第4,753,894号明細書も参照されたい。細胞の４集団が、特定可能であった。マーカーの５２０Ｃ９及びＣＤ４４の双方を発現する細胞の小集団、いずれかのマーカーのみを発現する集団はもとより、いずれのマーカーも発現しない集団も存在した。ＣＤ４４発現に関して、細胞を単離した（図２）。$CD44^{+}$又は$CD44^{-}$細胞を、それらが増殖できる能力について試験した。マーカー$CD44^{-}$の腫瘍細胞ではなく、マーカー$CD44^{+}$の腫瘍細胞が、in vitroでコロニーを、かつin vivoで腫瘍を形成することができた（表１）。$CD44^{+}$細胞の単離は、腫瘍

形成細胞の少なくとも２．５倍の純化を招くことに注目されたい。

【０１９７】

【表１】

表　１
乳癌幹細胞の単離集団

	$CD44^+$	$CD44^-$
in vitro コロニー	＋	－
マウスにおける腫瘍形成性	＋	－

ヒト乳癌細胞を、ＦＡＣＳを用いて採集した。in vitro でのコロニーの分析を、それぞれの表現型の５，０００の細胞を用いて、別個の２ウェル内で実施した。選別された細胞の in vivo 増殖を、2×10^6のマーカーCD44+又はCD44-細胞をマウスに注入することによって実施した。マウスを、実験１では毎週、実験２では４週目に分析した。マーカーCD44-細胞でなく、マーカーCD44+細胞の注入は、in vitro での腫瘍の形成及び増殖を招いた。in vitro 実験は、患者から単離した凍結細胞でも複製し、in vitro 実験を裏付けた。in vivo 実験は、２回複製した。

【０１９８】

これらの結果は、充実癌の幹細胞モデルの原理の証明として役立ち、下記のことを立証する：

（ａ）充実腫瘍細胞は、表面型上及び機能的に不均一である；いくつかの腫瘍細胞は、腫瘍形成性であるが、その他は、限定された増殖能を有し、移植しても腫瘍を形成しない；

（ｂ）ＦＡＣＳによって細胞を分離することによって、腫瘍形成細胞を富化することができる；

（ｃ）腫瘍形成性面分を研究することによって、腫瘍幹細胞を単離し、大方針を治療標的の特定に、より注意深く絞り込むことができる。

【０１９９】

本実施例は、二つの腫瘍からのクローン形成乳癌腫瘍細胞が、ＣＤ４４を発現することを示す。その他のマーカーも、乳癌幹細胞のそれ以上の純化を許す。本発明者らは、いくつかの抗原の発現について腫瘍細胞を分析した。不均一な発現パターンを有するいくつかの細胞は、ＭＵＣ１、Notch４、アネキシンＶ、３１７Ｇ５、ＣＤ９、ＣＤ２４、２６０Ｆ９、Ｐ－糖タンパク質、及びＣＤ４９Ｆを包含する。２６０Ｆ９は、５５キロダルトンの糖タンパク質（ムチン）Ｂ細胞表面抗原に結合する［Weiner, L.M. et al., Cancer Res., 49: 4062-4067 (1989)；Gregg, E.O. et al., J. Immunol., 138:4502-4508 (1987)］。ヒト乳癌細胞に選択的に結合するマウスモノクローナル抗体を開示する、米国特許第4,753,894号明細書も参照されたい。これらのマーカーのＣＤ４４との併用は、ＣＤ４４のみで達成されたのを越える、腫瘍幹細胞の富化の増大を許す。

【０２００】

顕著なことに、$CD44^+$（腫瘍形成）細胞は、すべて、Ｂ３８．１$^+$でもある。Ｂ３８．１抗体の記載については、Kufe et al., Cancer Research, 43(2): 851-7 (1983)を参照されたい。アネキシン、Notch４及びＣＤ２４の発現は、Ｂ３８．１$^+$細胞によって不均一である。そのため、本発明者らは、２腫瘍からの乳癌幹細胞を、Ｂ３８．１$^+$又は$CD44^+$細胞の様々な下位集団を分析することによってさらに純化することができる。実際に、本発明者らは、一次生検から得たＢ３８．１$^+$$CD24^+$及びＢ３８．１$^+$$CD24^-$細胞を単離し、組織培養に入れた。Ｂ３８．１$^+$$CD24^-$細胞のみが、コロニーを形成したにすぎなかった。もう一つの腫瘍で、細胞の$260F9^+CD24^-$、$260F9^+CD24^{hi}$、及び$260F9^+CD24^{lo}$集団を単離した。細胞の$CD24^{-/lo}$集団のみが、腫

瘍を形成したにすぎない（表２）。Ｂ３８．１又は２６０Ｆ９及びＣＤ２４を用いると、腫瘍形成細胞の５～６倍の富化があることに注目されたい。

【０２０１】

【表２】

表　２
ＣＤ２４$^{+}$及びＣＤ２４$^{-/lo}$細胞腫瘍形成性の分析

腫瘍形成	ＣＤ２４$^{+}$	ＣＤ２４$^{-/lo}$
腫瘍Ｔ１	－	＋
腫瘍Ｔ２	－	＋

ＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスに 50,000～200,000 のＣＤ２４$^{+}$又はＣＤ２４$^{-/lo}$細胞のいずれかを注入し、２週間後に腫瘍形成について分析した。

【０２０２】

実施例２

乳腺細胞増殖におけるNotchについての役割

本実施例の目的は、少なくとも２種類の異なる腫瘍で、Notch４が少数の腫瘍形成細胞によって発現されることの予備的証拠を与えることであった。実施例１からの腫瘍Ｔ１及び腫瘍Ｔ２を、Notch４の発現について分析した。細胞を、抗Notch４ポリクローナル抗体で染色し、ＦＡＣＳによって分析した。細胞の５～１５％が、検出可能レベルのNotch４を発現した。さらに、非腫瘍形成細胞の異なる集団が、異なるNotchリガンド、及びFringeファミリーの成員を発現した。正常な乳腺組織及び乳腫瘍組織によって、いずれのNotchＲＮＡが発現されるのかを決定するために、それぞれのNotchmＲＮＡに特異的なプライマーを用いて、ＲＴ－ＰＣＲを実施した。興味深いことに、Notch２ではなく、Notch１、Notch３及びNotch４が、正常乳腺細胞及び乳腫瘍細胞の双方によって発現された。100,000の細胞からＲＮＡを調製した。正常乳腺細胞又は乳腫瘍細胞からのＲＮＡのＲＴ－ＰＣＲを、Notch１、Notch２、Notch３及びNotch４に特異的なプライマーを用いて実施した。予測された大きさのＰＣＲ産物が、Notch１、３及び４について存在し、これらの細胞内のこれらのマーカーの存在を示した。ＲＮＡをＲＮアーゼで前処理した場合、シグナルは失われた。

【０２０３】

増殖におけるNotchの役割を決定するために、Notch組換えリガンド、又は該リガンドの作用薬ペプチドを、正常な乳腺上皮細胞の培養の培地に加えた。いずれのNotch作用薬も、単一細胞の生存／増殖を刺激し：Notch作用薬の存在下では、２～３倍も多くのコロニーが形成され、それらは、より高い百分率の大きく、混合したコロニーを形成した（４０％対２０％）。単一細胞をクローン密度で播種したときは、２種類のコロニーが得られた。おそらくは充実腫瘍幹細胞から生じた、筋上皮細胞と管上皮細胞との混合物からなる、数百ないし数千の細胞で構成された巨大コロニーが存在した。単一の系譜のみを含むと思われ、おそらく、限定された始原細胞の後代を表わす、より小さい細胞コロニーも存在した。

【０２０４】

in vitroで増殖した正常な乳腺上皮細胞から、（筋上皮細胞と管上皮細胞との双方を含む）二系譜コロニーを、単一の細胞によって生成した。筋上皮細胞は、抗ＣＡＬＬＡ抗体で染色することによって特定した。管上皮細胞は、抗ＥＳＡ抗体で染色することによって特定した。Notch作用薬ペプチドの存在又は不在下で、Matrigel（登録商標）中で成長した類器官は、Notch作用薬ペプチドの存在下より多く側鎖形成かつ増殖した。この作用薬ペプチドは、カゼイン産生の阻害が示すとおり、分化も阻害した。これらの結果は、これらのアッセイが、正常な乳腺上皮からの多能始原細胞を検出する手段も提供することを立

証する。このアッセイは、正常な乳腺幹細胞の純化に用いてもよい。これらの結果は、Notchが正常な乳腺の発達に機能を有することも立証する。

【０２０５】

次いで、乳癌腫瘍細胞におけるNotch４発現を調べた。高レベルのNotch４が、少数の腫瘍細胞で発現された。腫瘍形成集団を特定するＢ３８．１集団を、Notch４発現について分析したとき、Ｂ３８．１^{low}、Notch４$^{+}$である細胞の、別個の小集団が明白になった。

【０２０６】

Notch４$^{+}$及びNotch４$^{-}$細胞を選別し、in vitroで分析した。意外にも、いずれの集団も、組織培養では増殖しなかった。二つの可能な説明が存在する。第一に、細胞増殖には細胞の２集団間の相互作用が必要とされることがあり得た。次に、抗体は、Notch４の作用薬又は拮抗薬のいずれでもあり得て、腫瘍細胞の増殖を阻害し得る。これらの可能性を区別するため、腫瘍細胞を、抗Notch４抗体とともに温置し、次いでin vitroで検定した。乳癌細胞を、抗Notch４抗体に接触させた後、組織培養に入れた。細胞を、抗Notch４抗体を含有するか、含有しないか、又は抗体を生成するのに用いたペプチドとともに予備温置した抗Notch４抗体を含有するＨＢＳＳ中、氷上で１時間温置した。可溶性Deltaの存在下、及び対照として可溶性Deltaなしでも、細胞を増殖させた。

【０２０７】

対照細胞は、組織培養中で増殖し、コロニーを形成したが、Notch４とともに温置した細胞は、形成しなかった。抗Notch４抗体を、細胞を加える前に、抗体を生成するのに用いたペプチドとともに温置したとき、増殖は回復した。in vitroでの増殖に対するNotchの役割を確認するため、細胞を、可溶性Delta、Notchリガンド、又はDeltaなしの対照培養を含有する培地中で、無血清の条件下で温置した。Deltaを有する培養は、多くのコロニーを形成したが、可溶性Deltaなしか、又は抗Notch４抗体に接触させた細胞を用いた培養では、少数の小コロニーのみ形成されたにすぎなかった。抗体を、このペプチドとともに予備温置したときは、抗体は、もはや増殖を遮断しなかった。したがって、Notch４経路は、in vitroでの乳癌細胞増殖に決定的に重要である。

【０２０８】

腫瘍細胞を、抗Notch４抗体に接触させ、次いで、細胞をマウスに注入して、抗体が腫瘍形成を阻害するか否かを決定した。35,000の腫瘍細胞を、抗体なし、抗Notch４抗体あり、又は抗体を生成するのに用いたペプチドとともに予備温置した抗Notch４抗体ありで温置した。２週間後、抗Notch４抗体に接触させた細胞が形成した腫瘍の直径は、対照腫瘍より４０％小さかった。したがって、抗Notch４抗体に接触させた細胞は、抗体を生成するのに用いたペプチドとともに温置した抗Notch４抗体に接触させた細胞より小さい腫瘍を形成した。

【０２０９】

乳癌腫瘍細胞の下位集団におけるNotch、Notchリガンド、及びFringeファミリーの成員の発現

乳腫瘍細胞の集団での、Notch受容体ファミリーの成員、Notchリガンド及びNotchシグナル修飾タンパク質の発現を調べた。初めに、Notch４$^{+}$及びNotch４$^{-}$集団内のマーカーに的を絞った。１００個のNotch４$^{+}$又はNotch４$^{-}$細胞を、ＦＡＣＳによって単離した（図４参照）。４０周のＰＣＲを実施して、指示されたｍＲＮＡを検出した。Notch４$^{+}$集団は、Notch１、Notch４及びJagged（一Notchリガンド）を発現した。Notch４$^{-}$集団は、Notch１及びNotch３とともにJaggedも発現した。Notch３（他のNotch受容体を通じてシグナリングを阻害し得る）は、Notch４$^{+}$集団によって発現されなかった。

【０２１０】

要約

本発明者らは、正常なヒト乳腺細胞及びヒト乳腺幹細胞向けのin vitro及びin vivoアッセイを開発した。ＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスモデルに生じる、異なる２種類の腫瘍では、腫瘍細胞は、いくつかの細胞表面マーカーの発現に関して不均一であった。いずれの腫瘍でも、クローン形成腫瘍幹細胞の表現型は、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$であっ

た。同じ集団は、in vivoアッセイでもクローン形成性であった。このＢ３８．１$^{+}$集団は、追加のいくつかのマーカーの発現を用いて、さらに下位区分することができる。in vitro及びin vivoでの証拠は、Notch経路、特にNotch４経路が、腫瘍形成における中心的経路を演じるとして強く含意する。

【０２１１】

実施例３

マウス異種移植片モデル

本発明者らは、原発性乳腫瘍からの腫瘍を確立することができる異種移植片モデルを、重篤な免疫不全であるマウスの乳腺に腫瘍を注入することによって開発した。異種移植片の腫瘍は、現在まで試験された、全部で５名の患者からの乳房切除術標本から確立した。３例の悪性胸水からも、腫瘍を確立することができた。ＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスに、ＶＰ－１６を投与し、原発性ヒト乳癌組織を移植した。Matrigel（登録商標）に懸濁させた悪性胸水３例から単離した腫瘍細胞を、マウスに注入し、やはり腫瘍を形成した。これは、フローサイトメトリーによる分析、及び異なるサブセットが腫瘍を形成できる能力についてのアッセイを容易にするのに充分な悪性腫瘍細胞を生成することを可能にした。本発明者らは、原発性腫瘍の一つ、及び悪性胸水細胞の一つが形成した腫瘍を大規模に研究した。さらに、実施しようとした腫瘍３例で、単細胞懸濁液を作成し、腫瘍に移転することができた。異種移植片アッセイにおけるこれらの改良は、クローン形成乳癌細胞を特性記述するための生物学的及び分子的試験を実施するのを許した。加えて、本発明者らは、原発性乳癌細胞、及びマウス異種移植片腫瘍から単離した細胞が、組織培養内で短期間（１～３週間）増殖する組織培養条件を見出した。

【０２１２】

マウスモデルで成長するヒト腫瘍を、採集し、単細胞懸濁液にさせ、ＦＡＣＳによって分析した。腫瘍細胞による細胞表面マーカーの発現の不均一性があった。初めに、悪性胸水から単離した乳癌細胞を、ＣＤ４４発現に基づいて群に分けた。細胞を、マーカー５２０Ｃ９及びＣＤ４４の発現について分析した。細胞の３集団が、特定可能であった。マーカー５２０Ｃ９及びＣＤ４４をともに発現した細胞の小集団、いずれかのマーカーのみを発現した集団、及びいずれのマーカーも発現しなかった集団があった。細胞を、ＣＤ４４の発現に関して単離した。ＣＤ４４$^{+}$又はＣＤ４４$^{-}$細胞を、それらが増殖できる能力について試験した。マーカーＣＤ４４$^{-}$の腫瘍細胞ではなく、マーカーＣＤ４４$^{+}$の腫瘍細胞が、in vitroでコロニーを、かつin vivoで腫瘍を形成することができた（表３）。ＣＤ４４$^{+}$細胞の単離は、腫瘍形成細胞の２倍の富化を招くことに注目されたい。

【０２１３】

【表３】

表　３
ＦＡＣＳを用いて採集されたヒト乳癌細胞

	ＣＤ４４$^{+}$	ＣＤ４４$^{-/lo}$
in vitro コロニー	＋	－
マウスにおける腫瘍形成性	＋	－

in vitro でのコロニーの分析を、それぞれの表現型の５，０００の細胞を用いて、別個の２ウェル内で実施した。選別された細胞の in vivo 増殖を、２ｘ１０^{6}のマーカーＣＤ４４$^{+}$又はＣＤ４４$^{-}$細胞をマウスに注入することによって実施した。マウスを、試験１では３週目に、実験２では４週目に分析した。マーカーＣＤ４４$^{-}$細胞でなく、マーカーＣＤ４４$^{+}$細胞の注入は、in vitro での腫瘍の形成及び増殖を招いた。in vitro 実験は、患者から単離した凍結細胞でも複製し、in vitro 実験を裏付けた。in vivo 実験は、２回複製した。

【０２１４】
これらの結果は、クローン形成乳癌腫瘍細胞が、ＣＤ４４を発現することを示す。本発明者らは、乳癌幹細胞をさらに純化するのを許す可能性がある、その他のマーカーについての検索を開始した。これを実施するために、いくつかの抗原の発現について、腫瘍細胞を分析した。
【０２１５】
意外にも、ＣＤ４４$^{+}$（腫瘍形成）細胞は、すべて、Ｂ３８．１$^{+}$でもあった。実際に、本発明者らは、一次生検から得たＢ３８．１$^{+}$ＣＤ２４$^{+}$及びＢ３８．１$^{+}$ＣＤ２４$^{-}$細胞を単離し、組織培養に入れた。Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ２４$^{-}$細胞のみが、コロニーを形成したにすぎなかった。
【０２１６】
次に、マーカーＣＤ２４の発現に基づいて、腫瘍２例から細胞を単離した。腫瘍Ｔ２では、ＣＤ２４$^{-}$、ＣＤ２４^{lo}及びＣＤ２４^{hi}集団を単離した。双方の例で、ＣＤ２４$^{-/lo}$集団のみが、腫瘍を形成したにすぎない（表４）。Ｂ３８．１又は２６０Ｆ９及びＣＤ２４を用いると、腫瘍形成細胞の５～６倍の富化があることに注目されたい。
【０２１７】
【表４】

