

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年10月24日(24.10.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/203255 A1

(51) 国際特許分類:

C12Q 1/02 (2006.01) C12Q 1/68 (2018.01)
A61K 31/55 (2006.01) C12Q 1/6837 (2018.01)
A61K 31/7068 (2006.01) C12Q 1/6874 (2018.01)
A61K 45/06 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/016421

(22) 国際出願日: 2019年4月17日(17.04.2019)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

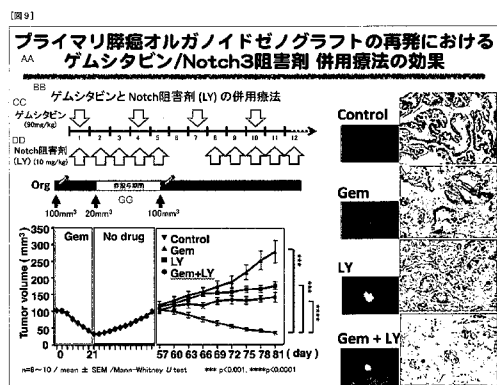
(30) 優先権データ:
特願 2018-080585 2018年4月19日(19.04.2018) JP

(71) 出願人: 公立大学法人横浜市立大学 (PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION YOKOHAMA CITY UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒2360027 神奈川県横浜市金沢区瀬戸2番2号 Kanagawa (JP). 地方独立行政法人神奈川県立病院機構 (KANAGAWA PREFECTURAL HOSPITAL ORGANIZATION) [JP/JP]; 〒2310005 神奈川県横浜市中区本町2丁目2番地 Kanagawa (JP).

(72) 発明者: 谷口 英樹 (TANIGUCHI, Hideki); 〒2360004 神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目9番 公立大学法人横浜市立大学内 Kanagawa (JP). 関根 圭輔 (SEKINE, Keisuke); 〒2360004 神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目9番 公立大学法人横浜市立大学内 Kanagawa (JP). 上野 康晴

(54) Title: DRUG EVALUATION METHOD USING RECONSTRUCTED CANCER TISSUE

(54) 発明の名称: 再構成癌組織を用いた薬剤評価方法



AA Effect of gemcitabine/Notch3 inhibitor combined treatment in the recurrence of primary pancreatic cancer organoid xenograft
BB Combined treatment with gemcitabine and Notch inhibitor (LY)
CC Gemcitabine
DD Notch inhibitor
GG Non-administration period

(57) Abstract: The purpose of the invention is to provide a method for identifying molecules involved in refractory cancers. Furthermore, the purpose of the invention is to provide a method for identifying drugs effective against refractory cancers. Additionally, the purpose of the invention is to provide a drug effective against recurrent cancers. Provided is a method for screening for molecules involved in refractory cancers, wherein the expression level of an EMT-associated molecule at pre- and post-administration of an anticancer agent is measured in stromal cells and/or cancer cells in tissue that reconstructs the cancer microenvironment, and an EMT-associated molecule presenting a higher expression level at post-administration of the anticancer agent than at pre-administration is scored as being involved in refractory cancers. Also provided is a method for screening for drugs effective against refractory cancers, wherein the expression level of an EMT-associated molecule at pre- and post-administration of an anticancer agent is measured in stromal cells and/or cancer cells in tissue that reconstructs the cancer microenvironment, and an EMT-associated molecule presenting a higher expression level at post-administration of the anticancer agent than at pre-administration is scored as being involved

(UENO, Yasuharu); 〒2360004 神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目9番 公立大学法人横浜市立大学内 Kanagawa (JP). 奥田 諒(OKUDA, Ryo); 〒2360004 神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目9番 公立大学法人横浜市立大学内 Kanagawa (JP). 森永 聡一郎(MORINAGA, Soichiro); 〒2418515 神奈川県横浜市旭区中尾二丁目3番2号 地方独立行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立がんセンター 臨床研究所内 Kanagawa (JP). 宮城 洋平(MIYAGI, Yohei); 〒2418515 神奈川県横浜市旭区中尾二丁目3番2号 地方独立行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立がんセンター 臨床研究所内 Kanagawa (JP).

SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類 :

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(74) 代理人: 間山 世津子, 外(MAYAMA, Setsuko et al.); 〒2210835 神奈川県横浜市神奈川区鶴屋町3丁目30番の1 農機舎館4階 Kanagawa (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,

in refractory cancers, while a substance that can inhibit the function of this EMT-associated molecule is scored as a drug effective against refractory cancers. Further provided is a drug for treating and/or preventing tumor recurrence as a combination of an anticancer agent with an inhibitor targeted to the NOTCH3 signal.

(57) 要約: 癌の治療抵抗性に関与する分子を同定するための手法を提供する。また、癌の治療抵抗性に有効な薬剤を同定するための手法を提供する。さらに、再発癌に有効な薬剤を提供する。癌微小環境を再構成する組織中の癌細胞及び／又は間質細胞において、抗癌剤の投与前と投与後のEMT関連分子の発現レベルを測定し、抗癌剤の投与前よりも投与後の発現レベルが上昇しているEMT関連分子を癌の治療抵抗性に関与していると判定する、癌の治療抵抗性に関与する分子のスクリーニング方法。癌微小環境を再構成する組織中の癌細胞及び／又は間質細胞において、抗癌剤の投与前と投与後のEMT関連分子の発現レベルを測定し、抗癌剤の投与前よりも投与後の発現レベルが上昇しているEMT関連分子を癌の治療抵抗性に関与していると判定し、そのEMT関連分子の機能を阻害できる物質を癌の治療抵抗性に有効な薬剤であると判定する、癌の治療抵抗性に有効な薬剤のスクリーニング方法。抗癌剤とNOTCH3シグナルを標的とする阻害薬とを併用する、再発腫瘍の治療及び／又は予防薬。

明 細 書

発明の名称：再構成癌組織を用いた薬剤評価方法

技術分野

[0001] 本発明は、再構成癌組織を用いた薬剤評価方法に関する。

背景技術

[0002] 膵癌は癌の進展が早く、再発・転移が高頻度に生じる。膵癌の治療薬として下記の報告があるが、いずれも、十分な治療成績は得られていない。

1) 単剤投与による膵癌治療法

・ JAMA, 297, 267-77, 2007. (非特許文献1) : 膵癌に対するGemcitabineの単独療法の報告である。

・ 特許第5909767号(特許文献1) : 膵癌などのForkhead box M1(FOXM1)を高発現する癌に対するワクチンとして有効な、新規ペプチドの報告である。

・ 特許第5904552号(特許文献2) : 膵癌で発現するインターロイキン6(IL-6)の阻害剤を用いた治療の報告である。

・ 特開2015-221793(特許文献3) : ヒトTROP2の阻害抗体を用いた治療法の報告である。

・ 特開2017-48170(特許文献4) : クローディン18に対する抗体を用いて膵癌等の増殖抑制を図るものである。

・ 特開2017-141163(特許文献5) : 膵癌で発現が亢進するリボソームタンパク質であるRPL29を標的として治療を図る方法である。

2) 併用投与による膵癌治療法

・ JAMA 304, 1073-81, 2010(非特許文献2) : Gemcitabineとフルオロウラシルの併用療法であるが、標準治療には採用されていない。

・ Lancet, 388-248-57, 2016. (非特許文献3) : GemcitabineとTS-1の併用療法の報告である。

[0003] しかしながら、これらの報告では上皮間葉転換の制御は出来ず、膵癌細胞

の高い薬剤抵抗性を解除することが出来ない。

[0004] また、膵癌の多くは再発を来すが、再発後の膵癌に有効な治療薬は開発されていない。

[0005] 特表2016-520289（特許文献6）には、GemcitabineとNOTCH3阻害剤の併用療法が開示されているが、再発後の癌に対する治療効果については言及されていない。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：JAMA, 297, 267-77, 2007.

非特許文献2：JAMA 304, 1073-81, 2010

非特許文献3：Lancet, 388-248-57, 2016.

特許文献

[0007] 特許文献1：特許第5909767号

特許文献2：特許第5904552号

特許文献3：特開2015-221793

特許文献4：特開2017-48170

特許文献5：特開2017-141163

特許文献6：特表2016-520289

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、癌の治療抵抗性に関与する分子を同定するための手法を提供することを目的とする。

[0009] また、本発明は、癌の治療抵抗性に有効な薬剤を同定するための手法を提供することを目的とする。

[0010] さらに、本発明は、再発癌に有効な薬剤を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0011] 癌組織中には、癌細胞の他に様々な間質（血管内皮細胞や間葉系細胞等）

が存在し、癌微小環境が形成されることにより、癌細胞の治療抵抗性が亢進する。本発明者らは、癌の治療抵抗性を担う上皮間葉転換関連因子に着目し、間質を伴う再構成癌組織を用いて癌（再発癌を含む）に対して治療標的となる分子・薬剤をスクリーニングする手法を確立した。この手法により、上皮間葉転換関連因子NOTCH3が同定され、NOTCH3の機能を阻害することにより、癌の薬剤抵抗性を解除できることを確認した。さらに、ゲムシタビン（Gemcitabine）とNOTCH3阻害剤を併用することにより、再発癌の治療においても高い治療効果が得られることを確認した。本発明は、これらの知見に基づいて、完成された。

[0012] 本発明の要旨は以下の通りである。

（１）癌微小環境を再構成する組織中の癌細胞及び／又は間質細胞において、抗癌剤の投与前と投与後のEMT関連分子の発現レベルを測定し、抗癌剤の投与前よりも投与後の発現レベルが上昇しているEMT関連分子を癌の治療抵抗性に関与していると判定する、癌の治療抵抗性に関与する分子のスクリーニング方法。

（２）癌微小環境を再構成する組織中の癌細胞及び／又は間質細胞において、抗癌剤の投与前と投与後のEMT関連分子の発現レベルを測定し、抗癌剤の投与前よりも投与後の発現レベルが上昇しているEMT関連分子を癌の治療抵抗性に関与していると判定し、そのEMT関連分子の機能を阻害できる物質を癌の治療抵抗性に有効な薬剤であると判定する、癌の治療抵抗性に有効な薬剤のスクリーニング方法。

（３）癌の治療抵抗性に有効な薬剤が癌の再発の治療及び／又は予防に有効な薬剤である（２）記載の方法。

（４）抗癌剤とNOTCH3シグナルを標的とする阻害薬とを併用する、再発腫瘍の治療及び／又は予防薬。

[0013] 本発明により、癌の治療成績の大幅な向上が期待される。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願2018 - 80585の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

発明の効果

[0014] ヒト膵癌オルガノイドを用いた検討において、上皮間葉転換関連分子であるNOTCH3が膵癌細胞の治療抵抗性に関与することが確認された。NOTCH3は膵癌細胞と膵癌間質細胞の双方で発現しており、膵癌細胞と間質細胞の相互作用に重要な役割を持つことが確認されている。NOTCH3を阻害することにより、従来の手法では治療困難される再発膵癌について、治療効果が確認された。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]プライマリヒト膵癌オルガノイドを対象とした抗癌剤（ゲムシタビン）の薬剤感受性評価の結果を示す。

