

(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
2013年9月12日(12.09.2013)

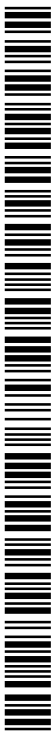


(10) 国際公開番号
WO 2013/133220 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/02 (2006.01) G01N 33/483 (2006.01)
C12N 5/09 (2010.01) G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/055865
- (22) 国際出願日: 2013年3月4日(04.03.2013)
- (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 2012-052348 2012年3月8日(08.03.2012) JP
- (71) 出願人: 学校法人産業医科大学(UNIVERSITY OF OCCUPATIONAL AND ENVIRONMENTAL HEALTH, JAPAN) [JP/JP]; 〒8078555 福岡県北九州市八幡西区医生ヶ丘1番1号 Fukuoka (JP).
- (72) 発明者: 上野 光(UENO, Hikaru); 〒8078555 福岡県北九州市八幡西区医生ヶ丘1番1号 学校法人産業医科大学内 Fukuoka (JP). 鈴木 光浩(SUZUKI, Mitsuhiko); 〒8078555 福岡県北九州市八幡西区医生ヶ丘1番1号 学校法人産業医科大学内 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 高島 一(TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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, 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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))



WO 2013/133220 A1

(54) Title: CANCER MALIGNANCY TESTING METHOD, PLURIPOTENT TUMORIGENIC CELLS, AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 発明の名称: がんの悪性度の試験方法、ならびに多能性を有する造腫瘍細胞およびその調製方法

(57) Abstract: The present invention provides: a method for testing the latent malignancy of a cell population; new tumorigenic cells that are useful for discovering the mechanisms associated with cancer and developing cancer therapy; and a method for preparing said cells. The present invention is characterized by the creation of pluripotent tumorigenic cells from non-tumorigenic cells via hypoxia-induced reprogramming, and/or by the use of SSEA-1, SSEA-3, TRA-1-60 or TRA-1-81 as a specific cell surface marker associated with the pluripotent tumorigenic cells.

(57) 要約: 本発明は、細胞集団の潜在的ながん悪性度を試験するための方法、がんの機構の解明や治療法の確立等に有用な新規の造腫瘍細胞、および該細胞を調製するための方法等を提供する。本発明は、低酸素負荷で誘導されるリプログラミングにより非造腫瘍細胞から多能性を有する造腫瘍細胞を生じさせること、および/またはSSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60またはTRA-1-81を多能性を有する造腫瘍細胞の特異的な細胞表面マーカーとして利用することを特徴とする。

明 細 書

発明の名称：

がんの悪性度の試験方法、ならびに多能性を有する造腫瘍細胞およびその調製方法

技術分野

[0001] 本発明は、細胞集団の潜在的ながん悪性度を試験する方法に関する。本発明はまた、低酸素負荷で誘導されるリプログラミングにより非造腫瘍細胞から生じた多能性を有する造腫瘍細胞、および該細胞を調製する方法等にも関する。

背景技術

[0002] 腫瘍内のがん細胞は同質ではなく実はきわめて多様で不均一である。この不均一性は現在のところ、（互いに排他的なものではないが）2つのモデルにより説明されている。クローン進化モデル（clonal evolution model；非特許文献1）においては、ほとんどのがん細胞が造腫瘍能を有しており、遺伝子の違い（遺伝子変異）およびエピジェネティックな機構の違いを通じて不均一性が生じるとする。一方、がん幹細胞（cancer stem cell；CSC）仮説によれば、がん細胞は階層的に構成されており、CSCと呼ばれる小集団のみが、自己複製し、腫瘍を発生させ、そしてエピジェネティックな変化を通じて多様な表現型を持つ非造腫瘍細胞群を生じることができるとされる（非特許文献2～4）。CSCの概念は魅力的ではあるが、現在の一方的な階層モデルには多くの疑問や矛盾があり、特にCSCの起源については未解明である（非特許文献3、5および6）。一つの仮説は、CSCは、それが存在する組織の幹細胞ががん化したものとする。あるいは、CSCは、非CSCが幹細胞様の特性を獲得することにより生じる可能性がある。上皮間葉移行（Epithelial-to-Mesenchymal Transition；EMT）は、そのようなプロセスが起こり得る一つの機構であると報告されている（非特許文献7）。いずれの場合も、現時点では造腫瘍細胞と非造腫瘍細胞とを識別できる

特異的な細胞マーカーは確定していない（非特許文献8および9）。

[0003] 抗腫瘍血管新生療法は、がんの有効な治療法となることが期待されていた。しかし、臨床試験の結果は期待外れなものであり、がんは決して治らず、得られる生存利益はせいぜい数ヶ月であった。更に驚くべきことには、治療後に治療前よりもむしろ悪化している症例もあった（非特許文献10～12）。腫瘍内の低酸素環境が、原因の少なくとも一つと考えられる（非特許文献13）。腫瘍内の低酸素領域の存在は、未分化な表現型のがん細胞の存在と、そして臨床的には予後不良とよく相関していることが知られている（非特許文献14および15）。低酸素は、低酸素誘導因子（Hypoxia-Inducible Factors；HIF）を活性化することにより、多くの遺伝子を活性化する（非特許文献15および16）。膠芽細胞腫、結腸直腸がんおよび非小細胞肺癌において、HIF2 α をターゲティングすることにより自己複製が阻害され、造腫瘍能が低下した（非特許文献17および18）。

[0004] 分化した細胞が幹細胞に復帰することは不可能であると考えられていたが、京都大学の山中らにより、Oct3/4、Sox2、Klf4およびc-Mycの4因子を遺伝子導入すれば、線維芽細胞において初期化が誘導され、多能性幹細胞（induced pluripotent SC；iPSC；人工多能性幹細胞）に転換できるという驚くべき発見がなされた（非特許文献19）。この事実により、分化した非造腫瘍性がん細胞が造腫瘍能を持つCSCに復帰する可能性があり得ることになる。実際に胚性幹（ES）細胞で発現している遺伝子や上記4つの初期化誘導遺伝子が、より未分化な腫瘍細胞においてより高頻度に発現していることが見出されている（非特許文献20）。加えて：

- （a）低酸素条件下では遺伝的不安定性が促進される（非特許文献21）；
- （b）OCT3/4はHIF-2 α の直接の標的である（非特許文献22）；
- （c）様々な幹細胞が低酸素微小環境内に存在する（非特許文献23）；
- および（d）低酸素はiPSCの作製効率を向上させる（非特許文献24）。

しかしながら、低酸素により、分化した非造腫瘍細胞において初期化が誘導され、それにより多能性を有する造腫瘍細胞が生成されることを実証した

報告は存在しない。

先行技術文献

非特許文献

- [0005] 非特許文献1: Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.
- 非特許文献2: Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., and Wahl, G.M. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66, 9339-9344.
- 非特許文献3: Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E.R., and Morrison, S.J. (2009). Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* 138, 822-829.
- 非特許文献4: Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8, 755-768.
- 非特許文献5: Gupta, P.B., Chaffer, C.L., and Weinberg, R.A. (2009). Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat Med* 15, 1010-1012.
- 非特許文献6: Shipitsin, M., and Polyak, K. (2008). The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance. *Lab Invest* 88, 459-463.
- 非特許文献7: Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704-715.
- 非特許文献8: Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* 17, 313-319.
- 非特許文献9: Quintana, E., Shackleton, M., Foster, H.R., Fullen, D.R.

, Sabel, M.S., Johnson, T.M., and Morrison, S.J. (2010). Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. *Cancer Cell* 18, 510-523.

非特許文献10 : Bergers, G., and Hanahan, D. (2008). Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 8, 592-603.

非特許文献11 : Ebos, J.M., and Kerbel, R.S. (2011). Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nat Rev Clin Oncol* 8, 210-221.

非特許文献12 : Paez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Vinals, F., Inoue, M., Bergers, G., Hanahan, D., and Casanovas, O. (2009). Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 15, 220-231.

非特許文献13 : Loges, S., Mazzone, M., Hohensinner, P., and Carmeliet, P. (2009). Silencing or fueling metastasis with VEGF inhibitors: antiangiogenesis revisited. *Cancer Cell* 15, 167-170.

非特許文献14 : Gordan, J.D., and Simon, M.C. (2007). Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev* 17, 71-77.

非特許文献15 : Keith, B., and Simon, M.C. (2007). Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell* 129, 465-472.

非特許文献16 : Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 721-732.

非特許文献17 : Franovic, A., Holterman, C.E., Payette, J., and Lee, S. (2009). Human cancers converge at the HIF-2alpha oncogenic axis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21306-21311.

非特許文献18 : Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R.E., et al. (2009)

). Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell* 15, 501-513.

非特許文献19 : Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.

非特許文献20 : Ben-Porath, I., Thomson, M.W., Carey, V.J., Ge, R., Bell, G.W., Regev, A., and Weinberg, R.A. (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 40, 499-507.

非特許文献21 : Reynolds, T.Y., Rockwell, S., and Glazer, P.M. (1996). Genetic instability induced by the tumor microenvironment. *Cancer Res* 56, 5754-5757.

非特許文献22 : Covello, K.L., Kehler, J., Yu, H., Gordan, J.D., Arsham, A.M., Hu, C.J., Labosky, P.A., Simon, M.C., and Keith, B. (2006). HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev* 20, 557-570.

非特許文献23 : Mohyeldin, A., Garzon-Muvdi, T., and Quinones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 7, 150-161.

非特許文献24 : Yoshida, Y., Takahashi, K., Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2009). Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 5, 237-241.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、当該技術分野における上述の現状を鑑み為されたものであり、造腫瘍能を有するがん細胞（すなわち、がん幹細胞）が生じる機構を突き止め、以って細胞集団の潜在的ながん悪性度を試験し得る方法を提供することをその目的とする。本発明はまた、低酸素負荷で誘導されるリプログラミング

グにより非造腫瘍細胞から生じた多能性を有する造腫瘍細胞、および該細胞を調製するための方法等を提供することも目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者等は、上記の課題を解決すべく鋭意検討した。

本発明者等は先ず、当該技術分野において得られている知見に基づいて、低酸素により非がん幹細胞において初期化が誘導され、それにより多分化能（multipotencyまたはpluripotency）を有する造腫瘍細胞が生じるという仮説を立てた。係る仮説を実証すべく、本発明者等は、いくつかのヒト肺がん細胞株を用いて、造腫瘍細胞と非造腫瘍細胞とを特異的に識別し得る細胞表面マーカーを同定することを試み、ES細胞特異的な細胞表面マーカーとして知られるSSEA-1およびSSEA-3がそのようなマーカーとして利用し得ることを見出した。そして、上記の細胞株およびマーカーを用いて、更なる研究を行ったところ、低酸素負荷により、分化した非造腫瘍細胞において容易に初期化が誘導されてがん幹細胞を生じること、そして生じたがん幹細胞は、不均一な表現型の非造腫瘍性の子孫を生じ得るのみならず、3胚葉すべてに及ぶ広範な分化能力を示すことを初めて明確に実証した。本発明者等は更に、TRA-1-60およびTRA-1-81もSSEA-1およびSSEA-3と同様に、多能性を有する造腫瘍細胞と非造腫瘍細胞とを特異的に識別し得る細胞表面マーカーとして利用し得ることを見出した。そして、これらのマーカーの発現が、被験者におけるがんの転移および生存率と有意に相関することを本発明者等は見出した。本発明者等は、これらの知見に基づき更に研究を進め、本発明を完成するに至った。

[0008] 本発明はすなわち、以下を提供する。

[1] 細胞集団の潜在的ながん悪性度を試験する方法であって、

(1) 試験の対象とする細胞集団を用意する工程、

(3) 前記の細胞集団におけるSSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60およびTRA-1-81からなる群から選択される1以上のマーカータンパク質の発現レベルを測定する工程、および

(4) 前記の1以上のマーカータンパク質の発現のいずれかが陽性である場合、前記の試験の対象とする細胞集団は潜在的ながんの悪性度が高いと決定する工程

を含む、方法。

[2] 前記測定工程の以前に、

(2) 前記細胞集団を低酸素負荷に供する工程

を更に含み、前記測定工程において前記1以上のマーカータンパク質の発現レベルを測定される細胞集団が、前記低酸素負荷工程後の細胞集団である、上記[1]に記載の方法。

[3] 前記1以上のマーカータンパク質が、SSEA-1、TRA-1-60およびTRA-1-81からなる群から選択される少なくとも1つを含む、上記[1]または[2]に記載の方法。

[4] 前記1以上のマーカータンパク質がSSEA-1を含む、上記[1]～[3]のいずれか1つに記載の方法。

[5] 前記測定工程において、更に、SSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60およびTRA-1-81以外の1以上の幼若化マーカー遺伝子のmRNAまたはタンパク質発現レベルも測定される、上記[1]～[4]のいずれか1つに記載の方法。

[6] 前記幼若化マーカー遺伝子が、OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC、NANOG、LIN28、REX1およびERASからなる群から選択される1以上の遺伝子である、上記[5]に記載の方法。

[7] 前記低酸素負荷工程において、10%未満の酸素レベルにおける10時間以上の低酸素負荷が少なくとも1回行われる、上記[2]～[6]のいずれか1つに記載の方法。

[8] 前記の発現レベルの測定が、フローサイトメトリー法または免疫組織化学法を用いて行われる、上記[1]～[7]のいずれか1つに記載の方法。

[9] 被験者におけるがんの悪性度を試験するために、被験者においてがん

の存在が疑われる組織から採取された試料に対して行われる、上記 [1] ~ [8] のいずれか 1 つに記載の方法。

[1 0] 前記被験者が前記がんの術後の患者である、上記 [9] に記載の方法。

[1 1] 前記の試験の対象とする細胞集団が、SSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60およびTRA-1-81からなる群から選択される 1 以上のマーカータンパク質の発現の全てが陰性であることを指標にして選択されたものである、上記 [1] ~ [1 0] のいずれか 1 つに記載の方法。

[1 2] 前記がんが肺がん、消化器がん、乳がん、皮膚がんまたは脳腫瘍である、上記 [1] ~ [1 1] のいずれか 1 つに記載の方法。

[1 3] 低酸素負荷で誘導されるリプログラミングにより非造腫瘍細胞から生じた多能性を有する造腫瘍細胞を調製する方法であって、

(1) 非造腫瘍細胞を含む細胞集団を用意する工程、

(2) 前記の用意された細胞集団から、SSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60およびTRA-1-81からなる群から選択される 1 以上のマーカータンパク質の発現の全てが陰性であることを指標にして非造腫瘍細胞を選択する工程、

(3) 前記の選択された細胞集団を低酸素負荷に供する工程、および

(4) 低酸素負荷工程後の細胞集団から、SSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60およびTRA-1-81からなる群から選択される 1 以上のマーカータンパク質の発現のいずれかが陽性であることを指標にして、多能性を有する造腫瘍細胞を選択する工程

を含む、方法。

[1 4] 前記の非造腫瘍細胞を選択する工程および前記の多能性を有する造腫瘍細胞を選択する工程において、前記 1 以上のマーカータンパク質が、SSEA-1、TRA-1-60およびTRA-1-81からなる群から選択される少なくとも 1 つを含む、上記 [1 3] に記載の方法。

[1 5] 前記の非造腫瘍細胞を選択する工程および前記の多能性を有する造

腫瘍細胞を選択する工程において、前記1以上のマーカータンパク質がSSEA-1を含む、上記[13]または[14]に記載の方法。

[16] 前記の選択された多能性を有する造腫瘍細胞において、SSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60およびTRA-1-81以外の1以上の幼若化マーカー遺伝子のmRNAまたはタンパク質の発現が陽性であることを確認することを更に含む、上記[13]～[15]のいずれか1つに記載の方法。

