

(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
2020年9月3日(03.09.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/174539 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01) C12N 15/53 (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/007082

(22) 国際出願日: 2019年2月25日(25.02.2019)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人: 国立大学法人東北大学 (TOHOKU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 Miyagi (JP).

(72) 発明者: 今井 淳太 (IMAI, Junta); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 片桐 秀樹 (KATAGIRI, Hideki); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 菅原 裕人 (SUGAWARA, Hiroto); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP).

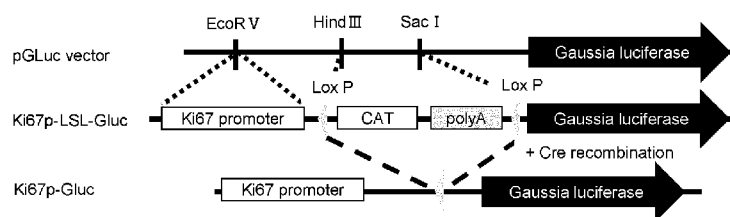
(74) 代理人: 特許業務法人秀和特許事務所 (IP FIRM SHUWA); 〒1030004 東京都中央区東日本橋三丁目4番10号 アクロポリス 21ビル8階 Tokyo (JP).

(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,

(54) Title: NON-HUMAN MAMMAL FOR MONITORING CELL PROLIFERATION

(54) 発明の名称: 細胞増殖モニター用非ヒト哺乳動物



(57) Abstract: Provided is a non-human mammal which retains, on a chromosome, a gene construct that comprises: (i) a promoter sequence of genes related to cell proliferation; (ii) a secretory reporter protein-coding sequence; and (iii) a sequence that is sandwiched in two lox sequences arranged between said promoter sequence and said secretory reporter protein-coding sequence to inhibit the transcription of the secretory reporter protein-coding sequence (reporter protein transcription-inhibiting sequence), wherein the secretory reporter protein can be expressed in a cell proliferation-dependent manner by enabling the functioning of a Cre recombinase.

(57) 要約: (i) 細胞増殖関連遺伝子のプロモーター配列と、(ii) 分泌型レポータータンパク質をコードする配列と、(iii) 前記プロモーター配列と前記分泌型レポータータンパク質コード配列との間に配置された、2つのlox配列に挟まれ、前記分泌型レポータータンパク質をコードする配列の転写を阻害する配列(レポータータンパク質転写阻害配列)と、を含む遺伝子構築物を染色体上に保持する非ヒト哺乳動物であって、Creリコンビナーゼを機能させることによって、細胞増殖依存的に前記分泌型レポータータンパク質を発現することができる、非ヒト哺乳動物。

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：

- 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
（規則5.2(a)）

明 細 書

発明の名称：細胞増殖モニター用非ヒト哺乳動物

技術分野

[0001] 本発明は医療や創薬分野で好適に使用される細胞増殖モニター用非ヒト哺乳動物に関する。

背景技術

[0002] 細胞増殖をモニターすることは細胞や組織の状態を評価したり薬剤などの効果を評価したりするために有用である。インビトロの細胞を用いた細胞増殖の評価は一般的には³H-チミジン、BrdU、MTTなどの試薬を用いて行われる。

[0003] また、近年では、細胞増殖関連分子であるKi67のプロモーターの制御下でGFPを発現させ、細胞増殖をGFPの蛍光でモニターすることが報告されている（非特許文献1）。

[0004] 一方、インビボの生体における細胞増殖をモニターできる方法の開発が求められており、例えば、GFPなどの蛍光レポータータンパク質を組織や腫瘍部位特異的に発現させた実験動物が開発されている。しかしながら、これまでの方法では生理的な細胞増殖をインビボでモニターするには感度が低く、また、蛍光を測定するためのイメージング装置が必要であり、より簡便なシステムの開発が求められていた。

[0005] 非特許文献2および3には分泌型ルシフェラーゼであるGaussiaルシフェラーゼを用いることでインビボの生体プロセスを血中に分泌されたルシフェラーゼの蛍光を測定することにより評価できることが開示されている。しかしながら、このような分泌型レポーターを細胞増殖の評価に使用できるかどうかは不明であった。

また、いくつかの先行報告では腫瘍細胞や腫瘍細胞から作成した細胞株の増殖についてレポーターを指標にモニターしたことを開示しているが、この場合、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異等により細胞増殖活性が正常細胞を上回る状態となった細胞または細胞株の増殖数に依存したレポーター発現

とその検知によってなされた報告であり、通常の増殖能または増殖活性を有する細胞の増殖を評価できるかどうかは不明であった。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1 : Cytometry A 77, 564-570. (2010)

非特許文献2 : Nat Methods 5, 171-173.2008

非特許文献3 : Nat Protoc 4, 582-591.2009

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、インビボの生理的な細胞増殖をリアルタイムで簡便に測定できるシステムを開発することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、(i) 細胞増殖関連遺伝子のプロモーター配列と、(ii) 分泌型レポータータンパク質をコードする配列と、(iii) 前記プロモーター配列と前記分泌型レポータータンパク質コード配列との間に配置された、2つのlox配列に挟まれ、前記分泌型レポータータンパク質をコードする配列の転写を阻害する配列（レポータータンパク質転写阻害配列）とを含む遺伝子構築物を染色体上に保持する非ヒト哺乳動物を、組織特異的にCreリコンビナーゼを発現する非ヒト哺乳動物と交配させることによって、特定の組織において細胞増殖依存的に前記分泌型レポータータンパク質を発現する非ヒト哺乳動物が得られることを見出し、これを用いることにより、目的組織におけるインビボの生理的な細胞増殖をリアルタイムで簡便に測定できることを見出し、本発明の完成に至った。

[0009] 本発明の要旨は以下のとおりである。

- [1] (i) 細胞増殖関連遺伝子のプロモーター配列と、
- (ii) 分泌型レポータータンパク質をコードする配列と、

(iii) 前記プロモーター配列と前記分泌型レポータータンパク質コード配列との間に配置された、

2つのlox配列に挟まれ、前記分泌型レポータータンパク質をコードする配列の転写を阻害する配列（レポータータンパク質転写阻害配列）と、

を含む遺伝子構築物であって、

前記レポータータンパク質転写阻害配列が2つのlox配列とともにCreリコンビナーゼによって切除されることにより、細胞増殖依存的に前記分泌型レポータータンパク質を発現させることができる、遺伝子構築物。

[2]細胞増殖関連遺伝子がKi67である、[1]に記載の遺伝子構築物。

[3]分泌型レポータータンパク質がGaussialシフェラーゼである、[1]または[2]の遺伝子構築物。

[4]前記レポータータンパク質転写阻害配列がマーカー遺伝子とその転写を終結させるポリA配列である、[1]～[3]のいずれかに記載の遺伝子構築物。

[5][1]～[4]のいずれかに記載の遺伝子構築物を染色体上に保持する非ヒト哺乳動物であって、Creリコンビナーゼを機能させることによって、細胞増殖依存的に前記分泌型レポータータンパク質を産生することができる、非ヒト哺乳動物。

[6]前記遺伝子構築物は染色体上のROSA26部位に導入された、[5]に記載の非ヒト哺乳動物。

[7][5]または[6]に記載の非ヒト哺乳動物をCreリコンビナーゼ発現非ヒト哺乳動物と掛け合わせることによって得られた、細胞増殖依存的に前記分泌型レポータータンパク質を産生する、非ヒト哺乳動物。

[8]前記Creリコンビナーゼ発現非ヒト哺乳動物が薬剤誘導性核移行型Creリコンビナーゼ発現非ヒト哺乳動物である、[7]に記載の非ヒト哺乳動物。

[9]前記Creリコンビナーゼ発現非ヒト哺乳動物が組織特異的にCreリコンビナーゼを発現する非ヒト哺乳動物であり、組織特異的に、細胞増殖に応じて前記分泌型レポータータンパク質を産生する、[7]または[8]に記載の非ヒト哺乳動物。

[10]前記組織が肝臓または脾臓である、[9]に記載の非ヒト哺乳動物。

[11]マウスである、[5]～[10]のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物。

[12][5]～[11]のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物から得られた細胞。

[13][5]～[11]のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物または[12]に記載の細胞を用いて前記分泌型レポータータンパク質を定量する工程を含む、細胞増殖の評価方法。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、インビボの生理的細胞増殖をわずかな血液の採取によってリアルタイムで高感度に測定できる。また、蛍光イメージング装置などを必要としないため、簡便な測定が可能である。また、組織特異的にCreリコンビナーゼを発現させることで組織特異的な細胞増殖をモニタリングすることができ、脾臓のような小さな組織における細胞増殖も高感度で測定可能である。本発明の非ヒト哺乳動物は病態解析、薬剤評価などに好適に使用できる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]リアルタイム細胞増殖レポーターの遺伝子構築物を示す図。I o x P部位を隣接させたCAT/polyAエレメント(LSLカセット)を、Gluc Basic-1ベクター中のヒトKi67プロモーター(Ki67p)の下流に配置し、Ki67p-LSL-Glucコンストラクトを構成した。Cre組換え後、CAT/polyAエレメントを切除し、GlucをKi67p制御下で発現させた。

