(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2014-516551
(P2014-516551A)
(43)公表日　平成26年7月17日(2014.7.17)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12Q 1/04	(2006.01)	C12Q	1/04		2G045
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A	4B063
G01N 33/53	(2006.01)	C12Q	1/68		
G01N 33/536	(2006.01)	G01N	33/53	Y	
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/536	D	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 42 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2014-513725 (P2014-513725)
(86)(22)出願日　平成24年6月1日 (2012.6.1)
(85)翻訳文提出日　平成26年1月8日 (2014.1.8)
(86)国際出願番号　PCT/US2012/040361
(87)国際公開番号　WO2012/167011
(87)国際公開日　平成24年12月6日 (2012.12.6)
(31)優先権主張番号　61/492,738
(32)優先日　平成23年6月2日 (2011.6.2)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　596060697
マサチューセッツ　インスティテュート　オブ　テクノロジー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９ケンブリッジ，マサチューセッツ・アヴェニュー・７７
(71)出願人　302051223
タフツ　ユニバーシティー
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　メドフォード　バロウ　ホール　（番地なし）
(74)代理人　100095832
弁理士　細田　芳徳

最終頁に続く

(54)【発明の名称】メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞のｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドゲノム複製中間体

(57)【要約】
本発明は、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を同定する方法のほか、中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムを検出することにより、そうした細胞の増殖、遊走、複製および／または生存を選択的に調節する作用物質を同定する方法を提供する。さらに、アテローム性動脈硬化症、再狭窄および良性または悪性腫瘍などの障害の診断方法、予後診断方法および処置方法も提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を同定する方法であって、
ａ）　サンプル中の細胞の核を可視化するステップであって、前記サンプルは、約５０ミクロンまでの最大直径を有する核の核構造の完全性を実質的に維持する方法により調製されるステップと、
ｂ）　前記サンプルにおいて中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムを含む細胞を同定するステップと
を含み、
それによりメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を同定する方法。
【請求項２】
前記メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞は動物幹細胞である、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
ｃ）ステップｂ）で同定された前記細胞を数えることをさらに含む、請求項１または請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞は胎児（胎仔）幹細胞、幼若幹細胞、成熟幹細胞または腫瘍幹細胞から選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
前記動物は哺乳動物、たとえばヒトである、請求項２に記載の方法。
【請求項６】
前記サンプルは単離された組織生検サンプルまたは細胞培養サンプルである、請求項３に記載の方法。
【請求項７】
前記可視化はｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖に特異的な検出可能に標識した抗体と前記細胞を接触させた結果である、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
前記標識は蛍光標識である、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記可視化は一本鎖核酸と二本鎖核酸とを識別する色素と前記細胞を接触させた結果である、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
前記色素はアクリジンオレンジであり、前記細胞は可視化の前にＲＮＡｓｅで処理される、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記サンプルは前記核の可視化の前にＲＮＡｓｅで処理される、請求項１または９に記載の方法。
【請求項１２】
前記可視化はｓｓＤＮＡに特異的な検出可能に標識した抗体と前記細胞を接触させた結果である、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記標識は蛍光標識である、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記サンプルは腫瘍、創傷治癒傷害またはアテローム硬化病変を含む疑いがある組織由来の組織生検標本であり、前記創傷治癒傷害は任意に再狭窄病変であってもよい、請求項６に記載の方法。
【請求項１５】
メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の増殖、遊走、複製または生存を調節する作用物質を同定する方法であって、