表　４
フローサイトメトリーによって単離されたヒト乳癌細胞の分画

マウスの腫瘍形成	ＣＤ２４$^{+}$	ＣＤ２４$^{-/lo}$
腫瘍Ｔ１	－	＋
腫瘍Ｔ２	－	＋

マウスに50,000のＣＤ２４$^{+}$又はＣＤ２４$^{-/lo}$細胞を注入した。注入４週間後に腫瘍の形成を決定した。

【０２１８】
ＣＤ２４$^{-}$細胞集団から生じる腫瘍の分析
充実腫瘍幹細胞のモデルによれば、ＣＤ２４$^{-}$細胞は、ＣＤ２４$^{+}$及びＣＤ２４$^{-}$細胞をともに有する腫瘍を生じる。この仮説を試験するために、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ２４$^{-}$細胞を用いて、二次移植片を実施した。
【０２１９】
得られた腫瘍を、取り出し、細胞を、Ｂ３８．１及びＣＤ２４の発現に関して再分析した。幹細胞モデルから予測されたとおり、移植されたＢ３８．１$^{+}$ＣＤ２４$^{-}$細胞から生じた腫瘍から得た細胞は、Ｂ３８．１及びＣＤ２４双方の発現に関して不均一であった。Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ２４$^{-}$細胞によって開始された腫瘍から単離された細胞のマーカー発現パターンは、本来の腫瘍のそれに類似した。
【０２２０】
これらの結果は、充実癌の充実腫瘍幹細胞モデルの原理の証明として役立ち、下記のことを立証する：
（１）腫瘍細胞は、表面型上及び機能的に不均一である；
（２）ＦＡＣＳによって細胞を分離することによって、腫瘍形成細胞を富化することができる；
（３）腫瘍形成性画分を試験することによって、腫瘍幹細胞を単離し、大方針を治療標的の特定に、より注意深く絞り込むことができる。
【０２２１】
実施例４
マウスモデルにおける原発性乳腫瘍細胞の分析

本発明者らのマウスモデルにおいて、患者８名からの腫瘍を確立した。また、原発性腫瘍３例、及び胸水２例から確立した腫瘍を特性記述した。２例は、高速成長性腫瘍であり、３例は低速成長性腫瘍であった。

【０２２２】

異なる腫瘍のそれぞれについて、腫瘍形成細胞の表現型を決定した。分析のために、腫瘍を、マウスから取り出し、単細胞懸濁液にさせた。初めに、本発明の充実腫瘍幹細胞モデルを、また腫瘍形成細胞の表現型が実際にＢ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$であることを確認した。すべての腫瘍で、これらのマーカーの発現に基づく、ＦＡＣＳによって単離した細胞の限定希釈分析を実施した。

【０２２３】

本発明者らの予備的データに基づき、推定される腫瘍形成細胞の最高の純化へと導く抗体カクテルは、下記のとおりであった：抗３８．１－ＡＰＣ、抗ＣＤ４４－ＦＩＴＣ及び抗ＣＤ２４－ＰＥ、抗ＣＤ３－Cytochrome、抗ＣＤ１０－Cytochrome、抗ＣＤ１４－Cytochrome、抗ＣＤ１６－Cytochrome、抗ＣＤ３１－Cytochrome、ＣＤ４５－Cytochrome、ＣＤ１４０ｂ－Cytochrome、抗ＣＤ６４－Cytochrome、抗ＥＳＡ－Ｐｈａｒ－ｒｅｄ及び７ＡＡＤ（生存性マーカー）。シトクロームで標識化された抗体は、すべて、系譜カクテル（ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$）の一部であると見なした。ＦＲＣＳを用いて、推定される乳癌幹細胞を単離したが、それらは、異種移植片腫瘍Ｔ１では、細胞のＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$集団であり、細胞のＣＤ４４$^{+}$Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$集団は、乳癌幹細胞が、より富化され、ＥＳＡ$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$集団が、最も富化されていた。悪性細胞の異なる集団を、in vivo及びin vitroモデルで試験して、原発性腫瘍形成細胞の表現型が、マウス異種移植片モデルで成長する間に変化しないことを確かめた。本発明者らが、腫瘍形成細胞を次第に富化するにつれ、腫瘍を形成するのに要する細胞数及び時間は、減少した。

【０２２４】

実施例５

乳腺細胞の増殖におけるNotchの役割

Notchタンパク質は、成長／生存因子Delta及びJaggedに対する受容体である［Panin et al., Nature, 387(6636): 908-912 (1997)；Perron et al., Cellular & Molecular Life Sciences, 57(2): 215-23 (2000)；Shimizu et al., J. Biol. Chem., 274(46): 32961-9 (1999)］。いくつかの正常幹細胞では、Notchは、増殖、生存及び分化に役割を果たすことが公知である［Apelqvist et al., Nature, 400(6747): 877-81 (1999)；Berry et al., Development, 124(4): 925-36 (1997)；Yasutomo et al., Nature, 404(6777): 506-10 (2000)；Morrison, Cell, 101: 499-510 (2000)］。一定の状況では、Notchの刺激は、幹細胞の自己更新を促進できるが、他の状況では、分化を促進することができる。Deltaは、４種類のNotch受容体すべてを活性化する。

【０２２５】

本発明者らは、乳癌腫瘍細胞におけるNotch４の発現を調べた。Notch４を、少数の腫瘍細胞上で発現させた。腫瘍形成集団を特定するＢ３８．１集団を、Notch４発現について分析したとき、Ｂ３８．１^{lo}及びNotch４$^{+}$である、細胞の明確な小集団が明らかになった。

【０２２６】

本発明者らは、Notch４$^{+}$及びNotch４$^{-}$細胞を選別し、それらがin vitroでコロニーを形成できる能力を分析した。意外にも、いずれの集団も、組織培養では増殖しなかった。二つの可能な説明が存在する。第一に、細胞増殖には細胞の２集団間の相互作用が必要とされることがあり得た。これに代えて、抗体は、Notch４の作用薬又は拮抗薬のいずれでもあり得て、受容体の阻害又は活性化が、腫瘍細胞の増殖を阻害し得る。

【０２２７】

これらの可能性を区別するため、分離していない腫瘍細胞を、抗Notch４抗体とともに温置し、次いで、in vitroでコロニーを形成できる能力について検定した。対照細胞は、

組織培養内で増殖し、コロニーを形成したが（図５Ａ）、Notch４抗体とともに温置した細胞は、増殖しなかった（図５Ｂ）。抗Notch４抗体を、抗体を生成するのに用いたペプチドとともに予備温置したとき（このペプチドは、理論的には、細胞との抗体の結合を遮断するはずである）、腫瘍細胞がコロニーを形成できる能力は、回復した（図８Ｃ）。Notchが腫瘍細胞によってコロニー形成を調節することを確認するため、細胞を、可溶性Deltaありか、又はそれなしの培地で温置した（それぞれ、図５Ａ及び５Ｄ）。Deltaを有する培養は、多くのコロニーを形成したが（図５Ａ）、可溶性Deltaを欠く培地でか、又は抗Notch４抗体に接触させた細胞を用いた培養では、少数の小コロニーのみ形成されたにすぎなかった（図５Ｂ、５Ｄ及び５Ｅ）。まとめると、これらの結果は、Notch４経路が、細胞内の乳癌細胞の増殖／生存を調節し、抗Notch４抗体が、in vitroでの活性化を遮断することを示す。

【０２２８】

次に、腫瘍細胞を、抗Notch４抗体とともに温置し、次いで、細胞をマウスに注入して、抗体が腫瘍形成を阻害するか否かを決定した。抗Notch４抗体に接触させた細胞は、細胞を加える前に、抗体を生成するのに用いたペプチドとともに温置した抗Notch４抗体に接触させた細胞より小さい腫瘍を形成した。約35,000の腫瘍細胞を、抗体なし、抗Notch４抗体あり、又は抗体を生成するのに用いたペプチドとともに予備温置した抗Notch４抗体ありで温置した。２週間後、抗Notch４抗体に接触させた細胞が形成した腫瘍の直径は、いずれの対照腫瘍より４０％小さかった。in vitro及びin vivoアッセイの最も単純な説明は、Notch活性化は、幹細胞の増殖／生存を促進し、抗Notch４抗体は、受容体活性化を遮断することである。

【０２２９】

実施例６

乳癌幹細胞のそれ以上の特性記述

５例の腫瘍からのヒト乳癌腫瘍（原発性乳腫瘍３例の乳房切除術標本、及び転移性乳癌からの悪性胸水２例）を、ＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスに確立した。５例の腫瘍は、初め、新生物細胞マーカーの不均一性を理解するのに用いた。これらの結果に基づき、患者から切除直後の原発性腫瘍から単離された、細胞を用いた実験を実施して、マウス異種移植片モデルが、ヒト乳癌を正確に反映することを確かめた。

【０２３０】

ＣＤ４４発現及び腫瘍形成性

転移性乳癌から得た細胞（Ｔ１と名付ける）、及び原発性乳腫瘍１例（Ｔ２と名付ける）を、分析に充分な細胞を得るために、マウスで拡大するために選んだ。これを達成するため、Ｔ１からの10^6～10^7個の胸水細胞（凍結サンプル）、又はＴ２の１～２mm^3の小片（新鮮な生検サンプル）を、マウスの乳腺脂肪パッド内で１～３ヶ月間増殖させた。次いで、得られたヒト腫瘍を採集し、単細胞懸濁液にさせ、異なるいくつかの抗原の発現についてフローサイトメトリーによって分析した。混入しているマウス細胞は、マウスＨ－２Ｋ（主要組織適合性複合体クラスＩ）を発現する細胞を除去することによって、分析から排除し、死細胞は、生存性染料を用いて除去した。

【０２３１】

充実腫瘍幹細胞モデルから予測されたとおり、細胞は、ＣＤ４４及びＢ３８．１を包含する、様々な細胞表面マーカーの不均一発現を示した。これらのマーカーが、腫瘍形成細胞を非腫瘍形成細胞から区別できるか否かを決定するため、これらのin vivo継代させたＴ１又はＴ２細胞から、$CD44^+$又は$CD44^-$細胞を単離し（図６）、ＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスに$CD44^+$又は$CD44^-$細胞を注入した。

【０２３２】

その他の報知的マーカーの特定

注射後６～１２週間に、観察及び触診によって、マウスを腫瘍について調べ、次いで、すべてのマウスを検死して、触診するには過小であり得た注入部位での成長を探した。$CD44^+$の注入は、すべて、可視的な腫瘍を生じたが$CD44^-$の注入は、検出可能な腫瘍

を全く形成しなかった（表５）。次に、第一継代Ｔ１及びＴ２からの細胞を、Ｂ３８．１の発現に基づいて選別し、マウスに注入した。腫瘍は、Ｂ３８．１$^{+}$細胞のすべての注入から出現したが、Ｂ３８．１$^{-}$からは腫瘍形成が全く検出されなかった（表５）。したがって、継代した双方の腫瘍からの腫瘍形成細胞は、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$であった。

【０２３３】

【表５】

表　５
腫瘍Ｔ１及び腫瘍Ｔ２細胞の異なる集団の腫瘍形成性

	細胞数／注入数		
腫瘍数／注入	8×10^5	5×10^5	2×10^5
Ｔ１細胞			
ＣＤ４４$^{-}$	0/2	0/2	-
ＣＤ４４$^{+}$	2/2	2/2	-
Ｂ３８．１$^{-}$	0/2	0/2	-
Ｂ３８．１$^{+}$	2/2	2/2	-
ＣＤ２４$^{+}$	-	-	1/6
ＣＤ２４$^{-}$	-	-	6/6
Ｔ２細胞			
ＣＤ４４$^{-}$	0/2	0/2	-
ＣＤ４４$^{+}$	2/2	2/2	-
Ｂ３８．１$^{-}$	0/2	0/2	-
Ｂ３８．１$^{+}$	2/2	2/2	-
ＣＤ２４$^{+}$	-	-	1/6
ＣＤ２４$^{-}$	-	-	6/6

指示されたマーカーの発現に基づき、図２に記載のとおりのフローサイトメトリーによって、細胞を単離し、２～８ｘ１０^{5}個の細胞をＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスの乳腺脂肪パッドに注入した後に腫瘍を形成できる能力について検定した。形成された腫瘍の数／実施された注入の数を、細胞集団のそれぞれについて示す。

【０２３４】

腫瘍は、ＣＤ２４発現についても不均一であった。200,000個のＣＤ２４$^{+}$又はＣＤ２４$^{-/lo}$細胞をＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスに注入したとき、ＣＤ２４$^{-/lo}$細胞を注入されたマウスは、すべて、腫瘍を成長させた（表５）。ＣＤ２４$^{+}$細胞を注入された位置で触診によって検出できた腫瘍は、皆無であったが、ＣＤ２４$^{+}$細胞を注入されたマウス１２匹中２匹は、実際には、注入部位に僅かな成長を有し、それは、検死の際にのみ検出できたにすぎない。対照的に、ＣＤ２４$^{-/lo}$細胞を注入された部位は、すべて、直径が１ｃｍより大きい腫瘍を有して、視覚的に、かつ触診によって容易に明白であった。フローサイトメトリーによってＣＤ２４$^{+}$画分からＣＤ２４$^{-}$細胞を完全に除去するのは、極めて困難であることから、僅かな成長は、代表的には選別されたＣＤ２４$^{+}$集団中に存在する、１～３％のＣＤ２４$^{-}$細胞による汚染を表わす可能性がが高い。これに代えて、この僅かな成長は、増殖能が低下したＣＤ２４$^{+}$癌細胞から生じた可能性もある。現時点では、本発明者らは、これらの可能性を区別することができない。にもかかわらず、この異種移植片モデルで触診可能な腫瘍を形成した細胞は、すべて、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$であった。

【０２３５】
正常な細胞型に付随する、本発明者らが集合的にＬＩＮＥＡＧＥ（ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ１０、ＣＤ１４、ＣＤ１６、ＣＤ１９、ＣＤ３１、－ＣＤ４５、－ＣＤ６４及び－ＣＤ１４０ｂ）と称するいくつかの抗原は、多数回マウスで継代させた腫瘍の分析に基づき、癌細胞によって発現されないことが見出された。ＬＩＮＥＡＧＥ$^{+}$細胞を排除することによって、正常なヒト白血球、内皮細胞及び繊維芽細胞が、特に未継代又は第一継代腫瘍から排除された。
【０２３６】
ＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスに確立された腫瘍のうち４例のフローサイトメトリー分析によって、これらの腫瘍は、すべて、Ｂ３８．１、ＣＤ４４及びＣＤ２４の発現に関して不均一であることが明らかにされた（例えば、図７Ａ、７Ｂを参照されたい）。しかし、腫瘍は、それぞれ、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$細胞の明確な集団を含んだ。ＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスにおける１継代後に分析した、独立した４例の腫瘍では、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$細胞の頻度は、生存ヒト腫瘍細胞の９．５±４．５％（平均±標準偏差）であった。接種の７週間後に、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞及びＢ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{+}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞の注入部位を、組織学によって調べた。Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$注入部位は、直径が１ｃｍより大きい腫瘍を含んだが、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{+}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$注入部位は、検出可能な腫瘍を全く含まなかった。Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{+}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$注入の部位では、正常マウス乳腺組織のみが、組織学によって認められたにすぎなかったが（図７Ｋ）、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞によって形成された腫瘍は、ヘマトキシリン及びエオジン染色された切片における形態学によって判定された限りで、悪性細胞を含んだ（図７Ｌ）。Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{+}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$注入部位は、１１週間後に調べたときでさえ、腫瘍は全く検出されなかった。
【０２３７】
Ｂ３８．１、ＣＤ４４、ＣＤ２４及びＬＩＮＥＡＧＥマーカーを用いた腫瘍形成細胞の富化
Ｔ１、Ｔ２、及びＴ３、すなわちＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスで１回継代された第三の腫瘍を、腫瘍形成細胞は、Ｂ３８．１、ＣＤ４４、ＣＤ２４及びＬＩＮＥＡＧＥマーカーの発現に基づいて富化できるか否かを決定するために、試験した。すべての事例で、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$細胞は、腫瘍形成細胞が顕著に富化された。未選別Ｔ１又はＴ２細胞を注入したときは、５ｘ１０^{4}個の細胞が、一貫して腫瘍を生じたが、１０^{4}個の細胞は、少数の事例にのみ腫瘍を生じたにすぎない（表６）。対照的に、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞をＴ１又はＴ２から単離したときは（図７）、この集団からの１０^{3}という僅かな細胞が、すべての事例で腫瘍を生じることができた（表６、図７Ｊ及び７Ｌ）。Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$であるが、ＣＤ２４$^{+}$である細胞は、腫瘍を形成できなかった。これらのデータは、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$集団は、ＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスに腫瘍を形成できる能力が未分画腫瘍細胞に比して少なくとも１０倍富化されることを示す。この集団は、Ｔ１及びＴ２内の細胞の４～１７％を占めた（癌細胞の５～２３％）。
【０２３８】
実施例７
ヒト原発性腫瘍細胞の分析
実施例７の富化された集団における腫瘍形成活性が、異種移植片モデル内での繁殖の結果として生じた可能性を排除するため、凍結させなかった胸水乳癌細胞を、ＣＤ４４及びＣＤ２４の発現に基づいて単離した。新生物細胞の約１１％がＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$であり、７５％がＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{+}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$であった。100,000のＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$の注入３例は、すべて、腫瘍を形成したが、ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{+}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞は、全く形成しなかった（図６）。次に、非継代