[図2]Cre-アデノウイルス感染Hepa1-6細胞またはMIN6-K8細胞の培地中のルシフェラーゼ活性を示すグラフ。LucZ-アデノウイルス感染細胞の培地中のルシフェラーゼ活性を対照として用いた。データは平均値±標準誤差で表す。**スチューデントt検定による評価で $p < 0.01$ 。各群で $n = 4 \sim 6$ 。

[図3]マイトマイシンC(MitC)、ラパマイシン、またはロスコビチン処理後のLucZ-アデノウイルス感染またはCre-アデノウイルス感染H

e p a 1 - 6 細胞の培地中のルシフェラーゼ活性を示すグラフ。溶媒で処理した L a c Z - アデノウイルス感染細胞の培地中のルシフェラーゼ活性を対照として用いた。データは平均値 ± 標準誤差で表す。一元配置分散分析 (A N O V A) による評価で $## p < 0.01$ 。各群で $n = 4 \sim 5$ 。

[図4] C r e - アデノウイルス感染 M I N 6 - K 8 細胞における C A T 遺伝子または G l u c 遺伝子の発現を示すグラフ。L a c Z - アデノウイルス感染細胞における遺伝子発現を対照として用いた。データは平均値 ± 標準誤差で表す。* スチューデント t 検定による評価で $p < 0.01$ 。各群で $n = 4 \sim 6$ 。

[図5] 部分的肝切除 (P H x) または偽手術 (S O) 後の i L K i 6 7 p - G l u c マウス (K i 6 7 p - L S L - G l u c ; C r e (+)) の血漿中ルシフェラーゼ活性の経時変化 (0 日目に対する相対値) を示すグラフ。C r e E R 対立遺伝子を持たない同腹子マウスを対照として用いた (K i 6 7 p - L S L - G l u c ; C r e (-))。データは平均値 ± 標準誤差で表す。 $n = 4 \sim 8$ 。

[図6] P H x 後 3 日目の i L K i 6 7 p - G l u c マウスの i n v i v o 生物発光イメージングの画像を示す (写真)。S O 後の i L K i 6 7 p - G l u c マウスを対照として用いた。P H x 後 3 日目の i L K i 6 7 p - G l u c マウス由来の肝臓をルシフェラーゼ (緑) および K i 6 7 (赤) で二重免疫蛍光染色したもの。代表的な画像を示す。P H x 後の、C r e E R 対立遺伝子を持たない同腹子マウス由来の肝臓を対照として用いた。スケールバーは $50 \mu m$ 。

[図7] 妊娠中の i β K i 6 7 p - G l u c マウス (K i 6 7 p - L S L - G l u c ; C r e (+)) の血漿中ルシフェラーゼ活性の経時変化 (0 日目に対する相対値) を示すグラフ。妊娠 (+) は、その後の出産から判定された、妊娠したマウスを表す。妊娠 (-) は未交配のマウスを表す。膣栓が識別された日を 0 日目と定義した。データは平均値 ± 標準誤差で表す。一元配置分散分析 (A N O V A) による評価で $## p < 0.01$ 。 $n = 3 \sim 6$ 。

[図8]高グルコース濃度（HG）で刺激した後の $i\beta K i 67 p-G l u c$ マウスから単離した膵島の培地中のルシフェラーゼ活性（左）、膵島中での内在性 $K i 67$ の遺伝子発現（右）を示すグラフ。低グルコース濃度（LG）で培養した単離膵島の培地中のルシフェラーゼ活性、またはこれら膵島中の遺伝子発現を対照として用いた。

[図9]グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）で刺激した後の $i\beta K i 67 p-G l u c$ マウスから単離した膵島の培地中のルシフェラーゼ活性（左）、膵島中での内在性 $K i 67$ の遺伝子発現（右）を示すグラフ。溶媒を用いて培養した単離膵島の培地中のルシフェラーゼ活性、またはこれら膵島中の遺伝子発現を対照として用いた。データは平均値±標準誤差で表す。NS，有意差無し。スチューデントt検定による評価で** $p < 0.01$ 。各群で $n = 4$ 。

発明を実施するための形態

[0012] <遺伝子構築物>

本発明の遺伝子構築物は、

- (i) 細胞増殖関連遺伝子のプロモーター配列と、
- (ii) 分泌型レポータータンパク質をコードする配列と、
- (iii) 前記プロモーター配列と前記分泌型レポータータンパク質コード配列との間に配置された、

2つのlox配列に挟まれ、前記分泌型レポータータンパク質をコードする配列の転写を阻害する配列（レポータータンパク質転写阻害配列）と、を含む。

前記レポータータンパク質転写阻害配列が2つのlox配列とともにCreリコンビナーゼによって切除されることにより、細胞増殖関連遺伝子のプロモーター配列から細胞増殖依存的に分泌型レポータータンパク質遺伝子を発現させることができる。

[0013] 細胞増殖関連遺伝子とは、細胞増殖が行われるときに特異的に発現する遺伝子、すなわち、細胞周期のG0期には発現せず、それ以外、特にM期において

発現する遺伝子が挙げられ、具体的には、Ki67遺伝子、PCNA遺伝子、CyclinD1遺伝子、cdk2遺伝子、ファルネシルトランスフェラーゼ遺伝子、及びEGFレセプター遺伝子などが挙げられる。この中では、Ki67が好ましく用いられる。

[0014] Ki67遺伝子のプロモーターとしては配列番号1に記載の塩基配列を含む配列が挙げられるが、細胞増殖依存的な転写促進活性を有する限り、これには限定されず、配列番号1の塩基配列の相補配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAであってもよい。ストリンジントな条件とは、例えば、ハイブリダイゼーションの後、 $0.1\times\text{SSC}$ 、 $0.1\%\text{SDS}$ 、 65°C で洗浄する条件が挙げられる。

[0015] 分泌型レポータータンパク質とは、細胞内で発現され、非ヒト哺乳動物の体液中に分泌されるレポータータンパク質を意味する。ここで、体液は、血液、リンパ液、汗、尿、唾液などが挙げられるが、好ましくは血液である。レポータータンパク質は、免疫学的手法、比色反応、蛍光発光、化学発光などにより検出可能なものであれば特に制限されないが、例えば、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼなどが挙げられる。レポータータンパク質は分泌シグナルが付加されてもよい。分泌型のレポータータンパク質として具体的には、例えば、Gaussialルシフェラーゼ、Cypridinalルシフェラーゼ、Metridialルシフェラーゼ、Vargulalルシフェラーゼ、Oplophorusルシフェラーゼ、Pleuromammalルシフェラーゼなどの分泌型ルシフェラーゼや分泌性胎盤アルカリホスファターゼ（SEAP）などが挙げられる。Gaussialルシフェラーゼをコードする塩基配列は例えば配列番号2に示され、Gaussialルシフェラーゼのアミノ酸配列は例えば配列番号3で示される。ただし、分泌型ルシフェラーゼとして機能するタンパク質およびそれをコードする限りこれらのものには限定されない。

[0016] lox配列はCreリコンビナーゼによって認識される配列であればよいが、例えば、loxP, lox71, lox66, lox511, lox2272, Vlox (VCre), Slox (SCre)などが例示される。

[0017] レポータータンパク質転写阻害配列はスタッファー配列と呼ぶこともあるが、その3'側に連結された分泌型レポータータンパク質をコードする遺伝子の転写を阻害するために設けられた配列であり、当該配列が部位特異的組換え酵素によってlox配列とともに切り出されることによって、細胞増殖関連遺伝子プロモーターの直下に分泌型レポータータンパク質遺伝子が配置され、当該プロモーターの制御下に分泌型レポータータンパク質遺伝子の転写が起こるようになる。レポータータンパク質転写阻害配列は転写を阻害するのに十分な長さを有していれば特に限定されないが、当該配列が存在することを識別しやすくするためのマーカー遺伝子（分泌型レポータータンパク質とは異なるレポータータンパク質をコードする遺伝子や薬剤耐性遺伝子など、例えば、LacZ、CAT、GFP、Neo、Hygなど）が使用できる。レポータータンパク質転写阻害配列はその3'末端にポリA配列が付加されてもよい。