[図2]プライマリヒト膵癌オルガノイドの薬剤抵抗性に関与する分子の探索手法を示す。

[図3]プライマリ膵癌オルガノイドにおけるEMT関連分子の発現亢進を示す（Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)解析）。

[図4]上皮間葉転換（EMT）を介する癌の治療抵抗性機構を示す。

[図5]膵癌オルガノイドから形成されたゼノグラフトにおけるEMTマーカーの検出結果を示す。

[図6]NOTCH3は間質豊富な膵癌オルガノイドで発現が亢進し、抗癌剤投与後のオルガノイドで発現が持続することを示す。図6Aにゲムシタビン投与前後での膵癌オルガノイド由来ゼノグラフト（Org）あるいは膵癌シスト由来ゼノグラフト（Cyst）でのNOTCH分子群の発現状態を示す。図6Bに免疫染色結果の定量結果を示す。サイトケラチン7(CK7)を発現する膵癌細胞におけるNOTCH分子群の発現結果を示す。図6Cでは膵癌細胞におけるNOTCH下流シグナルの発現解析結果を示す。図6Dに膵癌の原発巣と間質を有する膵癌オルガノイドでのNOTCH3の発現状態を示す。Smooth muscle actin(SMA)は間葉系細胞のマーカーとして使用した。図6Eは術後にゲムシタビン（GEM）あるいは、TS-1治療を行った患者の生存期間を示す。手術時の膵癌組織における癌細胞でのNOTCH3発現、および間質細胞でのNOTCH3発現に基づき生存数をプロットした。

[図7]抗癌剤投与後の膵癌組織におけるNOTCH3陽性細胞の特性評価の結果を示す。

[図8]膵癌オルガノイド由来ゼノグラフトを対象としたNOTCH3阻害剤と抗癌剤の併用治療の検討結果を示す。

[図9]再発膵癌に対するNOTCH3・ゲムシタビン併用治療効果の検討結果を示す。

[図10]NOTCH3阻害剤治療後の膵癌組織における間質量の減少を示す。

[図11]NOTCH3阻害剤治療後組織におけるEMT関連分子の発現を示す。

発明を実施するための形態

[0016] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0017] 本発明は、癌微小環境を再構成する組織中の癌細胞及び／又は間質細胞において、抗癌剤の投与前と投与後のEMT関連分子の発現レベルを測定し、抗癌剤の投与前よりも投与後の発現レベルが上昇しているEMT関連分子を癌の治療抵抗性に関与していると判定する、癌の治療抵抗性に関与する分子のスクリーニング方法を提供する。

[0018] また、本発明は、癌微小環境を再構成する組織中の癌細胞及び／又は間質細胞において、抗癌剤の投与前と投与後のEMT関連分子の発現レベルを測定し、抗癌剤の投与前よりも投与後の発現レベルが上昇しているEMT関連分子を癌の治療抵抗性に関与していると判定し、そのEMT関連分子の機能を阻害できる物質を癌の治療抵抗性に有効な薬剤であると判定する、癌の治療抵抗性に有効な薬剤のスクリーニング方法を提供する。癌の治療抵抗性に有効な薬剤が癌の再発の治療及び／又は予防に有効な薬剤でありうる。

[0019] 癌組織中には、癌細胞の他に様々な間質（血管内皮細胞や間葉系細胞等）が存在し、癌微小環境が形成されることにより、癌細胞の治療抵抗性が亢進する。

[0020] 本発明において、「癌微小環境を再構成する組織」は、癌を構成する癌細胞および間質細胞を含み、これらの細胞の相互作用により癌細胞の治療抵抗性が亢進しているものであるとよく、癌患者由来のプライマリ癌細胞や継代

された細胞あるいは株化された癌細胞から作製された癌オルガノイド、癌オルガノイドから作製されたゼノグラフトなどを例示することができる。

[0021] 本発明において、「癌オルガノイド」とは、癌細胞とその他の細胞から構成される細胞凝集体である。複数の細胞間での細胞間相互作用を再現することが可能である。癌オルガノイドは、癌微小環境を再現するものであるとよく、例えば、間質が豊富である。

[0022] 癌オルガノイドの間質の豊富さを定量する手法はいくつかある。

a: 間葉系細胞のマーカー (α -SMA) を指標とした免疫染色による定量 (図7参照)。原発巣 (61%程度) に対して、後述の実施例で作製した膵癌オルガノイド (10:7:20) は59%程度であった。本発明の癌オルガノイドは、この定量方法により、1~1000%であるとよく、好ましくは、10~500%であり、より好ましくは、10~300%である (免疫染色による陽性率)。

b: 間質内の細胞外マトリックス (膵癌の場合は、ヒアルロン酸・コラーゲンなど) の定量 (コラーゲンについては、シリウス赤染色による定性解析、シリウス赤染色後の偏光顕微鏡像解析による定量解析が可能である (図8参照))。後述の実施例では、原発巣 (74%程度) に対して、膵癌オルガノイド (10:7:20) は44%程度であった。本発明の癌オルガノイドは、この定量方法により、1~1000%であるとよく、好ましくは、10~500%であり、より好ましくは、10~300%である。

c: 間質内にヒアルロン酸やコラーゲンが蓄積すると、組織の硬度が増加する。組織の硬さを指標として判断することも可能である。

[0023] 多くの場合、癌組織は、癌細胞の他に間質と呼ばれる部分がある。間質には、線維芽細胞などの間葉系細胞の他、血管、リンパ管、神経などを構成する細胞 (血液細胞、血管細胞、免疫細胞など)、炎症をつかさどる細胞 (炎症細胞) などの多種類の細胞、これらの細胞の間に存在するコラーゲンなどからなる結合組織が存在して、特徴的な構造を形成している。これを癌微小環境と呼ぶ。

[0024] 癌オルガノイドは、癌間質を含む癌微小環境を再現するとよい。癌オルガ

ノイドは、癌微小環境の他、さらに、腺管構造を再現するとよい。腺管構造は、上皮性の特性を有する癌細胞によって形成されうる。

[0025] また、癌オルガノイドは、癌の治療抵抗性、浸潤・転移及び再発からなる群より選択される少なくとも1つを再現するとよい。癌の治療抵抗性としては、薬剤感受性、放射線感受性、免疫療法感受性、栄養療法感受性などを例示することができる。「癌の再発」とは、切除後に再び癌が現れること、抗がん剤治療、放射線治療、免疫療法、栄養療法、それらの組合せの治療で消滅した癌が再び現れること、あるいは縮小した癌が再び大きくなることをいい、治療した部位の近くで起こるだけでなく、別の場所に転移として見つかることも含む概念である。

[0026] 癌の種類は、特に限定されるわけではなく、肝臓癌、腎臓癌、悪性脳腫瘍、膵臓癌、胃癌、肺癌などいかなるものであってもよい。後述の実施例では、膵癌オルガノイドを作製した。

[0027] 癌オルガノイドは、例えば、癌細胞を間葉系細胞及び血管内皮細胞と共培養することにより作製することができる。培養は、三次元（3D）培養である。癌オルガノイドの再構成に適した3D培養技術は、Nature, 25;499(7459):481-4, 2013、Nat Protoc. 9(2):396-409, 2014、Cell Stem Cell, 7;16(5):556-65, 2015などで報告されている。また、培養容器としては、W02014/196204などに開示されたもの、市販されているもの（例えば、クラレ社のElp lasiaなど）などを用いるとよい。

[0028] 癌細胞は、既存の癌細胞株であってもよいし、ヒト癌原発巣より分離した癌組織を用いて樹立したプライマリ癌細胞株や継代された細胞であってもよい。癌の種類は、特に限定されるわけではなく、肝臓癌、腎臓癌、悪性脳腫瘍、膵臓癌、胃癌、肺癌などいかなるものであってもよい。癌は、主としてヒト由来のものを用いるが、ヒト以外の動物（例えば、実験動物、愛玩動物、使役動物、競走馬、闘犬などに利用される動物、具体的には、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、サル、ウシ、ウマ、ヒツジ、ニワトリなど）由来の癌細胞を用いてもよい。

[0029] 本明細書において、「血管内皮細胞」とは、血管内皮を構成する細胞、又はそのような細胞に分化することのできる細胞をいう。ある細胞が血管内皮細胞であるかどうかは、マーカータンパク質、例えば、TIE2、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、CD41が発現しているかどうかを調べることにより確認できる（前記マーカータンパク質のいずれか一つあるいは複数が発現していれば血管内皮細胞であると判断できる。）。血管内皮細胞は、分化したものであっても、未分化なものであってもよい。血管内皮細胞が、分化した細胞であるかどうかは、CD31、CD144により、確認することができる。当業者間で使用されている用語のうち、endothelial cells、umbilical vein endothelial cells、endothelial progenitor cells、endothelial precursor cells、vasculogenic progenitors、hemangioblast (HJ. joo, et al. Blood. 25;118(8):2094-104. (2011)) などは本発明における血管内皮細胞に含まれる。好ましい血管内皮細胞は、臍帯静脈由来の血管内皮細胞である。血管内皮細胞は、血管から採取したり、あるいは、人工多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性幹細胞（ES細胞）などの多能性幹細胞から公知の方法に従って作製することができる。血管内皮細胞は、主としてヒト由来のものをを用いるが、ヒト以外の動物（例えば、実験動物、愛玩動物、使役動物、競走馬、闘犬などに利用される動物、具体的には、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、サル、ウシ、ウマ、ヒツジ、ニワトリなど）由来の血管内皮細胞を用いてもよい。

[0030] 本明細書において、「間葉系細胞」とは、主として中胚葉に由来する結合組織に存在し、組織で機能する細胞の支持構造を形成する結合組織細胞であるが、間葉系細胞への分化運命が決定しているが、まだ間葉系細胞へ分化していない細胞も含む概念である。間葉系細胞は、分化したものであっても、未分化なものであってもよい。ある細胞が未分化間葉系細胞であるかどうかは、マーカータンパク質、例えば、Stro-1、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD133、CD271、Nestinが発現しているかどうかを調べることにより確認できる（前記マーカータンパク質のいずれか一つあるいは複数が発現していれば未分化間葉系細胞であると判断できる。）。また、前項のマーカーのいずれも