乳腫瘍標本からのＢ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$集団（図７Ｉ）が腫瘍形成性であるか否かを試験した。マウスに継代した後に分析した、独立した腫瘍４例のうち、フローサイトメトリーを許すのに充分な唯一の凍結されたＴ１の非継代細胞が、入手できたにすぎなかった。加えて、第五の患者からの凍結非継代細胞（Ｔ５）を分析した。非継代Ｔ１細胞の５％、及び非継代Ｔ５細胞の３５％が、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$であった。

【０２３９】

40,000のＢ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞、又は非継代Ｔ１からフローサイトメトリーによって単離した40,000のＢ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{+}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞を、すべて、１匹のマウスに注入した。非継代Ｔ５細胞からは、60,000～100,000細胞のＢ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$集団（図７Ｉ）、及びＢ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{+}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$集団（図７Ｆ）が単離され、ＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウス３匹のそれぞれに、これを注入した。ＣＤ２４$^{-/lo}$集団は、Ｔ１細胞から腫瘍を、Ｔ５細胞からは３例の注入中２例に腫瘍を形成したが、ＣＤ２４$^{+}$集団は、決して腫瘍を形成せず、継代された腫瘍で特定された腫瘍形成集団は、非継代Ｔ１及びＴ５サンプル中にも存在することを立証した。非継代Ｔ１細胞から生じた腫瘍を分析したときは、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞の頻度は、継代及び非継代Ｔ１双方のサンプル中のと同様であった。

【０２４０】

【表６】

表・6
腫瘍形成性乳癌細胞はCD44^{+}B38^{+}CD24^{-}集団で著しく富化される

	各細胞投与量についての腫瘍数／注入数								
細胞注入	$5x10^5$	$1x10^5$	$5x10^4$	$2x10^4$	$1x10^4$	$5x10^3$	$1x10^3$	$5x10^2$	$2x10^2$
T1 細胞(異種移植)									
ソートなし	4/4	4/4	6/6	-	2/6	-	0/6	-	-
B38.1^{+}CD44^{+}CD24^{+}	-	-	-	0/5	0/5	0/5	0/5	-	-
B38.1^{+}CD44^{+}CD24^{-}	-	-	-	5/5	5/5	5/5	5/5	-	-
ESA^{+}B38^{+}CD24^{-}	-	-	-	-	-	-	8/8*	2/2	1/2
ESA^{-}B38^{+}CD24^{-}	-	-	-	-	-	-	0/8*	0/2	0/2
T2 細胞(異種移植)									
ソートなし	4/4	4/4	4/4	-	1/6	-	0/6		
B38.1^{+}CD44^{+}CD24^{+}	-	-	-	0/5	0/5	0/5	0/5	-	-
B38.1^{+}CD44^{+}CD24^{-}	-	-	-	5/5	5/5	5/5	5/5	-	-
T3 細胞(異種移植)									
B38.1^{+}CD44^{+}CD24^{+}	-	-	-	-	0/2	-	-	-	-
B38.1^{+}CD44^{+}CD24^{-}	-	-	-	-	2/2	-	-	-	-
T5 細胞(プライマリ)									
CD44^{+}CD24^{+}		0/3							
CD44^{+}CD24^{-}		3/3							
T1 細胞(プライマリ)									
B38.1^{+}CD44^{+}CD24^{+}			0/1						
B38.1^{+}CD44^{+}CD24^{-}			1/1						
T6 細胞(プライマリ)									
B38.1^{+}CD44^{+}CD24^{+}		0/1	0/2						
B38.1^{+}CD44^{+}CD24^{-}		1/1	1/2						

第一継代腫瘍Ｔ１、腫瘍Ｔ２又は腫瘍Ｔ３細胞から細胞を単離した。Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$及びＢ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{+}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞を、図３に記載のフローサイトメトリーによって単離した。各表現型の指示された数の細胞を、ＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスの乳腺脂肪パッドに注入した。各群の細胞の注入から形成された腫瘍の数を示す。Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞の単離は、腫瘍形成細胞の１０倍を越える富化を招き、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{+}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞の注入からは、腫瘍が全く生じないことに注目されたい。
細胞をＢ３８．１$^{+}$ＣＤ２４$^{+}$に加えてＥＳＡ$^{+}$として選別したときは、２００細胞という僅かな注入が、腫瘍を生じて、選別しなかった細胞に比して、腫瘍形成性の約５０倍の富化を生じた。
*これらの注入については、$1x10^3$に代えて、$2x10^3$を用いた。

【０２４１】

実施例８

乳癌腫瘍からの細胞集団のそれ以上の特性記述

一腫瘍で、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$集団のＥＳＡ$^{+}$サブセットを選別することによって、腫瘍形成細胞をさらに富化した。ＥＳＡ$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡ

ＧＥ$^{-}$細胞をＴ１から単離したとき（図８Ａ）、この集団からは２００という少数の細胞が、腫瘍を生じることができたが、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$であるがＥＳＡ$^{-}$の細胞２，０００個の注入は、いずれの場合も腫瘍を形成できなかった（図６）。少なくとも10,000の未分画細胞が、何らかの腫瘍を形成するのに必要とされた。したがって、ＥＳＡ$^{+}$Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$集団は、選別されなかった腫瘍細胞にに比して、腫瘍を形成できる能力が少なくとも５０倍富化されている。ＥＳＡ$^{+}$Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$集団は、Ｔ１細胞の２～４％（癌細胞の２．５～５％）を占める。ＥＳＡ$^{+}$Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞及び非腫瘍形成細胞を、細胞学によって調べ、両集団とも、外見が実質的に区別できない、悪性細胞からなった。

【０２４２】

実施例９

乳癌細胞の増殖向け組織培養条件を改良するための癌幹細胞の使用

組織培養では、少数の原発性腫瘍細胞のみが、コロニーを形成できるにすぎないことが、長く公知となっている。充実腫瘍幹細胞モデルによれば、細胞の非腫瘍形成集団は、多少の増殖できる能力を保持している可能性があるが、細胞の腫瘍形成集団は、そうするための、より大きい余地を有すると思われる。原発性腫瘍から直接にか、又はマウスで成長中の腫瘍Ｔ１及び腫瘍Ｔ２から単離された、等しい数の腫瘍形成表現型、及び非腫瘍形成細胞を、組織培養プレートにクローン密度で播種し、コロニー形成を測定した。原発性の患者の細胞は、乳癌細胞系を容易に形成し、組織培養中で充分に増殖する腫瘍からの凍結原発性細胞のアリコートからの細胞であった。

【０２４３】

細胞学は、集団が、それぞれ、上皮起源の癌細胞を含むことを示した（図９）。

【０２４４】

初めに、コロニーは、腫瘍形成細胞からばかりでなく、いくつかの腫瘍では、非腫瘍形成細胞からも形成された（図９）。しかし、１２日目までに、腫瘍形成細胞が形成したコロニーは、成長したが、非腫瘍形成細胞は、死滅した（図９）。１４日目までには、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{+}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞のみが、癌細胞の無数の大コロニーを形成したにすぎない（図９Ｃ）。

【０２４５】

これらの細胞を、組織培養内で３代にわたって継代させ、上皮性新生物細胞は、増殖し続けた。対照的に、非腫瘍形成細胞は、２～４個の細胞からなる小コロニーのみを形成できたにすぎず、数日後には、増殖を停止した（図９Ｃ）。

【０２４６】

これらの結果は、二つの重要な点を示している。第一に、幹細胞の表現型は、免疫不全マウスアッセイの人為的産物ではない。表現型上は同一である細胞集団が、増大した増殖能力をマウス異種移植片モデルとin vitroアッセイとの双方で有するという事実は、この集団が、乳癌の患者に見出される細胞の腫瘍形成集団であることを示している。

【０２４７】

第二に、非腫瘍形成細胞の少なくともいくつかは、限定された増殖の余地を有する。このことは、非腫瘍形成集団を特定するのに用いられたマーカーが、生存性を欠く細胞についての単なる選別ではないことを示している。

【０２４８】

これらの結果は、本実施例が、in vitroクローン形成アッセイを化学療法薬物の感受性を予測するのに用いることは、しばしば、治療法に対する特定の患者の応答を予測しないという問題に解決を与える。本実施例に用いられた腫瘍の一つでは、細胞の非腫瘍形成集団が、４日目には腫瘍形成細胞（本発明の充実腫瘍幹細胞）とほとんど同程度に効率的にコロニーを形成した。この腫瘍を薬物スクリーニングアッセイに用いるのに、in vitroでクローン形成性である非腫瘍形成及び腫瘍形成細胞が、特定の試験化合物に異なって応答するならば、アッセイは、特に早期に採点したならば、試験化合物が乳癌幹細胞をin viv

oで排除できる能力を反映しなかったであろう。

【０２４９】

実施例１０

幹細胞集団は、幹細胞と非腫瘍形成性細胞集団との両方を再生する

決定論的充実腫瘍幹細胞モデル（図１Ｂ）によると、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$腫瘍形成性細胞は、さらに別のＢ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$腫瘍形成性細胞と表現型が不均一の非腫瘍形成性細胞集団とを含む腫瘍を形成する。古典的モデルでは、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞から形成される腫瘍は、単に個数が増加したＢ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞からなると示唆されるところである。

【０２５０】

１，０００個のＢ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞から生じた腫瘍を解離し、Ｂ３８．１、ＣＤ４４及びＣＤ２４の発現についてフローサイトメトリーで分析した（図１０）。決定論的充実腫瘍幹細胞モデルから予想されるように、移植Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞から生じた腫瘍から得た細胞は、全てのマーカーの発現について不均一であった（図１０Ｃ及び図１０Ｆ）。どのケースにおいても、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞によって誘導された腫瘍から単離された細胞のマーカー発現パターンは、元の腫瘍と似たパターンを示した（図１０Ａ及び図１０Ｂ、図１０Ｃ及び図を図１０Ｃ、図１０Ｆと比較）。

【０２５１】

Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞により形成きれた腫瘍が、他の非腫瘍形成性細胞に加えて腫瘍形成性Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞を含有するかどうかを試験した。Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞又はＢ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{+}$ＬＩＮＥＡＧＥ－細胞は１０００個のＢ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞を７週間前に注射することにより開始した第２継代Ｔ１腫瘍から単離した。１０００個の細胞は一回の注射について第３継代の腫瘍を形成するために４個体の動物の各々に投与した。元のＴ１及びＴ２腫瘍に対すると同様に全４つのＢ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$集団の注射は、新規な腫瘍を生じたが、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{+}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$集団は新規な腫瘍を生じなかった。

【０２５２】

本実施例は、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$集団が、さらに別の腫瘍形成性Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞と、表現型が異なる非腫瘍形成性細胞との両方を形成することを実証している。

【０２５３】

実施例１１

異なる新生細胞集団による、潜在的な治療標的対象の発現

決定論的充実腫瘍幹細胞モデル（図１Ｂ）において、腫瘍形成性腫瘍細胞と非腫瘍形成性腫瘍細胞とによる遺伝子発現は異なりうる。現在の癌治療では大幅な結果の改善は困難であるが、これは非腫瘍形成性細胞が治療の標的になりやすく、数の少ない腫瘍形成性充実腫瘍幹細胞が標的になりにくいということに原因がある。ある治療で非腫瘍形成性集団のみを破壊して腫瘍を小さくしても、残っている腫瘍形成性充実腫瘍幹細胞が腫瘍の再生を引き起こす可能性がある。

【０２５４】

ＥＧＦ受容体（ＥＧＦ－Ｒ）又はＨＥＲ２／ｎｅｕのいずれかの発現について、第一継代Ｔ１細胞を調べた。ＥＧＦ－Ｒ及びＨＥＲ２／ｎｅｕは、乳癌細胞増殖に関与していると考えられている潜在的な治療標的対象である。非腫瘍形成性細胞に比べて、腫瘍形成性Ｔ１細胞は抗ＥＧＦ－Ｒ抗体による染色性が低く、腫瘍形成性細胞におけるＥＧＦ－Ｒ発現は、１個の細胞レベルでは検出できなかった（図１１）。

【０２５５】

検出可能なレベルでＥＧＦ－Ｒを発現しなかった細胞が腫瘍形成性であるかを調べるために、１，０００－２，０００個のＥＧＦＲ-Ｂ３８．１+ＣＤ２４-ＬＩＮＥＡＧＥ-細胞をＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスに注射した。４例中全てにおいて腫瘍が形成され、ＥＧＦ－Ｒ-細胞が腫瘍形成性であることが確認された。これに対して、腫瘍形成性Ｔ１細胞と非腫瘍形成性Ｔ１細胞との間に、ＨＥＲ２／ｎｅｕ発現の実質的な違いを検出することはできなかった（図１１Ｂ及び図１１Ｅ）。

【０２５６】

充実腫瘍幹細胞モデルから予想されるように、１，０００－２，０００個のＨＥＲ２／ｎｅｕ+Ｂ３８．１+ＣＤ２４-ＬＩＮＥＡＧＥ-細胞は、４例中全てにおいて腫瘍を形成した。本実施例は、治療標的対象の発現について、腫瘍形成性集団と非腫瘍形成性集団との間に差異があり得ることを示している。

【０２５７】

これらの実験は、充実腫瘍の幹細胞モデルの原理を証明し、下記を実証している。

（ａ）腫瘍細胞は表現型上及び機能上不均一である；

（ｂ）ＦＡＣＳによって細胞を分離することで、腫瘍形成性細胞を富化することができる；及び

（ｃ）腫瘍形成性画分を研究することで、充実腫瘍幹細胞を単離してより厳密な分子的及び生物学的検定を行える。

【０２５８】

実施例１２

Notchが乳癌細胞増殖に役割を担っているととの更なる証拠

Notchが充実腫瘍幹細胞マーカーであるかどうかを調べるために、Notch４+細胞とNotch４-細胞を分別し、生体外でのコロニー形成能について分析した。驚くことに、どちらの細胞集団も組織培養中で成長しなかった。

【０２５９】

この結果については２つの説明が考えられる。第一に、細胞の成長には２細胞集団間の相互作用が必要であると考えられる。第二に、抗体がNotch４のアゴニスト又はアンタゴニストのいずれかとして作用し、受容体が活性化又は阻害された結果、腫瘍細胞成長が阻害されると考えられる。これらの可能性を区別するために、分離していない腫瘍細胞を抗Notch４抗体と共に培養し、可溶性Delta（Notchリガンド）を含む組織培養中にて、生体外でコロニーを形成できるかどうかを調べた。Deltaは、腫瘍から単離されたこの細胞がコロニーを形成するのに必須なものである。対照細胞が組織培養で成長しコロニーを形成した（図１２Ａ）のに対し、Notch４抗体と培養した細胞は成長しなかった（図１２Ｂ）。抗体を作成するのに用いたペプチド（理論上、このペプチドは抗体と細胞との結合を阻害する）と抗Notch４抗体とを予め保温すると、腫瘍細胞のコロニー形成能が回復する（図１２Ｃ）。抗Notch２抗体はコロニー形成に影響を与えなかった。

【０２６０】

腫瘍細胞によるコロニー形成を、Notchが調節していることを確認するために、可溶性Deltaを含む培養基と含まない培養基で細胞を培養した（図１２Ａと図１２Ｄ）。Deltaを含む培養基ではコロニーが多数形成されたが（図１２Ａ）、可溶性Deltaを含まない培養基又は抗Notch４抗体に接触させた細胞を用いた培養基では、数個の小さなコロニーしか形成されなかった（図１２Ｂ、図１２Ｄ及び図１２Ｅ）。これらのデータは、Notch４経路が細胞中の乳癌細胞の増殖／生存を調節し、抗Notch４抗体が生体外での活性化を阻害することを示唆している。

【０２６１】

抗Notch４抗体が、生体内での乳癌腫瘍細胞成長を阻害するかどうかについても調べた。まず、２０，０００、１０，０００又は５，０００個の腫瘍形成性細胞を抗Notch４抗体と、あるいは抗Notch４抗体及び阻止ペプチドと共に培養した。２０，０００又は１０，０００個の腫瘍形成性細胞を注射した場合、抗体によって腫瘍の発生を１週間遅らせることができ、５,０００個を注射した場合には１３日遅らせることができた。これは抗体