[17] 前記幼若化マーカー遺伝子が、OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC、NANOG、LIN28、REX1およびERASからなる群から選択される1以上の遺伝子である、上記[16]に記載の方法。

[18] 前記低酸素負荷工程において、10%未満の酸素レベルにおける10時間以上の低酸素負荷が少なくとも1回行われる、上記[13]～[17]のいずれか1つに記載の方法。

[19] 前記の非造腫瘍細胞を選択する工程および前記の多能性を有する造腫瘍細胞を選択する工程において、細胞の選択が、フローサイトメトリー法を用いて行われる、上記[13]～[18]のいずれか1つに記載の方法。

[20] 低酸素負荷で誘導されるリプログラミングにより非造腫瘍細胞から生じた多能性を有する造腫瘍細胞。

発明の効果

[0009] 本発明の試験方法によれば、がん組織等の臨床標本においてマーカータンパク質の発現を検出するだけで、簡便かつ高信頼度に多能性を有する造腫瘍細胞の存在を検出し、以ってがん悪性度を試験できる。あるいは、マーカータンパク質の発現の検出に先立ち、がん組織等の試料中の細胞集団を低酸素負荷に供することにより、多能性を有する造腫瘍細胞への非造腫瘍細胞のリプログラミングを促進し、それにより試験の感度を更に向上させることができる。本発明の試験方法を適用することにより、生体内に存在する造腫瘍細胞または低酸素状態に起因して造腫瘍細胞に転換される見込みが高い非造腫瘍細胞をがんが初発または再発する前に検出して、悪性度を予測することが

可能である。あるいは、がんの発症を初期のステージで検出してがん患者の早期治療に導くことも可能である。また、がん患者に対する治療効果を造腫瘍細胞または低酸素状態に起因して造腫瘍細胞に転換される見込みが高い非造腫瘍細胞の存在を指標にして評価することも可能である。更に、本発明により提供される試験方法、新規細胞および該細胞の調製方法は、例えば、非造腫瘍細胞から多能性を有する造腫瘍細胞へのリプログラミングの機構に関する研究や、悪性がんの有効な治療法の確立等のために有用であるばかりか、iPS細胞作製においてがん化を防ぐ作製方法の開発にも資する。

図面の簡単な説明

[0010] [図1] 図1は、がん細胞における幹細胞性マーカーの低酸素誘導による活性化を示す。様々ながん細胞および線維芽細胞 (TIG3) (A, B) またはN417細胞 (A-H) をnormoxia (Nまたは白色カラムで示す) または5% O₂ (Hyまたは黒色カラムで示す) のいずれかの条件下で12時間インキュベートした後、幹細胞性マーカーの遺伝子活性化およびタンパク質発現のためのRT-PCR (A, C)、定量的リアルタイムPCR (qPCR) (B)、FACS解析 (D) または免疫組織化学 (E) に供した。hypoxia条件下での様々な時点におけるN417の遺伝子活性化をRT-PCRにより調べた (C)。アルカリホスファターゼ活性 (F)、スフィア形成 (G)、およびヘキスト33342 (5 μg/mL) を用いたサイドポピュレーション (SP) アッセイ (H) も行なった。qPCR解析 (B) では、normoxia条件下でのTIG3発現レベルを1.0 (平均±標準偏差、n=3) とし、それに対してmRNAレベルを正規化した。スフィアアッセイ (G) のために、hypoxiaまたはnormoxiaに暴露した細胞を2週間インキュベートした後、スフィア (直径>75 μm) の個数を数えた (平均±標準偏差、n=3、* p < 0.01)。SP (H) はベラパミル (50 μM) の存在下 (+Ver) または非存在下 (-) で測定した。ベラパミル感受性の低強度の画分をSPと定義した。

[図2] 図2は、「分化した」非造腫瘍細胞が低酸素下においてがん幹細胞に復帰することを示す。(A) 様々な選別されたN417細胞画分 (注射あたり1.0 x 10⁴細胞、各群についてn=4) をNOD-SCIDマウスに皮下注射し、腫瘍形成を観察

した。(B) 非選別細胞、SSEA-1+細胞またはSSEA-3+細胞のいずれかにより形成された異種移植腫瘍から分離されたがん細胞をFACSによりSSEA-1およびSSEA-3発現について解析した。各項目について左から、非選別細胞、SSEA-1+細胞、SSEA-3+細胞の場合を示す。(C) N417細胞を5% O₂下で12時間インキュベートした後、SSEA-1、SSEA-3、OCT3/4、SOX2およびNANOGの発現をFACSにより解析した。SSEA陽性または陰性画分をそれぞれ青色または赤色で示している。(D) 4つのES細胞特異的表面抗原のいずれも発現しない細胞画分を選別した。選別していない細胞および選別した細胞のプロファイルを示す(a, b)。normoxia条件下で12時間インキュベートした後、選別した細胞をhypoxia (5% O₂) (d) またはnormoxia (c) のいずれかに12時間暴露した後、ES細胞特異的抗原に対する解析を再度行った。SSEA-1、SSEA-3およびTRA1-81陽性細胞の実際の数を示す(e)。様々な条件における解析した全細胞に対する生細胞の割合を示す(f)。3回の独立した実験を行い、同様の結果を得た。

[図3] 図3は、低酸素負荷により生じたがん幹細胞が多能性であることを示す。(A) 様々な解析を含む実験プロトコールを示す。(B) 胚様体形成の間の様々な時点における低酸素暴露した細胞および低酸素暴露していない細胞、ならびに何らかの処理をする前の細胞(Cとして示す)を幹細胞性遺伝子および様々なマーカー遺伝子についてのRT-PCRに供した。(C) 低酸素暴露した細胞(Hy)および低酸素暴露していない細胞(N)をVEGF-A + PDGF-AAの存在下(それぞれ10ng/mL)または非存在下でEB形成後に2日間インキュベートした後、ヒトVEGFR2およびヒトCD31の発現についてのFACS解析に供した。血管新生増殖因子についての1日目におけるRT-PCR解析も示している。(D) 低酸素暴露した細胞(Hy)および低酸素暴露していない細胞(N)を分化促進培地中でEB形成後に12日間インキュベートした後、 β IIIチューブリン(a, d)、 α FP(b, e)または α SMA(c, f)の免疫染色に供した。核の染色にはDAPIを用いた。スケールバーは100 μ mを示す。(E, F) SSEA-1+、SSEA-3+または非選別のN417-GFP細胞をNOD-SCIDマウスの辜丸に注射した。腫瘍が形成された。

(E) そのような腫瘍のパラフィン切片に対して、 β IIIチューブリン(a)、

α FP (b) および α SMA (c) の発現解析を行った。(F) 組織化された組織も腫瘍内に見られた。HE染色により、CK14 (d) を発現する真皮 (a)、ならびに腺組織 (b) および筋肉 (c) が明らかにされた。そのような組織中の細胞は抗GFP抗体で染色され (e, f)、これらの組織はがん細胞に由来することを示した。スケールバーは500 μ mを示す。

[図4] 図4は、異種移植腫瘍が、機能的な内皮細胞および血管平滑筋細胞にその後分化し、がん細胞の低酸素誘導性のリプログラミングを示すことを示す。(A, B) N417-GFPによる異種移植腫瘍を、個々の図に示されるように、CA9 (番号なしおよび1)、SOX2 (2)、OCT3/4 (3)、フォン・ウィレブランド因子 (vWF) (4)、hCD31 (5)、HIF1 α (6)、HIF2 α (7)、NANOG (8)、SSEA-1 (9) またはKi67 (10) に対する抗体を用いた免疫組織化学に供した。CA9染色の状態に従い、腫瘍領域を4群に分類した。a: 高度低酸素領域、b: 低酸素領域、c: 中間領域、d: 非低酸素領域。(C) hCD31、mCD31またはh α SMAに対する抗体を用いて、N417-GFP細胞、H358細胞、H460細胞またはH157細胞のいずれかにより形成された異種移植腫瘍を解析した。いくつかの切片では、ヒトおよびマウス両方の α SMAを認識する抗体 (α SMAとして示す) を用いた。N417-GFP異種移植腫瘍からのいくつかの切片は、GFPに対する抗体およびhCD31またはh α SMAのいずれかに対する抗体で二重染色された。この結果は、hCD31またはh α SMA発現細胞が実際ががん細胞に由来することを示す。H460およびH157異種移植腫瘍では、mCD31+ ECおよび α SMA+細胞は組織化された構成ではない。スケールバーは100 μ mを示す。

[図5] 図5は、SSEA-1陽性細胞およびSSEA-3陽性細胞が、TRA-1-60およびTRA-1-81陽性であることを示す。(A) N417細胞を5% O₂下で12時間インキュベートした後、SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、OCT3/4、SOX2、NANOG、TRA-1-60およびTRA-1-81の発現をFACSにより解析した。SSEA陽性または陰性画分をそれぞれ青色または赤色で示している。(B) SSEA-1陽性細胞を免疫不全マウスの皮下に移植し、12週間後に、成長した異種移植腫瘍 (xenograft) を免疫染色法により解析した。(C) ヒト肺がん標本切片を免疫染色法により解析した。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0012] (定義)

本発明において、がんは任意の種類のがんであってよく、固形がん〔例えば、消化器がん（例えば、胃がん、食道がん、小腸がん、結腸がん、直腸がん、肛門がん、肝臓がん、胆道がん、膵臓がん等）、泌尿器または生殖器のがん（例えば、腎がん、腎細胞がん、膀胱がん、前立腺がん、腎盂および尿管がん、胆嚢がん、胆管がん、精巣がん、陰茎がん、子宮がん、子宮内膜がん、子宮肉腫、子宮頸がん、膣がん、外陰がん、卵巣がん、卵管がん等）、脳・神経系のがん（例えば、脳腫瘍（グリオブラストーマ等）、脊髄腫瘍等）、頭頸部がん（例えば、喉頭がん、口腔がん、唾液腺がん、副鼻腔がん、甲状腺がん等）、呼吸器系のがん（例えば、肺がん（小細胞肺がん、非小細胞肺がん、転移性肺がんを含む）、気管支がん等）、乳がん、皮膚がん（例えば、悪性黒色腫等）、骨のがん（例えば、骨肉腫等）、筋肉のがん（例えば、横紋筋肉腫等）等〕、血液がん〔例えば、骨髄腫、白血病、リンパ腫等〕等を挙げることができるが、これらに限定されない。本発明が対象とするがんとしては、低酸素状態の発生と関連するがんが特に好ましいものとして挙げられ、従って任意の固形がんが特に好ましい。固形がんとして具体的には、肺がん、消化器がん、乳がん、皮膚がんおよび脳腫瘍が好ましく、肺がん、消化器がんおよび乳がんがより好ましく、肺がんおよび消化器がんが更により好ましく、肺がんが特に好ましい。

[0013] 本発明で用いられる細胞集団の由来または本発明の対象は、通常、哺乳動物である。哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類やウサギ等の実験動物、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ、ミンク等の家畜、イヌ、ネコ等のペット、ヒト、サル、アカゲザル、マーモセット、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類等を挙げることができるが、これらに限定されない。

[0014] 本発明において発現レベルの検出の対象とされるStage-Specific Embryoni

c Antigen (ステージ特異的胎児抗原 ; S S E A) - 1、S S E A - 3、T R A - 1 - 6 0 および T R A - 1 - 8 1 (以下、これらを総称して「本発明のマーカートンパク質」または単に「本発明のマーカー」と呼称することもある) は、特定のモノクローナル抗体により特異的に認識される表面糖鎖抗原として見出されたものであり、E S 細胞等の多能性幹細胞において発現することが知られている。本発明のマーカーは、具体的には例えば、Myung, J.S. et al., Cell Stem Cell 4, 440-452 (2009) (S S E A - 1)、Muramatsu T. et al., Trends Glycosci Glyc 21, 197-206 (2009) (S S E A - 3)、William, M.S. et al., Stem Cells 25, 720-730 (2007) (T R A - 1 - 6 0 および T R A - 1 - 8 1) 等に記載されている。

[0015] 本明細書において、「造腫瘍細胞」とは、良性または悪性の、進行性増殖を示す腫瘍の形成を惹起できる細胞をいう。細胞集団の造腫瘍能を評価する方法として、例えば核型分析、軟寒天コロニー形成試験、免疫不全動物における腫瘍形成能試験等が知られており、当業者はこれらの試験のいずれかまたは組み合わせにより、所与の細胞集団が造腫瘍能を有するのか否かを評価することができる。

造腫瘍細胞は、一般にがん幹細胞として知られる細胞であり得る。がん幹細胞とは、継続的に増殖可能な腫瘍の再構築に必要ながん細胞であって、自己複製能、およびがん細胞集団内の多様な表現型を有するがん細胞のすべてを産生できる分化能を有する細胞と定義される(例えば、上記非特許文献2を参照)。自己複製能とは、分裂した2つの娘細胞のどちらか1つ、あるいは、両方の細胞が、細胞系譜上、親細胞と同等の能力および分化程度を保持している細胞を産出できる能力をいう。

[0016] 本明細書において、「非造腫瘍細胞」とは上記の造腫瘍細胞ではない細胞をいう。非造腫瘍細胞は造腫瘍能を有しないがん細胞であってもよいし、あるいはがん細胞でなくてもよい。

[0017] 本明細書において「多能性(pluripotency)」とは、分化多能性のことであって、内胚葉、中胚葉および外胚葉の3つの胚葉のいずれの系列の細胞に

も分化できる、細胞が有する能力のことをいう。細胞が多能性を有するか否かを評価する方法は当該技術分野で公知であり、例えば、細胞を浮遊培養して胚様体を形成させ、更に胚様体を種々の分化培地中で培養した後、組織特異的なマーカー発現の有無を検出することにより三胚葉全てに分化できたかどうかを確認する方法、細胞を免疫不全マウスに移植することによりテラトーマが形成されることを確認する方法、等が挙げられる。

[0018] 本明細書において「リプログラミング」または「初期化」とは、分化した細胞が、エピジェネティックな変化を受けて、上に定義した意味での多能性を有する細胞に変容されることをいう。

[0019] 本明細書において「幼若化マーカー遺伝子」とは、ES細胞やiPS細胞等の多能性幹細胞において特異的な発現を示す遺伝子をいう（例えば、実験医学増刊Vol.26, No.5, p.29-34を参照）。ここでいう「特異的な発現」とは、ES細胞やiPS細胞等の多能性幹細胞においては高いmRNAおよび／またはタンパク質発現が見られるが、当該細胞が分化すると急速に発現が低下することを意味する。本発明において用いることができる幼若化マーカー遺伝子としては、以下に限定されないが、例えば、OCT3／4、SOX2、KLF4、c-MYC、NANOG、LIN28、REX1、ERAS等が挙げられ、好ましいものとしてはOCT3／4、SOX2、KLF4、c-MYCおよびNANOGである。

本明細書において「幼若化マーカータンパク質」とは、上で定義される「幼若化マーカー遺伝子」のタンパク質を意味する。

[0020] 本明細書において、マーカータンパク質の発現レベルの測定は、後述するように、通常、当該マーカータンパク質に対する特異的抗体等を用いたフローサイトメトリー解析等により行われる。マーカーの発現が「陽性」であるとは、該マーカーが細胞表面上（または細胞内）に発現しており、当該マーカーに対する抗体による特異的結合が検出できることをいう。マーカーの発現が「陰性」であるとは、該マーカーが細胞表面上（または細胞内）に実質的に発現しておらず、当該マーカーに対する抗体による特異的結合が検出で