発現していない間葉系細胞は分化間葉系細胞と判断できる。当業者間で使用されている用語のうち、mesenchymal stem cells、mesenchymal progenitor cells、mesenchymal cells (R. Peters, et al. PLoS One. 30;5(12):e15689 . (2010)) などは本発明における間葉系細胞に含まれる。好ましい間葉系細胞は、骨髓由来の間葉系細胞（特に、間葉系幹細胞）である。間葉系細胞は、骨髓、脂肪組織、胎盤組織、臍帯組織、歯髄等の組織から採取したり、あるいは、人工多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性幹細胞（ES細胞）などの多能性幹細胞から公知の方法に従って作製することができる。間葉系細胞は、主としてヒト由来のものを用いるが、ヒト以外の動物（例えば、実験動物、愛玩動物、使役動物、競走馬、闘犬などに利用される動物、具体的には、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、サル、ウシ、ウマ、ヒツジ、ニワトリなど）由来の未分化間葉系細胞を用いてもよい。

[0031] 共培養における三種類の細胞の培養比は癌オルガノイドが形成できる範囲内であれば特に限定されないが、好適な細胞の数比は、癌細胞：血管内皮細胞：間葉系細胞＝10：1～100：1～100であり、より好適には、癌細胞：血管内皮細胞：間葉系細胞＝10：1～100：5～100である。癌細胞20万個程度、血管内皮細胞14万個程度、間葉系細胞20万個程度を共培養して、大きさが10～50000マイクロメートル程度（直径）の癌オルガノイドを形成させることができる。本発明に用いる場合、癌オルガノイドの大きさは、10～30000（直径）マイクロメートル程度であるとよい。

[0032] 培養の際に使用する培地は、癌オルガノイドが形成されるものであればどのようなものでもよいが、血管内皮細胞培養用の培地、癌細胞培養用の培地、前記2つの培地を混合したものなどを使用することが好ましい。血管内皮細胞培養用の培地はどのようなものを使用してもよいが、hEGF（組換えヒト上皮細胞成長因子）、VEGF（血管内皮細胞成長因子）、ヒドロコルチゾン、bFGF、アスコルビン酸、IGF1、FBS、Antibiotics(例えば、ゲンタマイシン、アンフォテリシンBなど)、Heparin、L-Glutamine、Phenolred、BBEの少なくとも1種を含むものを使用するのが好ましい。血管内皮細胞培養用の培地と

しては、EGM-2 BulletKit (Lonza社製)、EGM BulletKit (Lonza社製)、Vas cuLife EnGS Comp Kit (LCT社製)、Human Endothelial-SFM Medium (Thermo Fisher Scientific社製)、ヒト微小血管内皮細胞増殖培地 (TOYOBO社製) などを用いることができる。癌細胞培養用の培地はどのようなものを使用してもよく、例えば、DMEM培地が挙げられる。膀胱癌オルガノイドの作製には、EGM:DMEM=1:1の培地が適していることが確認されている。

[0033] 細胞の培養にあたっては、足場材料を用いる必要はないが、三種類の細胞の混合物を間葉系細胞が収縮可能なゲル状支持体上で培養するとよい。

[0034] 間葉系細胞の収縮は、(顕微鏡、ないし肉眼で)形態学的に立体組織形成を認めることや、葉さじなどによる回収に伴い組織の形状が保たれる強度を有することを示すなど (Takebe et al. Nature, 499(7459), 481-484, 2013) のようにして確認することができる。

[0035] 支持体は、適正な硬さ (例えば、ヤング率200kPa以下(マトリゲルをコートした形状が平坦なゲルの場合など)であるが、支持体の適正な硬さはコーティングと形状によって変化しうる。)を有するゲル状基材であるとよく、そのような基材としては、ハイドロゲル (例えば、アクリルアミドゲル、ゼラチン、マトリゲルなど)などを例示することができるが、それらに限定されることはない。なお、目的とする集合体の形・サイズ・量に応じて、支持体の硬さは均一である必然性はなく、硬さに空間的・時間的な勾配を設定することやパターン化することが可能である。支持体の硬さが均一である場合には、支持体の硬さは、好ましくは、100kPa以下、より好ましくは1~50kPaである。ゲル状支持体は、平面であってもよいし、あるいは、ゲル状支持体の培養する側の断面がU又はV字の形状であるとよい。ゲル状支持体の培養する側の断面がU又はV字の形状であることにより、支持体の培養面に細胞が集まるようになり、より少ない数の細胞及び／又は組織で細胞集合体が形成されるので有利である。また、支持体に、化学的・物理的な修飾を施してもよい。修飾物質としては、マトリゲル、ラミニン、エンタクチン、コラーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチンなどを例示することができる。

- [0036] ゲル状培養支持体の硬さに空間的な勾配を設定した一例は、中心部の硬さが周辺部の硬さより固いゲル状培養支持体である。中心部の硬さは、200kPa以下が適正であり、周辺部の硬さは、中心部より柔らかければよいが、支持体の中心部と周辺部の適正な硬さはコーティングと形状によって変化する。ゲル状培養支持体の硬さに空間的な勾配を設定した別の一例は、周辺部の硬さが中心部の硬さより固いゲル状培養支持体である。
- [0037] パターン化したゲル状培養支持体の一例は、中心部の硬さが周辺部の硬さより固いというパターンを1個以上有するゲル状培養支持体である。中心部の硬さは、200kPa以下が適正であり、周辺部の硬さは、中心部より柔らかければよいが、支持体の中心部と周辺部の適正な硬さはコーティングと形状によって変化する。パターン化したゲル状培養支持体の別の一例は、周辺部の硬さが中心部の硬さより固いというパターンを1個以上有するゲル状培養支持体である。周辺部の硬さは、200kPa以下が適正であり、中心部の硬さは、周辺部より柔らかければよいが、支持体の中心部と周辺部の適正な硬さはコーティングと形状によって変化する。
- [0038] 培養時の温度は特に限定されないが、30～40℃とするのが好ましく、37℃とするのが更に好ましい。
- [0039] 培養期間は特に限定されないが、1～60日とするのが好ましく、1～7日とするのが更に好ましい。
- [0040] 本発明者らは、ヒト癌原発巣より分離した癌組織を用いてプライマリ癌細胞株を樹立し、このプライマリ癌細胞株を用いて、癌オルガノイドを作製することにも成功した。この方法は、タンパク質分解酵素及びRhoキナーゼ（ROCK）阻害剤の存在下で、癌組織を消化してから、癌細胞の凝集体を得ること、前記凝集体を継代した後、癌細胞を分離すること、前記癌細胞を間葉系細胞及び血管内皮細胞と共培養して、癌オルガノイドを形成させることを含む。タンパク質分解酵素及びRhoキナーゼ阻害剤とともに、デオキシリボヌクレアーゼの存在下で、癌組織を消化してもよい。
- [0041] 癌組織を消化するには、タンパク質分解酵素及びRhoキナーゼ阻害剤を添加

した（さらに、デオキシリボヌクレアーゼを添加してもよい）培地（例えば、DMEM培地）中で癌組織を37℃で適当な時間（後述の実施例では、20分）インキュベートするとよい。培地中のRhoキナーゼ阻害剤の濃度は、10 μ M程度であるとよい。Rhoキナーゼ阻害剤としては、Y-27632（R&D）を例示することができる。培地には、FBSを添加するとよい。

[0042] 癌細胞の凝集体（癌シスト）は、ゲル（例えば、マトリゲル）内に包埋した状態で継代するとよい。継代時の癌シストの分散には、Rhoキナーゼ阻害剤を添加した分散液（例えば、TrypLE（Thermo Fisher Scientific社））を用いるとよい。その後、培地交換をして、新しいゲル内に包埋するとよい。

[0043] 継代後の癌シストを分散液（例えば、TrypLE（Thermo Fisher Scientific社））で処理し、その後、血管内皮細胞及び間葉系細胞と共培養するとよい。癌細胞と血管内皮細胞及び間葉系細胞との共培養は前述した通りである。

[0044] 癌微小環境を再現する、再構成された癌オルガノイドを非ヒト動物に移植することにより、癌微小環境を再現する、ゼノグラフトを作製することができる。癌微小環境は癌間質を含むとよい。再構成された癌オルガノイドがさらに腺管構造を再現するとよい。また、ゼノグラフト自身がさらに腺管構造を再現してもよい。腺管構造は、上皮性の特性を有する癌細胞によって形成されうる。ゼノグラフトは、癌の治療抵抗性、浸潤・転移及び再発からなる群より選択される少なくとも1つを再現するとよい。癌オルガノイドは、プライマリ癌細胞や継代された細胞より再構成されたものであっても、既存癌細胞株より再構成されたものであってもよい。癌オルガノイド由来ゼノグラフトは、癌の治療抵抗性、浸潤・転移及び再発からなる群より選択される少なくとも1つを再現しうる。また、癌オルガノイド由来ゼノグラフトは、薬剤トランスポーターの発現を再現しうる。さらに、癌オルガノイド由来ゼノグラフトは、腫瘍血管を有してもよい。癌オルガノイド由来ゼノグラフトは、腫瘍血管に特徴的な薬剤漏れ出しを再現しうる。これらの癌オルガノイド由来ゼノグラフトは、癌細胞を間葉系細胞及び血管内皮細胞と共培養することで形成された癌オルガノイドを非ヒト動物に移植することにより作製する

ことができる。癌の種類は、特に限定されるわけではなく、肝臓癌、腎臓癌、悪性脳腫瘍、膵臓癌、胃癌、肺癌などいかなるものであってもよい。後述の実施例では、膵癌オルガノイドからゼノグラフトを作製した。間葉系細胞の比率が高い細胞混合比の膵癌オルガノイドから作製されたゼノグラフトは、間質が豊富であり、薬剤感受性が低下する傾向が認められた。本発明に用いる場合、癌オルガノイド由来ゼノグラフトの大きさは、10~5000立方ミリメートル程度であるとよい。移植の対象となる非ヒト動物としては、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、サル、ウシ、ウマ、ヒツジ、ニワトリなどを例示することができるが、これらに限定されるわけではない。

[0045] 癌オルガノイド及び癌オルガノイド由来ゼノグラフトは、癌の治療抵抗性、浸潤・転移及び再発からなる群より選択される少なくとも1つの評価に用いることができる。

[0046] 癌オルガノイドを用いて、癌の治療抵抗性を評価する場合は、癌オルガノイドに癌の治療と同等の処置を施し（例えば、薬剤の添加、放射線の照射、免疫療法剤の添加、栄養素の添加など）、適当な時間経過後に、生存している癌細胞数をカウントし、IC50値を算出するとよい。

[0047] 癌オルガノイド由来ゼノグラフトを用いて、癌の治療抵抗性を評価する場合は、癌オルガノイドを非ヒト動物に移植し、形成されるゼノグラフトの体積が適当な大きさになった時点で、癌の治療を開始し、適当な頻度で治療薬を投与した後、ゼノグラフトを摘出し、その体積を測定するとよい。

[0048] 癌の治療薬としては、既存の癌治療薬（放射線も含む）、癌治療薬の候補化合物などが挙げられる。

[0049] 癌オルガノイドを用いて、癌の浸潤・転移を評価する場合は、例えば、トランスウェルなどを用いた遊走および浸潤アッセイを用いて癌オルガノイドからの細胞遊走を観察するとよい。