[0018] <本発明の遺伝子構築物を染色体上に保持する非ヒト哺乳動物>

本発明の非ヒト哺乳動物は、前記の遺伝子構築物を染色体上に保持する。

本発明の非ヒト哺乳動物は、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ブタ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ヒツジ、ウシ、マーモセットなどの任意の非ヒト哺乳動物であり得るが、好ましくはマウスである。

[0019] 本発明の非ヒト哺乳動物（トランスジェニック非ヒト哺乳動物）は、前記遺伝子構築物を非ヒト哺乳動物の染色体上に組み込むことで得ることができる。相同組換えによって染色体上の特定の位置に組み込むために、前記遺伝子構築物は染色体上の目的部位と相同な配列をさらに含むことが好ましい。ここで、染色体上の目的部位としては、Rosa26遺伝子座が好ましい。マウスROSA26遺伝子座は、Friedrich及びSorianoにより1991年に、レトロウイルスを感染させた胚性幹(ES)細胞を用いるジーントラップ実験により発見された(Genes & Development, 1991, 5, 1513~1523)。ROSA26遺伝子座をマウスES細胞でターゲティングすることは、トランスジェニックマウスモデルを構築するために広く用いられている(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96, 5037-5042など)。

[0020] 本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、例えば、以下の（a）～（g）の工程を含む方法により得ることができる。

（a）前記遺伝子構築物を含むターゲティングベクターを非ヒト哺乳動物の胚性幹（ES）細胞に導入する工程、

（b）前記遺伝子構築物が挿入された染色体を有するES細胞を選択する工程、

（c）選択したES細胞を受精卵に導入する工程、

（d）該受精卵を偽妊娠雌性非ヒト哺乳動物の卵管あるいは子宮に移植する工程、

（e）該非ヒト哺乳動物を飼育し、産まれた仔から、生殖系列キメラを選択する工程、

（f）該生殖系列キメラを交配させ、産まれた仔から、前記遺伝子構築物が挿入された染色体を有する個体を選択する工程、および

（g）（f）で得られた個体同士を交配させ、産まれた仔から、両方の相同染色体において、前記遺伝子構築物が挿入されたホモ接合体を選択する工程。

[0021] このような方法は、例えば、Hoganら、Manipulating the Mouse Embryo : A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory (1986) や、米国特許第5,616,491号および5,750,826号などに記載されている。

[0022] 上記のようにして得られた本発明の遺伝子構築物を染色体上に保持する非ヒト哺乳動物の体内において、Creリコンビナーゼを発現させることにより、細胞増殖依存的に前記分泌型レポータータンパク質を発現する非ヒト哺乳動物を得ることができる。

[0023] 好ましくは、本発明の遺伝子構築物を染色体上に保持する非ヒト哺乳動物を、Creリコンビナーゼ発現非ヒト哺乳動物と掛け合わせることによって、細胞増殖依存的に前記分泌型レポータータンパク質を発現する非ヒト哺乳動物を得ることができる。

[0024] <Creリコンビナーゼ発現非ヒト哺乳動物>

Cre recombinase遺伝子としては、lox配列を認識してそれに挟まれる配列を除去しうるタンパク質をコードする遺伝子であれば特に制限されないが、例えば、GenBankに Accession No. X03453で登録されているバクテリオファージP1のCre recombinase遺伝子を挙げることができる。

[0025] Creリコンビナーゼはその発現のタイミングを制御するため、薬剤誘導性核移行型であることが好ましい。例えば、薬剤依存的に核に移行し、lox配列で挟まれたレポータータンパク質転写阻害配列を切除するようにするため、Creリコンビナーゼを、薬剤依存的に核移行を促すタンパク質との融合タンパク質として発現させることが好ましい。このようなタンパク質としては核内ホルモン受容体が挙げられ、エストロゲン受容体が好ましく使用できる。Creリコンビナーゼとエストロゲン受容体の融合タンパク質を発現するマウスはGenesis 39, 167-172. (2004)などに記載されている。このような融合タンパク質として発現させることで、タモキシフェンなどのリガンドを投与した時のみCreが機能して細胞増殖依存的なレポータータンパク質の分泌を観察することができる。

[0026] 目的組織特異的な細胞増殖を評価するため、Creリコンビナーゼを目的組織のみで発現させて、目的組織特異的に分泌型レポータータンパク質を発現させることが好ましい。Creリコンビナーゼを目的組織のみで発現させるためには、Creリコンビナーゼをコードする遺伝子を組織特異的プロモーターの3'側に連結して、当該プロモーターの制御下で発現させることが好ましい。

[0027] 組織特異的プロモーターは、目的組織に応じて適宜選択できる。

肝臓特異的プロモーターとしては、肝臓アルブミンプロモーター、ApoAⅠプロモーター、 α -フェトプロテインプロモーター、 α 1-アンチトリプシンプロモーター、トランスフェリントランスサイレチンプロモーター、血清アミロイドAプロモーター、トランスサイレチンプロモーター、HNF-6プロモーターなどが挙げられる。

膵臓 β 細胞特異的プロモーターとしては、インスリンプロモーター、グルカゴンプロモーター、PDX-1プロモーターなどが挙げられる。

骨格筋特異的プロモーターとしては、ミオシンH鎖プロモーター、筋クレアチンキナーゼプロモーター、ジストロフィンプロモーター、カルパインプロモーター、アルファ-アクチンプロモーター、速筋型トロポニン1プロモーター、などが挙げられる。

皮膚特異的プロモーターとしてはケラチンプロモーターなどが挙げられる。

肺特異的プロモーターとしてはサイトケラチン18プロモーター、C F T R（嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子）プロモーター、肺サーファクタントタンパク質A、Bプロモーターなどが挙げられる。

脂肪組織特異的プロモーターとしてはリポタンパク質リパーゼプロモーター、アジプシンプロモーター、アディポネクチンプロモーター、aP 2プロモーターなどが挙げられる。

神経特異的プロモーターとしては、コリンアセチルトランスフェラーゼプロモーター、c-F o sプロモーター、A r cプロモーター、シナプシンIプロモーター、ニューロン特異的エノラーゼプロモーター、ニューロフィラメント-Lプロモーター、ニューロペプチドYプロモーター、チロシン水酸化酵素遺伝子プロモーター、ドーパミン- β -ヒドロキシラーゼ遺伝子プロモーター、L 7 プルキンエ細胞タンパク質プロモーター、D 1 Aドーパミン受容体遺伝子プロモーター、グルタミン酸デカルボキシラーゼ65遺伝子プロモーター、神経ニコチン性アセチルコリン受容体ベータ3遺伝子プロモーター、G A B A（A）受容体デルタサブユニット遺伝子プロモーターなどが挙げられる。

血球特異的プロモーターとしてはf 4 / 8 0プロモーター、ライソザイム2プロモーター、ケモカイン(C-X 3-Cモチーフ)受容体1プロモーター、コロニー刺激因子1受容体プロモーターなどが挙げられる。

腸管特異的プロモーターとしてはヴィリンプロモーターが挙げられる。

上記のような適当なプロモーターの下流に連結されたCreリコンビナーゼ遺伝子を染色体上に保持する非ヒト哺乳動物は上記と同様の手順で得ることが

できる。

[0028] <細胞増殖依存的に分泌型レポータータンパク質を産生する非ヒト哺乳動物>

本発明の遺伝子構築物を保持する非ヒト哺乳動物およびCreリコンビナーゼ発現非ヒト哺乳動物を交配させ、生まれてくる子孫の中から、分泌型レポータータンパク質をコードする遺伝子およびCreリコンビナーゼをコードする遺伝子をホモまたはヘテロに有し、目的組織において、レポータータンパク質転写阻害配列が除去され、細胞増殖関連遺伝子プロモーターの制御下で分泌型レポータータンパク質をコードする遺伝子が発現する動物を、サザンブロットやPCRなどの遺伝子解析または表現型解析によりスクリーニングする。このような手順により、細胞増殖依存的に分泌型レポータータンパク質を産生する非ヒト哺乳動物が得られる。

[0029] 上記非ヒト哺乳動物またはそれから得られた細胞は細胞増殖の評価および解析に使用できる。すなわち、上記非ヒト哺乳動物またはその細胞は細胞増殖に応じてレポータータンパク質を分泌するため、分泌されたレポータータンパク質を定量することで、細胞増殖の評価、解析又はモニターすることができる。例えば、血液などの体液を定期的に採取し、そこに含まれるレポータータンパク質の量を測定することで、細胞増殖をモニターすることができる。測定はレポータータンパク質の種類によって適当な方法を選択できる。ルシフェラーゼの場合、ルシフェラーゼの基質を用いて活性を測定することができる。