きないことをいう。なお、当業者に明らかなように、発現レベルは定性的なものであってもよいし、定量的なものであってもよい。

[0021] (試験方法)

本発明は、細胞集団の潜在的ながん悪性度を試験する方法（以下、本発明の試験方法ともいう）を提供する。本発明の試験方法は、

(1) 試験の対象とする細胞集団を用意する工程、

(3) 前記の細胞集団におけるSSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60およびTRA-1-81からなる群から選択される1以上のマーカータンパク質の発現レベルを測定する工程、および

(4) 前記の1以上のマーカータンパク質の発現のいずれかが陽性である場合、前記の試験の対象とする細胞集団は潜在的ながんの悪性度が高いと決定する工程

を含む。

[0022] 本発明の試験方法において、細胞集団の潜在的ながん悪性度とは、当該細胞集団が生体内（例えば、上記哺乳動物の生体内）の特定の部位（例えば、当該細胞集団が由来する組織）に存在する時に生じることが見込まれるがんの悪性度をいう。ここで、がんの悪性度は、当業者により、生体内における多能性を有する造腫瘍細胞またはがん幹細胞の存在の有無と関連付けられ得る任意のがん悪性度を意味し、例えば、予後不良の度合い（例えば、生存率、治療抵抗性、および悪化または再発の可能性、等）、ならびに／あるいは転移、増殖および／または浸潤の可能性および／または早さと関連するものであり得る。

本発明者等は、本発明のマーカータンパク質が、多能性を有する造腫瘍性細胞と非造腫瘍性細胞とを特異的に識別できる細胞表面マーカー（またはがん幹細胞マーカー）として使用できることを見出した。そのため、がん組織等の臨床標本において本発明のマーカータンパク質の発現を検出するだけで、簡便かつ高信頼度になんがん悪性度を試験できる。

本発明者等は更に、分化した非造腫瘍細胞（従って、本発明のマーカータ

ンパク質を発現しない)が、低酸素負荷によりリプログラミングされて、本発明のマーカートンパク質を発現する、多能性を有する造腫瘍細胞になり得ることも見出した。従って、ある細胞集団が、後述するようにして、低酸素負荷に供され、更に本発明のマーカートンパク質の発現レベルを測定された場合に、本発明のマーカートンパク質を発現すれば、元々の細胞集団内には、多能性を有する造腫瘍細胞が存在していたか、あるいは、低酸素状態に起因して多能性を有する造腫瘍細胞にリプログラミングされる蓋然性が高い分化した非造腫瘍細胞が存在していたと理解される。このようにして、本発明の試験方法により細胞集団の潜在的ながん悪性度を決定することができる。特に、がん組織中でのがん幹細胞の頻度が低いために検出が容易でない場合であっても、細胞集団を低酸素負荷に供することにより、多能性を有する造腫瘍細胞にリプログラミングされる蓋然性が高い非造腫瘍細胞は容易にリプログラミングされて本発明のマーカートンパク質を発現するようになる。従って、本発明の試験方法において、細胞集団を低酸素負荷に供する工程を含めることにより、試験の感度を更に高めることができる。

[0023] (1) 試験の対象とする細胞集団を用意する工程

[0024] 本発明の試験の対象とする細胞集団は、本発明による潜在的ながん悪性度の試験を所望される任意の細胞集団であってよい。該細胞集団は、被験者から採取された生体試料、あるいは当業者により研究、開発または医療等の目的のために用いられるあらゆる細胞集団、等であり得る。該細胞集団は良性または悪性（すなわち、がん細胞）の腫瘍細胞を含むものであってもよいし、あるいは含まないものであってもよい。

[0025] 被験者から採取された生体試料を用いることにより、該被験者における潜在的ながん悪性度を試験することができる。用いられる生体試料は、通常、被験者においてがんの存在が疑われる組織から採取された試料である。がんの存在が疑われる組織としては、例えば、上記したがん種の原因または転移が疑われる組織、腫瘍細胞またはがん細胞を含むことが既知である組織、治療（例えば、外科的治療、抗がん剤治療、放射線療法、免疫療法、温熱療法

等) されているがんの組織、等が挙げられる。また、がんの術後（外科的切除・摘出後）の再発と、がん幹細胞の残存とが関連する可能性が示唆されており、従って、がんの術後の患者から採取された術後組織の試料を用いることも好ましい。

本発明の試験方法に供される生体試料は、被験者から採取可能なものであれば特に限定されるものではなく、試験の目的、すなわち試験の対象とするがん種に応じて、血液、骨髓液、リンパ液等の体液試料や、肺、各種消化器、乳房、皮膚、脳組織等の種々の臓器の生検試料等を利用できる。体液試料または生検試料等からの、培養に供する細胞集団の調製は、当業者に慣用されている手順に従えばよい。

[0026] 前記の研究、開発または医療等の目的のために用いられる細胞集団についても、本発明による潜在的ながん悪性度の試験を所望される任意の細胞集団であってよい。

例えば、非造腫瘍細胞から多能性を有する造腫瘍細胞へのリプログラミングの機構に関する研究のために、所与の細胞集団を用いることができる。それに限定されるものではないが、特にこのような研究目的での本発明の試験方法の適用において、試験の対象とする細胞集団として、予め非造腫瘍細胞のみを選別したものをを用いることもまた好ましい。この場合、例えば、1つ以上の本発明のマーカートンパク質に対する特異的抗体、好ましくは全ての本発明のマーカートンパク質に対する特異的抗体を用いたフローサイトメトリ法において、用いられた全ての特異的抗体に対する結合が陰性であることを指標として該選別を行うことができる。

また、種々のがんの有効な治療法の確立のために、インビトロにおいて特定の処置（例えば、抗がん剤の候補物質の投与）を施されたがん細胞集団と、該処置を施されていない同一の由来のがん細胞集団とを本発明の試験方法に供し、両細胞集団の潜在的ながん悪性度を比較することにより、当該処置（例えば、候補物質）の有効性を評価することができる。これにより、特に、多能性を有する造腫瘍細胞（もしくはがん幹細胞）および／または該細胞

にリプログラミングされる蓋然性が高い非造腫瘍細胞を標的化した有効な抗がん療法の開発に資することができる。

あるいは、医療目的での移植用細胞集団を本発明の試験方法に供することにより、該細胞集団の安全性を評価することもできる。例えば、作製した i P S 細胞を本発明の試験方法に供することで該 i P S 細胞のがん化の可能性を評価し得るため、がん化を防ぐ i P S 細胞の作製方法の開発に資することができる。

[0027] (2) 用意された細胞集団を低酸素負荷に供する工程

[0028] 上記工程 (1) において用意された細胞集団が本工程において低酸素雰囲気下で培養されてもよい。即ち、本工程の実施は任意である。本明細書において低酸素雰囲気とは、細胞を培養する際の雰囲気中の酸素濃度が、大気中のそれよりも有意に低いことを意味する。具体的には、通常の細胞培養で一般的に使用される雰囲気中の酸素濃度よりも低い酸素濃度の条件が挙げられ、例えば雰囲気中の酸素濃度が 18%未満の条件が該当する。好ましくは、雰囲気中の酸素濃度は 15%未満 (例、14%未満、13%未満、12%未満、11%未満等)、10%未満 (例、9%未満、8%未満、7%未満、6%未満等)、または 5%未満 (例、4%未満、3%未満、2%未満等) である。また、培養対象の細胞の生存を維持するため、雰囲気は、最小限度の酸素を含む必要がある。この観点から、雰囲気中の酸素濃度は、通常 0.01%以上であり、好ましくは、雰囲気中の酸素濃度は 0.1%以上 (例、0.2%以上、0.3%以上、0.4%以上等)、0.5%以上 (例、0.6%以上、0.7%以上、0.8%以上、0.9%以上等)、または 1.0%以上 (例、1.1%以上、1.2%以上、1.3%以上、1.4%以上等) である。

[0029] 酸素濃度以外の雰囲気条件は、通常の細胞培養で一般的に使用される条件を適用することができる。例えば、雰囲気中の CO₂ 濃度は、通常約 1~10%の範囲であり、好ましくは約 5%である。雰囲気中の湿度は、通常約 70~100%の範囲であり、好ましくは約 95~100%である。

[0030] 細胞の環境において低酸素状態を創出する手法は特に制限されないが、酸素濃度の調節可能なCO₂インキュベーター内で細胞を培養する方法が容易であり、好適な例として挙げられる。酸素濃度の調節可能なCO₂インキュベーターは、種々の機器メーカーから販売されている（例えば、Thermo scientific社、池本理化学工業、十慈フィールド、和研薬株式会社等のメーカー製の低酸素培養用CO₂インキュベーターを用いることができる）。あるいは、三菱ガス化学株式会社から市販されているアネロパック等の嫌気培養用製品を用いることも好適な例として挙げられる。このような製品を用いることにより、低酸素条件を迅速かつ簡単に実現できる。

[0031] 低酸素条件下で細胞を培養する期間は、本発明の試験方法を実現できる限り特に限定されない。該培養期間は、多能性を有する造腫瘍細胞にリプログラミングされる蓋然性が高い分化した非造腫瘍細胞において、低酸素負荷により当該リプログラミングを誘導し得る期間であるべきである。このような観点から、該培養期間としては、例えば、1時間以上、3時間以上、5時間以上、7時間以上、10時間以上、12時間以上、15時間以上、20時間以上、1日以上または2日以上である。また、細胞生存にとっては不利な条件（すなわち、低酸素雰囲気条件）下での培養であることから、培養期間が長すぎると細胞が死滅してしまい、適切な試験ができない恐れがある。培養期間の上限は当業者であれば適宜決定することができるが、例えば、50日以下、40日以下、30日以下、20日以下、10日以下、7日以下、5日以下、4日以下、3日以下または2日以下である。低酸素条件下での好ましい培養期間は、試験の対象とする細胞集団、雰囲気中の酸素濃度等によっても変動し、当業者は用いる細胞集団、酸素濃度等に応じて適宜当該培養期間を調整することができる。

また、本工程において低酸素雰囲気下での培養は少なくとも1回行われるが、低酸素負荷によりリプログラミングを誘導される非造腫瘍細胞を増加させるという観点から、上記期間の培養を複数回（例、2回、3回、4回、5回またはそれより多く）行うこともまた好ましい。

- [0032] また、特に非造腫瘍細胞のリプログラミングの機構に関する研究や治療法の開発等の目的の場合、用意された試験の対象とする細胞集団を低酸素負荷に供する前、低酸素負荷と同時に、各回の低酸素負荷の間に、または低酸素負荷後に、当該細胞集団を所定の処理（例えば、任意の試薬への暴露等）に付すこともできる。
- [0033] 本発明の試験方法において用いられる培地の基礎培地としては、通常の細胞培養で一般的に使用されるものを用いることができ、培養対象の細胞集団の種類に応じて適宜選択することが可能である。基礎培地としては、例えばDMEM、EMEM、RPMI-1640、 α -MEM、F-12、F-10、M-199等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、上記基礎培地の混合物を用いてもよい。
- [0034] 本発明の試験方法において用いられる培地は、自体公知の添加物を含むことができる。添加物としては、特に限定されないが、例えば血清、成長因子（例えばインスリン等）、鉄源（例えばトランスフェリン等）、ポリアミン類（例えばプトレシン等）、ミネラル（例えばセレン酸ナトリウム等）、有機酸（例えばピルビン酸、乳酸等）、血清蛋白質（例えばアルブミン等）、アミノ酸（例えばL-グルタミン等）、還元剤（例えば2-メルカプトエタノール等）、ビタミン類（例えばアスコルビン酸、d-ビオチン等）、糖類（例えばグルコース等）、ステロイド（例えば β -エストラジオール、プロゲステロン等）、抗生物質（例えばストレプトマイシン、ペニシリン、ゲンタマイシン等）、緩衝剤（例えばHEPES等）等が挙げられる。当該添加物は、それぞれ自体公知の濃度範囲内で含まれることが好ましい。
- [0035] 本発明の方法で用いられる培養温度は、培養対象の細胞集団の種類に応じて適宜設定することができる。培養温度は、通常約30~40℃の範囲であり、好ましくは約37℃である。
- [0036] (3) 前記の細胞集団におけるSSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60およびTRA-1-81からなる群から選択される1以上のマーカータンパク質の発現レベルを測定する工程

[0037] 本工程では、上記工程（１）で用意された細胞集団、または上記工程（２）の処理後の細胞集団における本発明のマーカートンパク質のうちの少なくとも１つの発現レベルが測定される。試験の対象とする細胞集団に応じて、本発明のマーカートンパク質のうちのいずれが特に好ましいかは変動し得るが、多能性を有する造腫瘍細胞に対する高い特異性の観点から、例えば、SSEA-1、TRA-1-60またはTRA-1-81の少なくともいずれか１つの発現レベルが測定されることが好ましく、少なくともSSEA-1の発現レベルが測定されることがより好ましい。また、SSEA-1およびTRA-1-60またはTRA-1-81の両方について発現を検出することにより、試験の精度を更に高めることができる。あるいは、SSEA-1もしくはSSEA-3のいずれか、またはそれらの両方の発現レベルが測定されてもよい。また、本発明のマーカートンパク質とともに、上述した幼若化マーカー遺伝子の１つ以上についてのmRNAまたはタンパク質発現レベルも測定することもまた好ましい。後述するように、これらの遺伝子の発現レベルは、本発明のマーカートンパク質の発現が陽性の細胞が実際に多能性を有する造腫瘍細胞であるかどうかの検証のために有用である。

[0038] 本発明のマーカートンパク質または幼若化マーカートンパク質の発現レベルの測定は、特異的抗体を用いた免疫学的手法により行うことができる。免疫学的手法としては、フローサイトメトリー法、免疫組織化学法、放射性同位元素免疫測定法（RIA法）、ELISA法、ウェスタンブロットティング等の自体公知の手法が挙げられ、好ましくは、フローサイトメトリー法および免疫組織化学法である。感度や迅速性、特定のマーカーを発現する細胞を選択的に回収できる等といった優位性から、フローサイトメトリー法は特に好ましい。また、免疫組織化学法は、組織標本に対して簡便かつ迅速に実施できる等の利点を有する。これらの手法のためのプロトコール、キットおよび機器は、当該技術分野において周知されていて市販されている。

[0039] 本発明のマーカートンパク質または幼若化マーカートンパク質を特異的に認識する抗体は、R&Dシステムズ社、ベクトン・ディッキンソン社、eB

ioscience社等の供給元から市販されている抗体を用いることができる（後述の実験例も参照されたい）。

[0040] 本明細書において、抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体等の天然型抗体、遺伝子組み換え技術を用いて製造され得るキメラ抗体、ヒト化抗体や一本鎖抗体、およびこれらの結合性断片が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体またはこれらの結合性断片である。結合性断片とは、特異的結合活性を有する前述の抗体の一部分の領域を意味し、具体的には例えば $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、 $F a b$ 、 $F v$ 、 $s F v$ 、 $d s F v$ 、 $s d A b$ 等が挙げられる (Exp. Opin. Ther. Patents, Vol. 6, No.5, p.441-456, 1996)。抗体のクラスは、特に限定されず、 $I g G$ 、 $I g M$ 、 $I g A$ 、 $I g D$ あるいは $I g E$ 等のいずれのアイソタイプを有する抗体をも包含する。好ましくは、 $I g G$ または $I g M$ であり、精製の容易性等を考慮するとより好ましくは $I g G$ である。