[0050] 癌オルガノイド由来ゼノグラフトを用いて、癌の浸潤・転移を評価する場合は、癌オルガノイドを非ヒト動物に移植し、形成されるゼノグラフトの体積が適当な大きさになった後の適当な時間経過後に、遠隔転移が想定される

組織内での癌細胞コロニーあるいは癌細胞を観察したりするとよい。

[0051] 癌オルガノイドを用いて、癌の再発を評価する場合は、癌オルガノイドに癌の治療と同等の処置を施し（例えば、薬剤の添加、放射線の照射、免疫療法剤の添加、栄養素の添加など）、癌細胞の消滅あるいは減少が観察された後に前記癌の治療と同等の処置を施すことを中止し、適当な時間経過後に、生存している癌細胞数あるいは癌オルガノイドのサイズをカウントするとよい。

[0052] 癌オルガノイド由来ゼノグラフトを用いて、癌の再発を評価する場合は、癌オルガノイドを非ヒト動物に移植し、形成されるゼノグラフトの体積が適当な大きさになった時点で、癌の治療を開始し、適当な頻度で投与して、ゼノグラフトの消滅あるいは減少が観察された後、癌の治療を中止し、適当な時間経過後に、ゼノグラフトの体積あるいは構成細胞数を測定するとよい。

[0053] 癌の浸潤・転移を評価する方法及び癌の再発を評価する方法は、癌の治療薬のスクリーニングに利用することもできる。このスクリーニングにより、癌の浸潤・転移を治療及び／又は予防する薬や癌の再発予防に効果的な薬を見つけることができる。

[0054] プライマリ癌オルガノイド（ヒト癌原発巣より分離した癌組織を用いて樹立したプライマリ癌細胞株から作製した癌オルガノイド）の薬剤感受性は患者の術後再発と関連することが確認されている。このことから、癌オルガノイド及び癌オルガノイドから作製したゼノグラフトの治療抵抗性は患者予後と相関すると考えられる。患者の癌細胞由来の癌オルガノイド及び／又はゼノグラフトが治療感受性である場合は、患者は術後に再発しないと予測され、患者の癌細胞由来の癌オルガノイド及び／又はゼノグラフトが治療抵抗性である場合は、患者は術後に再発すると予測される。

[0055] 癌オルガノイド由来のゼノグラフトを担持する非ヒト動物は、癌の治療抵抗性、浸潤・転移又は再発の評価、癌の予後予測などに用いることができる。非ヒト動物としては、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、サル、ウシ、ウマ、ヒツジ、ニワトリなどを例示することができるが、これらに限定さ

れるわけではない。

[0056] 本発明の癌の治療抵抗性に関与する分子のスクリーニング方法では、癌微小環境を再構成する組織中の癌細胞及び／又は間質細胞において、抗癌剤の投与前と投与後のEMT関連分子の発現レベルを測定し、抗癌剤の投与前よりも投与後の発現レベルが上昇しているEMT関連分子を癌の治療抵抗性に関与していると判定する。

[0057] 本発明のスクリーニング方法において、癌細胞は、既存の癌細胞株であってもよいし、ヒト癌原発巣より分離した癌組織を用いて樹立したプライマリ癌細胞株や継代された細胞であってもよい。癌の種類は、特に限定されるわけではなく、肝臓癌、腎臓癌、悪性脳腫瘍、膵臓癌、胃癌、肺癌などいかなるものであってもよい。癌は、主としてヒト由来のものを用いるが、ヒト以外の動物（例えば、実験動物、愛玩動物、使役動物、競走馬、闘犬などに利用される動物、具体的には、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、サル、ウシ、ウマ、ヒツジ、ニワトリなど）由来の癌細胞を用いてもよい。間質細胞には、線維芽細胞などの間葉系細胞の他、血管、リンパ管、神経などを構成する細胞（血液細胞、血管細胞、免疫細胞など）、炎症をつかさどる細胞（炎症細胞）などの多種類の細胞が含まれる。

[0058] 「抗癌剤の投与」とは、*in vivo*で抗癌剤を被験動物に投与する癌の治療処置の他、薬剤の添加、放射線の照射、免疫療法剤の添加、栄養素の添加など癌の治療と同等の*in vitro*での処置も含む概念である。癌オルガノイドを動物に移植して作製したゼノグラフトを用いて本発明のスクリーニング方法を実施する場合、被験動物への抗癌剤の投与前と投与後のゼノグラフト中の癌細胞と間質細胞のそれぞれにおけるEMT関連分子の発現レベルを測定して、両者を比較するとよい。抗癌剤の投与スケジュールは、癌患者への投薬スケジュールに準じたものが望ましい。癌オルガノイドを用いて本発明のスクリーニング方法を実施する場合、癌オルガノイドへの抗癌剤の添加前と添加後の癌オルガノイド中の癌細胞と間質細胞のそれぞれにおけるEMT関連分子の発現レベルを測定する、あるいは、癌オルガノイドへの対象治療と抗癌剤治療後

の癌オルガノイド中の癌細胞と間質細胞のそれぞれにおけるEMT関連分子の発現レベルを測定し、両者を比較するとよい。

[0059] 抗癌剤としては、例えば、膀胱癌に対するものとして、ゲムシタビン、フルオロウラシル、TS-1、パクリタキセル、ナブパクリタキセル、5-FU・イリノテカン・オキサリプラチン、エルロチニブ、カペシタビンなどを例示することができるが、これらに限定されるわけではない。

[0060] EMT関連分子とは、上皮特性を有する癌細胞の形質を間葉系細胞の形質に変化させる作用を持つ分子群を指し、EMT関連分子としては、E-cadherin (CDH1), ZEB1, ZEB2, SNAIL1, SNAIL2, TWIST1, SMAD2, SMAD3, N-cadherin(CDH2), TGF β 1, TNF, IL1 β , EGF, ERBB2, ERBB3, VEGFA, VIM, EPCAM, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, DELTA, HEY1, HEY2, JAG2, JAK, STAT1, STAT3, MMP3, PI3K, PTEN, AKT1, AKT2, AKT3, MTOR, HIF1A, RAS, RAF1, MAP2K1, ERK1, MAPK1, MAP3K1, MAPK14, MAPK8, NF κ B1, IRAK1, IRAK2, IRAK3, IRAK4, TRAF1, TRAF2 などが知られているが、これらに限定されるわけではない。

[0061] EMT関連分子の発現レベルの測定は、遺伝子発現レベルの測定であっても、蛋白質発現レベルの測定であってもよい。遺伝子発現レベルの測定は、リアルタイムPCR、RT-PCR、マイクロアレイ解析やRNAシーケンスによって行うことができ、蛋白質発現レベルの測定は、免疫染色法、ウェスタンブロット法などによって行うことができる。

[0062] 「発現レベルの上昇」は、統計学的に有意差が認められる程度の上昇であればよく、p値が0.05未満等程度の上昇を例示することができる。

[0063] EMT関連分子の発現レベルの測定は、癌微小環境を再構成する組織中の癌細胞と間質細胞の両方について行うとよいが、癌細胞又は間質細胞の一方のみで行ってもよい。癌細胞又は間質細胞のいずれか一方で発現レベルが上昇しているEMT関連分子であれば、癌の治療抵抗性に関与している可能性があり、癌の治療抵抗性に関与していると判定するには、少なくとも癌細胞で発現レベルが上昇していることが好ましく、癌細胞及び間質細胞の両方で発現レベルが上昇していることがより好ましい。

- [0064] 抗癌剤の投与前よりも投与後の発現レベルが上昇しているEMT関連分子は、癌の治療抵抗性に関与していると判定される。
- [0065] 癌の治療抵抗性としては、薬剤感受性、放射線感受性、免疫療法感受性、栄養療法感受性などを例示することができる。
- [0066] 癌の治療抵抗性に関与していると判定したEMT関連分子の機能を阻害できる物質を癌の治療抵抗性に有効な薬剤であると判定することができる。
- [0067] 本発明により、EMT関連分子のNOTCH3が癌の治療抵抗性に関与していると判定された（後述の実施例参照）。
- [0068] NOTCH3は、1-4まで存在するNOTCHファミリーの1つである。これら4因子は同様のシグナル伝達系を有し標的遺伝子も重複するため発現場所の違いによる機能の違い以外、明確な差異は不明である。NOTCHシグナルは多細胞生物において広く保存されているシグナルである。他の多くのシグナル伝達物質と異なり、細胞膜上に存在するリガンド(DLL1、DLL3、DLL4、JAG1、JAG2)とレセプター(NOTCH)を介して接触する細胞間のシグナルを直接伝達する因子である。神経系や免疫系などにおいて重要な役割を有することが知られている。また、NOTCH3はCerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarct and Leukoencephalopathy (CADASIL) と呼ばれる皮質下梗塞と白質脳症をともなう常染色体優性遺伝性脳動脈症の原因遺伝子として知られている。
- [0069] 本発明者らは、ゲムシタピンとNOTCH3阻害剤を併用することにより、再発癌の治療においても高い治療効果が得られることを確認した（後述の実施例参照）。よって、本発明は、抗癌剤とNOTCH3シグナルを標的とする阻害薬とを併用する、再発腫瘍の治療及び／又は予防薬を提供する。
- [0070] NOTCH受容体は、1回膜貫通型タンパク質で細胞外ドメインと膜貫通ドメイン及び細胞内ドメイン(NICD)からなる。Notchリガンドが結合するとTACE(ADAM金属プロテアーゼTNF- α 変換酵素)によって細胞外ドメインが切れ、次に γ -セクレターゼによって膜貫通ドメインと細胞内ドメイン(NICD)が切り離されるNICDは核内へ移行しCBF1/Su(H)/Lag-1ファミリー転写因子複合体を

形成し標的遺伝子の転写を制御する。多くのNotch阻害剤はこの γ -セクレターゼの阻害によって働く。

[0071] NOTCH3シグナルを標的とする阻害薬としては、LY3039478(Eli Lilly)、MK-0752(Merck)、PF-03084014(Pfizer)など、医薬的に許容されるそれらの塩又は溶媒和物などを例示することができるが、これらに限定されるわけではない。医薬的に許容される塩としては、ナトリウムりん酸塩、ナトリウム塩、カリウム塩、塩酸塩、硫酸塩などの塩を例示することができるが、これらに限定されない。医薬的に許容される溶媒和物としては、水、メタノール、エタノール、ジメチルホルムアミド、酢酸エチル、ジメチルスルホキシド(DMSO)などの溶媒和物を例示することができるが、これらに限定されない。NOTCH3シグナルを標的とする阻害薬は、市販のものを使用してもよいし、公知の技術を用いて合成してもよい。

LY3039478 : 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-1-{[(10S)-8-(2-hydroxyethyl)-9-oxo-6,8-diazatricyclo[9.4.0.0^{2,7}]]pentadeca-1(15),2,4,6,11,13-hexaen-10-yl}carbamoyl}ethyl]butanamide