また、組織特異的にCreリコンビナーゼを発現させることで、組織特異的な細胞増殖を評価、解析又はモニターすることができる。さらに、Creリコンビナーゼを薬剤誘導型とすることにより、解析するときのみレポータータンパク質を分泌させることができる。

[0030] 本発明の細胞増殖依存的に分泌型レポータータンパク質を産生する非ヒト動物は、外部刺激に対する細胞増殖の変化や病態などの内部要因に対する細胞増殖の変化をモニターするために使用することができる。また、薬剤の細

胞増殖に対する影響を評価するために使用することができる。すなわち、本発明のトランスジェニック非ヒト動物に被験物質を投与し、被験物質が細胞増殖に与える影響を評価することができる。被験物質投与前後のトランスジェニック非ヒト動物より体液（例えば、血液）サンプルを採取して、体液中に含まれるレポータータンパク質の増減を指標として、当該被験物質の効果を評価することができる。例えば、被験物質の投与により、体液中に含まれるレポータータンパク質の量が低減した場合には、当該被験物質は細胞増殖を抑制する効果を有すると判断することができ、逆に、体液中に含まれるレポータータンパク質の量が増大した場合には、当該被験物質は細胞増殖を促進する効果を有すると判断することができる。例えば、目的組織にがんを誘発し、その細胞増殖を測定することにより、癌の進行をモニターできるし、薬剤を添加することで薬剤の抗がん効果を評価することもできる。

実施例

[0031] 以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明の態様は以下の実施例には限定されない。

[0032] 材料および方法

E S細胞における遺伝子ターゲティング、およびノックインマウスの生成
 pGLuc Basic-1ベクターをNanoLight Technologies（米国アリゾナ州）より購入した。このベクターは、プロモーターを含まないレポーター遺伝子Gluc（Gaussia princeps分泌ルシフェラーゼのヒト化コード配列）（配列番号2）を含む[Mol Ther 11, 435-443. (2005)]。図1に示すように、リアルタイム細胞増殖のモニタリングのためのコンストラクトを構築するため、ヒトKi67プロモーター配列（配列番号1）をpGLuc Basic-1のEcoRV部位に、IoxP-クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ（CAT）-polyA-IoxP（LSL）[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 160-164. (1995)]カセットをpGLuc Basic-1のSacI部位とHindIII部位の間に、それぞれ挿入した（Ki67p-LSL-Glu

cコンストラクト)。このK i 6 7 p - L S L - G l u cコンストラクトを、マウス肝細胞株H e p a 1 - 6またはマウス β 細胞株M I N 6 - K 8 [J D iabetes Investig 1, 137-142. (2010)] にトランスフェクトした。これらの細胞でコンストラクトが機能するのを確認した後、K i 6 7 p - L S L - G l u cを、C 5 7 B L / 6 Nマウス由来E S細胞のR o s a 2 6遺伝子座にエレクトロポレーションでノックインした。相同組換え体のE S細胞クローンを、P C Rおよびサザンブロット分析でn e oプローブを用いて識別した。樹立されたこれらの相同組換え体E S細胞から、キメラマウスを生成した。このキメラマウスを野生型マウスと交配することで、ヘテロ接合体マウスを得た。

[0033] 組換えアデノウイルス

C A Gプロモーター制御下のC r eリコンビナーゼ遺伝子をコードする組換えアデノウイルス (C r e - アデノウイルス) を、先の報告 [Gastroenterology 152, 1521-1535 e1528. (2017), Am J Physiol Endocrinol Metab 290, E308-316. (2006)] に記載のように用いた。

L a c Z遺伝子をコードする組換えアデノウイルス (L a c Z - アデノウイルス) を対照として使用した。

[0034] i n v i t r o実験

H e p a 1 - 6細胞は、10%ウシ胎児血清ならびにペニシリン (100 U / m L) およびストレプトマイシン (100 m g / m L) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c, マサチューセッツ州W a l t h a m) 中で維持した。M I N 6 - K 8細胞は、10%ウシ胎児血清ならびにペニシリン (100 U / m L) およびストレプトマイシン (100 m g / m L) を添加した、25 m Mグルコースを含むダルベッコ改変イーグル培地中で維持した。アデノウイルス感染のため、細胞を、 2.2×10^5 P F U のC r e - アデノウイルスまたはL a c Z - アデノウイルスを含む培地中で48時間インキュベートした。細胞増殖を抑制するため、H e p a 1 - 6細胞を、マイトマイシン (30 μ g / m L

）、ロスコビチン（ $500\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、またはラパマイシン（ $50\mu\text{M}$ ）を含む培地中で5時間インキュベートし、その後これらの薬剤を含まない培地中で20時間インキュベートした。溶媒として水を用いた。

[0035] *G a u s s i a* ルシフェラーゼアッセイ

マウスの尾部を小切開し、血液試料を採取した。 $50\mu\text{L}$ の血液を $1\mu\text{L}$ の 0.5M EDTAに加え、10分間以上遠心して血漿を分離した。 $1\mu\text{L}$ の 0.5M EDTAを $50\mu\text{L}$ の血液に加え、その後10分間以上遠心して血漿を分離した。次いで、リン酸緩衝食塩水（PBS）で希釈した $100\mu\text{L}$ の $10\mu\text{g}/\text{mL}$ セレンテラジン（*Nanolight Technologies*）を、96穴プレート中の $20\mu\text{L}$ の試料（培地または血漿）に加えた。*Gluc*活性を、セレンテラジンを注入し、光子計数を10秒間行うように設定したプレートルミノメーター（*Fluoroscan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific*）を用いて測定した [Nat Methods 5, 171-173. (2008)]。

[0036] 定量RT-PCRによる遺伝子発現量の評価

RNeasy Micro Kit（*QIAGEN*，東京，日本）を用いて、臍島または細胞溶解物から全RNAを抽出した。*Quantitect Reverse Transcription Kit*（*QIAGEN*）を用いて 100ng の全RNAから合成したcDNAを、リアルタイムPCR定量システム（*Light Cycler*ソフトウェア；*Roche Diagnostics*，マンハイム，ドイツ）により評価した。mRNAの相対量を、インバリアントな対照（*invariant control*）として*Actb* mRNAを用いて算出した。プライマー配列は次の通りであった：マウス*Ki67*（5′-AGTCTCTGGAGAGTCTGATGTTA-3′（配列番号4）[フォワードプライマー]、5′-ACTTCTTGGTGCAACAATGTC-3′（配列番号5）[リバープライマー]）、マウス*Actb*（5′-GATGCCCTGAGGCTCTT-3′（配列番号6）[フォワードプライマー]、5′-TGTGTTG

GCATAGAGGTCTTTAC-3' (配列番号7) [リバープライマー])、CAT遺伝子(5'-CAACCTATGGAAGTGAATGG-3' (配列番号8) [フォワードプライマー]、5'-CTCATCATCACTAGATGGCATTTC-3' (配列番号9) [リバープライマー])、Gluc遺伝子(5'-ATCGTCGACATTCC TGAGATTTC-3' (配列番号10) [フォワードプライマー]、5'-GGTCAGAACACTGCACGTTTG-3' (配列番号11) [リバープライマー])。

[0037] 動物

動物実験は、東北大学の研究機関ガイドラインに従って行った。東北大学環境・安全委員会動物実験専門委員会より倫理認定を得た。

アルブミンプロモーター-CreERトランスジェニックマウス [Genesis 39, 167-172. (2004)] は、Pierre Chambon氏およびDaniel Metzger教授 (Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology, Illkirch-Cedex, フランス) の協力により提供された。ラットインシュリン2プロモーター-CreER (RIP-CreER) マウス [Nature 429, 41-46. (2004)] は、The Jackson Laboratory (Bar Harbor, 米国メイン州) より購入した。

[0038] タモキシフェン誘導性肝臓特異的Ki67p-Glucマウス (iLK i67p-Glucマウス) を得るため、アルブミン-CreERマウスとKi67p-LSL-Glucの交配を行った。

[0039] 8週齢の時点で、雄のアルブミン-CreER; Ki67p-LSL-Glucマウスに、コーンオイル (Sigma) に溶かした80 μ g/g体重のタモキシフェン (Sigma, セントルイス, 米国ミズーリ州) を24時間ごとに5日間連続で腹腔内注射した。最後の注射から10日後、これらのマウスに、公開されているプロトコル [Nature protocols 3, 1167-1170. (2008)] に従って70%PHxを行った。このプロトコルは肝臓の左葉および中