[0041] 幼若化マーカーのmRNA発現レベルを測定する場合、常法に従い、RNAを生体試料から単離することができる。RNAを抽出するための一般的な方法が、当該技術分野において周知されており、Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, John Wiley and Sons(1997)等、分子生物学の標準的な教科書に開示されている。具体的には、Qiagenなどの製造業者から入手した精製キット、緩衝液セット、およびプロテアーゼを用いて、製造業者の指示に従ってRNA単離を行うことができる。

[0042] 幼若化マーカーのmRNA発現レベルの測定方法としては、特に限定されるものではないが、ノーザンブロットングおよびインサイチュハイブリダイゼーション (Parker & Barnes, Methods in Molecular Biology 106: 247-283 (1999)); RNaseプロテクション・アッセイ法 (Hod, Biotechniques 13: 852-854 (1992)); 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法 (RT-PCR) (Weis et al., Trends in Genetics 8: 263-264 (1992)); リアルタイム定量的RT-PCR (Held et al., Genome Research 6: 986-994 (1996)); なら

びにマイクロアレイ解析法等がある。マイクロアレイ解析法は、製造業者の指示に従って、Affymetrix GeneChip技術、Agilent Technologiesのマイクロアレイ技術またはIncyteのマイクロアレイ技術を用いる等して、市販されている装置によって実施することができる。

[0043] (4) 前記の1以上のマーカータンパク質の発現のいずれかが陽性である場合、前記の試験の対象とする細胞集団は潜在的ながんの悪性度が高いと決定する工程

[0044] 本工程での上記決定（または区別）のために、工程（3）で得られた1以上の本発明のマーカータンパク質の発現のいずれかが陽性であるか否かが評価される。当該評価において、工程（3）の測定における抗体の非特異的反応による影響を判定することが好ましい。そのために、例えば、工程（3）の測定において、本発明のマーカータンパク質を検出するために用いた抗体と同一のアイソタイプの抗体（アイソタイプコントロール）を用いて同様に発現レベルを測定し、特異的抗体での測定で得られた発現レベルと、アイソタイプコントロールでの測定で得られた発現レベルとを比較してもよい。このような手順は当該技術分野において周知である。発現レベルの比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行われ得る。

[0045] 本発明のマーカータンパク質の発現のいずれかが陽性であった細胞が実際に多能性を有する造腫瘍細胞であることを他の手段により検証することは、試験の信頼性をより高めるために好ましい。そのような手段としては、上述の1以上の幼若化マーカー遺伝子の発現が陽性であることの確認（上述）、分化多能性の確認（上述し、実験例にも示している）、造腫瘍能の確認（上述し、実験例にも示している）、エピジェネティック制御酵素（例えば、ヒストン脱アセチル化酵素、DNAメチル化酵素等が挙げられる）の発現パターンのES細胞またはiPS細胞との類似性の確認、等が挙げられる。また、このような試験を行うために、本発明のマーカータンパク質の発現のいずれかが陽性である細胞を選択的に回収する必要がある場合、本発明のマーカー

ータンパク質に対する特異的抗体を用いて、セルソーターや、磁性ビーズ、細胞吸着用カラム等により、該抗体に特異的に結合する細胞を単離すればよい。

[0046] (試験用の試薬等)

本発明の試験方法と関連して、本発明はまた、細胞集団の潜在的ながん悪性度の試験用試薬を提供する。該試薬は、本発明のマーカートンパク質を特異的に認識する抗体を含む。該試薬は、上記の幼若化マーカートンパク質を特異的に認識する抗体を更に含んでもよい。これらの抗体としては、本発明の試験方法において上述したものをを用いることができ、好ましい実施形態としても上述の通りである。

[0047] 低酸素負荷工程を含む本発明の試験方法と関連して、本発明は更に、低酸素培養機器および上記の試験用試薬を含む、細胞集団の潜在的ながん悪性度の試験用システム（キット）を提供する。「低酸素培養機器」とは、低酸素雰囲気下での細胞培養を可能にする機器を意味する。該機器としては、本発明の試験方法について上述したものをを用いることができ、低酸素雰囲気下での細胞培養が可能なインキュベーター、嫌気培養用製品（例、上掲のアネロパック）等を挙げることができる。「低酸素雰囲気」の定義は上述の通りである。

[0048] (治療方法)

本発明はまた、悪性度の高いがんを有する対象における前記がんの治療方法を提供する。当該方法は、前記対象においてがんの存在が疑われる組織から採取された試料に対して本発明の試験方法を適用する工程、および、前記試料には潜在的ながんの悪性度が高い細胞が含まれると決定された場合に、がんに対する療法を前記対象に施す工程を含む。

本発明の試験方法およびその好ましい実施形態については上述した通りである。また、がんに対する療法としては、悪性度の高いがんに対して一般に行われている任意の療法が挙げられ、例えば、外科的治療、抗がん剤治療、放射線療法、免疫療法、温熱療法等である。

[0049] (スクリーニング方法)

本発明はまた、がんの予防および／または治療剤のスクリーニング方法を提供する。当該方法は、

(1) がん細胞を含む細胞集団を用意する工程であって、前記細胞集団は、SSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60およびTRA-1-81からなる群から選択される1以上のマーカータンパク質を発現する細胞を含む前記工程、

(2) 前記の用意された細胞集団から、がんの予防および／または治療剤の候補物質の暴露に供した細胞集団と、前記候補物質の暴露に供しなかった対照細胞集団とを調製する工程、

(3) 前記暴露後の細胞集団および前記対照細胞集団におけるSSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60およびTRA-1-81からなる群から選択される1以上のマーカータンパク質の発現レベルを測定する工程、および

(4) 前記暴露後の細胞集団における前記の1以上のマーカータンパク質の発現の全てが、前記対照細胞集団における対応するマーカータンパク質の発現と比べて有意に低いレベルである場合、がんの予防および／または治療剤として前記候補物質を選択する工程

を含む。上記の工程(1)、(3)および(4)は、本発明の試験方法の記載に準じて行うことができ、好ましい実施形態についても同様である。上記の工程(2)における候補物質は任意の物質(例、天然または合成の化合物)であってよく、また暴露の条件は、スクリーニング試験の目的に応じて適宜設定することができる。当該方法により、多能性を有する造腫瘍細胞を標的とした抗がん剤のスクリーニングが可能となる。

また、本発明の試験方法と同様にして、上記の工程(1)の後であってかつ工程(3)の以前において、細胞集団を低酸素負荷に供してもよい。その場合の候補物質の暴露は、低酸素負荷に供する前、低酸素負荷と同時に、各回の低酸素負荷の間に、または低酸素負荷後に、行ってよい。当該工程を追

加する場合、上記の工程（１）で用意される細胞集団は、必ずしも前記の１以上のマーカーを発現する細胞を含まなくてもよい。当該工程を追加することにより、多能性を有する造腫瘍細胞のみならず、多能性を有する造腫瘍細胞にリプログラミングされる蓋然性が高い非造腫瘍細胞をも標的とする抗がん剤のスクリーニングが可能となる。

[0050] 本発明は更に、非造腫瘍細胞から多能性を有する造腫瘍細胞へのリプログラミングを促進する因子のスクリーニング方法を提供する。当該方法は、

- （１）非造腫瘍細胞を含む細胞集団を用意する工程、
- （２）前記の用意された細胞集団から、SSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60およびTRA-1-81からなる群から選択される１以上のマーカータンパク質の発現の全てが陰性であることを指標にして非造腫瘍細胞を選択する工程、
- （３）前記の選択された非造腫瘍細胞集団を、予め定められた因子の暴露に供する工程、
- （４）前記暴露後の細胞集団におけるSSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60およびTRA-1-81からなる群から選択される１以上のマーカータンパク質の発現レベルを測定する工程、および
- （５）前記の１以上のマーカータンパク質の発現のいずれかが陽性である場合、非造腫瘍細胞から多能性を有する造腫瘍細胞へのリプログラミングを促進する因子として前記因子を選択する工程を含む。

上記の工程（１）および（２）は、後述する本発明の調製方法に関して説明する通りに行うことができ、好ましい実施形態についても同様である。上記の工程（３）における因子は、スクリーニングを所望される任意の因子であってよく、例えば、物質（例、天然または合成の化合物）、環境条件（例、温度、周囲気体等）、放射線等であり得る。暴露の条件は、スクリーニング試験の目的に応じて適宜設定することができる。上記の工程（４）は、本発明の試験方法に関して説明した通りに行うことができ、好ましい実施形態

についても同様である。

また、本発明の試験方法と同様にして、マーカータンパク質の発現を検出する以前に、選択された非造腫瘍細胞を低酸素負荷に供してもよい。その場合の因子の暴露は、上述した通り、低酸素負荷に供する前、低酸素負荷と同時に、各回の低酸素負荷の間に、または低酸素負荷後に、行ってよい。

[0051] (調製方法)

本発明はまた、低酸素負荷で誘導されるリプログラミングにより非造腫瘍細胞から生じた多能性を有する造腫瘍細胞を調製する方法（以下、本発明の調製方法ともいう）を提供する。本発明の調製方法は、

- (1) 非造腫瘍細胞を含む細胞集団を用意する工程、
- (2) 前記の用意された細胞集団から、SSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60およびTRA-1-81からなる群から選択される1以上のマーカータンパク質の発現の全てが陰性であることを指標にして非造腫瘍細胞を選択する工程、
- (3) 前記の選択された細胞集団を低酸素負荷に供する工程、および
- (4) 低酸素負荷工程後の細胞集団から、SSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60およびTRA-1-81からなる群から選択される1以上のマーカータンパク質の発現のいずれかが陽性であることを指標にして、多能性を有する造腫瘍細胞を選択する工程を含む。

[0052] (1) 非造腫瘍細胞を含む細胞集団を用意する工程

[0053] 非造腫瘍細胞を含む細胞集団としては、非造腫瘍細胞を含んでいる限り任意のものを使用することができ、本発明の試験方法において試験の対象とする細胞集団として上述したものが挙げられ、典型的には、腫瘍細胞またはがん細胞を含む細胞集団である。本工程は、本発明の試験方法の工程(1)と同様にして行うことができる。

[0054] (2) 前記の用意された細胞集団から、SSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60およびTRA-1-81からなる群から選択される1以上のマ

ーカータンパク質の発現の全てが陰性であることを指標にして非造腫瘍細胞を選択する工程

[0055] 本工程の選択は、例えば、工程（１）で用意された細胞集団に対して、１つ以上の本発明のマーカータンパク質に対する特異的抗体、好ましくは全ての本発明のマーカータンパク質に対する特異的抗体を用いて、セルソーターや、磁性ビーズ、細胞吸着用カラム等により、用いられたいずれの抗体にも特異的に結合しない細胞を単離することにより行うことができる。

細胞集団の由来等に応じて、本発明のマーカータンパク質のうちのいずれが特に好ましいかは変動し得るが、多能性を有する造腫瘍細胞に対する高い特異性の観点から、例えば、SSEA-1または、TRA-1-60またはTRA-1-81の少なくともいずれか１つの発現が選択のために利用されることが好ましく、少なくともSSEA-1の発現が利用されることがより好ましい。また、SSEA-1およびTRA-1-60またはTRA-1-81の両方について発現を利用することにより、選択の精度を更に高めることができる。あるいは、SSEA-1もしくはSSEA-3のいずれか、またはそれらの両方の発現が利用されてもよい。特異的抗体としては、本発明の試験方法について説明したものを利用することができる。なお、単に多能性を有する造腫瘍細胞を濃縮するという目的であれば、本工程における非造腫瘍細胞の回収が高い純度であることは要求されないが、本発明の調製方法は、特に低酸素負荷で誘導されるリプログラミングにより非造腫瘍細胞から生じた多能性を有する造腫瘍細胞を取得するものであるため、本工程において多能性を有する造腫瘍細胞が実質的に存在しない程度（例えば、0.1%未満）まで除去されることが好ましい。

[0056] （３）前記の選択された細胞集団を低酸素負荷に供する工程

[0057] 工程（２）で取得した非造腫瘍細胞集団が本工程で低酸素負荷に供される。本工程についても、本発明の試験方法の工程（２）について説明したのと同様にして行うことができる。本工程の低酸素負荷により、細胞集団中の非造腫瘍細胞の少なくとも一部が、リプログラミングを誘導されて多能性を有

する造腫瘍細胞に転換され得る。

[0058] (4) 低酸素負荷工程後の細胞集団から、SSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60およびTRA-1-81からなる群から選択される1以上のマーカータンパク質の発現のいずれかが陽性であることを指標にして、多能性を有する造腫瘍細胞を選択する工程

[0059] 本工程では、工程(3)において生じ得た多能性を有する造腫瘍細胞が、本発明のマーカータンパク質の発現のいずれかが陽性であることを指標にして選択的に回収される。本工程の選択についても、例えば、工程(3)の後の細胞集団に対して、本発明のマーカータンパク質に対する特異的抗体を用いて、セルソーターや、磁性ビーズ、細胞吸着用カラム等により、該抗体に特異的に結合する細胞を単離することにより行うことができる。

細胞集団の由来等に応じて、本発明のマーカータンパク質のうちのいずれが特に好ましいかは変動し得るが、多能性を有する造腫瘍細胞に対する高い特異性の観点から、例えば、SSEA-1または、TRA-1-60またはTRA-1-81の少なくともいずれか1つの発現が選択のために利用されることが好ましく、少なくともSSEA-1の発現が利用されることがより好ましい。また、SSEA-1およびTRA-1-60またはTRA-1-81の両方について発現を利用することにより、選択の精度を更に高めることができる。あるいは、SSEA-1もしくはSSEA-3のいずれか、またはそれらの両方の発現が利用されてもよい。特異的抗体としては、本発明の試験方法について説明したものを利用することができる。

得られた細胞集団が実際に多能性を有する造腫瘍細胞であることを他の手段により検証することは好ましい。そのために、例えば、得られた細胞集団の一部に対して、上述の1以上の幼若化マーカー遺伝子の発現が陽性であることの確認(上述)、分化多能性の確認(上述し、実験例にも示している)、造腫瘍能の確認(上述し、実験例にも示している)、エピジェネティック制御酵素(例えば、ヒストン脱アセチル化酵素、DNAメチル化酵素等が挙げられる)の発現パターンのES細胞またはiPS細胞との類似性の確認、

等を行うことができる。

[0060] (多能性を有する造腫瘍細胞)

本発明は更に、低酸素負荷で誘導されるリプログラミングにより非造腫瘍細胞から生じた多能性を有する造腫瘍細胞（以下、本発明の造腫瘍細胞ともいう）を提供する。本発明の造腫瘍細胞の由来となる非造腫瘍細胞は、任意の非造腫瘍細胞であってよく、例えば、上述した任意のがん種の非造腫瘍細胞である。本発明の造腫瘍細胞は、それに限定されないが、例えば、上述した本発明の調製方法により取得することができる。

[0061] 本発明の造腫瘍細胞は、好ましくは、単離されかつ精製されている。「単離および精製」とは、本発明の造腫瘍細胞以外の細胞の混入を除去する処理がなされていることを意味する。本発明の造腫瘍細胞の純度は、高ければ高いほど好ましい。該純度は、例えば60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、更に好ましくは95%以上、特に好ましくは99%以上（例えば実質的に100%）である。