MK-0752 : 3-[(1s,4r)-4-(4-chlorobenzenesulfonyl)-4-(2,5-difluorophenyl)cyclohexyl]propanoic acid

PF-03084014 : (2S)-2-{[(2S)-6,8-difluoro-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl]amino}-N-(1-{1-[(2,2-dimethylpropyl)amino]-2-methylpropan-2-yl}-1H-imidazol-4-yl)pentanamide

[0072] 「併用」とは、抗癌剤とNOTCH3シグナルを標的とする阻害薬とを同時又は別々に投与する態様も、抗癌剤とNOTCH3シグナルを標的とする阻害薬とを配合剤の形態で合剤化して同時に投与する態様も含む概念である。

[0073] 「再発腫瘍」とは、切除後に再び現れた癌（腫瘍）、抗がん剤治療、放射線治療、免疫療法、栄養療法、それらの組合せの治療で消滅した後に再び現れた癌（腫瘍）、あるいは縮小した癌（腫瘍）が再び大きくなったもの、治療した部位の近くで起こるだけでなく、別の場所に転移した癌（腫瘍）も含む概念である。

[0074] 本発明の治療及び／又は予防薬は、全身又は局所的に、経口又は非経口で被験者又は被験動物に投与される。

[0075] 抗癌剤は、単独で、あるいは賦形剤または担体と混合し、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、液剤、シロップ、エアロゾル、坐剤、注射剤等に製剤化してもよい。賦形剤または担体は、当分野で常套的に使用され、医薬的に許容されるものであればよく、その種類及び組成は適宜変更される。例えば、液状担体としては水、植物油などが用いられる。固体担体としては、乳糖、白糖、ブドウ糖などの糖類、バレイショデンプン、トウモロコシデンプンなどのデンプン、結晶セルロースなどのセルロース誘導体などが使用される。ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロースなどの結合剤、カルボキシメチルセルロースなどの崩壊剤等を添加してもよい。その他、抗酸化剤、着色剤、矯味剤、保存剤等を添加してもよい。

[0076] 抗癌剤は、経口、経鼻、直腸、経皮、皮下、静脈内、筋肉内などの種々の経路によって投与できる。

[0077] 抗癌剤の製剤中における含量は、製剤の種類により異なるが、通常1～100重量%、好ましくは50～100重量%である。例えば、液剤の場合には、抗癌剤の製剤中における含量は、1～100重量%が好ましい。カプセル剤、錠剤、顆粒剤、散剤の場合は、抗癌剤の製剤中における含量は、通常約10～100重量%、好ましくは50～100重量%であり、残部は担体である。製剤は、単位投与製剤に製剤化するとよい。

[0078] 抗癌剤の投与量、投与の回数及び頻度は、被験者又は被験動物の症状、年齢、体重、投与方法、投与形態などにより異なるが、例えば、被験動物を対象とするゲムシタビン投与の場合、動物一匹当たり、有効成分の量に換算して、1 mg（又はml）～200 mg/kgを少なくとも1回、所望の効果が確認できる頻度で投与するとよい。

[0079] NOTCH3シグナルを標的とする阻害薬は、抗癌剤を含む製剤に含有させてもよいが、単独で、あるいは賦形剤または担体と混合し、錠剤、カプセル剤、

散剤、顆粒剤、液剤、シロップ、エアロゾル、坐剤、注射剤等に製剤化してもよい。賦形剤または担体は、当分野で常套的に使用され、医薬的に許容されるものであればよく、その種類及び組成は適宜変更される。例えば、液状担体としては水、植物油などが用いられる。固体担体としては、乳糖、白糖、ブドウ糖などの糖類、バレイショデンプン、トウモロコシデンプンなどのデンプン、結晶セルロースなどのセルロース誘導体などが使用される。ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロースなどの結合剤、カルボキシメチルセルロースなどの崩壊剤等を添加してもよい。その他、抗酸化剤、着色剤、矯味剤、保存剤等を添加してもよい。

[0080] NOTCH3シグナルを標的とする阻害薬は、経口、経鼻、直腸、経皮、皮下、静脈内、筋肉内などの種々の経路によって投与できる。

[0081] NOTCH3シグナルを標的とする阻害薬の製剤中における含量は、製剤の種類により異なるが、通常1～100 重量%、好ましくは50～100 重量%である。例えば、液剤の場合には、上記の(i)～(iii)からなる群より選択される少なくとも1種の物質の製剤中における含量は、1～100重量%が好ましい。カプセル剤、錠剤、顆粒剤、散剤の場合は、上記の(i)～(iii)からなる群より選択される少なくとも1種の物質の製剤中における含量は、通常約10～100 重量%、好ましくは50～100 重量%であり、残部は担体である。製剤は、単位投与製剤に製剤化するとよい。

[0082] NOTCH3シグナルを標的とする阻害薬の投与量、投与の回数及び頻度は、被験者又は被験動物の症状、年齢、体重、投与方法、投与形態などにより異なるが、例えば、被験動物を対象として、NOTCH3シグナルを標的とする阻害薬を通常、動物一匹当たり、有効成分の量に換算して、0.1 mg (又はml) ～ 100mg/kg体重程度を少なくとも1回、所望の効果が確認できる頻度で投与するとよい。

[0083] 抗癌剤とNOTCH3シグナルを標的とする阻害薬とを同時又は別々に投与する場合は、例えば、NOTCH3シグナルを標的とする阻害薬を治療開始から5日間連続して投与し、2日間休薬するサイクルを繰り返すと良い。ゲムシタビン投与

は、治療開始日から投与を開始し、3日に1回投与するサイクルを繰り返すと良い。

- [0084] 抗癌剤とNOTCH3シグナルを標的とする阻害薬とを配合剤の形態で合剤化して同時に投与する場合は、抗癌剤とNOTCH3シグナルを標的とする阻害薬とを適切な有効成分含有量で配合して合剤化した製剤を、所望の効果が確認できる頻度で投与するとよい

実施例

- [0085] 以下、実施例により本発明を更に詳細に説明する。

〔実施例1〕

プライマリヒト膵癌オルガノイドを対象とした抗癌剤（ゲムシタビン）の薬剤感受性評価（図1）

プライマリヒト膵癌細胞（膵癌患者から切除した組織から単離した細胞を増やしたもの）にルシフェラーゼ遺伝子を導入した後、プライマリ膵癌細胞の基本培地とEGM培地（Lonza）の1:1混合液を使用して、ストロマ細胞（ヒト間葉系幹細胞（hMSC）、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）いずれもLonza社）との三次元共培養を行い（プライマリヒト膵癌細胞：hMSC：HUVEC＝10:7:20）、豊富な間質を持つプライマリヒト膵癌オルガノイドを再構成した。再構成されたプライマリヒト膵癌オルガノイドに各濃度の抗癌剤（ゲムシタビン）を添加し、それぞれの薬剤感受性を評価した。豊富な間質を持つプライマリヒト膵癌オルガノイド（図中赤線●）は、プライマリヒト膵癌細胞のみで構成される群（図中青線■）と比べて、抗癌剤の抵抗性が亢進している。

- [0086] プライマリヒト膵癌オルガノイドの薬剤抵抗性に関する分子の探索（図2）

間質豊富なプライマリヒト膵癌オルガノイドは、抗癌剤に対して高い治療抵抗性を示した。癌間質を介した膵癌細胞の治療抵抗性亢進についてのメカニズムを明らかにするため、間質豊富なプライマリヒト膵癌オルガノイドと膵癌細胞との間における遺伝子発現および蛋白質発現を比較した。間質豊富なプライマリヒト膵癌オルガノイドより分離した膵癌細胞と膵癌細胞単独培

養後の膵癌細胞の間の遺伝子発現状態をマイクロアレイ解析により比較したところ、EMT関連因子、癌の悪性度への関連が報告された因子、腫瘍形成に関与することが報告された分子が多数抽出された。また、間質豊富なプライマリヒト膵癌オルガノイドと膵癌細胞の培養上清を対象としたプロテオーム解析（セクレトーム解析）を行ったところ、EMT関連分子（NOTCH3等）が複数抽出された。

[0087] プライマリ膵癌オルガノイドにおけるEMT関連分子の発現亢進の確認（図3）

間質豊富なプライマリヒト膵癌オルガノイドとプライマリヒト膵癌細胞の間に遺伝子発現状態を比較するため、各々のtotalRNAを用いてマイクロアレイデータ（Agilent社）を取得し、得られたアレイデータを用いてGene Set Enrichment Analysis (GSEA)解析を行った。双方のサンプル間で変動する遺伝子群がいずれの遺伝子セットに該当するかを検討したところ、膵癌オルガノイドは膵癌細胞のみと比べてEMT遺伝子セットが遺伝子発現データ中で有意に変動することが確認された。図中左側が膵癌オルガノイドの発現遺伝子、右側が膵癌細胞の発現遺伝子を示し、EMT関連遺伝子の検出頻度が左側で優位に高いことが確認された。

[0088] 上皮間葉転換（EMT）を介する癌の治療抵抗性機構（図4）

固形癌では癌細胞が治療抵抗性を獲得する過程において、癌細胞の特性が上皮様から間質様に変化することが知られている（上皮間葉転換：Epithelial-Mesenchymal Transition：EMT）。多くの癌においてEMTへの移行期（Partial EMT）より癌細胞の薬剤抵抗性が亢進することが報告されている。

[0089] 膵癌オルガノイドから形成されたゼノグラフトにおけるEMTマーカーの検出（図5）

前述の方法で作製した膵癌オルガノイドあるいは、膵癌シストをDMEM/F12培地で洗浄したのち、ピペットを用いて細かく分散して、DMEM/F12培地とマトリゲルの混合液（1:1混合液）中に懸濁し、200ulプラスチックチップを用いて回収し、重度免疫不全マウス（NSGマウス、チャールズリバー）の背部皮下に移植してゼノグラフトを作製した（膵癌オルガノイド由来ゼノグラフ

ト、膵癌シスト由来ゼノグラフト)。

膵癌オルガノイドから形成されたゼノグラフト (Organoid) でEMTマーカー (ZEB2, pSMAD2/3, N-CADHERIN) の発現を評価したところ (免疫染色法)、CK7を発現する膵癌細胞においてEMTマーカーの発現亢進が生じることが確認された。また、膵癌オルガノイドから形成されたゼノグラフトは、ゲムシタビン治療を施した後 (ゼノグラフトのサイズが100mm³に達した後、ゲムシタビン (90mg/kg) を3日毎に腹腔内投与した。) においても、EMT関連分子の発現が亢進していることが確認された (図5は、治療開始後30日目の組織を示す)。

[0090] NOTCH3は間質豊富な膵癌オルガノイドで発現が亢進し、抗癌剤投与後のオルガノイドで発現が持続する (図6)