ａ）　サンプル中の細胞において中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムを含む核の存在および／または数および／または分布を判定することであって、前記サンプルは、中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムを含むメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を含み、かつ、候補作用物質が前記核と相互作用するのに好適な条件下で前記作用物質との接触が維持されていたものであり、前記サンプルは約５０ミクロンまでの最大直径を有する核の完全性を実質的に維持する方法により調製されたものであることと、
ｂ）　前記候補作用物質と接触した前記細胞における中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムを含む核の存在および／または数を、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を含むが、前記候補作用物質と接触していない対照細胞における中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムを含む核の存在および／または数と比較することと
を含み、
前記候補作用物質と接触させていない前記対照細胞と比較した、前記候補作用物質と接触した前記細胞における中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムを含む核の数および／または分布の変化から、前記作用物質の有効性が示唆される方法。
【請求項１６】
前記細胞は培養液中で前記候補作用物質と接触する、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記細胞は動物細胞である、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記動物細胞はインビボで前記候補作用物質と接触する、請求項１５に記載の方法。
【請求項１９】
前記動物細胞は異種移植充実性腫瘍から採取された哺乳動物細胞である、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記可視化はｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖に特異的な抗体と前記細胞を接触させた結果である、請求項１５に記載の方法。
【請求項２１】
前記抗体は蛍光標識される、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
前記可視化は一本鎖核酸と二本鎖核酸とを識別する色素と前記細胞を接触させた結果である、請求項１５に記載の方法。
【請求項２３】
前記色素はアクリジンオレンジであり、前記細胞は可視化の前にＲＮＡｓｅで処理される、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記サンプルは前記核の可視化の前にＲＮＡｓｅで処理される請求項１５または２２に記載の方法。
【請求項２５】
前記可視化はＲＮＡｓｅ処理後にｓｓＤＮＡに特異的な抗体と前記細胞を接触させた結果である、請求項１５に記載の方法。
【請求項２６】
前記抗体は蛍光標識される、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
前記候補作用物質は、ＤＮＡポリメラーゼβ、ＤＮＡポリメラーゼζまたはＲＮＡｓｅＨ１から選択される分子を含む複製複合体を標的とする、請求項１５に記載の方法。
【請求項２８】
前記候補作用物質は、ＤＮＡポリメラーゼβ、ＤＮＡポリメラーゼζまたはＲＮＡｓｅＨ１と中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムとの結合を破壊する、または、ＤＮＡポリメラーゼβを介したもしくはＤＮＡポリメラーゼζを介した、前記中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムからのＤＮＡ複製、またはＲＮＡｓｅ　Ｈ１を介した、前記中間体ｄ

ｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムからのＲＮＡの除去を妨げる、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
前記候補作用物質と接触した前記細胞においてメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂を行っている釣鐘型の核の数の増加が検出される、請求項１５に記載の方法。
【請求項３０】
前記候補作用物質と接触した前記細胞においてメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂を行っている釣鐘型の核の数の減少が検出される、請求項１５に記載の方法。
【請求項３１】
メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞複製と関連する巨大分子を同定する方法であって、中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムを含むメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞において候補巨大分子を検出することを含み、前記候補巨大分子と前記中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムとの共局在から、前記巨大分子がメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の複製と関連していることが示される方法。
【請求項３２】
前記候補巨大分子は検出可能に標識した抗体を用いて検出される、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
前記メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞は動物幹細胞である、請求項３１に記載の方法。
【請求項３４】
前記メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞は植物幹細胞である、請求項１、１５または３１に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本出願は、２０１１年６月２日に出願された米国仮特許出願第６１／４９２，７３８号明細書の利益を主張する。上記の出願の教示内容は、本明細書に援用する。
【背景技術】
【０００２】
科学者らは、妊娠第２期の胎児の細胞および組織に腫瘍細胞および病理組織構造（腺癌など）が類似していることを長い間認識してきた（Ｃｏｈｎｈｅｉｍ，１８７６）。悪性腫瘍は、初期胎児（胎仔）と同様の速度で増殖し、胎児（胎仔）組織のように、組織学的には間葉系（局所的に組織化されていない）あるいは上皮系（局所的に組織化された）のニッチを含む。胎児（胎仔）幹細胞および癌幹細胞は、数が増加し、器官または腫瘍塊内の非常に不均一なニッチに存在する分化した様々な細胞型を生み出すと予想された。したがって、胎児（胎仔）幹細胞および癌幹細胞はどちらも、対称分裂して２つの幹細胞を生み出し、非対称分裂して幹細胞と分化した非幹細胞とを生み出すと予想された。幹細胞の対称分裂によって器官または腫瘍の正味の成長が起こる一方、非対称分裂によってそれ自体が分裂し、器官または腫瘍の細胞の大部分を生み出す移行細胞を作ると考えられる。同様に静脈におけるアテローム性動脈硬化症などの非癌性過剰増殖性障害、または手術後の再狭窄などの創傷治癒障害も、幹細胞の対称および非対称分裂による幹細胞集団の異常な増殖により引き起こされる可能性がある。癌および他の過剰増殖性疾患の効果的な処置には、これらの障害の根底にある幹細胞の増殖、遊走、複製または生存の選択的な調節を対象とする新規な治療剤が必要とされると考えられることが一般に認められていた。したがって、これらの障害の根底にある幹細胞を同定する手段と、前記幹細胞に特有の分子の標的分子および生化学的経路を同定する手段と、それらを殺すかまたはそれらが患者におい