[0062] 例えば、本発明の造腫瘍細胞の遺伝子発現解析、タンパク質解析、代謝解析等を行うことにより、がん研究が促進される。また、該細胞群を用いることにより、効率のよい腫瘍モデルを構築することができる。このような腫瘍モデルは、腫瘍発生・形成過程、治療抵抗性、転移過程等を研究する上で有用である。また、これらの研究を通じて、多能性を有する造腫瘍細胞（またはがん幹細胞）およびがんの理解につながるとともに、これを標的とした医薬品開発が可能となる。

[0063] 以下に実験例等を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明の範囲は以下の実験例等に限定されるものではない。

実施例

[0064] [実験方法]

細胞培養

本研究で用いた全ての細胞は、単一細胞から再クローニングした（従って遺伝子背景は同一である）。ヒトの肺がん細胞株H157、H358、A549（非小細

胞)、H460(大細胞)、N417(小細胞)、および悪性黒色腫細胞株Num2Bを10%ウシ胎児血清を含有するRPMI1640培地(Hyclone社)中で培養した。低酸素条件はアネロパックキット(三菱ガス化学株式会社)を用いて達成した。異所性遺伝子またはマイクロRNAを発現する細胞の作製は、pCDNA6.2、LipofectamineおよびBlasticidin(インビトロジェン社)を用いて行った。マイクロRNAのためのオリゴヌクレオチドは、BLOCK-iTプログラム(インビトロジェン社)を用いて設計した。分化アッセイ(図3)のために、胚様体(EB)形成後の細胞をSmGM-、FGM-2-またはHCM-BulletKit(ロンザ社、スイス国)中でインキュベートした。

RT-PCR解析

RT-PCR解析およびSYBR-Greenを用いたリアルタイムRT-PCR解析は標準的な方法により行った。GAPDH mRNAを用いて、RNAインプット量を正規化した。

FACS解析および免疫組織化学

FACSおよび免疫染色のために用いた抗体を下記表1に示す。

[0065]

[表1-1]

表1. 免疫組織化学およびフローサイトメトリーのために使用した抗体

抗体	メーカー	製品番号
OCT3/4	R&D	SC009
SOX2	R&D	SC009
NANOG	R&D	SC009
SSEA-1	R&D	SC009
SSEA-4	R&D	SC009
SSEA-3	Becton, Dickinson and Company (BD)	MC631
TRA1-60	eBioscience	13-8863
TRA1-81	eBioscience	13-8863
VEGFR2	Abcam	ab2349
β III-tublin (TU-20)	CST	4466
α -FP (3H8)	CST	3903
α -SMA	DAKO	M0851
GFP	Molecular Probes	A21311
hCD31 (89C2)	CST	3528
mCD31	Abcam	Ab28364
CA9	R&D	MAB2188
vWF	Abcam	ab6994
Ki67	DAKO	M7240
HIF1 α	Abcam	ab1
HIF2 α	Abcam	ab199
hCD31 for FACS	BD	560984
mCD31 for FACS	BD	561073
SSEA-1 for FACS	BD	560886
SSEA-3 for FACS	BD	560881
SSEA-4 for FACS	eBioscience	MAB1435

[0066]

[表1-2]

TRA1-60 for FACS	BD	560193
TRA1-81 for FACS	BD	9006219
human mitochondria	Millipore	MAB21273
human nuclei	Millipore	MAB1281
Alexa Fluor 488 (anti-mouse)	Molecular Probes	A31620
Alexa Fluor 488 (anti-rabbit)	Molecular Probes	A31628
Alexa Fluor 594 (anti-mouse)	Molecular Probes	A31624
Alexa Fluor 594 (anti-rabbit)	Molecular Probes	A31632
Alexa Fluor 647 (anti-mouse)	Molecular Probes	A31626
Alexa Fluor 647 (anti-rabbit)	Molecular Probes	A31634

[0067] 単一細胞への分離のために、細胞または異種移植腫瘍 (xenograft) を Tryp LE Express (インビトロジェン社) で5分間消化した。FACS解析、サイドポピュレーション (SP) 解析および細胞選別はFACSAria II (ベクトン・ディッキンソン社) を用いて行った。死細胞の除去のために7AAD (1 μ g/mL) を用いた。図中、アイソタイプコントロール抗体を用いて得られたFACSシグナルを灰色のシャドウで示している。アイソタイプ抗体で観察された最大の蛍光を上回る蛍光を示す細胞を陽性と考えた。そのような陽性細胞の割合を一部の図において示している。異種移植腫瘍は4%パラホルムアルデヒド中で固定し、パラフィン中に包埋した。切片 (5 μ m) を一次抗体、次いでHRP標識二次抗体、次いでジアミノベンジジンと共にインキュベートした。

免疫染色およびフローサイトメトリーの詳細なプロトコールは以下の通りである。

(免疫染色)

腫瘍は4%パラホルムアルデヒドで4°Cにて固定後、20%スクロース/PBS溶液、4°Cにて一晩静置し、アルコールによる透徹後、パラフィンにて包埋処理を行なった。薄切は5 μ mとして、スライドガラス上に固定し再度アルコールによる脱パラフィン処理を行なった。抗原賦活化液 (Antigen Retrieval Reage

nt, Basic; R&D systems) にて95°C, 20分加熱により賦活化処理を行なった。SSEA-1(1/500希釈)、TRA1-60 (1/500希釈)、TRA1-81 (1/500希釈)、OCT3/4 (1/250希釈)、SOX2 (1/250希釈)、NANOG (1/100希釈) 抗体にて1次抗体反応後、Polink-2 Plus HRP Mouse with DAB Kit (GBI Labs)による、HRP-標識ポリマー検出システムDAB染色法を用いた。発色方法はメーカープロトコールに従った。染色後十分に水洗し、透徹処理の後にエンテラン (Merk) にて封入処理したものを検鏡した。

(フローサイトメトリー (Fluorescence Activated Cell Sorter))

回収したがん細胞はBSAを含むFACS Buffer (1% FCS, 2mM EDTAを含むPBS) を用いて非特異的反応を阻害した後、FACS Bufferにて希釈したSSEA-1-FITC (BD Bioscience) にて染色した。核内染色には膜透過性を昂進させるため、Foxp3 Staining Kit (eBioscience) を用いた。メーカープロトコールに従って細胞を前処理後、OCT4-Alexa647、SOX2-Alexa647 (BD Bioscience) で染色した。死細胞の除去判定のために、染色後の細胞懸濁液へ1 μ g/mlの7-AAD (BD Bioscience) を1/400容量添加し、FACS Cant II (アナライザー) / Aria III (セルソーター) (BD Bioscience) にて測定、FlowJo Software (Treestar, Inc.) によって解析した。

腫瘍形成アッセイ

細胞をNOD-SCIDマウスまたはNOD/SCID IL2R γ ^{null}マウスに皮下注射した。腫瘍成長を毎週測定し、出現を注射から12週間後に評価した。マウスを用いた全ての手順は、日本国政府による法律第105号および告示第6号の下で産業医科大学倫理委員会により認可されたものである。

統計解析

全てのデータは平均±標準偏差として示している。2群間の比較には、学生t検定を用いた (p<0.05を有意とした)。

[0068] 実験例1：低酸素によりがん細胞において幹細胞マーカーが活性化される

低酸素 (hypoxia) によりES細胞マーカー遺伝子が活性化されるかどうかを確かめるために、5つのヒト肺がん細胞株および悪性黒色腫細胞株をスクリーニングした。細胞を5% O₂で12時間インキュベートした後、RT-PCR解析または定量的リアルタイムPCR解析のいずれかに供した。N417、H358、H460およびNum2B細胞において4つの初期化誘導遺伝子 (OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC) の全てが活性化されたが (図1A、1B)、ヒト線維芽細胞 (TIG3) はこれらの遺伝子のいずれの活性化も示さなかった。N417およびNum2Bでは、「ナイーブ」マーカーであるREX1を含む試験した全ての胚性遺伝子が活性化されていた。以降の実験では、N417を主に用いた。N417で得られた結果の殆どは、H358細胞においても確認された。

hypoxiaのN417細胞では、TGF- β がすぐに下方調節され、その後幹細胞性 (stemness) 遺伝子の活性化が見られた (図1C)。幹細胞性遺伝子およびES細胞特異的細胞表面抗原 (SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA1-60、TRA1-81) の低酸素誘導性発現がFACSおよび免疫組織化学により確認された (図1D、1E)。低酸素下において、N417はアルカリホスファターゼ活性の亢進を示し (図1F)、非接着性の球形の細胞集塊を形成した (図1G)。Hoechst 33342での染色後に観察されたベラパミル感受性のサイドポピュレーション (SP) は、正常酸素 (normoxia) での0.27%から、hypoxiaにおいて7.05%に増加していた (図1H)。上述した低酸素誘導性の反応は、6つの異なるN417クローン (GFPを発現するN417 (N417-GFP) の3クローンを含む) で確認され、H358細胞の3クローンにおいても観察された。

これらの結果から、いくつかのがんの非造腫瘍細胞は、低酸素下で初期化されて、造腫瘍性の細胞のみならず、iPS細胞のような多分化能 (multipotencyまたはpluripotency) を有する幹細胞様細胞に復帰し得るという仮説を立てた。

[0069] 実験例2：SSEA-1およびSSEA-3は、造腫瘍細胞と非造腫瘍細胞とを識別できるマーカーである

非がん幹細胞 (non-CSC) のがん幹細胞 (CSC) への復帰を証明するためには、これらの2つの細胞集団を分離することが必要であった。CSCの同定のために、ES細胞特異的細胞表面抗原 (SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、Tra1-81) を用いた。SSEA-1およびSSEA-3の発現は、N417細胞において互いに排他的であった。SSEA-1/SSEA-3陰性画分はTra1-81陽性細胞を含まなかった。重要なことに、いずれも低酸素に暴露された細胞から選別された、SSEA-1/SSEA-3陰性画分、および4つの抗原全てに陰性の画分は、異種移植腫瘍を形成しなかった。SSEA-1/SSEA-3陰性画分は、より許容性 (permissive) の高いNOD/SCIDインターロイキン2受容体 γ 鎖欠損 (NOD/SCID IL2R γ^{null}) マウスにおいても、注射から32週間後であっても腫瘍を作らないことが確認された。対照的に、低酸素に暴露された細胞から選別されたSSEA-1+細胞またはSSEA-3+細胞は、連続的に移植可能な異種移植腫瘍を形成し、これは未選別の親細胞よりも迅速かつ活発に増殖した (図2A)。SSEA-3+細胞またはSSEA-1+細胞のいずれかにより形成された異種移植腫瘍は、未選別の細胞により形成された腫瘍と同様の比率でSSEA-3+/-細胞およびSSEA-1+/-細胞を含んでおり、元々の腫瘍内の表現型の不均一性を再現していた (図2B)。これらの結果は、SSEA-1/SSEA-3陰性細胞は「分化した」非造腫瘍細胞であること、ならびに、SSEA-1+細胞画分およびSSEA-3+細胞画分の両方共、CSCを含むことを示している。

我々は次に、低酸素に暴露された細胞におけるSSEA遺伝子および初期化遺伝子の発現を解析した (図2C)。SSEA-1+画分およびSSEA-3+画分の両方が、OCT3/4、SOX2およびNANOGの発現の大幅な増加を示した。対照的に、異種移植腫瘍を形成し得なかった陰性画分は、それらの発現を実質的に示さなかった。我々は更に、低酸素に暴露された細胞で観察された全ての幹細胞様属性 (図1) はSSEA-1+細胞およびSSEA-3+細胞の特性であることを確認した。

[0070] 実験例3：分化した非造腫瘍細胞は、低酸素下において、驚くほどに短い期間で初期化を達成し造腫瘍細胞になる

4つの胚性抗原のいずれも発現しない細胞画分を選別した (図2D-a, -b)。選別した非造腫瘍細胞をnormoxiaで12時間培養した後、12時間、hypoxiaに暴

露するかまたはnormoxiaに維持し、上記4つの胚性抗原の発現を再び解析した。normoxiaにおいても染色陽性の細胞のわずかな増加が観察されたが（図2D-c）、増加はhypoxia条件下でより顕著であり、SSEA-1+細胞は72倍増加していた（図2D-d, e）。解析された細胞全体のうちの生細胞の割合は、選別直後に96.8%、normoxiaでの培養後に92.7%、hypoxiaでの培養後に84.5%であった（図2D-f）。解析の期間（24時間）およびhypoxia条件とnormoxia条件との間で細胞生存率が同様であったことから、無視できる程度のSSEA-1+またはSSEA-3+細胞が残っていたか、または陰性細胞画分にそれら陽性細胞が混入し、24時間以内に著しく増殖したかまたは遥かに良く生存したという可能性は実質的に除外される。低酸素に暴露する前に陰性画分を連続して2回選別した場合も、SSEA-1+細胞およびSSEA-3+細胞について得られた結果は、上記と同様であった。以上の結果から、分化した非CSCは、驚くほど短い期間内に、低酸素誘導性のリプログラミング（hypoxia-induced reprogramming ; HIR）によりCSCに復帰すると我々は結論した。

最初の低酸素暴露の後、4つ全ての抗原に対して染色陰性の細胞を選別して再度低酸素に暴露し、上記と同様に解析を行った。上記と同様、およそ10-15%または0.2-0.4%の細胞がそれぞれSSEA-1+またはSSEA-3+となった。このような手順を3サイクル繰り返したところ、同様の比率の細胞が各時点においてSSEA-1+またはSSEA-3+となることが確認された。このことは、ある特別な細胞画分のみでなく、あらゆる非CSCがCSCに復帰できることを示している。

[0071] 実験例4：低酸素により生成されたCSCは多能性である

我々は次に、低酸素に暴露されたN417細胞が幹細胞のような複数系列への分化能を有し得るかどうかを調べた。低酸素暴露された細胞を24時間、ハンギングドロップ培養を行い、胚様体（EB）を形成させた。次に、細胞を種々の分化促進培地で培養した。実験手順は図3Aに示した。EBの形成を通じて、低酸素により活性化された初期化遺伝子は急速に（OCT3/4）または徐々にのいずれかで下方調節され、一方、3つの胚葉の様々な分化マーカー遺伝子が上方調節された（図3B）。低酸素に暴露しなかった場合、細胞は内胚葉系列お

よび中胚葉系列のマーカ―遺伝子の活性化を示さなかった。興味深いことに、典型的なEMTマーカ―遺伝子であるビメンチンおよびフィブロネクチンは低酸素に暴露された細胞画分においてのみ活性化され、TGF- β 1およびその受容体は、細胞を正常酸素に維持した場合も、低酸素に暴露した場合も、同様に活性化された。低酸素に暴露された細胞では、1日目から血管新生増殖因子が活性化され、4日目には内皮細胞（EC）マーカ―であるヒトCD31（hCD31）およびヒトVEGFR-2を発現した（図3C）。陽性細胞の数は、細胞をVEGFおよびPDGFと共に培養した場合に更に増加した。分化促進培地中での2週間において、低酸素処理した細胞のみが外胚葉（ β IIIチューブリン）、内胚葉（ α フェトプロテイン； α FP）および中胚葉（ α 平滑筋アクチン； α -SMA）の分化マーカ―を発現した（図3D）。このような多様な分化能力は、低酸素に暴露したH358細胞においても観察された。