葉を結紮および摘出するためのものである。偽手術では正中開腹のみを行った。

[0040] タモキシフェン誘導性 β 細胞特異的*Ki67p-Gluc*マウス (*iβKi67p-Gluc*マウス) を得るため、*RIP-CreER*マウスと*Ki67p-LSL-Gluc*マウスの交配を行った。8週齢の時点で、*RIP-CreER; Ki67p-LSL-Gluc*マウスに、上記のようにタモキシフェン (*Sigma*) の腹腔内注射を行った。

[0041] 妊娠モデルについては、最後のタモキシフェン注射から1ヶ月後、雌の*iβKi67p-Gluc*マウスを雄の*C57BL/6N*マウスと交配した。雄の*C57BL/6N*マウスは*Japan SLC* (静岡, 日本) より購入した。それらマウスを同一のケージ内に一晩置いた翌朝、膣栓の存在によって交配を確認した。

[0042] これらの動物は、空調環境下、12時間明暗サイクルで飼育を行った。マウスには、標準的な実験用飼料 (65%炭水化物, 4%乳脂肪, 24%タンパク質; オリエンタル酵母工業株式会社 (東京, 日本) による提供) が自由に与えられた。*CreER*対立遺伝子を持たない同腹子マウスを対照として用いた。

[0043] *in vivo*生物発光イメージング

マウスを麻酔し、PBSで希釈したセレンテラジン (*Nanolight Technologies*) を4mg/kgの投与量で静脈注射した。注射から1分後、*Gluc*イメージングを行い、照明無しで冷却CCDカメラ (*IVIS SPECTRUM, PerkinElmer, Waltham*, 米国マサチューセッツ州) を用いて、光子数を1分間にわたり記録した [Nat Methods 5, 171-173. (2008)]。

[0044] 膵島解析

最後の注射から10日後、先の記述のように [Diabetes 60(2):537-47. (2011)]、膵島の単離を行った。膵島は1.0mg/mLコラゲナーゼV (*Sigma*) を含む1.0mLのハンクス液を膵管に逆行注入することにより単

離した。膵臓を37℃の恒温チャンバー内で消化した。マウスからの膵島の精製を、光学顕微鏡観察下で手選により達成した。単離した膵島を、10%ウシ胎児血清、25 mMグルコース、100 U/mLペニシリン、100 μ g/mLストレプトマイシン、および50 μ g/mLゲンタマイシンを含むRPMI 1640培地中、37℃にて、5%CO₂および95%空気中で一晩維持した。翌日、単離膵島を1.0 mg/mLコラゲナーゼで10分間、37℃にて処理し、ペプチドが確実に膵島内部に到達するようにした[J Mol Endocrinol 38, 127-136. (2007)]。その後、PBSで2回洗浄した。その後、膵島をマイトジェン刺激とともに48時間インキュベートした。高グルコース濃度による刺激のため、膵島を25 mMグルコースを含むRPMI 1640培地中でインキュベートした。低グルコース濃度実験は5.5 mMグルコースを含むRPMI 1640培地を用いて行った。GLP-1による刺激のため、膵島を、5.5 mMグルコース、および1 mMのジペプチジルペプチダーゼ-4阻害剤であるジプロチンA（ペプチド研究所、大阪、日本）、ならびに100 nM GLP-1（Aviva Systems Biology, Bachem, 米国）を含むRPMI 1640培地中でインキュベートした。溶媒として水を用いた。

[0045] 統計解析

全てのデータを平均値±標準誤差で表した。2群間の相違の統計的有意性はスチューデントt検定を用いて評価した。3群以上を対象とする実験では一元配置分散分析（ANOVA）を用いた後、ボンフェローニの事後検定を行った。

[0046] 結果

リアルタイム細胞増殖レポーター系の生成

血中Gluc活性を利用してリアルタイムな細胞増殖をモニタリングするため、pGLuc Basic-1ベクター（NanoLight Technologies, 米国アリゾナ州）にKi67pを挿入した。その後、LoxP-クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ（CAT）

ーpolyAーloxP (LSL) カセットをKi67pの下流に挿入した。このCATーpolyAカセットは終止配列として機能する。これにより、Gluc発現は増殖中のCre活性化細胞 (Ki67pーLSLーGlucコンストラクト) においてのみ促進されると期待される (図1)。

[0047] Cre組換え後に増殖中の細胞が実際にGlucを発現し、培地中にそれを分泌するかどうか調べるため、まず、前記Ki67pーLSLーGlucコンストラクトをマウス肝細胞株Hepa1ー6およびマウスβ細胞株MIN6にトランスフェクトし、次いでCreを含むアデノウイルス (Creーアデノウイルス) を感染させた。Hepa1ー6およびMIN6細胞の培地中のGluc活性は著しく上昇し (図2)、これらの細胞中で産生されたGlucが培地中に分泌されたことが示された。さらに、培地中の上昇したGluc活性は、マイトマイシンCおよびラパマイシン等の抗腫瘍剤、または、CDK阻害剤であるロスコビチンでHepa1ー6細胞を処理することによって有意に減少した (図3)。これらの発見は、培地中のGluc活性がこれらの細胞の細胞増殖状態を反映するということを示している。定量的逆転写酵素PCR (qRTーPCR) 法によると、loxP隣接CAT遺伝子およびGluc遺伝子の遺伝子発現は、それぞれ有意にダウンレギュレートおよびアップレギュレートされていた (図4)。このように、Ki67pーLSLーGluc系において、培地中に分泌されるルシフェラーゼの活性を測定することにより、Cre組換え後の培養細胞株における細胞増殖状態をモニタリングすることが可能となる。

[0048] 部分的肝切除後の肝細胞増殖のin vivoリアルタイムモニタリング

次に、Ki67pーLSLーGlucコンストラクトをC57BL/6NマウスのRosa26遺伝子座にノックインした (Ki67pーLSLーGlucマウス)。これらのマウスでは、GlucはCreが機能している細胞においてのみKi67プロモーターの制御下で発現し、循環中へ分泌されと考えられた。肝臓は高度な増殖能を有する大型臓器であるため、in vivoで細胞増殖をモニタリングするための本系の利用可能性を評価する

のに理想的な臓器であると考えた。そのため、まず、アルブミン-C r e E Rマウス [Genesis 39, 167-172. (2004)] をK i 6 7 p - L S L - G l u cマウスと交配することにより、タモキシフェン誘導性肝臓特異的K i 6 7 p - G l u cマウス (i L K i 6 7 p - G l u cマウス) を生成した。P H xは肝細胞増殖を誘導するために一般的に用いられる手法である [Science 276, 60-66. (1997)]。発明者らは、P H x後のi L K i 6 7 p - G l u cマウスにおいて、i n v i v oでリアルタイムな肝細胞増殖のモニタリングを試みた。尾静脈から得た血漿20 μ Lを用いて、各時点でのルシフェラーゼ活性を分析した。血漿中のルシフェラーゼ活性は70% P H x後2日目に上昇を始め、この手術後3日目に最大の上昇が見られた (図5)。上昇したルシフェラーゼ活性は、5日目までに、偽手術 (S O) を行ったi L K i 6 7 p - G l u cマウスと比較してごくわずかに高いだけの活性にまで低下し、このわずかに高い水準がその後も維持された。重要なことには、P H x後のi L K i 6 7 p - G l u cマウスにおけるルシフェラーゼ活性の経時変化は、以前に報告されたP H x後の肝再生の経時変化と類似したものであった [Science 276, 60-66. (1997)]。S O後のi L K i 6 7 p - G l u cマウスおよびC r e陰性対照マウスの血漿におけるルシフェラーゼ活性は、実験期間全体を通して低いままであった (図5)。

[0049] 次に、生物発光解析を行った。ルシフェラーゼの基質であるセレンテラジン (C T Z) の静脈注射後、P H xを行ったi L K i 6 7 p - G l u cマウスにおいてのみ、その存在が推定される肝臓の部分で強い発光シグナルが検出された (図6)。S Oを行ったi L K i 6 7 p - G l u cマウスにおいては発光が検出されなかった。従って、血漿中ルシフェラーゼ活性の上昇は、肝臓においてG l u cの産生が強化されたことに起因すると思われる。発光は、鼻部無毛部および四肢遠位部にも検出された。これはおそらく、これらの部位で毛細血管が緻密に表在するためと考えられる。このように、K i 6 7 p - G l u c系を使用することにより、P H x後の肝細胞増殖を極めて少量の血液のサンプリングでモニタリングすることができる。まとめると、こ

これらの結果は、選択された細胞型の増殖状態の定量リアルタイム *in vivo* モニタリングに対して *Ki67p-Gluc* 系が利用できることを示している。