膵癌オルガノイドから形成されたゼノグラフト (Org) および膵癌シストから形成されたゼノグラフト (Cyst) でNOTCH分子群の発現を評価した (免疫染色法)。間質豊富な膵癌オルガノイドで発現が亢進し、抗癌剤投与に発現が持続する分子としてNOTCH3が同定された。NOTCH3の発現は膵癌細胞と膵癌間質細胞の双方で亢進することが確認された。図6Aにゲムシタビン投与前後での膵癌オルガノイド由来ゼノグラフトあるいは膵癌シスト由来ゼノグラフトでのNOTCH分子群の発現状態を示す。図Bに免疫染色結果の定量結果を示す。サイトケラチン7(CK7)を発現する膵癌細胞におけるNOTCH分子群の発現結果を示す。図4では膵癌細胞におけるNOTCH下流シグナルの発現解析結果を示す。図Dに膵癌の原発巣と間質を有する膵癌オルガノイドでのNOTCH3の発現状態を示す。Smooth muscle actin(SMA)は間葉系細胞のマーカーとして使用した。図6Eは術後にゲムシタビン (GEM) あるいは、TS-1治療を行った患者の生存期間を示す。手術時の膵癌組織における癌細胞でのNOTCH3発現、および間質細胞でのNOTCH3発現に基づき生存頻度をプロットした。

[0091] 抗癌剤投与後の膵癌組織におけるNOTCH3陽性細胞の特性評価 (図7)

プライマリヒト膵癌オルガノイドに由来するゼノグラフトに膵癌治療薬 (ゲムシタビン) を投与し (ゲムシタビン (90mg/kg) を3日毎に腹腔内投与し

た。）、治療後に残存する膵癌細胞の特性を検討した。図7は、治療開始後30日目の組織を示す。治療後に残存した膵癌細胞はNOTCH3の発現が高く（免疫染色法）、また、細胞増殖が亢進していることが確認された。膵癌細胞におけるNOTCH3の発現を3段階に分類し（Ki67染色像（核）を基準に細胞を分類し、細胞周囲のNOTCH3の発現の強さで分類した。全体の発現量を元に、NOTCH3発現なし、弱染色、強染色の三段階で評価した。）、それぞれの群でKi67を発現し、増殖性を示す膵癌細胞の頻度を検討した。その結果、抗癌剤治療後に残存するNOTCH3強陽性細胞では、増殖している細胞の割合が高いことが確認された。NOTCH3陽性細胞は、抗癌剤に高い薬剤抵抗性を示すことが確認された。

[0092] 膵癌オルガノイド由来ゼノグラフトを対象としたNOTCH3阻害剤と抗癌剤の併用治療（図8）

NOTCH3阻害作用を有する阻害剤（LY 3039478（10 mg / kg, Eli Lilly））がヒト膵癌の治療に有効か否かを検討した。重度免疫不全マウス（NSGマウス、チャールズリバー）背部皮下にプライマリヒト膵癌オルガノイドを移植し、ゼノグラフトが一定のサイズ（100mm³）に達した時点から治療を開始した。膵癌治療薬であるゲムシタビンの投与群、NOTCH3阻害剤の投与群、ゲムシタビンとNOTCH3阻害剤の双方の投与群（併用群）、未治療群について腫瘍サイズの変化を検討した。NOTCH3阻害剤投与群では、ゲムシタビン治療群に近い治療効果が確認されるものの、膵癌組織の増大を完全に抑制することは困難であった。一方で、NOTCH3阻害剤とゲムシタビンの併用治療群では、膵癌組織の増大が強く抑制され、併用治療の有効性が明らかとなった。図中右に各治療後の膵癌ゼノグラフトのマクロ像およびHE染色像を示す。

[0093] 再発膵癌に対するNOTCH3・ゲムシタビン併用治療効果の検討（図9）

膵癌は癌の進展が早く、再発・転移が高頻度に生じる。再発した膵癌に対する有効な治療法は確立されておらず、新たな治療法の確立が必須である。再発膵癌の治療におけるNOTCH3阻害剤の有効性を検証するため、プライマリヒト膵癌オルガノイドを重度免疫不全マウス（NSGマウス、チャールズリバー

）に移植し、腫瘍サイズが一定（100mm³）に達した時点からゲムシタビン投与を施した。投与後、腫瘍サイズが減少した後、ゲムシタビン投与を中断すると膵癌の増殖が亢進することが確認された。本手法は、膵癌の再発を再現するモデルとして有益であることが確認された。

また、同再発モデルの治療にNOTCH3が有益か否かを検討した。腫瘍サイズが一定（100mm³）に達した時点からNOTCH3阻害剤、ゲムシタビン投与を行い、腫瘍サイズの変化を検討したところ、NOTCH3阻害剤あるいはゲムシタビンのいずれかを投与することで腫瘍サイズの増加を抑制できることが確認された。さらに、NOTCH3阻害剤とゲムシタビンの併用治療の効果を検討したところ、併用群では再発後の腫瘍サイズが大きく減少することが確認された。膵癌の再発にNOTCH3阻害剤とゲムシタビンの併用治療が有効であることが確認された。図中右に各治療後の膵癌ゼノグラフトのマクロ像およびHE染色像を示す。

[0094] NOTCH3阻害剤治療後の膵癌組織における間質量の減少（図10）

膵癌オルガノイド由来ゼノグラフトについてNOTCH3阻害剤、ゲムシタビン、併用治療を実施した後の間質量をシリウスレッド染色により評価した。図中左側上段に治療後のゼノグラフトのHE染色像、下段にシリウスレッド染色像を示す。NOTCH3阻害剤を用いて治療すると、膵癌組織中のシリウスレッド陽性領域が減少することが明らかとなった（右図）。また、図中央は、細胞核の染色により膵管部位での細胞の重層化の程度を評価し、平均値で示した。グラフ上の点は個々の膵管部位を示す。

[0095] NOTCH3阻害剤治療後組織におけるEMT関連分子の発現（図11）

NOTCH3治療後の膵癌組織においてEMT関連分子の発現を評価したところ（免疫染色）、NOTCH3阻害剤投与群においてEMT関連分子を発現する細胞が減少することが確認された（左図）。それぞれの治療群においてEMT関連分子・細胞増殖マーカー・幹細胞マーカー・細胞外マトリクス・繊維化マーカーの発現を評価したところ（免疫染色）、NOTCH3阻害剤とゲムシタビン併用群ではこれらの分子が抑制されることが明らかとなった。一方、NOTCH3阻害剤とゲム

シタビン併用群では、カスパーゼ活性などのアポトーシスマーカーの発現が亢進することが確認された（右図）。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

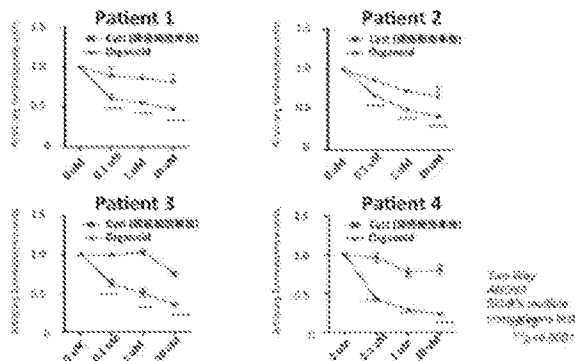
[0096] 本発明は、癌の治療抵抗性を克服する抗癌剤の同定に利用できる。また、本発明は再発癌（腫瘍）の治療及び予防に利用できる。

請求の範囲

- [請求項1] 癌微小環境を再構成する組織中の癌細胞及び／又は間質細胞において、抗癌剤の投与前と投与後のEMT関連分子の発現レベルを測定し、抗癌剤の投与前よりも投与後の発現レベルが上昇しているEMT関連分子を癌の治療抵抗性に関与していると判定する、癌の治療抵抗性に関与する分子のスクリーニング方法。
- [請求項2] 癌微小環境を再構成する組織中の癌細胞及び／又は間質細胞において、抗癌剤の投与前と投与後のEMT関連分子の発現レベルを測定し、抗癌剤の投与前よりも投与後の発現レベルが上昇しているEMT関連分子を癌の治療抵抗性に関与していると判定し、そのEMT関連分子の機能を阻害できる物質を癌の治療抵抗性に有効な薬剤であると判定する、癌の治療抵抗性に有効な薬剤のスクリーニング方法。
- [請求項3] 癌の治療抵抗性に有効な薬剤が癌の再発の治療及び／又は予防に有効な薬剤である請求項2記載の方法。
- [請求項4] 抗癌剤とNOTCH3シグナルを標的とする阻害薬とを併用する、再発腫瘍の治療及び／又は予防薬。

[図1]

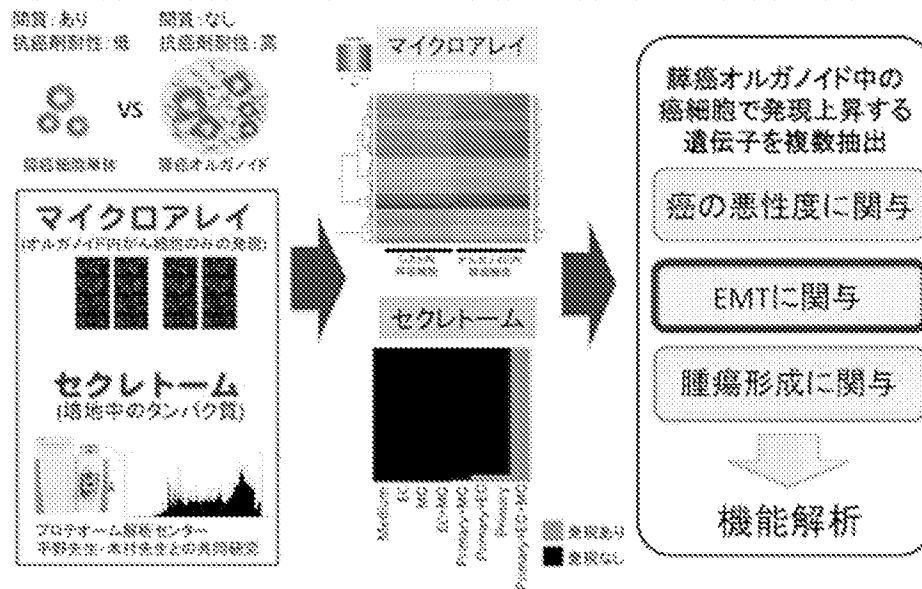
プライマリヒト肝癌オルガノイドの in vitro ゲムシタビン感受性評価



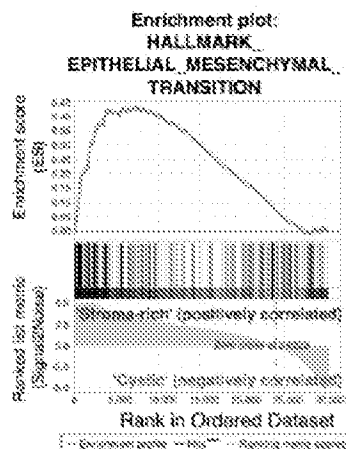
間質を伴うオルガノイドは高い薬剤抵抗性を示す

[図2]