次に、NOD-SCIDマウスの辜丸にSSEA-1+、SSEA-3+、または未選別の低酸素暴露したN417-GFP細胞を注入した（注入あたり 10^4 細胞）。2ヶ月後、未選別細胞では3回のうち2回の注入で、SSEA-1+細胞またはSSEA-3+細胞では全6回の注入すべてで腫瘍が形成され、 β IIIチューブリン、 α FPおよび α -SMAが腫瘍細胞内に検出された（図3E）。更に、腫瘍は、サイトケラチン14陽性の真皮、腺組織、筋肉等、3胚葉全てからの種々の分化により誘導された組織を含んでいた（図3F）。これらの組織化された組織がヒト細胞から構成されていることをGFP（図3F-e, f）、ヒトミトコンドリアおよびヒト核に対する抗体を用いた免疫組織化学により確認した。

これらの結果は、低酸素に暴露されたN417細胞は実際に多能性を有する細胞に初期化することを実証している。

[0072] 実験例5：異種移植腫瘍は、機能的な内皮細胞および血管平滑筋細胞にその後分化し、がん細胞の初期化を示している

N417-GFP異種移植腫瘍を組織学的に分析した。炭酸脱水酵素9（CA9）染色による評価を行なったところ、低酸素領域はまだら状またはパッチ状に散在しており、そのような低酸素領域内にOCT3/4陽性細胞およびSOX2陽性細胞が

検出された (図4A)。CA9染色の状態に従い、腫瘍領域を4群に分類した：(a) 殆どのがん細胞がCA9陽性である領域 (高度低酸素領域)、(b) CA9陽性細胞により囲まれた領域 (低酸素領域)、(c) 僅かにCA9染色された細胞により囲まれた領域 (中間領域)、(d) CA9陽性細胞を実質的に欠いた領域 (非低酸素領域) (図4B)。高度低酸素領域および低酸素領域 (a, b) 内では、細胞はSOX2 (a2, b2)、OCT3/4 (a3, b3)、HIF1 α (a6)、HIF2 α (a7)、NANOG (a8) またはSSEA-1 (a9) に対する染色が陽性であった。そのような低酸素領域においては、細胞は増殖マーカーKi-67 (a10) の発現をほぼ欠いていた。低酸素領域の外側部分では、恐らくはがん細胞または宿主の炎症細胞のいずれかに由来する多くのアポトーシス細胞が観察された。中間領域では、SOX2およびOCT3/4の検出はほんの僅かであるか、または殆ど検出されなかった (c2, c3の矢印)。非低酸素領域では、SOX2 (d2) およびOCT3/4 (d3) は検出されず、細胞は増殖活性を示していた (d10)。

赤血球を含有する血管が各細胞島の中央領域に見られた。興味深いことに、hCD31陽性細胞は、低酸素領域内に比較的散在して検出された (a5, b5)。しかしながら、hCD31陽性細胞は、 α -SMA陽性細胞 (図4C) と共に集まって組織化され、非低酸素領域において血管を形作っており (c5, d5)、血管は徐々に成熟してより機能的になるかのようであった。この概念を支持する事実として、通常比較的大きな血管のECにおいて検出されるフォン・ウィルブランド因子は、非低酸素領域内の血管においてのみ染色された (d4の矢印)。hCD31陽性細胞はヒトVEGFR-2も発現していた。

ECおよび血管平滑筋細胞 (VSMC) を検出するために、hCD31、マウスCD31 (mCD31) およびヒト α SMA (h α SMA) 特異的抗体を用いた。これらのいずれも、異種の抗原と反応しないことを確認した。N417-GFP異種移植腫瘍内の実質的に全ての血管細胞は、hCD31抗体およびh α SMA抗体でのみ検出された (図4C)。そのようなhCD31陽性細胞およびh α SMA陽性細胞は抗GFP抗体で標識され、腫瘍内のECおよびVSMCが実際ががん細胞に由来することを更に確認した。H358異種移植腫瘍内の血管はhCD31抗体およびh α SMA抗体で染色されたが、mCD

31抗体では染色されなかった。対照的に、H157異種移植腫瘍内およびH460異種移植腫瘍内のほぼ全てのECはmCD31陽性であった（それぞれ、約100%および約95%）。またこれらの腫瘍ではヒトおよびマウス両方の α SMAを認識する抗体を用いて検出されたECおよび α SMA陽性細胞は、血管様構造をとっていなかった。しかしながら、重要なことに、H460異種移植腫瘍では限られた領域が低酸素状態であり、この低酸素領域内の細胞ではSOX2、OCT3/4、SSEA-1およびhCD31が検出された。

興味深いことに、N417細胞およびH358細胞はH157細胞およびA549細胞よりも細胞増殖活性が遥かに低かったが、N417細胞またはH358細胞により形成された異種移植腫瘍は、H157細胞またはA549細胞により形成された異種移植腫瘍よりも急速に成長した。

[0073] 実験例6：TRA-1-60/-81もSSEA-1/-3と同様に悪性がんの診断マーカーとなる

我々は更に、多能性を有する造腫瘍細胞と非造腫瘍細胞との識別を可能とする、SSEA-1またはSSEA-3以外のマーカーを探索した。

その目的のために、種々の初期化遺伝子およびES細胞特異的細胞表面抗原について、SSEA-1および/またはSSEA-3との発現の相関性を調べた。

具体的には先ず、上記のヒト肺がん細胞を5% O_2 で12時間インキュベートした後、FACS解析を行った。SSEA-1、SSEA-3およびSSEA-4の各々の陽性画分および陰性画分についてのOCT3/4、SOX2、NANOG、TRA-1-60およびTRA-1-81の発現を図5Aに示す。結果は、SSEA-1陰性細胞およびSSEA-3陰性細胞はTRA-1-60/-81陰性であること、および、SSEA-1陽性細胞およびSSEA-3陽性細胞はTRA-1-60/-81陽性であることを示している。重要なこととして、一部のSSEA-1/-3陽性細胞がTRA-1-60/-81陽性となるのではなく、ほぼ全てのSSEA-1/-3陽性細胞がTRA-1-60/-81陽性であり、また同時に、ほぼ全てのSSEA-1/-3陰性細胞はTRA-1-60/-81陰性であった。これは、特にSSEA-1について顕著であった。一方、SSEA-4陽性細胞はTRA-1-60/-81陰性であった。

この結果は、培養ヒト肺がん細胞による異種移植腫瘍 (xenograft) のみならず、ヒト肺がん標本においても確認された (図5BおよびC)。図5Bは、FACS

選別したSSEA-1陽性細胞 10^3 個をマトリゲルに封入して免疫不全マウスの皮下に移植し、12週間後に、成長した腫瘍 (xenograft) を免疫染色法により解析したものである。一方、図5Cは、インフォームドコンセントを得て採取したヒト肺がん標本切片を免疫染色法で解析したものである (無作為に選んだ98症例で解析)。いずれの結果も、SSEA-1陽性細胞は同時にTRA-1-60/-81陽性であることを示している。

以上より、TRA-1-60/-81もSSEA-1/-3と同様に、多能性を有する造腫瘍細胞と非造腫瘍細胞とを識別するマーカーとして利用できることが実証された。

[0074] 実験例7 : SSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60またはTRA-1-81の発現は肺がんの転移および生存率と有意に相関する

我々は次に、ヒト肺がん標本において、SSEA-1、NANOG、OCT3/4およびSOX2の4因子の発現 (免疫染色法による) と、各種臨床病理所見 (性別、がん腫の大きさ、組織分類、および転移) との相関を調べた。結果を表2に示す。結果は、SSEA-1のみが、その発現と、診断時点での転移の有無との有意な相関を示した。

[0075] [表2]

表2 4マーカー因子の臨床病理学的検討

変数	症例数	SSEA-1		p値	NANOG		p値	OCT3/4		p値	SOX2		p値
		(+) n=73	(-) n=25		(+) n=67	(-) n=31		(+) n=93	(-) n=6		(+) n=92	(-) n=6	
性別				.589			.512			.457			.543
男性	74	55	19		51	23		70	4		69	5	
女性	24	18	6		16	8		22	2		23	1	
腫瘍サイズ (mm)				.246			.275			.404			.087
<20	54	43	11		34	20		52	2		53	1	
≥20	44	30	14		33	11		40	4		39	5	
ステージ分類 (TNM)				.294			.331			.160			.142
I	20	14	6		15	5		19	1		19	1	
II	8	4	4		4	4		7	1		6	2	
III	27	17	10		16	11		25	2		26	1	
IV	43	38	5		32	11		41	2		41	2	
組織分類				.097			.353			.349			.179
SCLC	23	16	7		15	8		21	2		23	-	
NSCLC (Sq)	25	17	8		16	9		23	2		22	3	
NSCLC (Ad)	45	38	7		34	11		44	1		43	2	
NSCLC (Others)	5	2	3		2	3		4	1		4	1	
転移				.001**			.128			.379			.379
M0	51	31	20		31	20		47	4		47	4	
M1	47	42	5		36	11		45	2		45	2	

Sq, 扁平上皮がん, Ad, 腺がん, SCLC, 小細胞肺がん, NSCLC, 非小細胞肺がん

[0076] 我々は更に、ヒト肺がん標本において、その生存率と各種因子との多変量解析を行った。結果を表3に示す。結果は、転移およびSSEA-1の発現が生存率と有意に相関することを示した。SSEA-1が最も強力な予後判定因子になる可能性も示された。

[0077] [表3]

表3 多変量解析による生命予後相関

変量	多変量解析		
	オッズ比	95%信頼区間	p値
性別 (男性 vs 女性)	0.639	0.330 – 1.239	.185
サイズ ($\leq 20\text{mm}$ vs. $> 20\text{mm}$)	0.772	0.390 – 1.528	.457
転移	3.348	1.655 – 6.774	<.001**
SSEA-1	11.639	2.238 – 60.535	.004**
NANOG	1.930	0.952 – 3.913	.068
OCT3/4	0.813	0.071 – 9.299	.868
SOX2	0.252	0.430 – 1.475	.126

産業上の利用可能性

[0078] 本発明の試験方法によれば、がん組織等の臨床標本においてマーカータンパク質の発現を検出するだけで、多能性を有する造腫瘍細胞の存在を検出し、以って簡便かつ高信頼度にごん悪性度を試験できる。あるいは、マーカータンパク質の発現の検出に先立ち、がん組織等の試料中の細胞集団を低酸素負荷に供することにより、多能性を有する造腫瘍細胞への非造腫瘍細胞のリプログラミングを促進し、それにより試験の感度を更に向上させることができる。本発明の試験方法を適用することにより、生体内に存在する造腫瘍細胞または低酸素状態に起因して造腫瘍細胞に転換される見込みが高い非造腫瘍細胞をがんが初発または再発する前に検出して、悪性度を予測することが可能である。あるいは、がんの発症を初期のステージで検出してがん患者の早期治療に導くことも可能である。また、がん患者に対する治療効果を造腫瘍細胞または低酸素状態に起因して造腫瘍細胞に転換される見込みが高い非造腫瘍細胞の存在を指標にして評価することも可能である。更に、本発明により提供される試験方法、新規細胞および該細胞の調製方法は、例えば、非

造腫瘍細胞から多能性を有する造腫瘍細胞へのリプログラミングの機構に関する研究や、悪性がんの有効な治療法の確立等のために有用であるばかりか、iPS細胞作製においてがん化を防ぐ作製方法の開発にも資する。

[0079] 本出願は日本で出願された特願2012-052348（出願日：2012年3月8日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

- [請求項1] 細胞集団の潜在的ながん悪性度を試験する方法であって、
- (1) 試験の対象とする細胞集団を用意する工程、
 - (3) 前記の細胞集団におけるSSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60およびTRA-1-81からなる群から選択される1以上のマーカータンパク質の発現レベルを測定する工程、および
 - (4) 前記の1以上のマーカータンパク質の発現のいずれかが陽性である場合、前記の試験の対象とする細胞集団は潜在的ながんの悪性度が高いと決定する工程
- を含む、方法。
- [請求項2] 前記測定工程の以前に、
- (2) 前記細胞集団を低酸素負荷に供する工程
- を更に含み、前記測定工程において前記1以上のマーカータンパク質の発現レベルを測定される細胞集団が、前記低酸素負荷工程後の細胞集団である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記1以上のマーカータンパク質が、SSEA-1、TRA-1-60およびTRA-1-81からなる群から選択される少なくとも1つを含む、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 前記1以上のマーカータンパク質がSSEA-1を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項5] 前記測定工程において、更に、SSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60およびTRA-1-81以外の1以上の幼若化マーカー遺伝子のmRNAまたはタンパク質発現レベルも測定される、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項6] 前記幼若化マーカー遺伝子が、OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC、NANOG、LIN28、REX1およびERASからなる群から選択される1以上の遺伝子である、請求項5に記載の方法。

- [請求項7] 前記低酸素負荷工程において、10%未満の酸素レベルにおける10時間以上の低酸素負荷が少なくとも1回行われる、請求項2～6のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項8] 前記の発現レベルの測定が、フローサイトメトリー法または免疫組織化学法を用いて行われる、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項9] 被験者におけるがんの悪性度を試験するために、被験者においてがんの存在が疑われる組織から採取された試料に対して行われる、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項10] 前記被験者が前記がんの術後の患者である、請求項9に記載の方法。
- [請求項11] 前記の試験の対象とする細胞集団が、SSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60およびTRA-1-81からなる群から選択される1以上のマーカータンパク質の発現の全てが陰性であることを指標にして選択されたものである、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項12] 前記がんが肺がん、消化器がん、乳がん、皮膚がんまたは脳腫瘍である、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項13] 低酸素負荷で誘導されるリプログラミングにより非造腫瘍細胞から生じた多能性を有する造腫瘍細胞を調製する方法であって、
(1) 非造腫瘍細胞を含む細胞集団を用意する工程、
(2) 前記の用意された細胞集団から、SSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60およびTRA-1-81からなる群から選択される1以上のマーカータンパク質の発現の全てが陰性であることを指標にして非造腫瘍細胞を選択する工程、
(3) 前記の選択された細胞集団を低酸素負荷に供する工程、および
(4) 低酸素負荷工程後の細胞集団から、SSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60およびTRA-1-81からなる群から選択さ

れる1以上のマーカータンパク質の発現のいずれかが陽性であることを指標にして、多能性を有する造腫瘍細胞を選択する工程を含む、方法。

[請求項14] 前記の非造腫瘍細胞を選択する工程および前記の多能性を有する造腫瘍細胞を選択する工程において、前記1以上のマーカータンパク質が、SSEA-1、TRA-1-60およびTRA-1-81からなる群から選択される少なくとも1つを含む、請求項13に記載の方法。

[請求項15] 前記の非造腫瘍細胞を選択する工程および前記の多能性を有する造腫瘍細胞を選択する工程において、前記1以上のマーカータンパク質がSSEA-1を含む、請求項13または14に記載の方法。

[請求項16] 前記の選択された多能性を有する造腫瘍細胞において、SSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60およびTRA-1-81以外の1以上の幼若化マーカー遺伝子のmRNAまたはタンパク質の発現が陽性であることを確認することを更に含む、請求項13～15のいずれか1項に記載の方法。

[請求項17] 前記幼若化マーカー遺伝子が、OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC、NANOG、LIN28、REX1およびERASからなる群から選択される1以上の遺伝子である、請求項16に記載の方法。