が生体内での腫瘍形成を阻害しうることを示唆している。

【０２６２】

次いで４種の乳癌細胞系について、Notch４の発現と抗Notch４抗体による成長阻害とを調べた。ＭＣＦ－７とＳＫＢＲ－３乳癌細胞系はNotch４を発現し、抗Notch４抗体はこれらの細胞の成長を阻害することが分かった。ＲＴ－ＰＣＲを行ったところ、いずれもNotch４を発現した。抗Notch４抗体が成長を阻害するかどうかを調べるために、５，０００個のＭＣＦ－７細胞を、抗Notch４抗体と、或いは抗Notch４抗体及び抗体を作成するのに用いたペプチドと、或いは無関係な対照抗体と共に培養した。抗Notch４抗体は、両方の細胞系において１０倍以上の強度でコロニー形成を阻害した。

【０２６３】

本実施例は、Notch４活性化が充実腫瘍幹細胞の増殖／生存を促進し、抗Notch４抗体が受容体活性化を阻害することを示している。

【０２６４】

実施例１３

遺伝子治療自殺ベクターによる乳癌幹細胞の標的化

乳癌幹細胞は、乳癌の中でわずかしか存在しない腫瘍細胞である。本発明では、遺伝子治療においてこれらの細胞を標的にすることを目的とする（図１３）。

【０２６５】

乳癌幹細胞によって発現されたマーカーを用いて、幹細胞をウイルスベクターの標的とした。まず異なる細胞系を３８．１抗体で染色し、フローサイトメトリーで分析した。ＭＣＦ７、ＳＫＢＲ３、Ｔ４７Ｄ及びＢＴ４７４乳癌細胞系は強度の陽性を示した。Ｐｒｏｌｉｎｘ（Prolinx，Inc.、米国ワシントン州ボーセル）法［図１４、Douglas JT他、Nature Biotechnology１４（１１）：１５７４－８（１９９６）参照］によって複合した抗繊維－Ｂ３８．１抗体を調製した。改変抗knob抗体と抗Ｂ３８．１抗体とを混合したところ、架橋して双特異性複合体を形成した（図１５）。複合体の抗繊維抗体部分はアデノウイルスに結合し、抗Ｂ３８．１部分は乳癌幹細胞に結合する。ＡｄＬａｃＺウイルスを抗繊維抗体のみと培養したところ、ウイルスの感染性が阻害された（図１６）。ウイルスを双特異性複合体と培養した場合、Ｂ３８．１抗体を高レベルで発現する細胞においてのみ、感染性が回復した（図１８）。結合していないＢ３８．１抗体によって阻害されるので、再標的化は特異的になる（図１８）。

【０２６６】

結論として、新規な双特異性複合体はアデノウイルスの感染性を改変し、従来存在する親和性を阻害し、乳癌幹細胞表面マーカーを発現する細胞へ感染を誘導する。

【０２６７】

実施例１４

乳癌幹細胞における下流標的

本実施例の方法は、癌幹細胞を用いた、Notch関連及び他の抗癌治療を開発する指標を提供する。アレイ法を用いて、特異的なNotchリガンドに誘導されるNotchシグナリングによって調節されうる分子経路を調べた。Research Geneticsにより配列確認済みのヒトｃＤＮＡ（ミシガン大学Microarray Networkより入手）を、Cancer and Microarray施設にて配列比較した。自己再生する乳癌幹細胞又は腫瘍から得た様々な細胞集団から、プローブを調製した。プローブを配列にハイブリダイズし、Cancer and Microarray施設によってハイブリダイゼーションパターンを読みとった。次いでハイブリダイゼーションパターンを分析し、様々なNotchリガンドによって刺激された乳癌幹細胞と、刺激を与えていない細胞とから得たプローブにハイブリダイズする遺伝子を同定した。同定された遺伝子は、乳癌細胞の生存又は自己再生の調節に関与する遺伝子であると考えられる。

【０２６８】

マイクロアレイの調製。マイクロアレイ法を用いて造血幹細胞の遺伝子発現を分析してきたが、この作業を癌幹細胞に適用した。

【０２６９】

現在、ミシガン大学Microarray NetworkはResearch Geneticsから入手した３２，５００個の配列確認済みヒトｃＤＮＡ配列を有している。ＮＣＩと共同して、「癌」チップを組み立てた。このチップは、増殖及び腫瘍形成に関与する１，２００個の遺伝子配列を包括的に含んでいる。ミシガン大学は「アポトーシスチップ」も開発しているが、このチップにはプログラム細胞死に関与することが知られている遺伝子が全て含まれている。特に、Notchの下流標的として知られるＨＥＳ遺伝子が配列に含まれている。

【０２７０】

乳癌幹細胞からのプローブの調製。精製したばかりの乳癌幹細胞から、又は様々なNotchリガンドの存在下／非存在下で培養した乳癌幹細胞から、メッセンジャーＲＮＡを単離した。必要であれば、例えばＰＣＲ又は線形ＲＮＡ増幅［Wang他、Nature Biotechnology １８：４５７－４５９（２０００年４月）］によって、ＲＮＡを増幅する。オリゴｄＴプライマーからの逆転写によってプローブを調製し、ＣＹ３又はＣＹ５複合ヌクレオチドに結合して標識化する。単離したばかりで培養を行っていない乳癌細胞から調製したプローブと、培養した乳癌細胞［適当なNotchリガンド（例えばFringe族を単独で又は組み合わせて用いる。腫瘍細胞の異なる集団によってどのリガンドが発現されるかに基づいて決定する）に接触した細胞など］から調製したプローブを用いて、遺伝子発現の概要を調べた。これらのアッセイを行うために、経膜領域を除去した可溶性のDelta又はJagged族、あるいは分泌性蛋白質のFringe族の一つに細胞を接触させた。バキュロウイルス又は哺乳類発現ベクターによってそれぞれトランスフェクトした昆虫細胞又は哺乳類細胞から、Delta、Jagged及びFringe族それぞれのNotchリガンドの組換え蛋白質を作製した。

【０２７１】

対照乳癌腫瘍形成性細胞と様々なNotchリガンドに接触させた腫瘍形成性細胞との間で、遺伝子発現パターンを比較した。様々なNotchリガンドと培養した乳癌幹細胞から作製した、異なる蛍光物質で標識したプローブに、各腫瘍由来の乳癌幹細胞から得たプローブを結合し、ハイブリダイゼーションパターンを比較した。まずＦＡＣＳによって乳癌幹細胞を単離した。細胞間のNotch相互作用を避けるたあに、細胞密度を１個として細胞を培養した。細胞を可溶性Delta（実施例６参照）、Delta様、Jagged１、Jagged２又は各Fringeに接触した。個々の細胞集団が示すNotchリガンド発現パターンに基づいて、単独の及び組み合わせた各蛋白質に細胞を接触させた。各実験条件で得たプローブにハイブリダイズしたマイクロアレイを比較分析し、Notchリガンド相互作用によって影響される分子経路を仮定した。例えば、ある細胞集団がDeltaとManic Fringeを発現する場合、乳癌幹細胞の第１群をDeltaのみに、第２群をDeltaとManic Fringeに、第３群をManic Fringeのみに接触させた。Ｃｙ５又はＣｙ３標識を用いて各群からｃＤＮＡを作製し、これを用いてマイクロアレイチップを精査する。更に、対照培養基で培養された細胞と単離したばかりの乳癌細胞とから作製したｃＤＮＡと共に、各群から得たｃＤＮＡを用いてマイクロアレイチップを精査する。各群の比較を５回行って、各試験群の配列遺伝子の発現パターンにおける差異が、実際に存在するものであるかを確認する。

【０２７２】

抗Notch４抗体で処理した細胞からのプローブの調製。Notch４に対する抗体は、生体外で成長を、生体内で腫瘍形成を阻害する。抗体がNotch４アゴニスト又はアンタゴニストのいずれかとして作用するとすれば、この効果を説明することができる。可溶性Deltaは生体外での癌細胞成長を促進するので、抗体はおそらくNotch４アンタゴニストである。抗Notch４抗体が腫瘍の成長を阻害する機構を調べるために、抗Notch４の存在下又は非存在下で又は対照の無関係な抗体及びNotchリガンドの様々な組合せとで培養した細胞からプローブを作製し、上記したようにマイクロアレイ発現分析に使用した。別の対照群では、抗体の存在下かつNotchリガンドの非存在下で培養した細胞を用いた。独立して調製したプローブ群を用いた独立した６回の実験で、それぞれの比較を行った。各群の遺伝子発現パターンを比較することによって、抗Notch４抗体がNotchシグナリングにどのように影響を与えるかを調べることができる。

【０２７３】

ｃＤＮＡプローブの作製。１－２μｇのｍＲＮＡを用いて、マイクロアレイ上の遺伝子発現プロファイルスクリーニング用プローブを合成した（Wang他、Nature Biotechnology １８：４５７－４５９（２０００年４月））。各実験において３枚のスライド１セット（計３２，５００のｃＤＮＡを含む）をスクリーンしたので、６μｇのｍＲＮＡが各アッセイに必要であった（６μｇのｍＲＮＡの逆転写で約３μｇのｃＤＮＡプローブが産生される。或いはスライド１枚あたり１μｇのプローブが産生される）。癌細胞のＲＮＡ濃度は高いという傾向がある。これまでのアッセイでは、10^7個の癌細胞からは約１００μｇの全ＲＮＡが産生され、約３μｇのポリA^+ＲＮＡが産生されている。従って、６μｇのｍＲＮＡを産生するためには、約2×10^7個の細胞が必要である。予備的なデータが示すように、フローサイトメトリーで精製された乳癌幹細胞を上記個数用意するのに、約５－１０個の１ｃｍ腫瘍から単離することができる。

【０２７４】

腫瘍内の全細胞数の約５％が乳癌幹細胞である。解離したばかりの（培養を行っていない）乳癌幹細胞をフローサイトメトリーで１日に10^6個以上単離するのは実用的ではない。この方法だと、１日に選別できる細胞から得られるｍＲＮＡは０．５μｇ未満である。選別した乳癌幹細胞を数日分蓄積し、単離されたばかりの細胞からプローブを調製するのに充分な量のｍＲＮＡを得ることができるが、全てのアッセイをこの方法で行うのは実用的ではない。あるアッセイでは組織培養中で短期間培養する必要がある。選別した細胞の培養効率は約１０％である。従ってプローブ合成の前に酵素を用いて鋳型を増幅する必要がある。増幅はＰＣＲ又はＴ７ＲＮＡポリメラーゼを用いた線形増幅によって行うことができる。本実施例では１５－１８回のＰＣＲを繰り返して少量の幹細胞からｃＤＮＡを増幅した。この方法を用いて高品質の造血幹細胞（ＨＳＣ）ｃＤＮＡライブラリーを構築し、造血幹細胞からプローブを作製した。単離されたばかりの乳癌幹細胞からプローブを作製するのに、同様の方法を用いた。あるいは線形ＲＮＡ増幅を用いてマイクロアレイハイブリダイゼーション用のプローブ作製に成功している例が数多く報告されている。従って両方の方法でプローブを調製し、得られるハイブリダイゼーションパターンを調べることによって、２種の方法を比較した。Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼ結合部位を有するオリゴｄＴプライマーを用いてｃＤＮＡの開始点とし、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ逆転写酵素（Ｇｉｂｃｏ）とｃＤＮＡ５’末端への標識化を可能にするＣｌｏｎｔｅｃｈ５’スイッチオリゴマーとを用いて、ｃＤＮＡを合成した。大腸菌ＤＮＡポリメラーゼを用いて第２のｃＤＮＡ鎖を合成した。次いでＴ７ＲＮＡポリメラーゼ又はＰＣＲによって増幅ＲＮＡ（ａＲＮＡ）を作製した。どちらの増幅方法を採用するかは標準的ｃＤＮＡ合成において作製されたプローブを比較することによって決定した。ａＲＮＡを調製した後、ランダム六量体を用いてｃＤＮＡを再合成した。このｃＤＮＡはそのままプローブに用いることもできるが、必要であれば更にもう一度増幅工程を行ってもよい。両方の方法を用いて、４０，０００個のＭＣＦ－７細胞（ヒト乳癌幹細胞系）からプローブを調製した。このプローブを、増幅していないＭＣＦ－７細胞から得たプローブと共にヒトｃＤＮＡマイクロアレイにハイブリダイズした。非増幅プローブのハイブリダイゼーションパターンに最も近いパターンを再生した増幅方法を選択した。次いで非増幅プローブのハイブリダイゼーションパターンにできるだけ近いパターンを増幅プローブが再生するまで、増幅条件を変更した。

【０２７５】

ハイブリダイゼーションパターンの分析。Cancer and Microarray Core施設においてレーザー自動読み取りシステムを用いてハイブリダイゼーションパターンを分析した。Genomics Solutionsから入手可能な製品を用いて、配列化、ハイブリダイゼーション、スキャニング及びハイブリダイゼーションパターンの分析を一括して行うシステムを用いれば、均一で効率のよいハイブリダイゼーションパターン分析を行うことができる。

【０２７６】

プローブ間で標準化ハイブリダイゼーションレベルに少なくとも３倍の差異が存在すれば、転写は差異的に発現される。各プローブの有効濃度に存在しうる差異を補正するために、１回の試験内でのＣｙ３及びＣｙ５標識化プローブからのハイブリダイゼーションシ

グナルをそれぞれに対して正規化した。プローブの量又は標識化効率における差異を補正するために、各群について逆色の蛍光標識を用いて各試験を繰り返した。

【０２７７】

差異的発現の検証。細胞群からのプローブに一貫してハイブリダイズするが、対照細胞群からのプローブにはハイブリダイズしないｃＤＮＡについて、さらに特徴を調べた。これらのｃＤＮＡ配列はMicroarray Networkから入手した。２種の方法を用いて、細胞集団間における候補遺伝子の差異的発現を確認した。第１の方法では、候補遺伝子に対するインシトゥハイブリダイゼーションプローブを調製し、上記した様々なNotchリガンドの存在下又は非存在下に培養した乳癌幹細胞について、インシトゥハイブリダイゼーションを行った。次いで培養細胞にインシトゥハイブリダイゼーションを行った。この方法の利点は、各細胞レベルで発現を比較できることにある。

【０２７８】

第２の方法では、候補遺伝子に対する入れ子ＰＣＲプライマーを設計し、精製したばかりの乳癌幹細胞（上記方法で単離）の複数の１－１０細胞アリコットについてＲＴ－ＰＣＲを行う。少量の細胞についてＲＴ－ＰＣＲを行うことによって、「非発現」集団が極少数の発現細胞を含んでいる場合でも、特定の転写を増幅する能力における差異を観察することが可能になる。この方法を用いて、多分化能造血原始細胞の異なる副集団間での、ＲＧＳ１８の差異的発現を実証した。

【０２７９】

ノーザン分析による差異的発現の確認。Notchリガンドの存在下又は非存在下で培養した$1-2\times10^{7}$個の乳癌幹細胞から得たポリA^{+}ＲＮＡを、差異的に発現したｃＤＮＡのプローブでハイブリダイズした。これらの試料間でハイブリダイゼーションシグナルを定量的に比較した。

【０２８０】

次いで、遺伝子が蛋白質レベルで差異的発現されていることを確認した。免疫細胞化学染色を用いることができない場合には、異なる細胞から得た蛋白質についてウエスタンブロット法を行った。

【０２８１】

異種移植モデルで長期に増殖するだけの初代乳癌細胞を用いた場合、ある種の分子分析は実施が難しい。このような分析は細胞系にて行うことができるが、本発明者らがかつて研究した、細胞系の初期継代を含む、多くの乳癌細胞系を用いることができる（Clarke他、Proc.Nati.Acad.Sci.USA.９２：１１０２４－２８（１９９５年１１月）；Hernandez－Alcoceba他、Human Gene Therapy１１（１１）：２０（２０００年９月）。初代乳癌細胞についてのアッセイで述べたように、様々なNotchリガンド、抗Notch４抗体又は対照抗体の存在下又は非存在下に、これらの細胞系を細胞密度を１個として培養した。クローン原性がNotchシグナリングによって影響を受ける場合には、マイクロアレイ分析のプローブを、様々なNotchリガンド、或いは抗Notch４抗体又は対照抗体の存在下又は非存在下に培養した細胞系から得たｃＤＮＡを用いて作製する。実質的に無限数の細胞を分析することができるので、増幅していないプローブを作製することができる。

【０２８２】

最後に、細胞系を用いることで、抗Notch４抗体がアゴニストであるかアンタゴニストであるかを有利に確認した。クローン原性が可溶性Deltaによって強化され抗Notch４抗体によって阻害されるということが、ある細胞系について同定された場合、その細胞系をこれらのアッセイに用いる。Notch誘導性ＨＥＴ－１プロモーターの制御下にて、ルシフェラーゼミニ遺伝子で安定的に細胞をトランスフェクトした［Jarriault他、Molecular & Cellular Biology１８（１２）：７４２３－３１（１９９８年１２月）］。細胞－細胞、Notch－Notchリガンド相互作用を避けるために、細胞濃度１で細胞を培養した。これらの細胞を、Notchリガンドの様々な組合せと、抗Notch４抗体又は対照抗体のいずれかとで処理した。細胞を回収しルシフェラーゼアッセイを行い、各条件がどのようにNotchシグナルトランスダクションに影響を与えるか（ＨＥＴ１プロモーターの転写促進として反映さ