[0050] 妊娠中の β 細胞増殖の *in vivo* リアルタイムモニタリング

次に、*in vivo* における膵臓 β 細胞の増殖を *Ki67p-Gluc* 系を用いてモニタリングできるかどうか調べた。RIP-CreERマウス [Nature 429, 41-46. (2004)] を *Ki67p-LSL-Gluc* マウスと交配し、それによりタモキシフェン誘導性 β 細胞特異的 *Ki67p-Gluc* マウス (*i β Ki67p-Gluc* マウス) を作製した。

生理的条件下での本系の利用可能性を評価するため、妊娠中の β 細胞増殖の *in vivo* でのモニタリングを試みた。妊娠中は膵臓 β 細胞が増殖し、膵臓におけるその量が増加することがよく知られている。そこで、妊娠中の *i β Ki67p-Gluc* マウス由来の血漿試料におけるルシフェラーゼ活性を継続的に測定した。各遺伝子型について、出産した雌マウスはそれまで妊娠中であつたと定義し、未交配のマウスを対照として用いた。妊娠中の *i β Ki67p-Gluc* マウス由来の血漿におけるルシフェラーゼ活性は交配後3日目に上昇を始め、妊娠12日目 (P12) まで上昇を続けた。その後、出産まで徐々に減少した (図7)。この場合もやはり、妊娠中の *i β Ki67p-Gluc* マウスにおけるルシフェラーゼ活性は、以前報告された妊娠中の β 細胞増殖の経時変化と類似するものであつた [TEM 21, 151-158. (2010)]。これらの結果は、*Ki67p-Gluc* 系を用いることによって、非常に小さな細胞集団である β 細胞の *in vivo* におけるリアルタイムな増殖をも検出できることをはっきりと示した。このように、本系によって、非常に小さな細胞集団の増殖を *in vivo* で継続的に検出することが可能であり、それは恐らく *Gluc* の高い感度と、*Ki67p* の高い選択性および低いバックグラウンドによるものと考えられる。

[0051] *i β Ki67p-Gluc* マウスから単離された膵島を用いた β 細胞増殖の *ex vivo* モニタリング

β 細胞の量はグルコース恒常性の重要な決定因子であり、 β 細胞量を増加させることは糖尿病の治療に対して長い間待ち望まれてきた治療法である。しかし、今までのところ β 細胞量を増加させるための、臨床的に利用できる方法は無い。

K i 6 7 p - G l u c系が β 細胞栄養因子の探索に利用できるかどうか調べるため、i β K i 6 7 p - G l u cマウスから単離した膵島の培養を、高濃度のグルコース（HG）およびグルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）等のいくつかの β 細胞増殖刺激〔33-35〕とともにに行い、培地中のルシフェラーゼ活性を測定した。

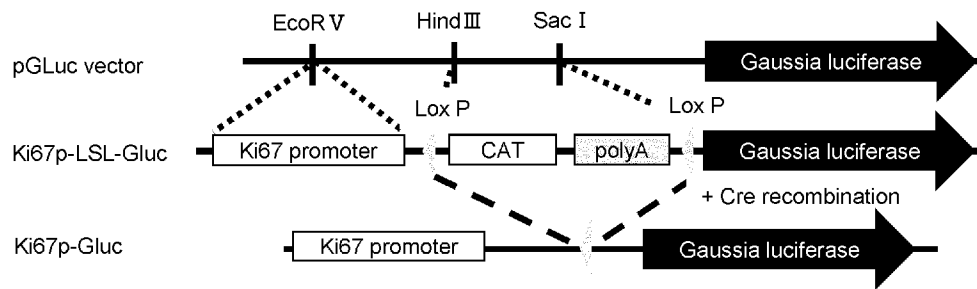
48時間のHG刺激後、培地中のルシフェラーゼ活性は有意に増加した（図8）。一方、同一の実験条件下で膵島のK i 6 7の遺伝子発現は僅かに増加したのみであり、その差異は低グルコース条件下で培養した単離膵島におけるものと比較して統計的な有意性にまで到達しなかった（図8）。また、GLP-1による48時間の刺激では、培地中のルシフェラーゼ活性が増加する傾向が見られた。一方で同様に、膵島におけるK i 6 7遺伝子発現については、いずれの同一刺激条件下でも増加が観察されなかった（図9）。これらの結果は、i β K i 6 7 p - G l u cマウスから単離した膵島を用いたex vivo K i 6 7 p - G l u c系が、遺伝子発現分析よりも高感度に β 細胞増殖促進因子の探索に利用可能であることを示している。G l u cは培地中で安定なことから、本手法によって刺激期間中の増殖状態の評価を累積的に行うことができると考えられる。刺激期間の終わりの時点の状態を反映する遺伝子発現分析とは異なり、G l u cのこのような特徴によって、極めて高い感度が達成できると考えられる。

請求の範囲

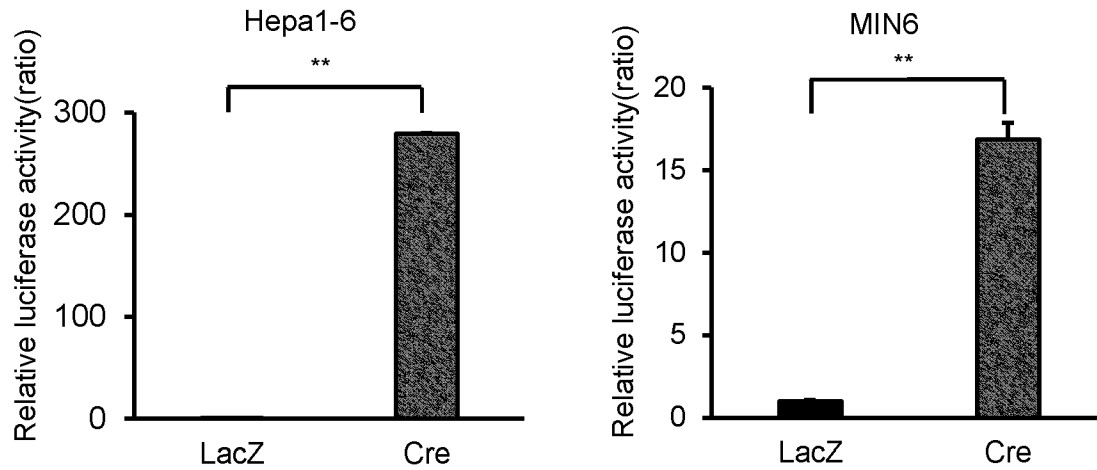
- [請求項1] (i) 細胞増殖関連遺伝子のプロモーター配列と、
(ii) 分泌型レポータータンパク質をコードする配列と、
(iii) 前記プロモーター配列と前記分泌型レポータータンパク質コード配列との間に配置された、
2つのlox配列に挟まれ、前記分泌型レポータータンパク質をコードする配列の転写を阻害する配列（レポータータンパク質転写阻害配列）と、
を含む遺伝子構築物であって、
前記レポータータンパク質転写阻害配列が2つのlox配列とともにCreリコンビナーゼによって切除されることにより、細胞増殖依存的に前記分泌型レポータータンパク質を発現させることができる、遺伝子構築物。
- [請求項2] 細胞増殖関連遺伝子がKi67である、請求項1に記載の遺伝子構築物。
- [請求項3] 分泌型レポータータンパク質がGaussialシフェラーゼである、請求項1または2に記載の遺伝子構築物。
- [請求項4] 前記レポータータンパク質転写阻害配列がマーカー遺伝子とその転写を終結させるポリA配列である、請求項1～3のいずれか一項に記載の遺伝子構築物。
- [請求項5] 請求項1～4のいずれか一項に記載の遺伝子構築物を染色体上に保持する非ヒト哺乳動物であって、Creリコンビナーゼを機能させることによって、細胞増殖依存的に前記分泌型レポータータンパク質を産生することができる、非ヒト哺乳動物。
- [請求項6] 前記遺伝子構築物は染色体上のROSA26部位に導入された、請求項5に記載の非ヒト哺乳動物。
- [請求項7] 請求項5または6に記載の非ヒト哺乳動物をCreリコンビナーゼ発現非ヒト哺乳動物と掛け合わせることによって得られた、細胞増殖依存的に前記分泌型レポータータンパク質を産生する、非ヒト哺乳動物。