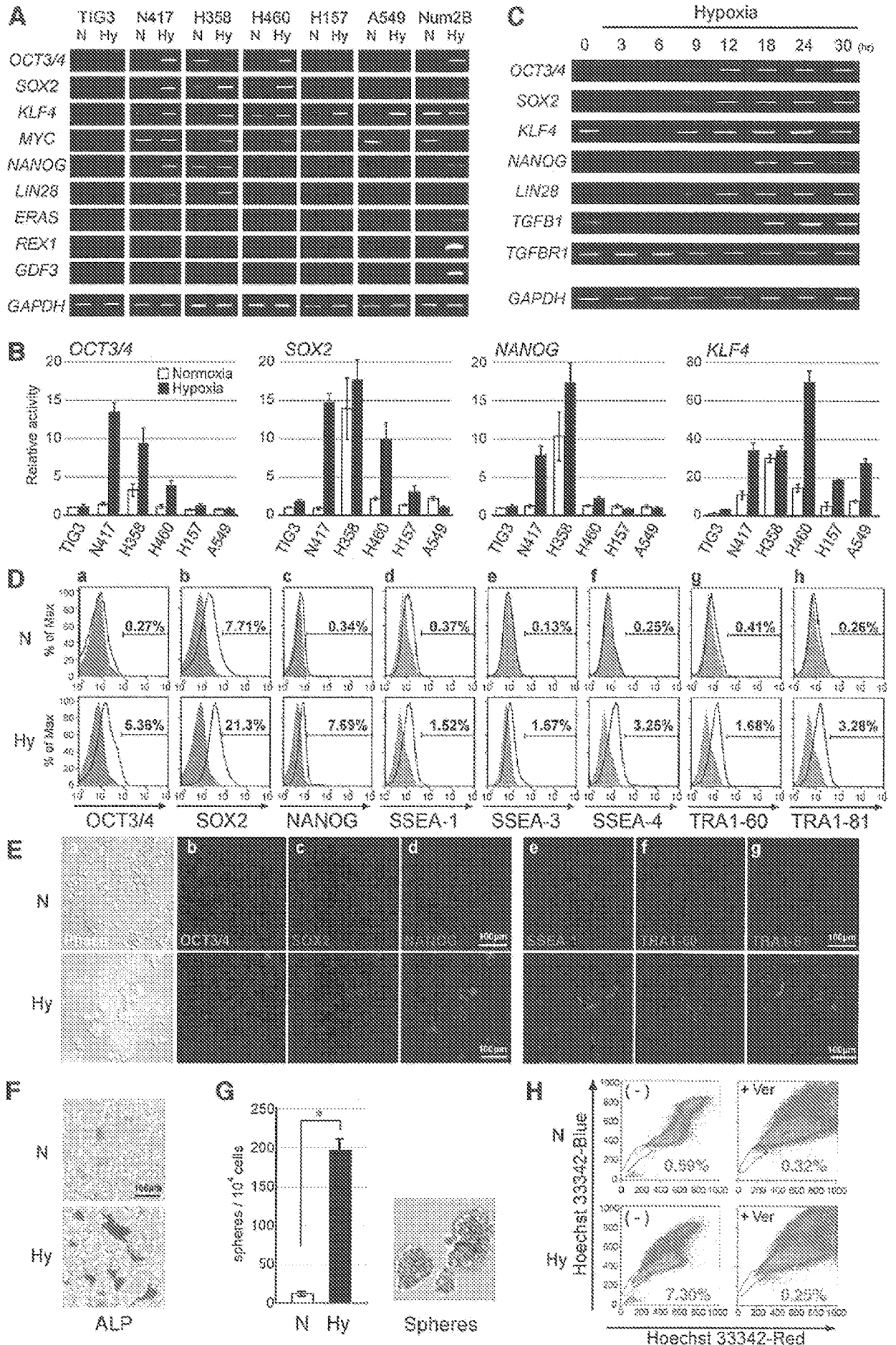
[請求項18] 前記低酸素負荷工程において、10%未満の酸素レベルにおける10時間以上の低酸素負荷が少なくとも1回行われる、請求項13～17のいずれか1項に記載の方法。

[請求項19] 前記の非造腫瘍細胞を選択する工程および前記の多能性を有する造腫瘍細胞を選択する工程において、細胞の選択が、フローサイトメトリ法を用いて行われる、請求項13～18のいずれか1項に記載の方法。

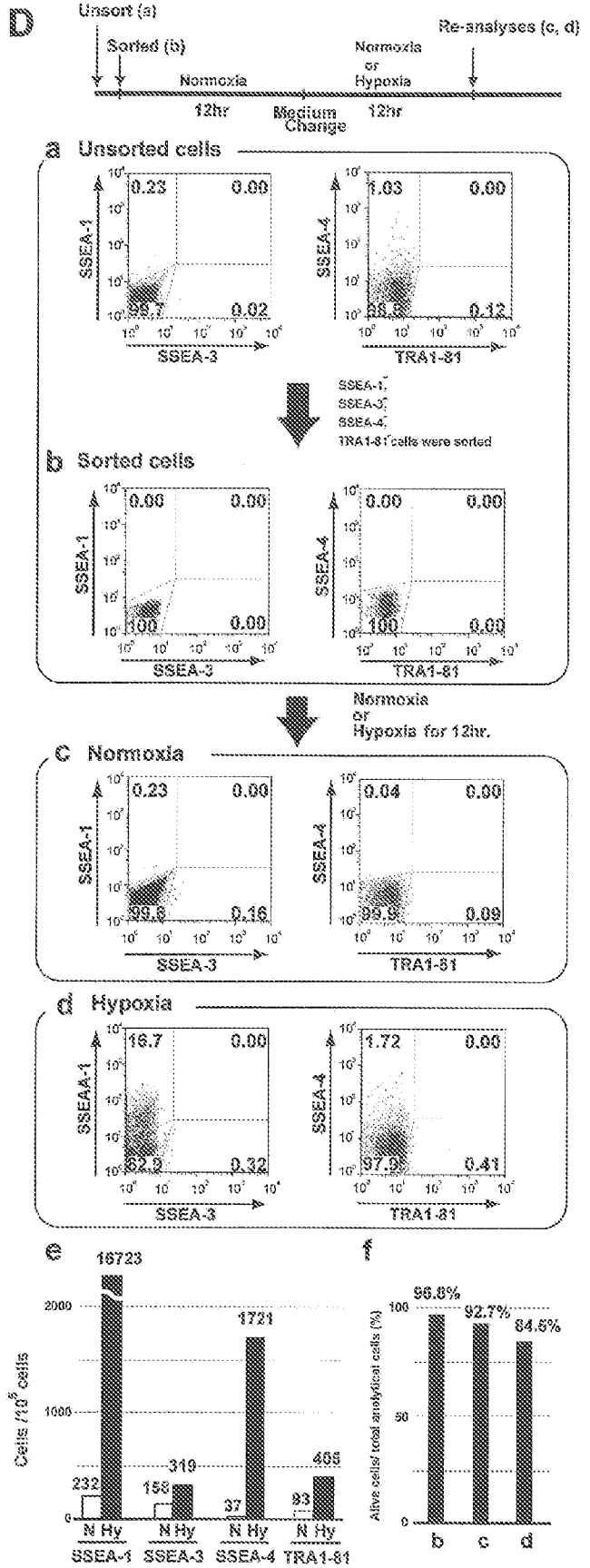
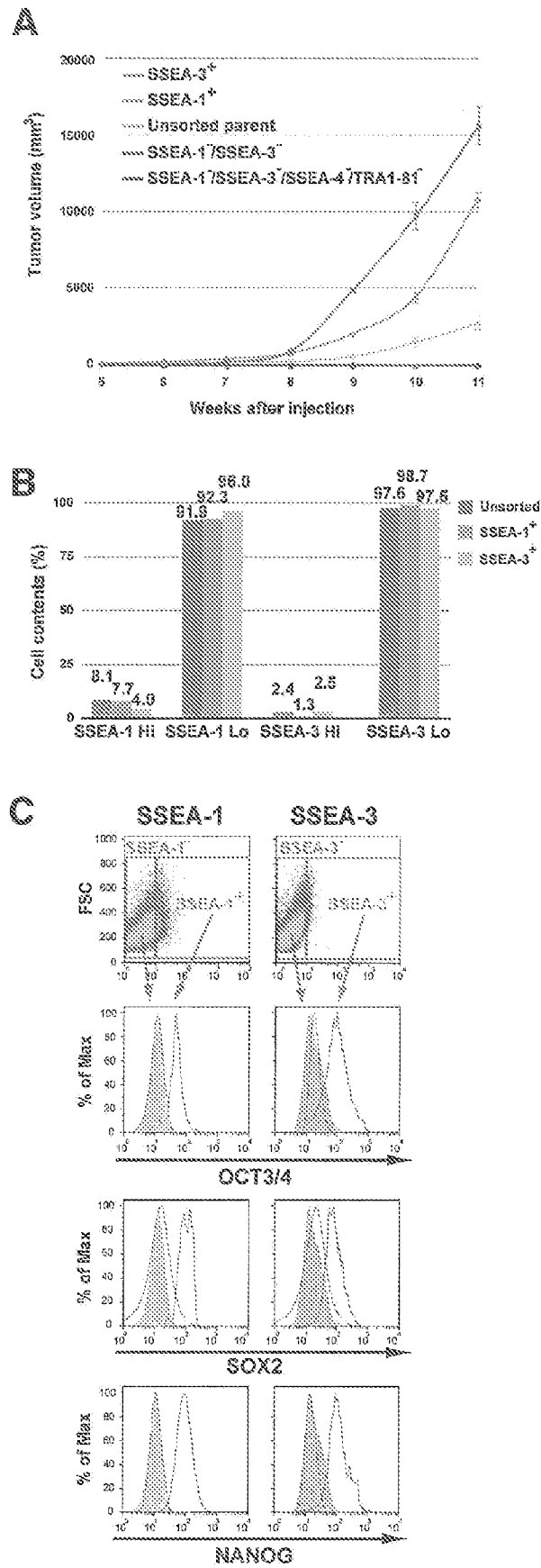
[請求項20] 低酸素負荷で誘導されるリプログラミングにより非造腫瘍細胞から

生じた多能性を有する造腫瘍細胞。

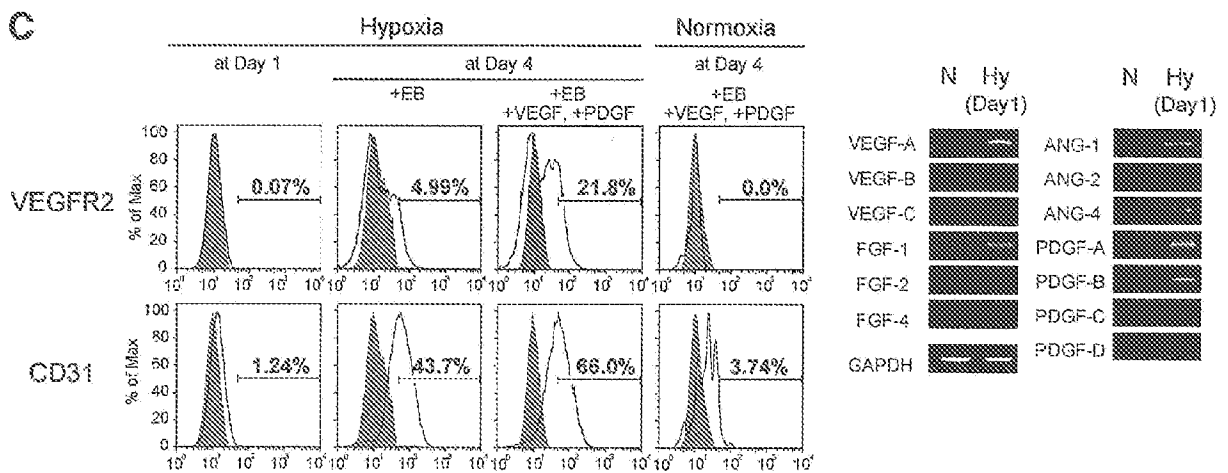
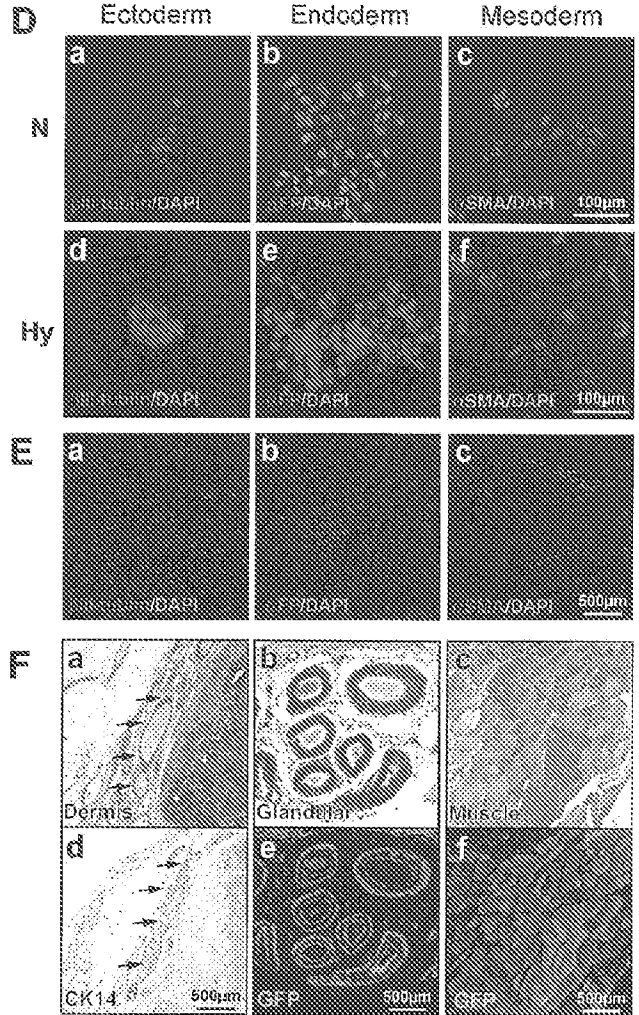
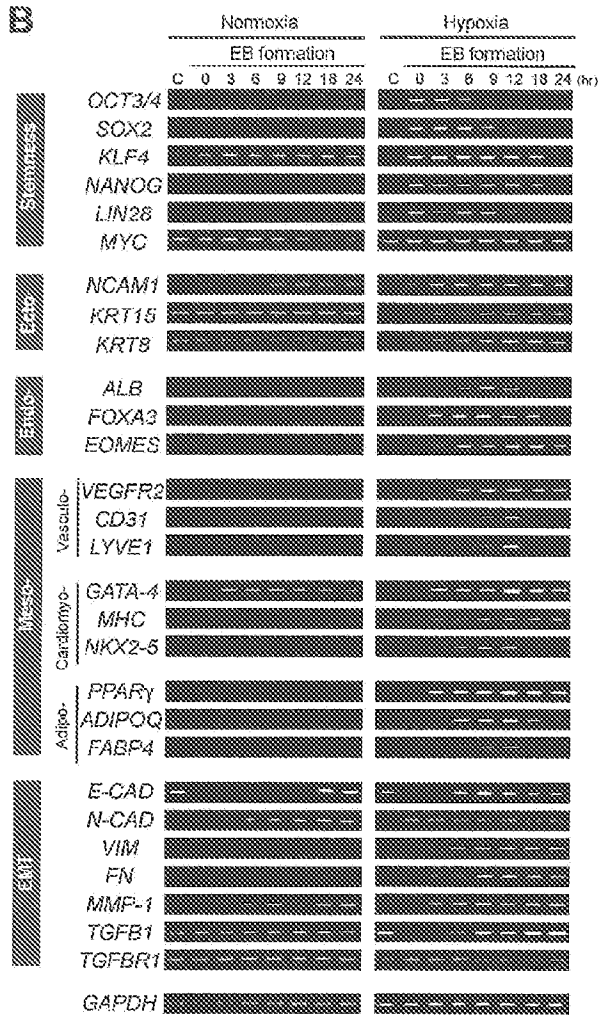
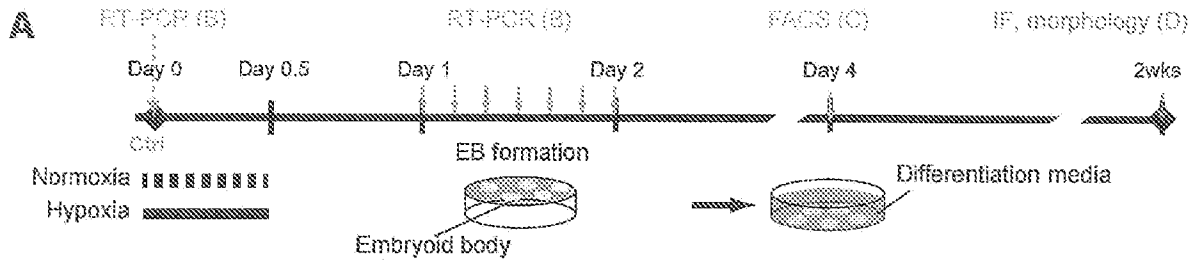
[Figure 1]