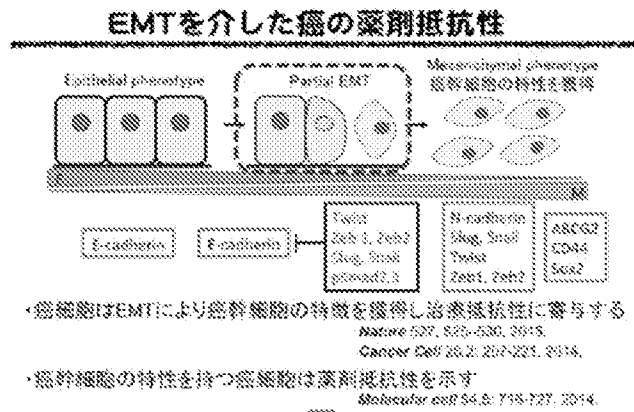
プライマリ肝癌オルガノイドの 治療抵抗性に関与する分子の探索



[図3]

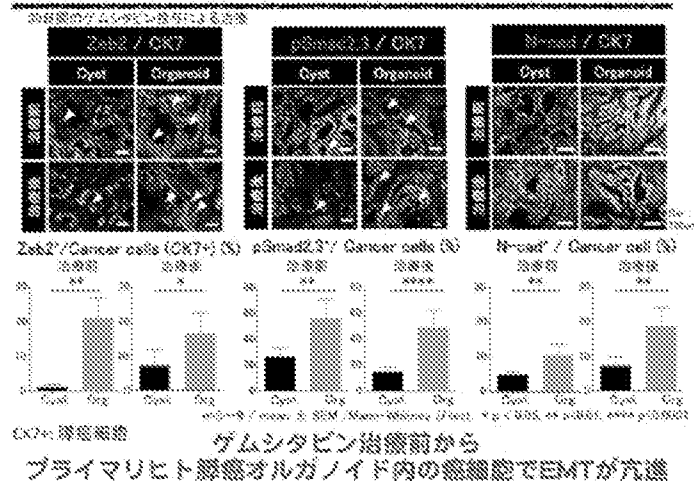


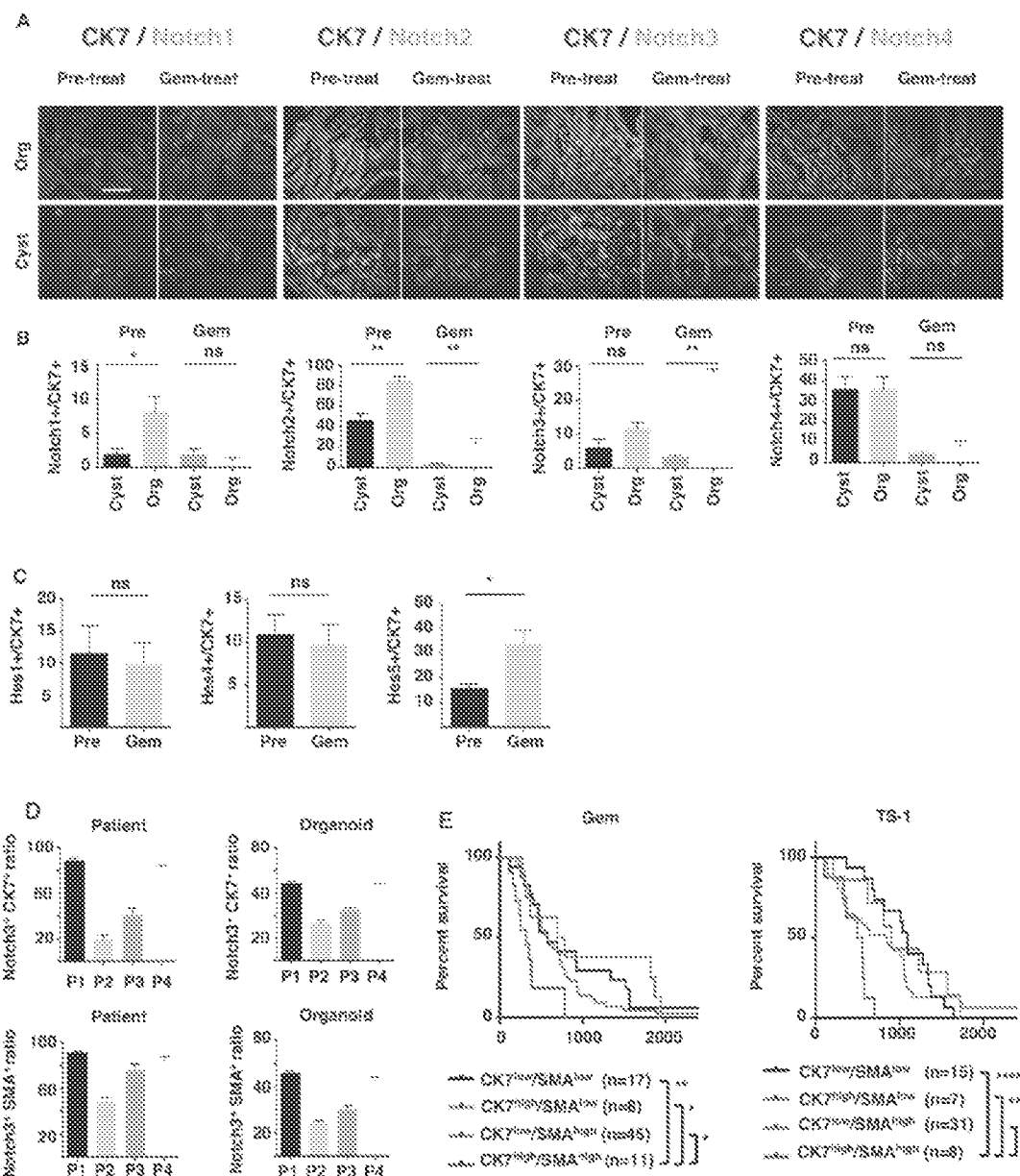
[図4]



プライマリヒト肺癌オルガノイドにおける薬剤抵抗性には
EMTによる癌幹細胞の特性獲得が関与？

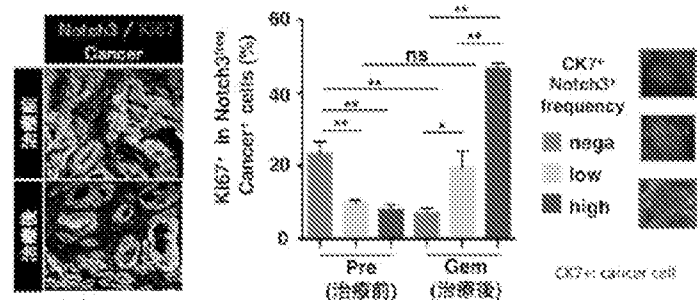
[図5]