- [請求項8] 前記Creリコンビナーゼ発現非ヒト哺乳動物が薬剤誘導性核移行型Creリコンビナーゼ発現非ヒト哺乳動物である、請求項7に記載の非ヒト哺乳動物。
- [請求項9] 前記Creリコンビナーゼ発現非ヒト哺乳動物が組織特異的にCreリコンビナーゼを発現する非ヒト哺乳動物であり、組織特異的に、細胞増殖に応じて前記分泌型レポータータンパク質を産生する、請求項7または8に記載の非ヒト哺乳動物。
- [請求項10] 前記組織が肝臓または脾臓である、請求項9に記載の非ヒト哺乳動物。
- [請求項11] マウスである、請求項5～10のいずれか一項に記載の非ヒト哺乳動物。
- [請求項12] 請求項5～11のいずれか一項に記載の非ヒト哺乳動物から得られた細胞。
- [請求項13] 請求項5～11のいずれか一項に記載の非ヒト哺乳動物または請求項12に記載の細胞を用いて前記分泌型レポータータンパク質を定量する工程を含む、細胞増殖の評価方法。

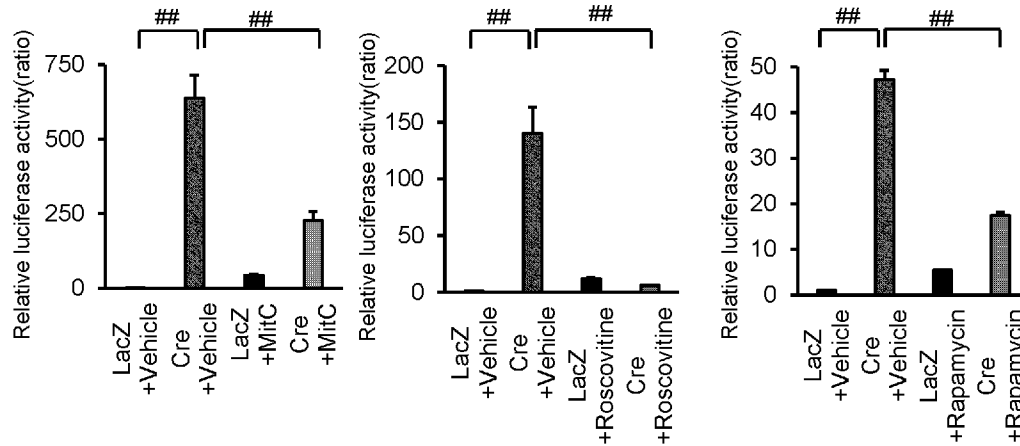
[図1]



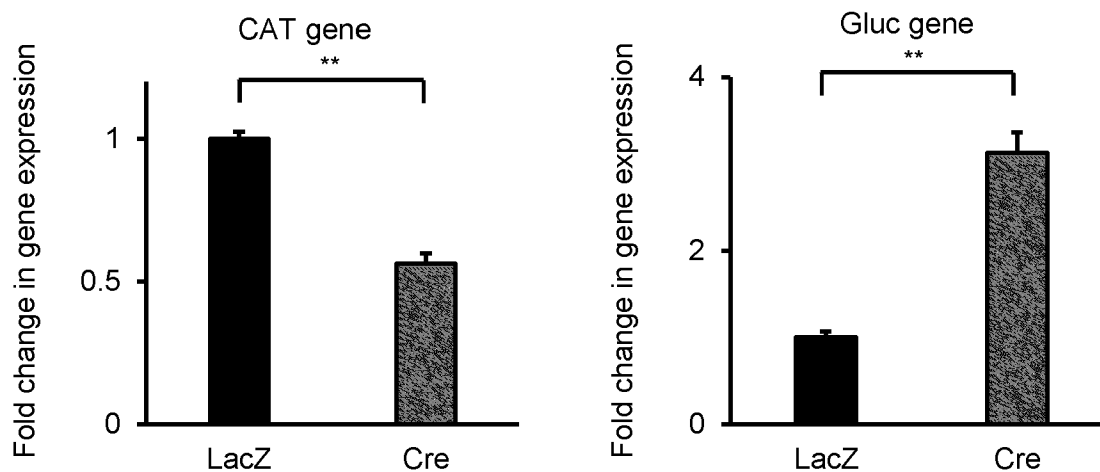
[図2]



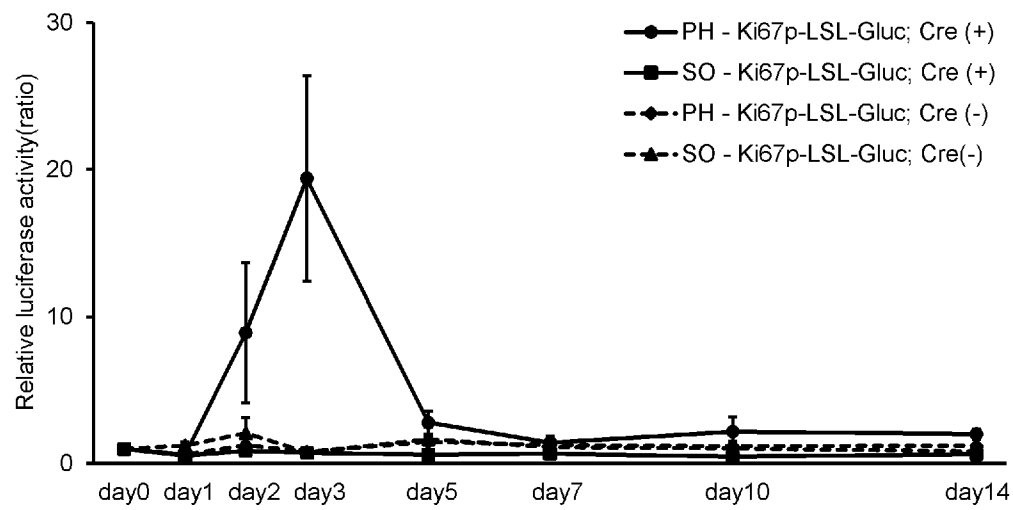
[図3]



[図4]



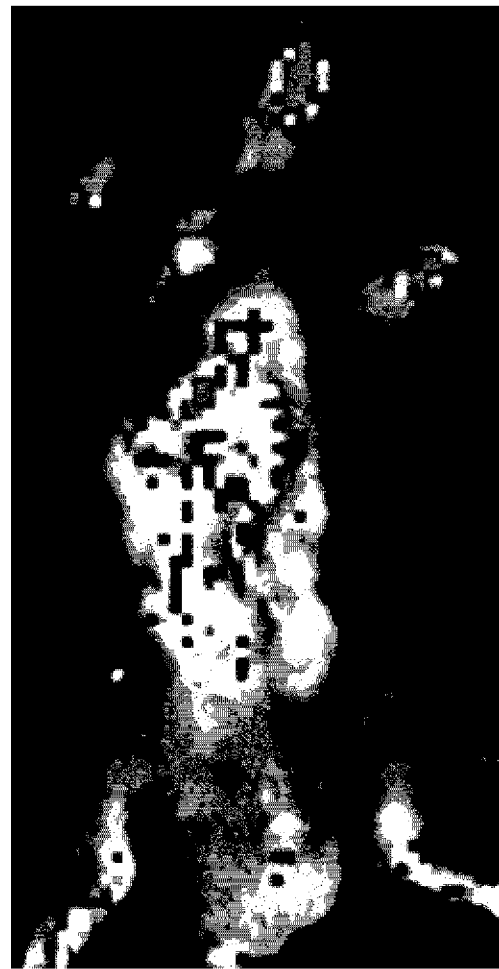
[図5]



[図6]