れる）を調べた。

【０２８３】

マイクロアレイ分析から明らかになってきた候補遺伝子の、包括的機能分析を行うことができる。全長ｃＤＮＡを単離し、レトロウイルス発現ベクター内にクローニングした。５個の異種移植腫瘍から単離した乳癌細胞系及び乳癌幹細胞を生体外で感染し、対照ベクターで感染したクローンに比較して、レトロウイルス導入遺伝子が自己再生性及び腫瘍形成性に与える影響を検定した。導入遺伝子はＩＲＥＳ－ＧＦＰを含むバイシストロン性メッセージとして発現される。これによってＦＡＣＳ又は蛍光顕微鏡を用いた、形質導入細胞の同定が可能になる。導入遺伝子がNotchシグナリングに与える影響を生体外及び生体内で調べた。これには、組織培養でのコロニー形成及びマウスの腫瘍形成性に影響を与えると判明したNotchリガンドの様々な組合せに対して、形質導入細胞に応答性があるかどうかを調べた。

【０２８４】

候補遺伝子の発現パターンを生体内で詳細に調べ、遺伝子が異種移植を超えてどれだけ広く発現されるかを調べた。初代乳癌の切片から得た組織片の大量なインシトゥハイブリダイゼーションに加えて、研究対象として選択された遺伝子産物に対する抗体を作製した。ミシガン大学のHybridoma Core施設では、ペプチドと発現された組換え蛋白質との両方を用いたモノクローナル抗体の調製が盛んに行われている。

【０２８５】

最終的には、遺伝子ターゲティングで作製したノックアウトマウスを用いて、未知の遺伝子の機能を生体内で調べた。ミシガン大学のTransgenic CoreはハツカネズミＥＳ細胞技術を確立しているが、高い率で「生殖細胞系に入る」ＥＳ細胞を提供し、相同遺伝子組換えＥＳクローンの作製を補助している。

【０２８６】

マイクロアレイ分析によって多くの遺伝子の発現を同時に比較することができるが、これによって遺伝子発現パターンにおける変化をスクリーニングする非常に強力な手段が提供される。生体外で幹細胞を精製し自己再生性と分化を調節する技術と組み合わせて、特殊な型の調節遺伝子のスクリーニングを非常に正確に行うことができるマイクロアレイ分析を達成できる。

【０２８７】

実施例１５

Notchシグナリングが乳癌形成に与える影響

正常な乳房の成長と発達におけるNotchの重要性を確認するために、Notchリガンド又はアゴニストペプチドが乳房腫瘍幹細胞の成長及び腫瘍形成にに与える影響を調べた。

【０２８８】

Notch活性化が生体内で腫瘍形成に与える影響。Notchリガンドの様々な組み合わせが腫瘍形成に与える影響について、実施例１４で得たマイクロアレイデータとの関係を調べた。これらのアッセイは、悪性乳癌細胞の富化培養前後の異種移植腫瘍細胞を用いて行った。これによってNotchが幹細胞と原始細胞に与える影響をそれぞれ区別することが可能になった。Notchリガンドが各癌細胞集団の成長及び分化に与える影響を、生体内アッセイを用いて決定した。

【０２８９】

Notch刺激が生体内で腫瘍の成長に与える影響を調べるために、１，０００個、１０，０００個、１００，０００個の乳癌腫瘍細胞を、可溶性Notchリガンド１種又は２種以上の組合せと共に培養してあるいは対照培養基で培養して、ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスに（それぞれ６複製を）注射した。可溶性形状のDelta、Delta様、Jagged１及びJagged２と、Fringe族を用いた。各リガンド又はリガンドの様々な組合せと共に細胞を別々に２時間培養した。Notchリガンドと共に細胞をＭａｔｒｉｇｅｌ（Ｒ）に懸濁し、次いでマウスに注射した。腫瘍を形成するのに必要な細胞の数と、腫瘍を形成するのに必要な時間との両方に、各Notchリガンド刺激が与える影響を調べた。これによってNotchが生体内で腫瘍の成

長に影響を与えるかどうかを調べることができる。

【０２９０】

前出の実施例において、抗Notch４抗体は、細胞と一回の短い培養を行うことによって腫瘍形成を妨げた。次に５個の異種移植腫瘍それぞれから得た１，０００、１０，０００、１００，０００個の腫瘍形成性細胞を、対照抗体又は抗Notch４抗体のいずれかのみ、又は様々な組合せでDelta、Jagged及びFringe族蛋白質の様々な組合せと共に培養した。各群を、同じ抗体又はNotchリガンドを含む、Ｍａｔｒｉｇｅｌ（Ｒ）に混合してマウスに注射した。抗Notch４抗体が、腫瘍を形成するのに必要な細胞数及び時間に与える影響を測定した。得られた結果と、実施例１４で得たマイクロアレイ発現データとの関連を調べた。

【０２９１】

Notchによる刺激は、正常な乳幹細胞の増殖を引き起こした。正常な幹細胞の場合と同様に、Fringe族はDelta又はJaggedシグナリングを調節するはずである。Notchも又、乳癌幹細胞の自己再生性に役割を果たしていると考えられる。

【０２９２】

実施例１５

ヒト被験体

下記のヒト由来の試料を、本発明の診断法に用いた。（１）乳癌患者から得た初代腫瘍及び（２）転移性乳癌の患者から得た胸膜液。主治医によって腫瘍又は胸膜液の除去が臨床上必要であると判断された患者から、腫瘍又は胸膜液の一部分を通常の治療時に得た。

【０２９３】

例えばミシガン大学病院では、ＩＲＢに認証された試料採取プロトコルがある。患者は指示されたインフォームドコンセントに同意を求められることになるが、患者にはそれ以上の負担はかからない。

【０２９４】

実施例１６

脊椎動物

ミシガン大学は動物福祉法改訂版（７Ｕ．Ｓ．Ｃ．２１３１節以下参照）並びに動物に関する他の連邦制定法及び条例に従っている。本発明では実験用マウス系ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウス及び他の免疫無防備マウス系（Ｂｅｉｇｅ／ＳＣＩＤマウスなど）を使用している。

【０２９５】

マウスは病状を発達させる前に安楽死させられるので、癌細胞成長によってマウスが不快を感じることはない。腫瘍が原因でマウスに不快感を与えている証拠がある（姿勢、食欲又は行動における変化や体重低下）場合には、直ちに安楽死させられる。万一マウスが中程度以上の不快感（姿勢、食欲又は行動における変化や体重低下が指標となる）を示した場合には、経口モルヒネやコデイン鎮痛剤が投与される。エーテル又は他の同様の一般的な麻酔薬によって麻酔をかけている間に、マウスの眼窩後方静脈内に骨髄細胞を接種する。

【０２９６】

American Veterinary Medical Associationの安楽死委員会に推奨されているように、CO_2でマウスを犠牲にする。安全性且つ慈悲の観点からこの方法を採用した。

【０２９７】

実施例１７

乳癌幹細胞及び非腫瘍形成性乳癌細胞の細胞周期分析

マウス異種移植腫瘍から得た細胞を調べた。腫瘍中の乳癌幹細胞（図１９Ａ）と非腫瘍形成性細胞（図１９Ｂ）の細胞周期状態を、フローサイトメトリーによって調べた。いずれの細胞集団においても、細胞周期中のＧ１、Ｓ及びＧ２／Ｍ相にある細胞の分布は類似していた。従って腫瘍形成性細胞と非腫瘍形成性細胞は同様の細胞周期分布を呈示していた。

【０２９８】
本実施例では、充実腫瘍幹細胞マーカーを発現した全ての細胞が、分析される腫瘍において細胞周期の特定の段階にあるという可能性が除外された。低レベルでヘキスト染色した細胞を選択することによって造血幹細胞活性を富化できるのが可能であるのと同様に、ヘキスト染色した腫瘍幹細胞をフローサイトメトリー選別して細胞周期の特定の段階にある細胞を選択することによって、腫瘍形成性活性をさらに富化することが可能である。
【０２９９】
実施例１８
ローダミン１２３による乳癌幹細胞及び非腫瘍形成性乳癌細胞の染色
本実施例の目的は、乳癌幹細胞及び非腫瘍形成性癌細胞における、複薬剤耐性ポンプの活性を調べることにある。異種移植腫瘍の１つから得たＥＳＡ$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞（乳癌幹細胞）と非腫瘍形成性細胞とをローダミン１２３により染色した。
【０３００】
細胞内でのローダミン１２３染色の明暗度を決定する主な要因の一つとして、細胞から染料を排除するＭＤＲポンプ活性が挙げられる［Yumoto R.他、Drug Metabolism & Disposition２９（２）：１４５－５１（２００１）；Daoud R.他、Biochemistry３９（５０）：１５３４４－５２（２０００）］。この腫瘍から得た充実腫瘍幹細胞の幾つかは、非腫瘍形成性癌細胞に比べて、ローダミン１２３染色による明暗度が低いことが判明した（図２０）。
【０３０１】
本実施例は、腫瘍細胞に不均一性があることを示し、ＭＤＲポンプ活性が充実腫瘍細胞において、より高くなっているという可能性を示している。
【０３０２】
実施例１９
卵巣癌腫瘍におけるＢ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞集団の存在
卵巣癌の患者から細胞削減手術によって得た、腫瘍及び腹水の両方に由来する癌細胞を分析した。Ｂ３８．１が卵巣癌細胞によって発現されることはよく知られている。驚くべきことに、フローサイトメトリー分析によって、複数の細胞集団の存在が示され、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞集団が明らかに存在した（図２１）。
【０３０３】
この細胞集団の表現型は乳癌幹細胞に類似しており、卵巣癌幹細胞を代表するものと考えられる。
【０３０４】
実施例２０
肉腫におけるＢ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞集団の存在／乳癌幹細胞データとの比較
Ｂ３８．１抗原は、乳癌と卵巣癌においてのみ発現されることが報告されている。ＶＰ１６で処理したＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスの両脇腹に肉腫細胞を接種することによって、２つの肉腫を得た。腫瘍の１つを摘出してフローサイトメトリーで調べた。驚くべきことに、肉腫細胞はＢ３８．１抗原を発現していた。その上更に、ＣＤ４４について３つの異なる細胞集団（高レベル、低レベル、陰性）が存在した（図２２）。
【０３０５】
従って、腫瘍細胞は表現型が乳癌幹細胞に類似したＣＤ４４＋細胞集団を含んでおり、また腫瘍幹細胞を代表するものと考えられる。
【０３０６】

【表７】

表　７
腫瘍Ｔ１及びＴ２細胞における異なる細胞集団における腫瘍形成性

	腫瘍数／注射回数		
細胞／注射	8×10^5	5×10^5	2×10^5
Ｔ１細胞			
ＣＤ４４$^-$	０／２	０／２	－
ＣＤ４４$^+$	２／２	２／２	－
Ｂ３８．１$^-$	０／２	０／２	－
Ｂ３８．１$^+$	２／２	２／２	－
ＣＤ２４$^+$	－	－	１／６
ＣＤ２４$^-$	－	－	６／６
Ｔ２細胞			
ＣＤ４４$^-$	０／２	０／２	－
ＣＤ４４$^+$	２／２	２／２	－
Ｂ３８．１$^-$	０／２	０／２	－
Ｂ３８．１$^+$	２／２	２／２	－
ＣＤ２４$^+$	－	－	１／６
ＣＤ２４$^-$	－	－	６／６

指示マーカーの発現に基づいて図２に記載のようにフローサイトメトリーで細胞を単離し、ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスの乳房脂肪パッドに２－8×10^5細胞を注入したあとに腫瘍を形成する能力について検定した。「形成された腫瘍の数／注射回数」を各細胞集団について示した。

【０３０７】
実施例２１
ポリヌクレオチドプローブの調製
全ＲＮＡ源からの１ラウンドＲＴ標識化。単離充実腫瘍幹細胞又は充実腫瘍幹細胞富化集団から単離されたポリヌクレオチドとして、細胞から抽出されたＲＮＡ又は抽出されたＲＮＡから作製された相補的ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）を用いることができる。
【０３０８】
本発明の方法の幾つかの態様（例えばハイブリダイゼーションに関与する態様）においては、標識化ｃＤＮＡが有用である。一つの態様においては、全ＲＮＡ源からの１ラウンドＲＴ標識化方法を用いる。
【０３０９】
標識化反応に関与するＲＮＡの質は、ハイブリダイゼーションの質に顕著な影響を与えうる。標準的な分子生物学の基準で良好に見えるＲＮＡ調製物でも、良好な結果が得られ

ないこともある。典型的な問題点として、ハイブリダイズ全表面にわたって分散した微粒子ノイズや、スライド上のＤＮＡ固定領域への非特異的な蛍光標識の結合が挙げられる。これらの問題は炭水化物による汚染に由来していると考えられる。炭水化物の汚染について考えられるのと同様に、標識化前後のエタノール沈降によって問題が悪化していることが予想される。純粋でない調製物を用いた場合、標識化とエタノール沈降の後に沈降を行うと、実質的に溶解しない目視可能な凝集物がしばしば形成される。核酸を炭水化物と共に乾燥した場合又は両者で共沈降を行った場合、強度の凝集物を形成することがよく知られている。この相互作用が、セルロース等のクロマトグラフィー支持体上に核酸を固定する基礎となっている。この種の問題を最小限に抑えるために、ＲＮＡ調製時及び標識化時に少量のエタノールを用いた又は好ましくは全くエタノールを用いない沈降を行う調製工程が勧められる。ここでは少なくとも、処理する細胞数に対して必要とされる分量だけの抽出溶媒及び洗浄溶液を用いた。適当な又はわずかに超過した抽出／洗浄量にすることで、ハイブリダイゼーションアッセイのノイズを最小限に抑えることができる。

【０３１０】

上記を充分に満足する方法として、トリアゾール抽出（ＢＲＬ）及びＲｎｅａｓｙ（Ｑｕｉａｇｅｎ）が挙げられる。

【０３１１】

全ＲＮＡを組織（充実腫瘍又は異種移植腫瘍）、フローサイトメトリーによって得た充実腫瘍幹細胞の組織培養、又は富化培養から調製した。調製したＲＮＡを、＞６ｍｇ／ｍｌのＲＮＡ濃度になる分量でＤＥＰＣ水中に懸濁した。最終調製工程で基質から回収したＲＮＡが希薄すぎる場合、ＭｉｃｒｏＣｏｎ３０（Ａｍｉｃｏｎ）を用いてＲＮＡの濃度を決定して、標識化に必要な濃度に濃縮した。５０ｍＭ　ＮａＯＨ中で少量の試料（Ａ２６０）の数値を読みとって確認した。

【０３１２】

ヌクレオチド混合物として、１０×低ＴｄＮＴＰ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ（米国ミズーリ州セントルイス）［２７－２０３５－０２］の１００ｍＭ　ｄＮＴＰ）を使用した。

【０３１３】

【表８】

表　８
ヌクレオチド混合物

ヌクレオチド	μｌ	ｍＭ最終（１／１０）濃度
ｄＧＴＰ	２５	０．５
ｄＡＴＰ	２５	０．５
ｄＣＴＰ	２５	０．５
ｄＴＴＰ	１０	０．２
水	４１５	
全量	５００	

【０３１４】

蛍光ヌクレオチドをAmersham Life Sciences又はPerkin Elmer Applied Biosystems Divisionから入手した。FluoroLinkＣｙ３－ｄＵＴＰ（＃４０１－８９６）又はFluoroLinkＣｙ５－ｄＵＴＰを使用した。Ｃｙ３及びＣｙ５ヌクレオチドの濃度は１ｍＭであった。

【０３１５】
Ｒ１１０ヌクレオチドの濃度は０．１ｍＭであり、最初の体積の０．１倍に乾燥及び再懸濁して１ｍＭにする必要があった。現在、標識化効率、蛍光量、スペクトル分離及び非特異的結合の傾向といった要素から、Ｃｙ３／Ｃｙ５が検出システムに最も適した組み合わせとなっている。
【０３１６】
標識化反応用のプライマーとして、オリゴ（ｄＴ）１２－１８（２７－７８５８－０１、Pharmacia）を用いることができる。Pharmacia１００ｍＭ母液から非標識化ヌクレオチド混合物を調製した。逆転写酵素としてＢＲＬ　ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔＩＩ（１８０６４－０１４）を用いた。５×緩衝液としてポリメラーゼを加えた緩衝液を用いた。
【０３１７】
マイクロアレイ用として、マイクロアレイに配置されたハウスキーピング遺伝子を参照して２種の蛍光標識を規格化した。
【０３１８】
質量標準及びＲＮＡ品質標準として、ｐＳＰ６４ポリ（Ａ）ベクター内でクローン大腸菌遺伝子にファージＲＮＡポリメラーゼを用いて、合成ｃＤＮＡのカクテルを作製した。可能であれば、１７μｌのＤＥＰＣ水中に１００μｇのＲＮＡを含む全ＲＮＡ溶液を調製する。さもなくば、１００ｍｇの全ＲＮＡをエタノール沈降して、標識化反応用に試料を濃縮する。残留エタノールは標識化の効率を妨げるので、全ての残留７０％エタノール洗浄液を、乾燥文は真空吸引で除去する。
【０３１９】
ＤＥＰＣ水にペレットを再懸濁し、最終容量を１７ｍｌとした。全ての残留沈殿物を遠心分離で除去した。最後に反応液にＲＮＡを添加した。
【０３２０】
蛍光ヌクレオチド（ＮＴＰ）ＲＴ標識化：下記を添加した。
【０３２１】
【表９】