て増殖しないようにする作用物質を同定する手段とが求められている。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００３】
本発明は特に、幹細胞、特に過剰増殖性の創傷治癒障害または腫瘍障害の根底にあるメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を同定する方法のほか、前記病的幹細胞に特有の分子の標的分子および生化学的経路を同定する方法、ならびにそうした細胞を殺すあるいはそれらが増殖、遊走もしくは生存しないようにする作用物質を同定する方法を提供する。本発明は１つには、ヒト胎児／小児成長のほか、非癌性過剰増殖の創傷治癒障害および腫瘍障害を誘導する幹細胞系統（本明細書でメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｅ）と呼ぶ）では、核ＤＮＡ鎖の分離および複製の予想外の様式が、植物、動物または細菌の細胞型の他の既知のどの型でも使用されないが、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｅ）に特徴的であるという、出願人らによる発見に基づく。この新規な形態の核ゲノムの複製は、複製中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッド（ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡヘリックス二重鎖、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡヘリックスまたは単にｄｓＲＮＡ／ＤＮＡとも呼ぶ）ゲノムの形成を含む。この知見は、核ＤＮＡ合成が、半染色分体の長さのＤＮＡを繰り返しコピーし、その後二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ／ＤＮＡ）形態の有糸分裂で染色分体が凝縮および分離しながら進行するヒト真核非幹細胞分裂のこれまでの知見とは異なる。一方、真核非幹細胞のヒト細胞ミトコンドリアＤＮＡの一部または全部がｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ中間体により合成されるという証拠が示されてきた。文献には、核ゲノムの複製および／または分離の任意の形態におけるｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドゲノムに関する具体的な言及または示唆はない。
【０００４】
したがって、一態様では、本発明は、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞、特に核の複製および分離を行っているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を同定する方法を提供する。本方法は、サンプル中、たとえば、組織サンプルもしくは腫瘍サンプルまたは細胞培養物中の細胞の核を可視化するステップを含み、サンプルは、約５０ミクロンまでの最大直径を有する核の中空で釣鐘型のメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）核構造の完全性を実質的に維持する方法により調製され、さらに、その後サンプル中でその釣鐘型の核によりメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｅ）を同定するステップ、および／または、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂を行っている（すなわち、中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムに関連する）メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞を認識するステップを含む。ある種の実施形態では、本方法は、同定された細胞を数えるステップをさらに含んでもよい。ある種の実施形態では、本方法は、同定された細胞を単離するステップをさらに含んでもよい。他の実施形態では、本方法は、中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムと共局在する巨大分子を同定することをさらに含む。
【０００５】
特定の実施形態では、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞は、哺乳動物幹細胞、たとえば、ヒト細胞である。ある種の実施形態では、細胞は、胎児（胎仔）幹細胞、幼若幹細胞、成熟幹細胞および／もしくは腫瘍幹細胞、ならびに／またはアテローム性動脈硬化症、静脈硬化症、手術後の再狭窄のような過剰増殖性の病理学的病変の幹細胞であってもよい
【０００６】
本発明の方法により同定される細胞は、組織から単離されたサンプル中、腫瘍生検標本中、またはアテローム性動脈硬化症、静脈硬化症、手術後の再狭窄のような他の過剰増殖性の病理学的病変部中、または細胞培養サンプル中の細胞であってもよい。特定の実施形態では、細胞を培養し、培養物を照射するかまたは他の方法で処理してから核を可視化する。より詳細な実施形態では、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の観察の前に、培養細胞を処理して大部分の真核非幹細胞を優先的に殺し、観察から除外する