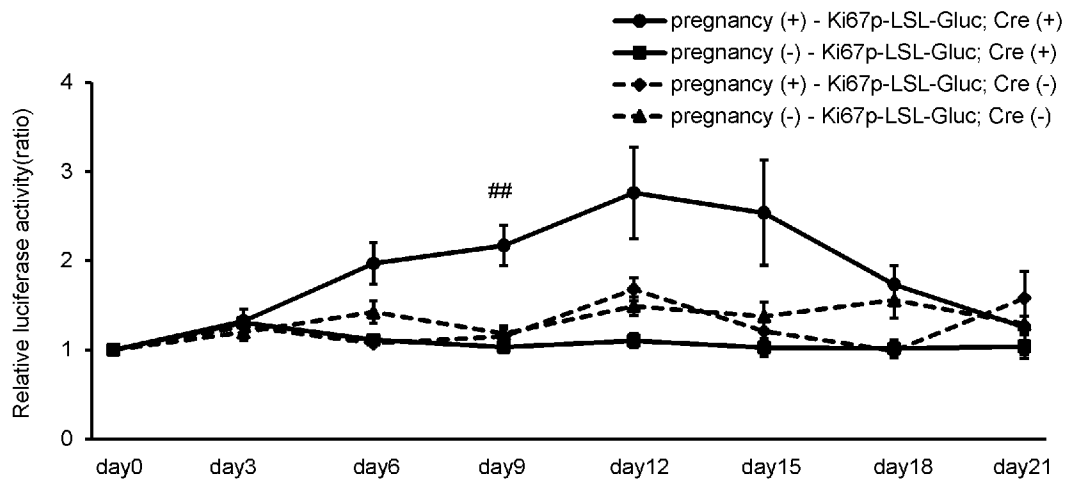


SO

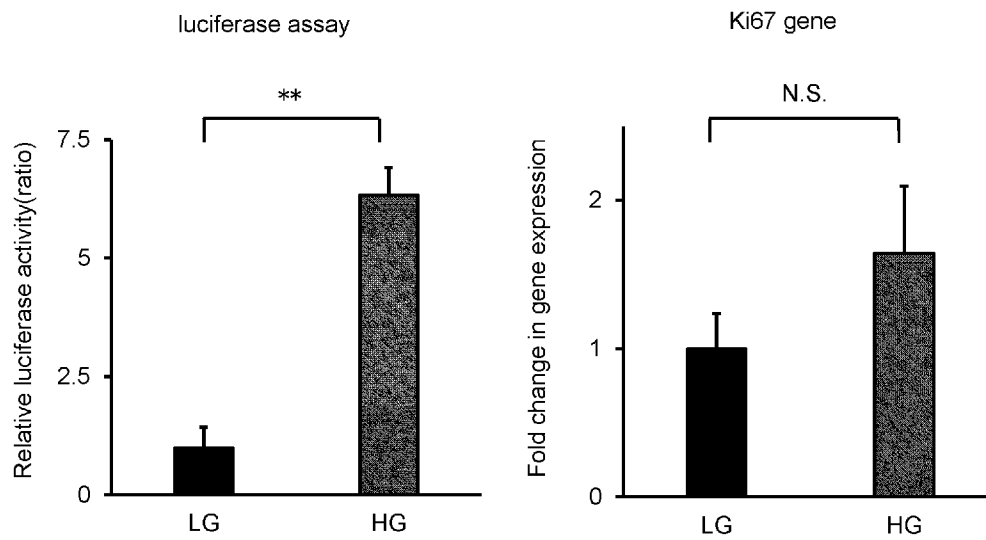


PH

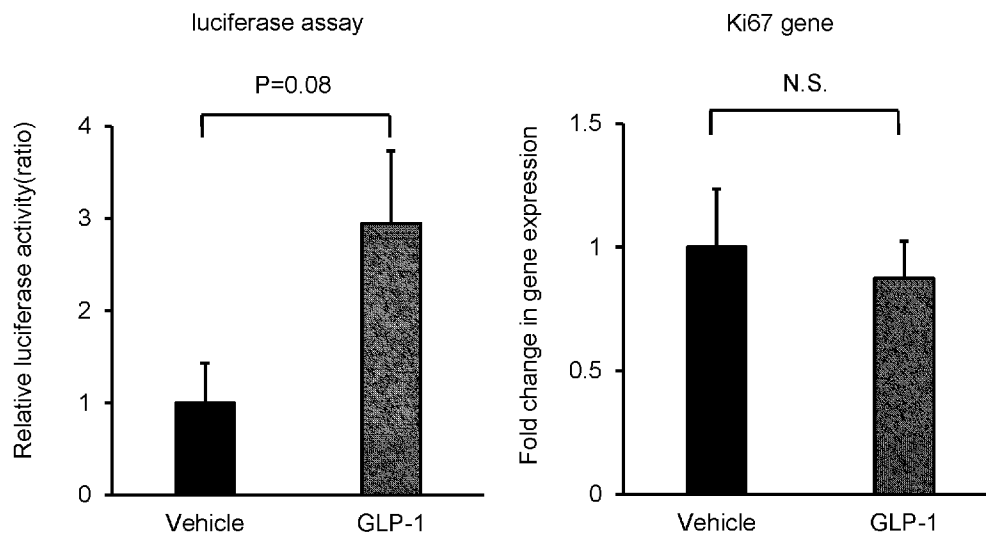
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/007082

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. C12N15/09(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, C12N5/16(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)i, C12N15/53(2006.01)i, C12Q1/02(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. C12N15/09, A01K67/027, C12N5/16, C12N9/02, C12N15/53, C12Q1/02

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), CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2008-506380 A (CXR BIOSCIENCES LIMITED) 06 March 2008, claims, paragraphs [0023], [0040]-	1, 2, 5, 11, 12
Y	[0042], [0047], examples & US 2010/0138935 A1 & EP 1769085 A1 & WO 2006/008484 A2, claims, pages 8, 12-14, examples	1-13
Y	TANNOUS BA et al., Gaussia luciferase reporter assay for monitoring biological processes in culture and in vivo, Nat. Protoc., 2009, Vol.4, pp. 582-591, abstract, Advantages of using secreted reporter assays, box 3, fig. 2, table 1	1-13
Y	ARENKIEL BR et al., Genetic control of neuronal activity in mice conditionally expressing TRPV1, Nat. Methods., 2008, vol. 5, pp. 299-302, fig. 1	1-13



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
25.04.2019

Date of mailing of the international search report
14.05.2019

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/JP2019/007082

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/006962 A1 (RHEINISCHE FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITAT BONN) 20 January 2011, pages 37-39 & US 2012/0117668 A1 & EP 2275567 A1	1-13
Y	SCHULER, M. et al., Efficient temporally controlled targeted somatic mutagenesis in hepatocytes of the mouse, <i>Genesis</i> , 2004, vol. 39, pp. 167-172, Summary	1-13
A	HARA, S. et al., Establishment of a conditional transgenic system using the 2A peptide in the female mouse germline, <i>J. Reprod. Dev.</i> , 2014, vol. 60, pp. 250-255, fig. 2	1-13
A	WURDINGER, T. et al., Asecreted luciferase for ex vivo monitoring of in vivo processes, <i>Nat. Methods.</i> , 2008, vol. 5, pp. 171-173, abstract	1-13
A	ZAMBON AC et al., Use of the Ki67 promoter to label cell cycle entry in living cells, <i>Cytometry A</i> , 2010, vol. 77, pp. 564-570, abstract	1-13
A	CN 101319215 A (ZHENG, J.) 10 December 2008, claims (Family: none)	1-13
A	EP 1336658 A1 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE DAE) 20 August 2003, examples (Family: none)	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, C12N5/16(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)i,
C12N15/53(2006.01)i, C12Q1/02(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. C12N15/09, A01K67/027, C12N5/16, C12N9/02, C12N15/53, C12Q1/02

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
日本国公開実用新案公報	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

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
X Y	JP 2008-506380 A (シーエックスアール・バイオサイエンシズ・リミテッド) 2008.03.06, 特許請求の範囲, [0023], [0040]-[0042], [0047], 実施例 & US 2010/0138935 A1 & EP 1769085 A1 & WO 2006/008484 A2, Claims, pp. 8, 12-14, Examples	1, 2, 5, 11, 12 1-13
Y	TANNOUS BA et al., Gaussia luciferase reporter assay for monitoring biological processes in culture and in vivo, Nat. Protoc., 2009, Vol.4, pp.582-591, Abstract, Advantages of using secreted reporter assays の項、Box3、Figure2、Table1	1-13

☑ 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。

* 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

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

国際調査を完了した日

25.04.2019

国際調査報告の発送日

14.05.2019

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)

西村 亜希子

4N

3435

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	ARENKIEL BR et al., Genetic control of neuronal activity in mice conditionally expressing TRPV1, Nat. Methods., 2008, Vol.5, pp.299-302, Figure1	1-13
Y	WO 2011/006962 A1 (RHEINISCHE FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITAT BONN) 2011.01.20, pp.37-39 & US 2012/0117668 A1 & EP 2275567 A1	1-13
Y	SCHULER M et al., Efficient temporally controlled targeted somatic mutagenesis in hepatocytes of the mouse, Genesis, 2004, Vol.39, pp.167-172, Summary	1-13
A	HARA S et al., Establishment of a conditional transgenic system using the 2A peptide in the female mouse germline, J. Reprod. Dev., 2014, Vol.60, pp.250-255, Fig.2	1-13
A	WURDINGER T et al., A secreted luciferase for ex vivo monitoring of in vivo processes, Nat. Methods., 2008, Vol.5, pp.171-173, Abstract	1-13
A	ZAMBON AC et al., Use of the Ki67 promoter to label cell cycle entry in living cells, Cytometry A, 2010, Vol.77, pp.564-570, Abstract	1-13
A	CN 101319215 A (ZHENG J) 2008.12.10, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-13
A	EP 1336658 A1 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE DAE) 2003.08.20, 実施例 (ファミリーなし)	1-13