表　９
逆転写酵素標識化

成分	μｌ
５×第１の鎖緩衝液	８
オリゴ（ｄＴ）１２－１８（５００μｇ／ｍｌ）	２
１０×低ｄＴ　ＮＴＰ混合物	４
蛍光ｄＵＴＰ（１ｍＭ）	４
０．１Ｍ　ＤＴＴ	４
ＲＮＡｓｉｎ	１
合成ｍＲＮＡ鎖（０．０６μｇ）	０．５
１００ｍｇ全ＲＮＡ	１７．０
計	４０

【０３２２】
ＲＮＡｓｉｎを添加した後、試料を旋回撹拌した。撹拌中に生じる気泡を最小限に抑えた。
【０３２３】
試料を６５℃に５分間保持した後、４２℃にした（プログラムＲ１）。次いで、２μｌのＳＳＩＩ酵素を添加した。酵素が反応液に充分に混合されていることを確認した。次に４２℃で２５分間保温した。２μｌのＳＳＩＩ酵素を添加した。酵素が反応液に充分に混合されていることを確認した。次いで４２℃で３５分間保温した。ＮａＯＨを添加する前に、５μｌの５００ ｍＭ ＥＤＴＡを添加して反応を停止した。
【０３２４】
１０ｍｌの１Ｍ ＮａＯＨを添加した。６５℃で６０分間保温して残留ＲＮＡを加水分解した。室温まで冷却し、２５μｌの１Ｍ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）を添加した。
【０３２５】
プローブのクリーンアップと分析用として、Ｍｉｃｒｏｃｏｎ３０に移し、約２０μｌ（エッペンドルフ５４１５Ｃ中で１４，０００ｒｐｍにて約３．５分間）に濃縮した。２００μｌのＴＥ（ｐＨ７．５）を添加して洗浄し、約２０μｌ（１４，０００ｒｐｍにて４－４．５分間）に濃縮した。きれいな収集管の上で容器を逆さにし、３０００ｒｐｍで３分間回転させて生成物を回収した。
【０３２６】
Ｃｙ５プローブがゼラチン状の青い沈殿物を生じることがあり、濃縮形状で回収される。この物質の存在は汚染物質の存在を示している。汚染の程度が大きいほど、このゲルにとらえられるプローブの断片は大きくなる。熱で溶解しても、この物質はＤＮＡ標的に一様で非特異的な結合をする特性がある。
【０３２７】
遠心分離濾過によって濃縮するが、望ましい最終量を得るのに必要な時間は場合によって異なる。過度に長い遠心分離を行うことで、濾過される溶液から殆ど全ての水を除去できる。蛍光標識化核酸をこのようにフィルター上で濃縮すると、非常に除去しにくくなる。従って、従来の近似値法で必要な回転回数ををを求め、望ましい体積を得る。
【０３２８】
分析用に２μｌアリコートのＣｙ５プローブを取り出し、１７－１８μｌをハイブリダイゼーション用に残して、ＴＡＥ中、２％アガロースゲル（ゲル寸法：幅６ｃｍ×長さ８．５ｃｍ、歯幅２ｍｍ）上にこのプローブを泳動する。ゲル上で泳動している試料を蛍光分析にかける際に最大の感度を得るために、最小限の染色剤とととともにローディング緩衝液を用いて、臭化エチジウムをゲル又は泳動緩衝液に添加した。
【０３２９】
Molecular Dynamics Storm 蛍光スキャナー（設定値：赤色蛍光、２００ミクロン解像度、ＰＭＴ上で１０００ボルト）上で、ゲルをスキャンした。標識化がうまくいった場合、低分子量転写物の蓄積と共に、４００ｂｐ～＞１０００ｂｐのプローブの高密度スミアーが得られる。標識化が薄く、低分子量物質が著しく多い場合には、標識化がうまくいかなかったことを意味する。
【０３３０】
ハイブリダイゼーション。遮断剤としてポリ（ｄＡ）［Pharmacia（２７－７９８８－０１）、８ｍｇ／ｍｌで再懸濁］；酵母菌ｔＲＮＡ［Sigma（Ｒ８７５９）、４ｍｇ／ｍｌで再懸濁］；及びＣｏＴ１ＤＮＡ［Life Technologies Inc.、１０ｍｇ／ｍｌに１０倍濃縮］を用いた。
【０３３１】
ハイブリダイゼーションに必要な量は、用いるアレイの寸法に依存する。少量（２０－２５μｌ）を必要とするハイブリダイゼーションとしては、Ｍｉｃｒｏｃｏｎ濃縮後のプローブ量が多すぎることがある。その場合には、Ｃｙ３プローブに遮断剤を添加し、Ｃｙ

３プローブを沈降させる。

【０３３２】

１０ｍｌハイブリダイゼーションにつき、８ｍｇのポリ（ｄＡ）；４ｍｇのｔＲＮＡ；及び１０ｍｇのＣｏＴ１ＤＮＡを添加した。

【０３３３】

【表１０】

表　１０

ハイブリダイゼーションプローブ混合物

Ｃｙ３標識化プローブ	～２０μｌ
ポリｄＡ（８ｍｇ／ｍｌ）	１μｌ
酵母菌ｔＲＮＡ（４ｍｇ／ｍｌ）	１μｌ
ＣｏＴ１　ＤＮＡ（１０ｍｇ／ｍｌ）	１μｌ

【０３３４】

２μｌの３Ｍ酢酸ナトリウム（ｐＨ５．５）を添加し、次いで６０μｌのエタノールを添加し、遠心分離にかけてから軽く乾燥し、～１７μｌのＣｙ５プローブに再懸濁した。アレイが約４０μｌのプローブを必要とする場合には、Ｃｙ３及びＣｙ５の濃縮物を取り置いて遮断剤を直接添加するので、沈降させる必要はない。

【０３３５】

次いで、２０μｌのハイブリダイゼーション混合物につき３μｌの２０×ＳＳＣを添加した。この時点で、２０μｌのハイブリダイゼーション混合物につき１μｌの５０×デンハートブロック液を任意に添加した。純度の高いプローブを用いたところ、デンハート液には目視できる変化はなかった。

【０３３６】

次いで、９８℃で２分間加熱し、４５℃に冷却し、２０μｌのハイブリダイゼーション混合物につき０．２μｌの１０％ＳＤＳを添加した。アレイに適用し、密閉した加湿チャンバ内で６５℃にて（１６－２４時間）ハイブリダイズした。

【０３３７】

洗浄。残留した未結合のプローブを室温にて２－５分間、数回洗浄してスライドから除去した。第１の洗浄は０．５×ＳＳＣ、０．０１％ＳＤＳで行った。第２回の洗浄は０．０６×ＳＳＣで行った。この工程の後スライドを空気乾燥したところ、蛍光のもやがスライド表面に残った。低いＧで短時間回転させてスライドから緩衝液を除去した。スライドをスライドホルダーに載せ、スライドホルダーを保持できる（水平の）スイング式支持体を有する遠心分離器にかけた。マイクロタイター板を遠心分離にかけるのに使われる、ほとんどの型の遠心分離器を用いることができる。

【０３３８】

上記の説明は、例証のみを目的とするものであって、上記に開示の形態にのみ本発明を限定することを企図するものではなく、本発明は付属の請求項によって定義される。

【図面の簡単な説明】

【図１】　充実腫瘍の不均一性の二つのモデルを示す図である。古典的モデル（図１Ａ）では、突然変異又は環境的差異が、腫瘍細胞に異なる様々な表現型を採らせる。白色、緑色及び赤色の細胞によって表される、環境的に決定される表現型の差異は、可逆的であり得るが、紫色の細胞によって表される、突然変異によって決定される表現型の変化は、不可逆的であり得る。異なる様々な表現型を有する多くの細胞は、広範囲に増殖し、新たな

腫瘍を形成する潜在的能力を有すると考えられる。この腫瘍幹細胞モデル（図１Ｂ）は、腫瘍形成性である腫瘍細胞（黄色の細胞）の小さい集団のみを有するにすぎないことを特徴とする。これらの腫瘍幹細胞は、無限の増殖可能性、新たな腫瘍を形成できる能力、及び不均一な、代表的には腫瘍塊を形成する、非腫瘍形成癌細胞を生じ得る能力によって特徴付けられる。

【図２】　乳癌腫瘍細胞の一連のＦＡＣＳプロットである。ヒトの患者２名から取り出した原発性乳癌の腫瘍細胞を、マウスに移植した。結果として生じた腫瘍を、マウスから取り出し、単細胞懸濁液を作成した。細胞を、抗ＣＤ４４－ＰＥ、抗５２０Ｃ９－ＡＰＣ、抗マウスＨ２Ｋ－ＦＩＴＣ（浸潤性マウス細胞を染色）及びヨウ化プロピジウム（ＰＩ、死細胞を染色）で染色した。生存する、ヒトＣＤ４４$^{+}$及びヒトＣＤ４４$^{-}$細胞を、単離し、in vitro及びin vivoでの研究に用いた。

【図３】　悪性胸部細胞によるＣＤ２４の発現を示す、一連のＦＡＣＳプロットである。細胞を単離し、図２に記載したとおりに染色した。マウス細胞及び死細胞は、分析から除外した。３種類の乳癌腫瘍からの細胞のＦＡＣＳプロットを示す。３種類すべての腫瘍からの細胞が、類似の表現型を有することに注目されたい。

【図４】　ヒト乳癌からのＣＤ２４$^{-}$細胞集団から生じた腫瘍の分析を示す、一連のＦＡＣＳプロットである。充実腫瘍幹細胞モデルによれば、ＣＤ２４$^{-}$細胞は、ＣＤ２４$^{+}$及びＣＤ２４$^{-}$双方の細胞を含む腫瘍を生じる。したがって、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ２４$^{-}$細胞を用いて、二次移植片を実施した（図４Ａ）。得られた腫瘍を取り出し、細胞を、Ｂ３８．１及びＣＤ２４発現に関して再分析した。幹細胞モデルによって予測されたとおり、移植されたＢ３８．１$^{+}$ＣＤ２４$^{-}$細胞から生じた腫瘍から得られた細胞は、Ｂ３８．１とＣＤ２４との双方の発現に関して不均一であった（図４Ｂ）。Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ２４$^{-}$細胞によって開始された腫瘍から単離された、細胞のマーカー発現パターンは、本来の腫瘍のそれに類似した（図４）。

【図５】　Notch４発現の分析を示す、ＦＡＣＳプロットである。細胞を、マウス異種移植腫瘍（下記参照）から単離し、抗体で染色した。悪性細胞を、Ｂ３８．１及びNotch４の発現について分析した。マウス細胞及び死細胞は、分析から除外した。

【図６】　ＣＤ４４発現に基づく乳癌細胞の分画を示すプロットである。腫瘍Ｔ１の細胞（図６Ａ、６Ｃ及び６Ｅ）及び腫瘍Ｔ２の細胞（図６Ｂ、６Ｄ及び６Ｆ）を、抗ＣＤ４４－ＰＥ、抗Ｈ２Ｋ－ＦＩＴＣ、及び生存率染料の７ＡＡＤで染色した。フローサイトメトリーを用いて、生存するヒト（Ｈ２Ｋ－）細胞を単離したが、それらは、ＣＤ４４$^{+}$（図６Ｃ、６Ｄ）又はＣＤ４４$^{-}$（図６Ｅ、６Ｆ）のいずれかであった。死細胞（７ＡＡＤ$^{+}$）は、すべての分析から除外した。図６Ａ及び６Ｂは、未分画Ｔ１及びＴ２細胞のドットプロットであって、表示されたとおりのＣＤ４４及びＨ２Ｋ発現を示す。単離されたＣＤ４４$^{+}$（図６Ｃ、６Ｄ）及びＣＤ４４$^{-}$（図６Ｅ、６Ｆ）の集団を示すプロットは、フローサイトメトリーによって単離された細胞の再分析を表す。これらの細胞を、マウスの乳房脂肪パッドに注入して、その腫瘍形成性を調べた。表１及び３は、ＣＤ４４$^{+}$細胞は腫瘍形成性であるが、ＣＤ４４$^{-}$はそうではなかったことを示す。

【図７】　腫瘍形成細胞の単離を示す図である。フローサイトメトリーを用いて、ＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスにおける腫瘍形成性について試験した、腫瘍Ｔ１（図７Ａ、７Ｄ及び７Ｇ）、腫瘍Ｔ２（図７Ｂ、７Ｅ及び７Ｆ）又は腫瘍Ｔ５（図７Ｃ、７Ｆ、７Ｉ）の細胞の下位集団を単離した。Ｔ１及びＴ２細胞は、ＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスで一回継代させたが、腫瘍Ｔ５細胞は、患者から取り出した直後に凍結した材料から得た。細胞は、抗Ｂ３８．１－ＡＰＣ、抗ＣＤ４４－ＰＥ、抗ＣＤ２４－ＦＩＴＣ、抗ＬＩＮＥＡＧＥ－Cytochrome、抗マウスＨ２Ｋ－Cytochrome（Ｔ１及びＴ２細胞のみ）、及び７ＡＡＤで染色した。各ドットプロットは、生存ヒトＢ３８．１$^{+}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞のＣＤ２４及びＣＤ４４染色パターンを表す。図７Ａ、７Ｂ及び７Ｃは、未分画腫瘍細胞を示す。ＣＤ２４$^{-/lo}$（図７Ｇ、７Ｈ、７Ｉ）又はＣＤ２４$^{+}$（図７Ｄ、７Ｅ、７Ｆ）のいずれかである、Ｂ３８．１$^{+}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞を、これらの腫瘍細胞からフローサイトメトリーによって単離した。図７Ｄ～７Ｉは、選別されたこれらの集団の再分析を表し、次いで、これらを

ＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスの乳房脂肪パッドに注入して、腫瘍形成性を試験した。図７Ｊは、マウスのＢ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{+}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$注入部位ではなく、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$注入部位での代表的な腫瘍を示す。ＣＤ２４$^{+}$（図７Ｋ、対物倍率２０ｘ）及びＣＤ２４$^{-/lo}$（図７Ｌ、対物倍率４０ｘ）注入部位からの組織に対して実施した組織学は、それぞれ、正常なマウス組織、及び悪性細胞を示した。

【図８】　ＥＳＡ発現に基づく腫瘍形成細胞の富化を示すプロットである。フローサイトメトリーを用いて、ＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスにおける腫瘍形成性について試験した、腫瘍Ｔ１細胞の下位集団を単離した。Ｔ１細胞は、ＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスで一回継代させた。細胞は、抗Ｂ３８．１－ＡＰＣ、抗ＣＤ４４－ＰＥ、抗ＥＳＡ－ＦＩＴＣ、抗ＬＩＮＥＡＧＥ－Cytochrome、抗マウスＨ２Ｋ－Cytochrome（Ｔ１）、及び７ＡＡＤで染色した。死細胞（７ＡＡＤ$^{+}$）、マウス細胞（Ｈ２Ｋ$^{+}$）及びＬＩＮＥＡＧＥ$^{+}$細胞は、分析から除外した。図８Ａのドットプロットは、生存ヒトＢ３８．１$^{+}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞のＣＤ２４及びＥＳＡ染色パターンを示す。腫瘍形成集団を、四角で囲み、矢印で示す。図８Ｂでは、ＥＳＡ$^{+}$Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞（左のパネル）、及び残余のＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$Ｈ２Ｋ$^{-}$細胞（右のパネル）を、フローサイトメトリーを用いて採集した。

【図９】　in vitroクローン形成アッセイの結果を示す図である。フローサイトメトリーを用いて、腫瘍形成細胞、又はその他の非腫瘍形成新生物（非腫瘍形成細胞）を、記載のとおり単離した。細胞は、可溶性Deltaを含有する組織培養培地に、表示された日数だけ入れた。腫瘍形成及び非腫瘍形成異種移植片である腫瘍１（Ｔ１）（図９Ａ）、腫瘍４（Ｔ４）（図９Ｂ）、又は原発性の患者（図９Ｃ）細胞を、組織培養に入れた後の表示された時間に示す。Ｔ４細胞を、パパニコラウ染色で染色し、光学顕微鏡（対物１００ｘ）下で調べた。非腫瘍形成（図９Ｄ）及び腫瘍形成（図９Ｅ）集団は、ともに、巨大な核、及び傑出した仁を有する新生物細胞からなることに注目されたい。組織培養プレートに付着した細胞の数は、両集団で類似しているが、腫瘍形成集団は、常にコロニーを生じることにも注目されたい。非腫瘍形成集団は、確立されたコロニーを生じない（又は短い期間、約２～６日間のみ生じる）。

【図１０】　Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞から生じた腫瘍における表現型の多様性を示す、一連のドットプロットである。このドットプロットは、腫瘍Ｔ１（図１０Ａ～１０Ｃ）又は腫瘍Ｔ２（図１０Ｄ～１０Ｆ）からの生存ヒトＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞のＣＤ２４及びＣＤ４４染色パターンを示す。図１０Ａ及び１０Ｄは、ＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスで一回継代させた腫瘍から得た未分画Ｔ１及びＴ２細胞を示す。Ｔ１（図１０Ｂ）又はＴ２（図１０Ｅ）からのＢ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞を、上記図２に記載したとおりに単離した。図１０Ｂ及び１０Ｅで再分析したＢ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$集団を、ＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスの乳房脂肪パッドに注入した。図１０Ｃ及び１０Ｆは、これらのＢ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞から生じた腫瘍の分析を示す。いずれの事例でも、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞は、本来の腫瘍で観察されたのと同様の表現型が多様な集団を含む腫瘍を形成したことに注目されたい。