オルガノイド由来ゼノグラフト内でのEMTの亢進



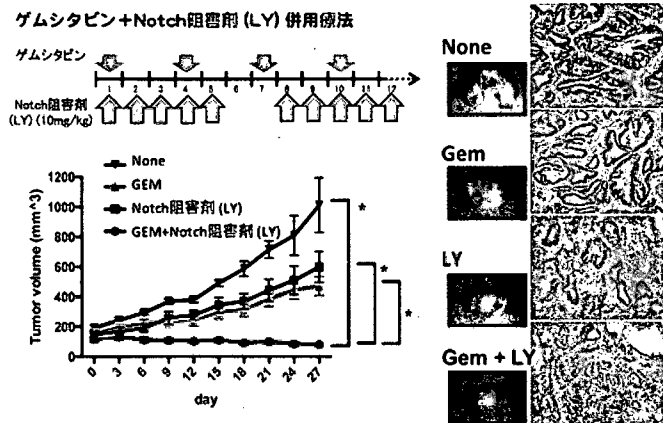
ゲムシタピン投与後の残存腫瘍細胞における Notch3⁺発現および細胞増殖能の評価

~~~~~



Notch3<sup>+/+</sup>雄雄鼠はグムシタピン治療後においても高い雄断続性を示す

[図 8]

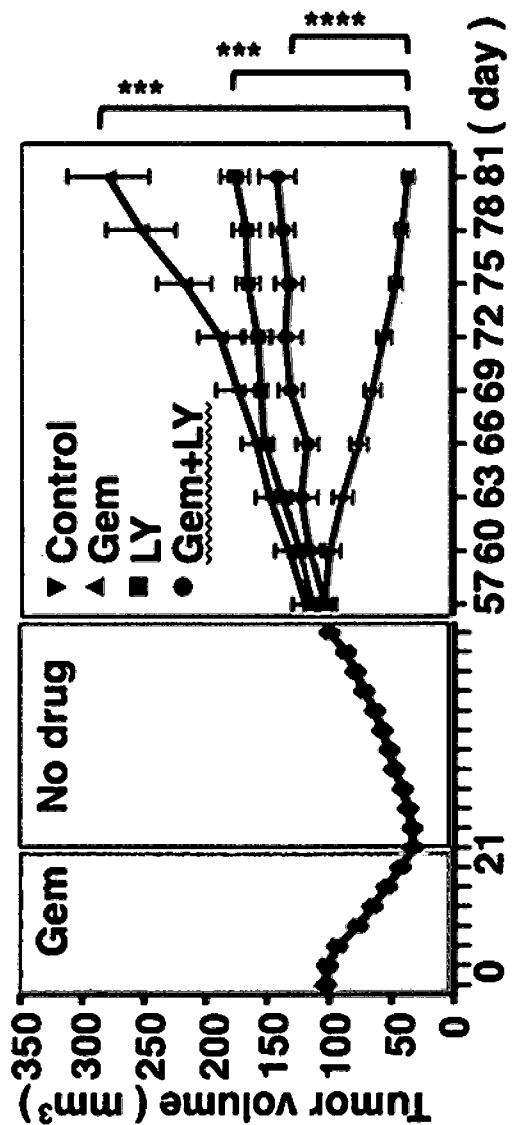
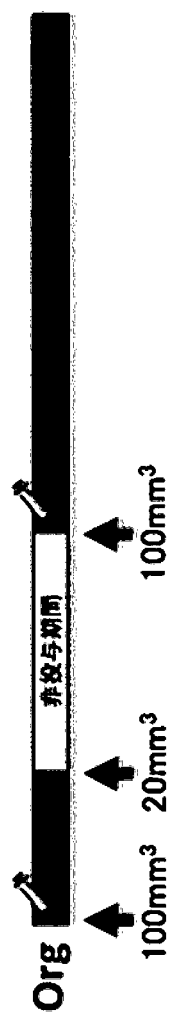
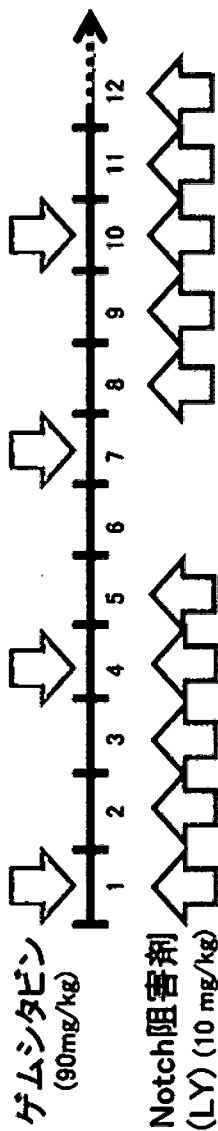
プライマリ肝癌オルガノイドゼノグラフトを対象とした  
ゲムシタビン/Notch3阻害剤 併用療法の検討

[図 9]

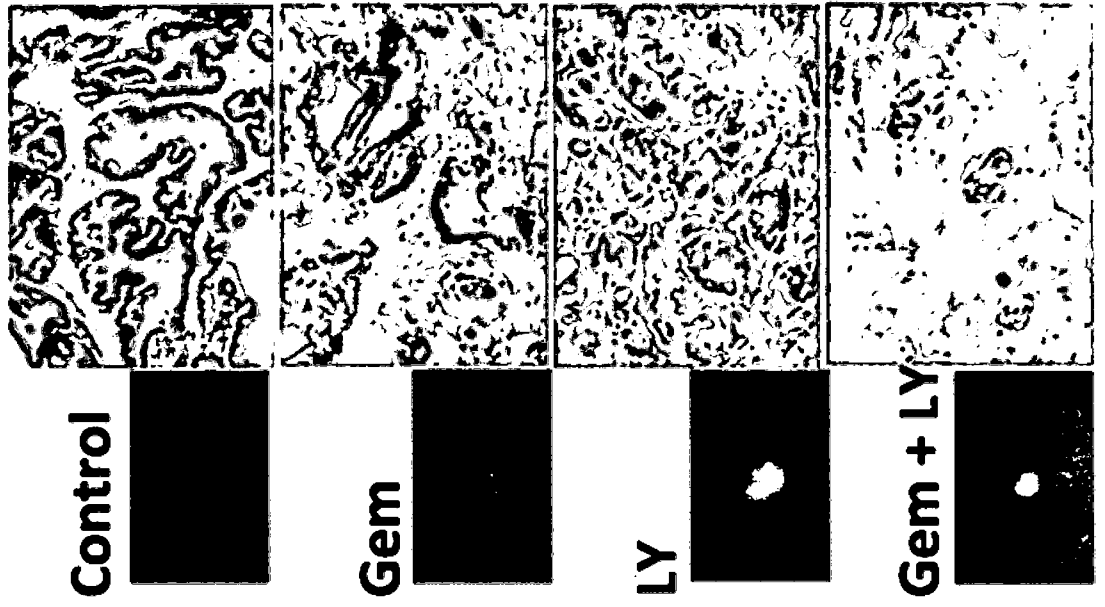
5/7

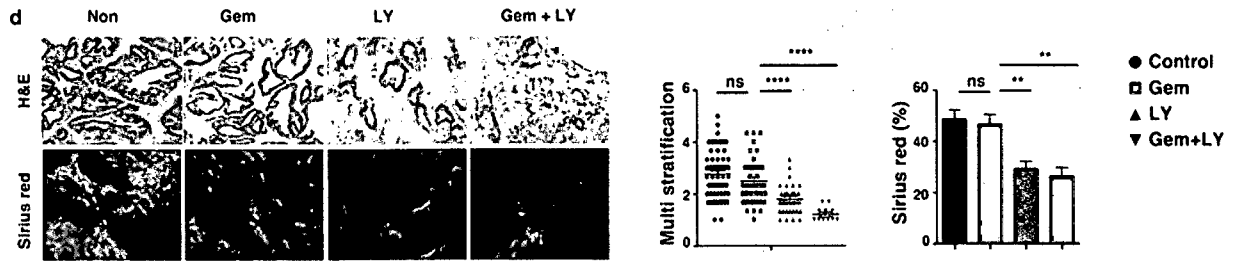
# プライマリ膵癌オルガノイドゼノグラフトの再発における ゲムシタビン/Notch3阻害剤 併用療法の効果

ゲムシタビンと Notch 阻害剤 (LY) の併用療法



n=6~10 / mean ± SEM / Mann-Whitney U test \*\*\* p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001







## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/016421

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12Q1/02(2006.01)i, A61K31/55(2006.01)i, A61K31/7068(2006.01)i, A61K45/06(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12Q1/68(2018.01)i, C12Q1/6837(2018.01)i, C12Q1/6874(2018.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. C12Q1/02, A61K31/55, A61K31/7068, A61K45/06, A61P35/00, A61P43/00, C12Q1/68, C12Q1/6837, C12Q1/6874, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/68

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

|                                                          |           |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| Published examined utility model applications of Japan   | 1922-1996 |
| Published unexamined utility model applications of Japan | 1971-2019 |
| Registered utility model specifications of Japan         | 1996-2019 |
| Published registered utility model applications of Japan | 1994-2019 |

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII),  
CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                        | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | KLINGHAMMER, K. et al., Choosing wisely-preclinical test models in the era of precision medicine, Cancer Treatment Reviews, vol. 55, 2017, pp. 36-45, particularly, abstract, 3D in vitro models, Patient derived xenograft (PDX) in vitro models, Drug discovery process and precision medicine, table 2 | 1-3                   |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
31.05.2019

Date of mailing of the international search report  
18.06.2019

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer  
  
Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/016421

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                     | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | ETO, K. et al., Human equilibrative nucleoside transporter 1 and Notch3 can predict gemcitabine effects in patients with unresectable pancreatic cancer, British Journal of Cancer, vol. 108, no. 7, 2013, pp. 1488-1494, particularly, abstract, results, first paragraph to fourth paragraph, discussion, third paragraph and last paragraph, fig. 3 | 1-3                   |
| Y         | WANG, Z. et al., Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway, Cancer Research, vol. 69, no. 6, 2009, pp. 2400-2407                                                                                                            | 1-3                   |
| Y         | ESPINOZA, I. et al., Notch signaling: Targeting cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition, OncoTargets and Therapy, vol. 6, 2013, pp. 1249-1259                                                                                                                                                                                       | 1-3                   |
| X         | WO 2015/153997 A2 (ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.) 08 October 2015, fig. 1, examples, paragraphs [0020], [0021], [0212]<br>& US 2017/0023576 A1                                                                                                                                                                                                         | 4                     |
| X         | JP 2016-520289 A (ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.) 14 July 2016, claims, fig. 1, examples, paragraphs [0131], [0115]<br>& WO 2014/151606 A2, claims, fig. 1, examples, paragraphs [0138], [0112] & CN 105051215 A & KR 10-2015-0130466 A                                                                                                                 | 4                     |
| A         | YAO, J. et al., Inhibition of Notch3 enhances sensitivity to gemcitabine in pancreatic cancer through an inactivation of PI3K/Akt-dependent pathway, Medical Oncology, vol. 27, no. 3, 2010, pp. 1017-1022                                                                                                                                             | 1-4                   |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                           |             |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                           |             |
| Int.Cl. C12Q1/02(2006.01)i, A61K31/55(2006.01)i, A61K31/7068(2006.01)i, A61K45/06(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12Q1/68(2018.01)i, C12Q1/6837(2018.01)i, C12Q1/6874(2018.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                           |             |
| B. 調査を行った分野                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                           |             |
| 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                           |             |
| Int.Cl. C12Q1/02, A61K31/55, A61K31/7068, A61K45/06, A61P35/00, A61P43/00, C12Q1/68, C12Q1/6837, C12Q1/6874, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/68                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                           |             |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                           |             |
| 日本国実用新案公報 1922-1996年<br>日本国公開実用新案公報 1971-2019年<br>日本国実用新案登録公報 1996-2019年<br>日本国登録実用新案公報 1994-2019年                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                           |             |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                           |             |
| JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                           |             |
| C. 関連すると認められる文献                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                           |             |
| 引用文献の<br>カテゴリー*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                                                                                                          | 関連する<br>請求項の番号            |             |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | KLINGHAMMER, Konrad et al., Choosing wisely - Preclinical test Models in the era of precision medicine, Cancer Treatment Reviews, Vol.55, 2017, pp.36-45, 特に Abstract, 3D in vitro models の項, Patient derived xenograft(PDX) in vitro models の項, Drug discovery process and precision medicine の項, Table 2 | 1-3                       |             |
| <input checked="" type="checkbox"/> C 欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                           |             |
| * 引用文献のカテゴリー<br>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの<br>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの<br>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)<br>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献<br>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献<br>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの<br>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの<br>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの<br>「&」 同一パテントファミリー文献 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                           |             |
| 国際調査を完了した日<br>31.05.2019                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 国際調査報告の発送日<br>18.06.2019  |             |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁 (I S A / J P)<br>郵便番号 100-8915<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 特許庁審査官 (権限のある職員)<br>清野 千秋 | 4 N 3 1 2 7 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 電話番号 03-3581-1101 内線      | 3488        |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                                                                                           | 関連する<br>請求項の番号 |
| Y                     | ETO, K. et al., Human equilibrative nucleoside transporter 1 and Notch3 can predict gemcitabine effects in patients with unresectable pancreatic cancer, British Journal of Cancer, Vol.108, No.7, 2013, pp.1488-1494,<br>特に Abstract, Results の第1～第4段落, Discussion の第3段落 及び最終段落, Figure 3. | 1-3            |
| Y                     | WANG, Z. et al., Acquisition of Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotype of Gemcitabine-Resistant Pancreatic Cancer Cells Is Linked with Activation of the Notch Signaling Pathway, Cancer Research, Vol.69, No.6, 2009, pp.2400-2407                                                    | 1-3            |
| Y                     | ESPINOZA, Ingrid et al., Notch signaling: Targeting cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition, OncoTargets and Therapy, Vol. 6, 2013, pp.1249-1259                                                                                                                         | 1-3            |
| X                     | WO 2015/153997 A2 (ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.) 2015.10.08, 図1, 実施例, [0020]-[0021], [0212] & US 2017/0023576 A1                                                                                                                                                                           | 4              |
| X                     | JP 2016-520289 A (オンコメッド ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド) 2016.07.14, 特許請求の範囲, 図1, 実施例, [0131], [0115]<br>& WO 2014/151606 A2, Claims, Fig.1, Examples, [0138], [0112]<br>& CN 105051215 A & KR 10-2015-0130466 A                                                                                   | 4              |
| A                     | YAO, Jun et al., Inhibition of Notch3 enhances sensitivity to gemcitabine in pancreatic cancer through an inactivation of PI3K/Akt-dependent pathway, Medical Oncology, Vol.27, No.3, 2010, pp.1017-1022                                                                                    | 1-4            |