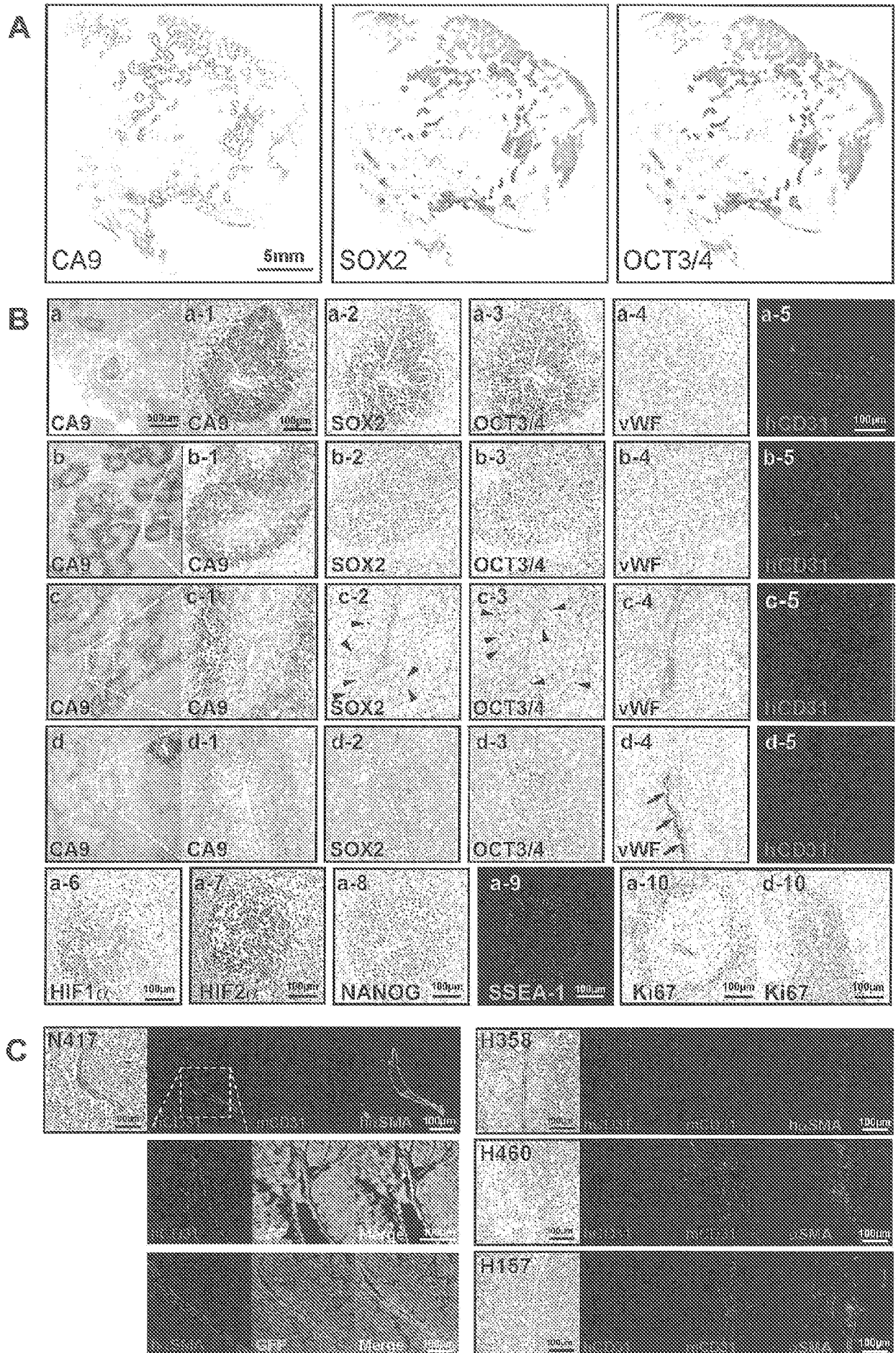
[FIG 2]



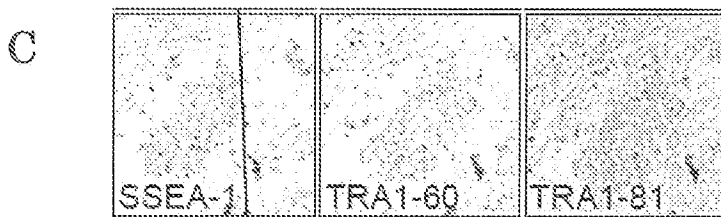
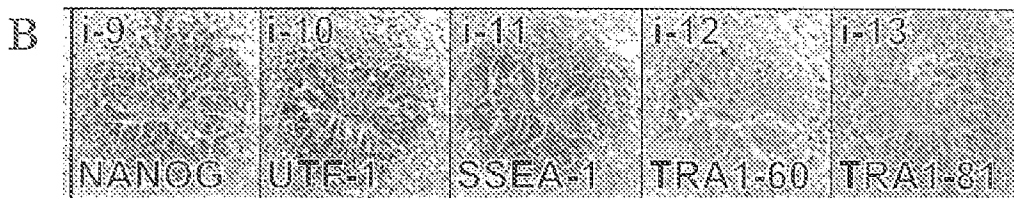
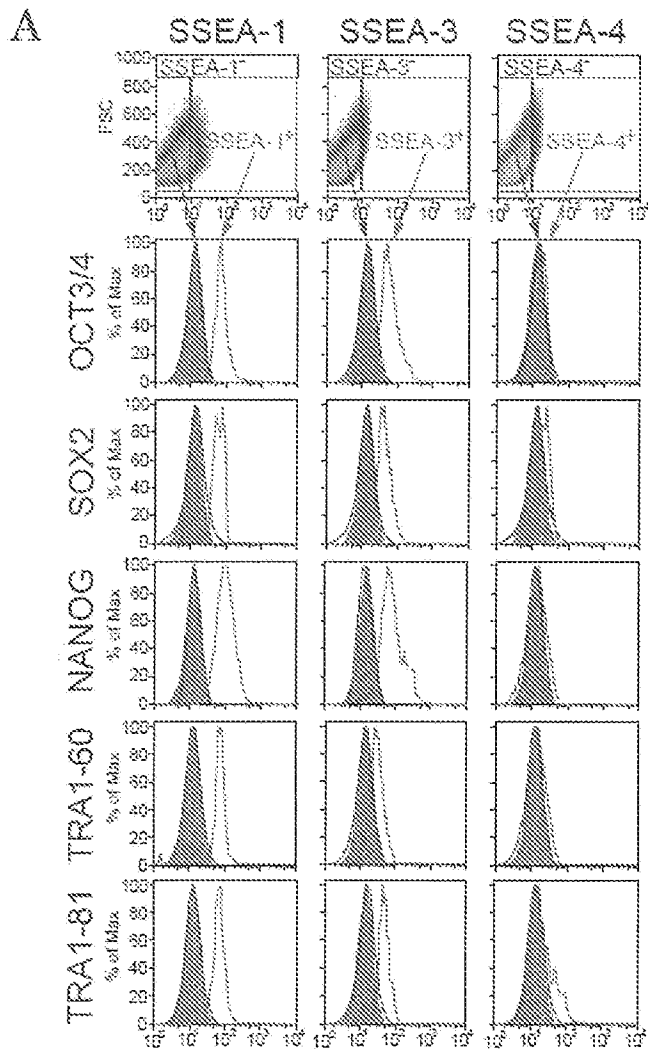
[3]



[図4]



[圖5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/055865

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/02(2006.01)i, C12N5/09(2010.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/483(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)

C12Q1/02, C12N5/09, C12Q1/68, G01N33/483, G01N33/50, G01N33/68

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

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed, CiNii

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GILBERT, C. A. and ROSS, A. H., Cancer stem cells: cell culture, markers, and targets for new therapies, J. Cell Biochem., 2009, Vol.108, No.5, pages 1031-1038.	1-20
Y	SON, M. J. et al., SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma, Cell Stem Cell, 2009, Vol.4, No.5, pages 440-452.	1-20
Y	JP 2011-524417 A (Academia Sinica), 01 September 2011 (01.09.2011), entire text & US 2009/0317411 A1 & US 2010/0136042 A1 & EP 2310047 A1 & EP 2303286 A1 & WO 2010/005598 A1 & WO 2010/005735 A2	1-20

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
22 March, 2013 (22.03.13)

Date of mailing of the international search report
02 April, 2013 (02.04.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/055865

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SCHOPPERLE, W. M. and DEWOLF, W. C., The TRA-1-60 and TRA-1-81 human pluripotent stem cell markers are expressed on podocalyxin in embryonal carcinoma, <i>Stem Cells</i> , 2007, Vol.25, pages 723-730.	1-20
Y	JP 2009-296895 A (National University Corporation University of Fukui), 24 December 2009 (24.12.2009), entire text (Family: none)	1-20
Y	ZENG, W. et al., Hypoxia, stem cells and bone tumor, <i>Cancer Lett.</i> , 2011, Vol.313, pages 129-136.	1-20
Y	MATHIEU, J. et al., HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells, <i>Cancer Res.</i> , 2011, Vol.71, No.13, pages 4640-4652.	1-20
Y	TANIMOTO, K., Cancer and hypoxia, <i>Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> , 2008, Vol. 225, No.13, pages 1315-1318.	1-20
Y	CONLEY, S. J. et al., Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , February 2012, Vol.109, No.8, pages 2784-2789.	1-20
Y	BEN-PORATH, I. et al., An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors, <i>Nat. Genet.</i> , 2008, Vol.40, No.5, pages 499-507.	1-20
Y	WONG, D. J. et al., Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells, <i>Cell Stem Cell</i> , 2008, Vol.2, pages 333-344.	1-20
A	JP 2008-278798 A (Tokyo Medical and Dental University), 20 November 2008 (20.11.2008), entire text (Family: none)	1-20
A	JP 2011-511625 A (Hansabiomed OU), 14 April 2011 (14.04.2011), entire text & US 2009/0191222 A1 & EP 2245465 A1 & WO 2009/092385 A1	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/055865

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2010-099039 A (Fujifilm Corp.), 06 May 2010 (06.05.2010), entire text & US 2010/0105868 A1	1-20
A	WO 2010/067722 A1 (Bio Matrix Research, Inc.), 17 June 2010 (17.06.2010), entire text & JP 2010-130993 A	1-20
A	JP 2010-075186 A (Wisconsin Alumni Research Foundation), 08 April 2010 (08.04.2010), entire text & JP 2007-531526 A & US 2005/0260749 A1 & EP 1730268 A1 & WO 2005/097977 A2	1-20

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12Q1/02(2006.01)i, C12N5/09(2010.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/483(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 (IPC))
 Int.Cl. C12Q1/02, C12N5/09, C12Q1/68, G01N33/483, 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

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)
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)、PubMed、CiNii

C. 関連すると認められる文献

引用文献の 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 請求項の番号
Y	GILBERT, C. A. and ROSS, A. H., Cancer stem cells: cell culture, markers, and targets for new therapies, J. Cell Biochem., 2009, Vol.108, No.5, pages 1031-1038.	1-20
Y	SON, M. J. et al., SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma, Cell Stem Cell, 2009, Vol.4, No.5, pages 440-452.	1-20

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

<p>* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「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 「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) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献 「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 「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 「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 「&」同一パテントファミリー文献</p>
--	---

国際調査を完了した日 2 2 . 0 3 . 2 0 1 3	国際調査報告の発送日 0 2 . 0 4 . 2 0 1 3
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 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) 白井 美香保 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 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 請求項の番号
Y	JP 2011-524417 A (アカデミア シニカ) 2011.09.01, 全文 & US 2009/0317411 A1 & US 2010/0136042 A1 & EP 2310047 A1 & EP 2303286 A1 & WO 2010/005598 A1 & WO 2010/005735 A2	1-20
Y	SCHOPPERLE, W. M. and DEWOLF, W. C., The TRA-1-60 and TRA-1-81 human pluripotent stem cell markers are expressed on podocalyxin in embryonal carcinoma, Stem Cells, 2007, Vol. 25, pages 723-730.	1-20
Y	JP 2009-296895 A (国立大学法人福井大学) 2009.12.24, 全文 (ファミリーなし)	1-20
Y	ZENG, W. et al., Hypoxia, stem cells and bone tumor, Cancer Lett., 2011, Vol. 313, pages 129-136.	1-20
Y	MATHIEU, J. et al., HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells, Cancer Res., 2011, Vol. 71, No. 13, pages 4640-4652.	1-20
Y	TANIMOTO, K., Cancer and hypoxia, 医学のあゆみ, 2008, Vol. 225, No. 13, pages 1315-1318.	1-20
Y	CONLEY, S. J. et al., Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, February 2012, Vol. 109, No. 8, pages 2784-2789.	1-20
Y	BEN-PORATH, I. et al., An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors, Nat. Genet., 2008, Vol. 40, No. 5, pages 499-507.	1-20
Y	WONG, D. J. et al., Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells, Cell Stem Cell, 2008, Vol. 2, pages 333-344.	1-20

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の 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 請求項の番号
A	JP 2008-278798 A (国立大学法人 東京医科歯科大学) 2008. 11. 20, 全文 (ファミリーなし)	1-20
A	JP 2011-511625 A (ハンサビオメド・オサウヒング) 2011. 04. 14, 全文 & US 2009/0191222 A1 & EP 2245465 A1 & WO 2009/092385 A1	1-20
A	JP 2010-099039 A (富士フイルム株式会社) 2010. 05. 06, 全文 & US 2010/0105868 A1	1-20
A	WO 2010/067722 A1 (株式会社バイオマトリックス研究所) 2010. 06. 17, 全文 & JP 2010-130993 A	1-20
A	JP 2010-075186 A (ウイスコンシン アラムニ リサーチ ファン デーション) 2010. 04. 08, 全文 & JP 2007-531526 A & US 2005/0260749 A1 & EP 1730268 A1 & WO 2005/097977 A2	1-20