【図１１】　ＨＥＲ２／ｎｅｕ及びＥＧＦ－Ｒの発現を示す図である。フローサイトメトリーを用いて、ＮＯＤ／ＳＣＩＤ系マウスで一回継代させた、腫瘍Ｔ１細胞の下位集団を単離した。図１１Ａで、細胞を、抗ＥＧＦ－Ｒ－ＰＥ、抗Ｂ３８．１－ＡＰＣ、抗ＣＤ２４－ＦＩＴＣ、抗ＬＩＮＥＡＧＥ－Cytochrome、抗マウスＨ２Ｋ－Cytochrome及び７ＡＡＤで染色したか、又は図１１Ｂで、抗ＨＥＲ２／ｎｅｕ－ＦＩＴＣ、抗Ｂ３８．１－ＡＰＣ、抗ＣＤ２４－ＰＥ、抗ＬＩＮＥＡＧＥ－Cytochrome、抗マスＨ２Ｋ－Cytochrome、及び７ＡＡＤで染色した。死細胞（７ＡＡＤ$^{+}$）、マウス細胞（Ｈ２Ｋ$^{+}$）及びＬＩＮＥＡＧＥ$^{+}$細胞は、すべての分析から除外した。図１１Ａのヒストグラムは、染色されなかった細胞（点線）、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ２４$^{-}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$腫瘍形成集団（斜線）、及びＢ３８$^{+}$ＣＤ２４$^{+}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$非腫瘍形成集団（実線）のＥＧＦ－Ｒ発現を表す。図１１

Ｂのヒストグラムは、染色されなかった細胞（点線）、Ｂ３８．１$^{+}$ＣＤ２４$^{-}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$腫瘍形成集団（斜線）、及びＢ３８$^{+}$ＣＤ２４$^{+}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$非腫瘍形成集団（実線）のＨＥＲ２／ｎｅｕ発現を表す。ＲＴ－ＰＣＲを、入れ子（nested）プライマーを用いて実施して、ＥＧＦ－Ｒを検出するか（図１１Ｃ及び１１Ｄ）、又はＨＥＲ２／ｎｅｕを検出した（１１Ｅ）。サンプルあたり１細胞を図１１Ｄ及び１１Ｅのパネルでか、又はサンプルあたり１０細胞を図１１Ｃで分析した。ＥＧＦ－Ｒは、腫瘍形成細胞では、タンパク質（図１１Ａ）及びｍＲＮＡ（図１１Ｃ、１１Ｄ）レベルの双方で、非腫瘍形成細胞より低レベルで発現される。

【図１２】　抗Notch４抗体との接触後に組織培養に入れた乳癌細胞の顕微鏡写真である。細胞を、抗Notch４抗体なしの可溶性Deltaとともにか、もしくはそれなしにか、抗Notch４抗体とともにか、又は抗体を生成するのに用いたペプチドとともに前温置した抗Notch４抗体とともに、ＨＢＳＳ中の氷上で１時間温置した。三重の実験で形成された、コロニーの数を示す。可溶性Deltaを培養体に加えた。可溶性DeltaなしのＦｃ制御培地を培地に加えた。記号：Ab＝抗Notch４抗体；Block＝抗Notch４抗体を生成するのに用いたペプチド。

【図１３】　腫瘍内のＢ３８．１$^{+}$細胞の模式図である。多数の患者からの乳癌幹細胞がＢ３８．１$^{+}$である。遺伝子療法のアプローチで成功裡に癌を治療するために、これらの細胞をベクターによる標的とすることができる。

【図１４】　双特異性結合体を得る方法、及び抗体に導入された化学的改変を説明する図である。

【図１５】　アデノウイルスを再標的化するための大方針を示す図である。ＬａＺウイルスは、腫瘍からのほとんどの細胞に感染することができる。ＬａＺウイルスを、抗線維抗体のみとともに温置した後、ＬａＺウイルスは、すべての細胞に感染できる能力を失う。ＬａＺウイルスを、双特異性結合体とともに温置した後は、分子のＢ３８．１部分は、Ｂ３８．１$^{+}$細胞へのウイルスの付着を許すため、これらの細胞のみが感染するにすぎない。

【図１６】　双特異性抗体による乳癌幹細胞の標的化を示す棒グラフである。異なる細胞系を、ＡｄＬａＺ、すなわちβ－ガラクトシダーゼ遺伝子を発現するＥ１欠失アデノウイルスに感染させた（灰色の棒、ウイルス感染についての対照）。ある場合には、ウイルスを、感染前に抗線維抗体とともに３０分間温置した（黄色の棒）。他の場合には、ウイルスを、双特異性結合体とともに温置した（緑色の棒）。感染の２４時間後、単層を固定し、Ｘ－Ｇａｌ含有緩衝液とともに温置した。感染した細胞は、青色であり、グラフは、得られた青色の細胞の対照となる感染に対する百分率（すなわち、異なる抗体との温置後の、ウイルスの感染率の上昇又は低下）を示す。

【図１７】　双特異性抗体が、乳癌幹細胞をアデノウイルスの標的とさせることができることを示す棒グラフである。棒は、１視野あたりの感染細胞の絶対数を表す。灰色：指定された細胞は、対照アデノウイルスに感染。黄色：指定された細胞は、抗線維抗体とともに温置されたアデノウイルスに感染。緑色：指定された細胞は、双特異性結合体抗体とともに温置した。赤色：細胞を、双特異性結合体とともに温置したウイルスに感染させたが、過剰なＢ３８．１抗体とともに温置した。

【図１８】　Ｘ－Ｇａｌ染色後の細胞単層のいくつかの写真である。感染した細胞は、この白黒写真では、暗い点のように見える（ＬａＺウイルスのβ－ガラクトシダーゼ遺伝子は、核局在化シグナルを有する）。染色は、細胞の核でなされる。

【図１９】　乳癌内の細胞の異なる集団を分析したグラフである。ＥＳＡ$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞の乳癌幹細胞（図１９Ａ）及びＥＳＡ$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{+}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$非腫瘍形成細胞（図１９Ｂ）を、図８に記載のとおり得た。細胞は、Eaves及び同僚が記載したとおり［Glimm, H. et al., Blood 96(13): 4185-93 (2000)］、ヘキスト３３３４２で染色した。乳癌幹細胞のヒストグラムに斜線を施した。乳癌幹細胞及び非腫瘍形成細胞は、細胞周期のすべての期に分布していることに注目されたい。

【図２０】　乳癌内の細胞の異なる集団をさらに分析したグラフである。ＥＳＡ$^{+}$ＣＤ４

4^{+}ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞の乳癌幹細胞及びＥＳＡ$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{+}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$非腫瘍形成細胞を、図７に記載のとおり得た。細胞は、Spantrudeら［Blood 85(4): 1006-16 (1995)］が記載したとおり、ローダミン１２３で染色した。乳癌幹細胞のヒストグラムに斜線を施した。乳癌幹細胞は、ローダミン１２３には比較的弱く染まる傾向があることに注目されたい。

【図２１】　卵巣癌幹細胞について腹水を分析したドットプロットである。細胞を、抗Ｂ３８．１－ＡＰＣ、抗ＣＤ４４－ＰＥ、抗ＣＤ２４－ＦＩＴＣ、抗ＬＩＮＥＡＧＥ－Cytochrome及び７ＡＡＤで染色した。死細胞（７ＡＡＤ$^{+}$）及びＬＩＮＥＡＧＥ$^{+}$細胞は、分析から除外した。乳癌幹細胞に類似する、際立ったＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞集団が存在することに注目されたい。

【図２２】　充実腫瘍幹細胞について肉腫細胞を分析したドットプロットである。異種移植片モデルで増殖させたＰ１肉腫細胞を、抗Ｂ３８．１－ＡＰＣ、抗ＣＤ４４－ＰＥ、抗ＣＤ２４－ＦＩＴＣ、抗ＬＩＮＥＡＧＥ－Cytochrome、抗Ｈ２Ｋ－Cytochrome及び７ＡＡＤで染色した。死細胞（７ＡＡＤ$^{+}$）、ＬＩＮＥＡＧＥ$^{+}$細胞及びマウス細胞は、分析から除外した。この分析における系譜カクテルは、ＣＤ１０、ＣＤ３１又はＣＤ１４０ｂを含まないことに注目されたい。際立ったＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-/lo}$ＬＩＮＥＡＧＥ$^{-}$細胞集団が存在することにも注目されたい。

【図１Ａ】

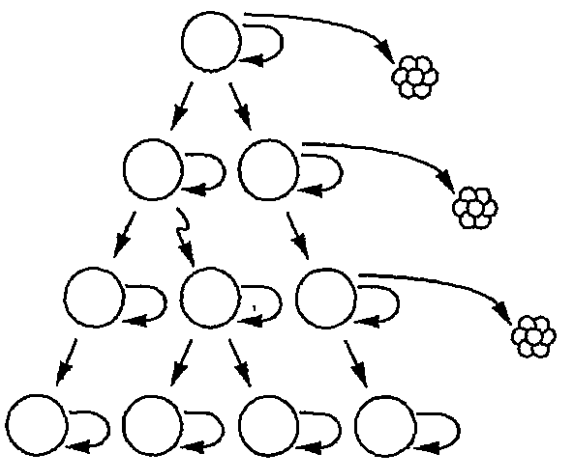


FIG. 1A

【図１Ｂ】

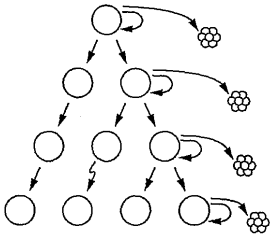
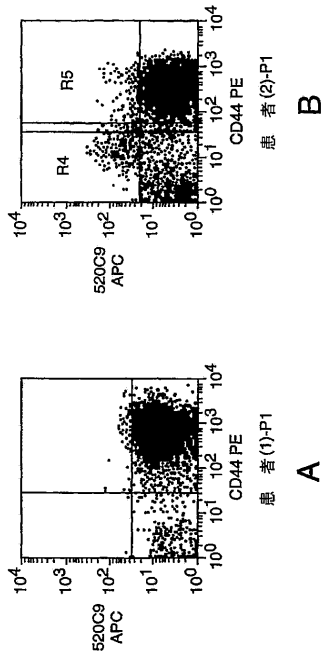
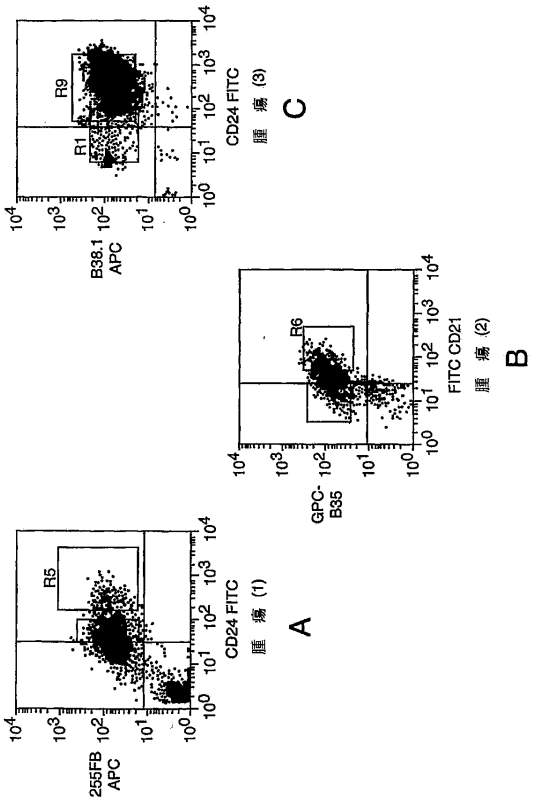


FIG. 1B

【図２】



【図３】



【図４Ａ】

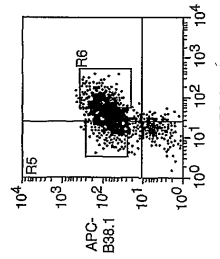


FIG. 4A

【図４Ｂ】

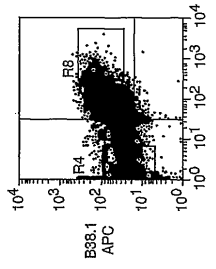


FIG. 4B

【図５】

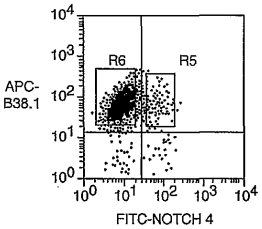


FIG. 5

【図６Ａ】

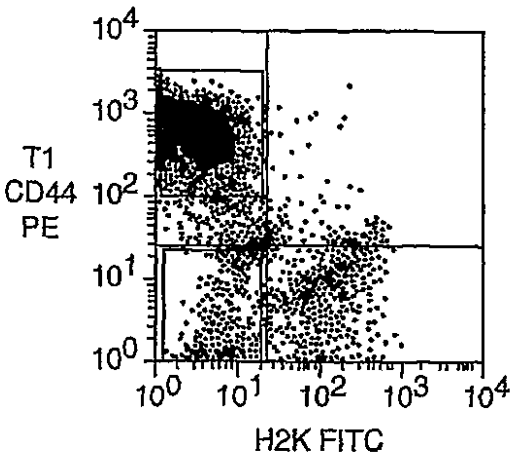


FIG. 6A

【図６Ｂ】

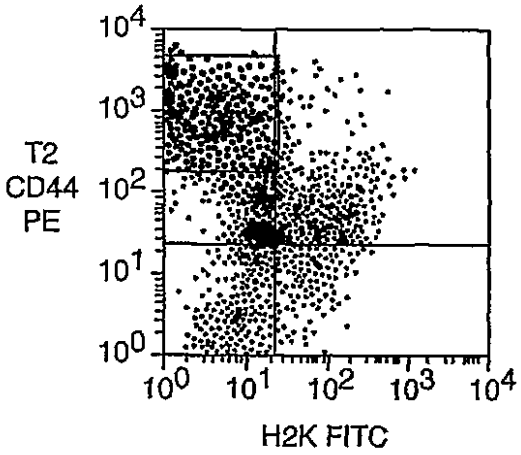


FIG. 6B

【図６Ｃ】

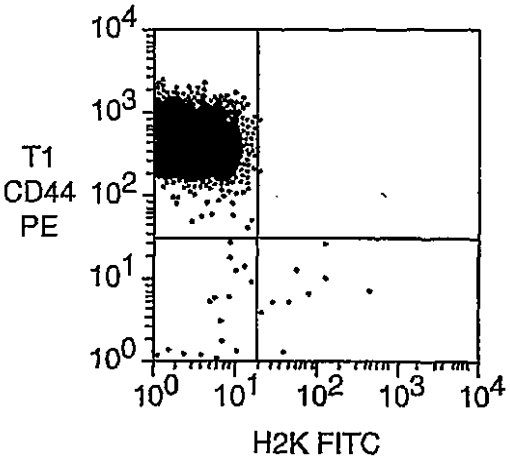


FIG. 6C

【図６Ｄ】

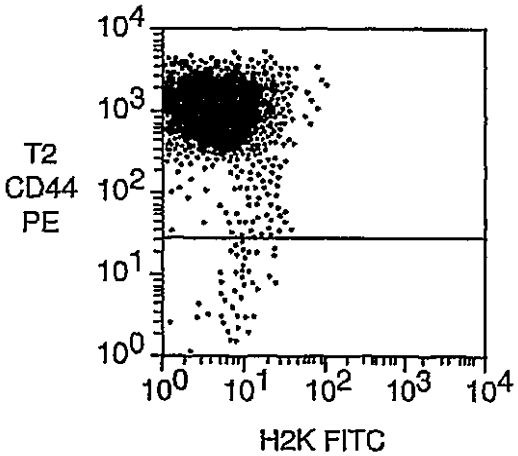


FIG. 6D

【図６Ｅ】

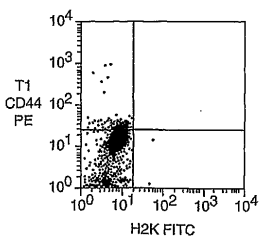


FIG. 6E

【図６Ｆ】

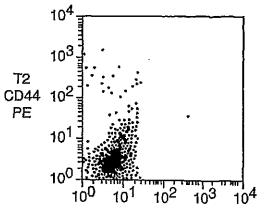
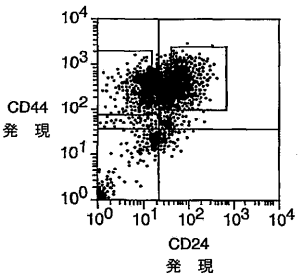


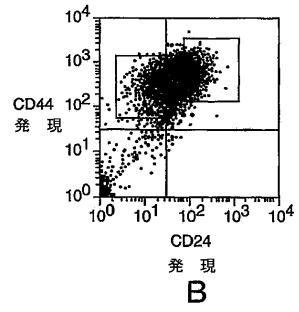
FIG. 6F

【図７Ａ】

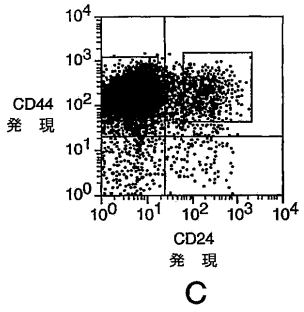


A

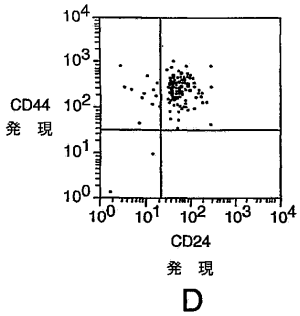
【図７Ｂ】



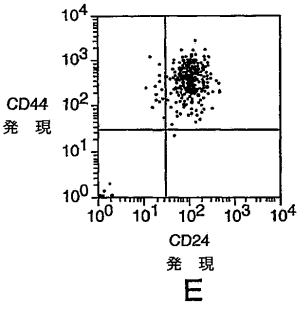
【図７Ｃ】



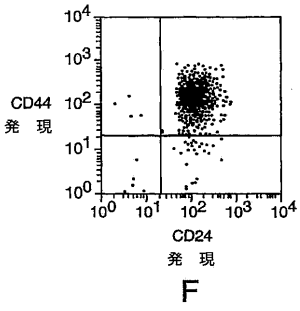
【図７Ｄ】



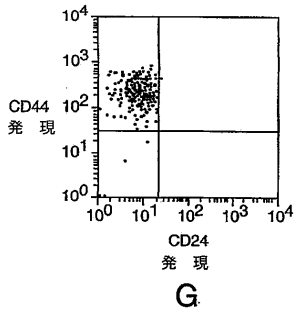
【図７Ｅ】



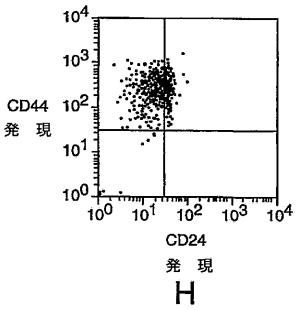
【図７Ｆ】



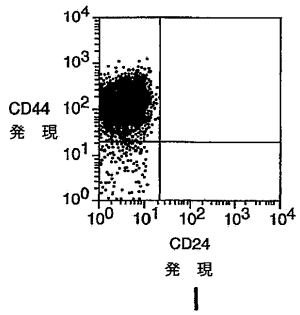
【図７Ｇ】



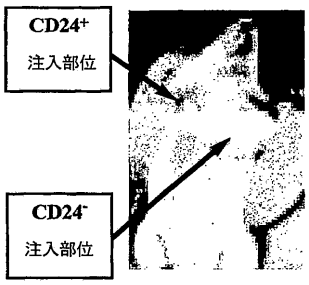
【図７Ｈ】



【図７Ｉ】



【図７Ｊ】



J

【図７Ｋ】



FIG.7K

【図７Ｌ】



FIG.7L

【図８】

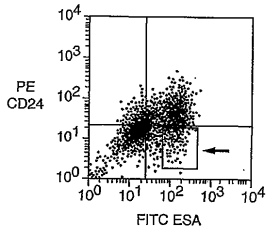
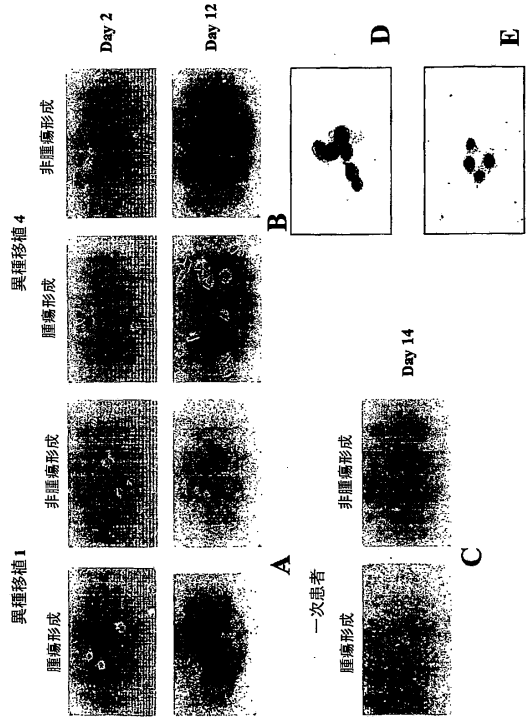
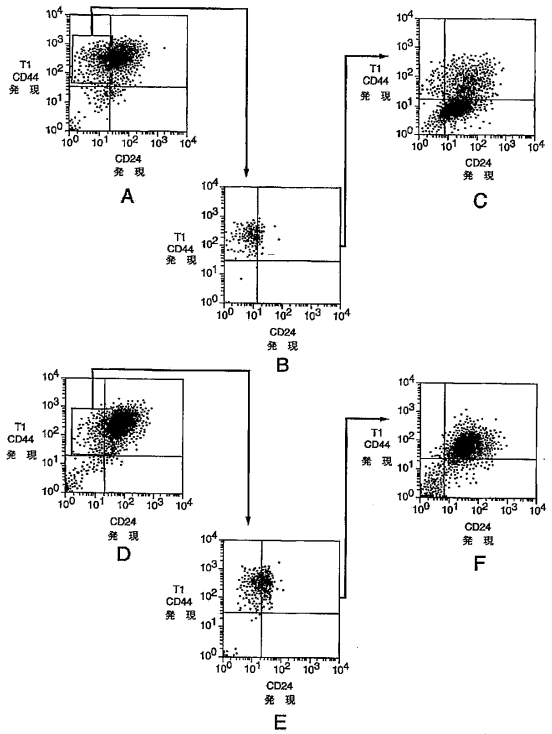


FIG. 8

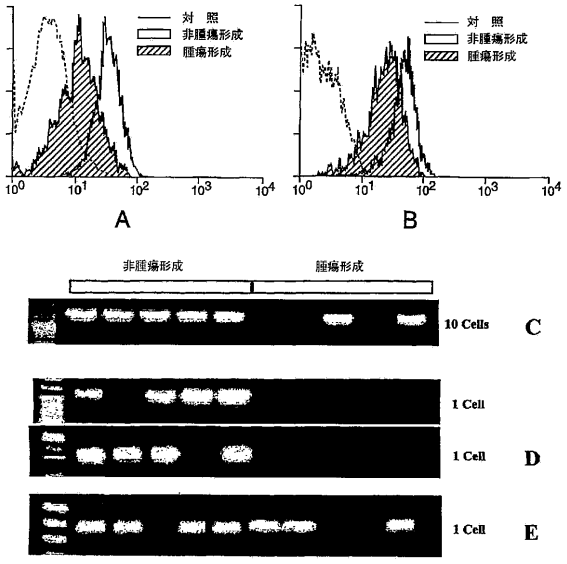
【図９】



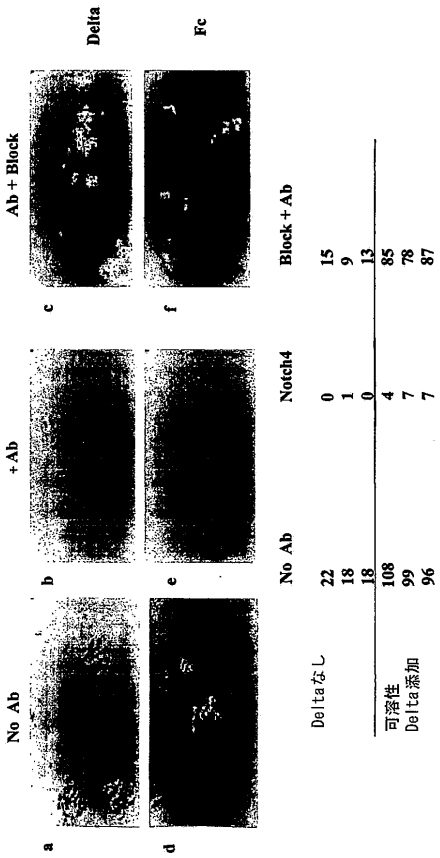
【図１０】



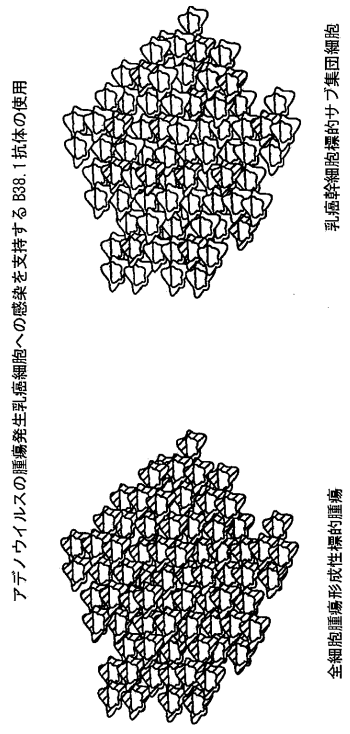
【図１１】



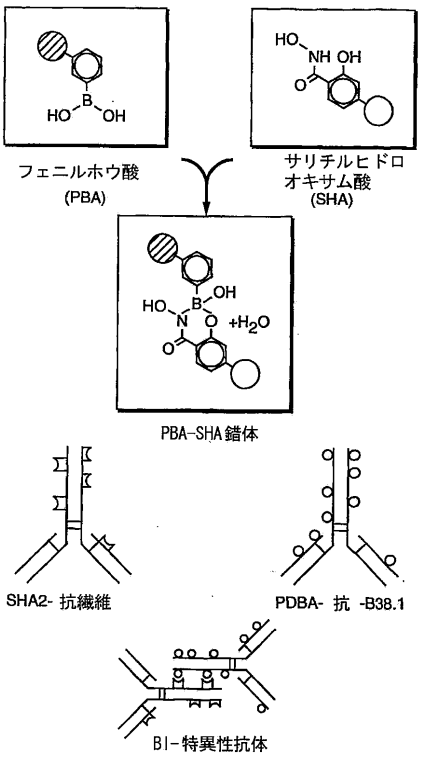
【図１２】



【図１３】



【図１４】



【図１５】

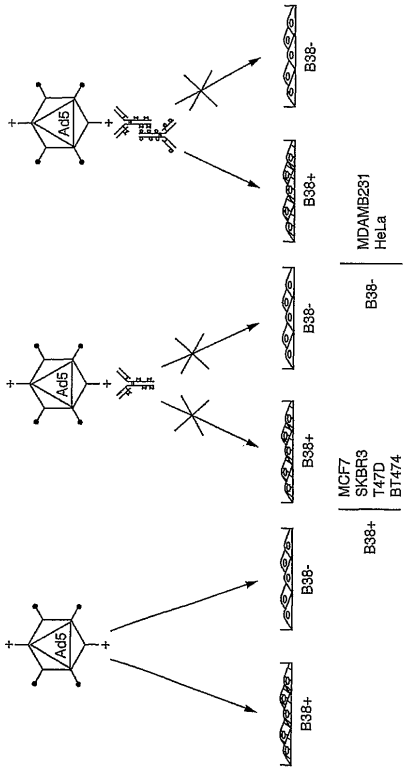
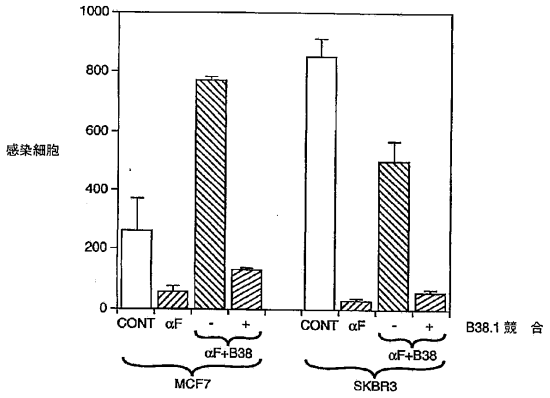


FIG. 15

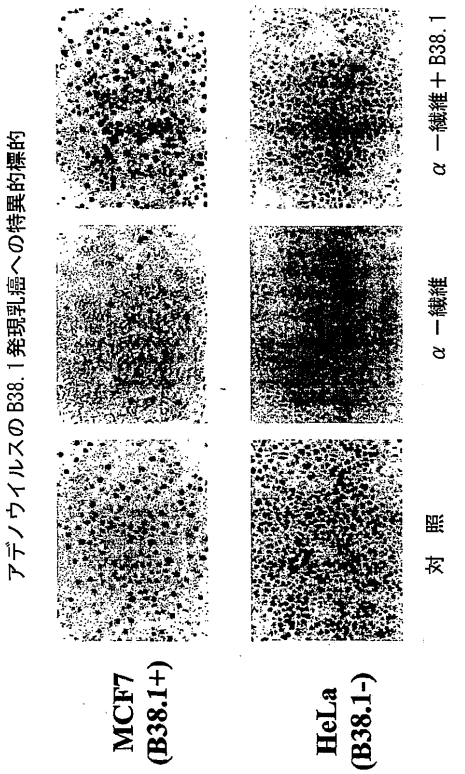
【図１６】



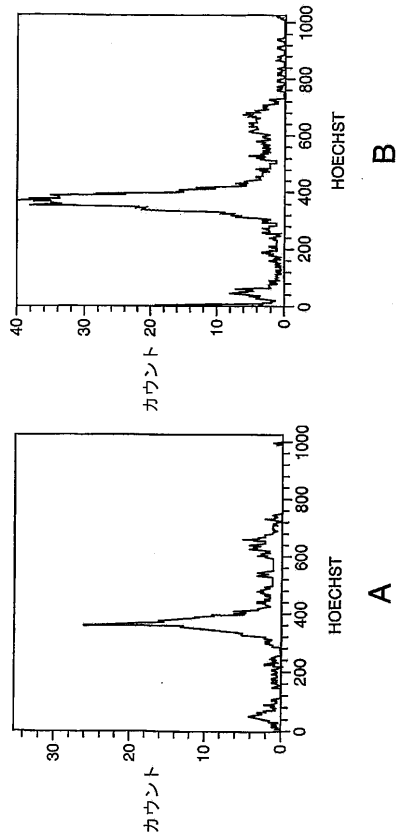
【図１７】



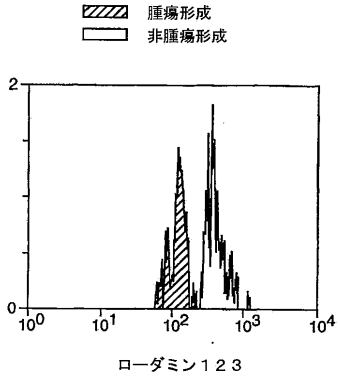
【図１８】



【図１９】



【図２０】



【図２１】

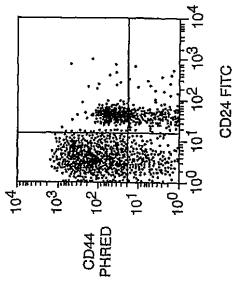


FIG. 21

【図２２】

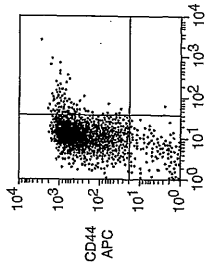


FIG. 22

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
G01N 33/50	*(2006.01)*	G01N	33/50	Z
G01N 33/53	*(2006.01)*	G01N	33/53	M
G01N 33/543	*(2006.01)*	G01N	33/543	541A
G01N 33/574	*(2006.01)*	G01N	33/543	541Z
G01N 37/00	*(2006.01)*	G01N	33/543	597
		G01N	33/574	A
		G01N	33/574	D
		G01N	37/00	103

(31)優先権主張番号 09/920,517
(32)優先日 平成13年8月1日(2001.8.1)
(33)優先権主張国 米国(US)

(73)特許権者 503046404
ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ ミシガン
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN
アメリカ合衆国, 48104－2592 ミシガン州, アン アーバー, セカンド フロア, サウス ユニバーシティ アベニュー 1214 テクノロジー マネージメント オフィス内
c／o Technology Management Office 1214 S. University Ave., 2nd Floor Ann Arbor, Michigan 48104－2592／U. S. A
(74)復代理人 110000523
アクシス国際特許業務法人
(74)復代理人 100165478
弁理士 波多野 寛海
(74)代理人 100067817
弁理士 倉内 基弘
(72)発明者 マイケル エフ. クラーク
アメリカ合衆国 48103 ミシガン、アン アーバー、クレイグ ロード 3377
(72)発明者 ショーン ジェイ. モリソン
アメリカ合衆国 48105 ミシガン、アン アーバー、バートン ファーム 3513
(72)発明者 マックス エス. ウィッカ
アメリカ合衆国 48109 ミシガン、アン アーバー、パークリッジ ストリート 2865
(72)発明者 ムハンマド アルハジ
アメリカ合衆国 48103 ミシガン、アン アーバー、コマー 2035、アパートメントナンバー316

審査官 ▲高▼ 美葉子

(56)参考文献 米国特許第04411990（US, A）
Frontiers is Bioscience, 1998, vol.3, p.d672-683

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15／00－15／90
JSTPlus／JMEDPlus／JST7580（JDreamIII）
PubMed
BIOSIS／WPI（DIALOG）