。こうした処理の例として、４００ｒａｄより大きい線量でのｘ線照射、または真核非幹細胞の死を引き起こすが、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞の死を引き起こす程度が著しく低いことが分かっている濃度での化学薬品（たとえば、５－フルオロウラシル、メトトレキサート、コルヒチン）への曝露が挙げられる。

【０００７】

他の実施形態では、細胞は、腫瘍、創傷治癒傷害（たとえば、再狭窄病変）、アテローム硬化病変または静脈硬化病変を含む疑いがある組織由来の組織生検標本の細胞である。

【０００８】

ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドゲノムを利用するゲノムの複製および分離を行っているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の核は、種々の手段により可視化することができ、特定の実施形態では、可視化は、サンプルの細胞を、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖に特異的な検出可能に標識した抗体と接触させた結果であってもよい。より詳細な実施形態では、抗体は蛍光標識される。他の実施形態では、細胞は、間接免疫蛍光法により、たとえば、検出可能に標識した二次抗体に特異的な抗体と細胞を接触させてから、検出可能に標識した二次抗体を用いて一次抗体を検出することにより可視化する。

【０００９】

他の実施形態では、核は、一本鎖核酸と二本鎖核酸とを識別する色素、たとえば、アクリジンオレンジなどと細胞を接触させた結果として可視化される。より詳細な実施形態では、核の核酸量を可視化する前にサンプル中の細胞を、たとえば、ＲＮＡｓｅ処理により処理してＲＮＡを除去する。他の特定の実施形態では、核の可視化は、ＲＮＡの除去処理後に、ｓｓＤＮＡに特異的な検出可能に標識した抗体、たとえばｓｓＤＮＡに特異的な蛍光標識抗体と細胞を接触させた結果である。同様にｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ中間体を含む細胞も、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡに特異的に結合し、かつ蛍光剤にコンジュゲートされている作用物質、たとえば、アクチノマイシンＤにより検出することができる。

【００１０】

別の実施形態では、ｄｓＤＮＡに結合すると鮮やかな蛍光を発するが、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡのみを含む核では蛍光を発しない色素、たとえばＤＡＰＩ（４’，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール）およびまたはＨｏｅｃｈｓｔ３３２５８の蛍光の非存在または顕著な減少により、大量（１～２４ピコグラム）のｄｓＲＮＡ／ＤＮＡを含む核を認識する。ここで、「Ｈｏｅｃｈｓｔ陰性」核は、骨髄または腫瘍に由来する細胞の混合物から単離されてきたこと、そして前記単離物は、移植実験において造血幹細胞または腫瘍幹細胞に「富んでいる」と報告されてきたことに留意されたい。一方、Ｈｏｅｃｈｓｔ陰性核を含む単一の細胞が中空の釣鐘型核などの幹細胞の特性を有することは報告されたことがなく、「Ｈｏｅｃｈｓｔ陰性」状態がこれまで、ゲノム複製および／または分離を行っている細胞と関連付けられたこともなければ、この状態が、大量のｄｓＲＮＡ／ＤＮＡを含む細胞核と関連付けられたこともない。

【００１１】

別の態様では、本発明は、ゲノムの複製および分離を行っているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞に特有の巨大分子および／または生化学的経路を同定する方法を提供する。こうした巨大分子または経路の生物学的機能（単数または複数）を阻害すると、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の増殖、遊走、複製および／または生存が阻害されると予想され得る。こうした方法は、中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムを含む細胞を同定するステップ、および候補巨大分子を（直接的または間接的に）検出するステップを含み、候補巨大分子と中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムとの共局在から、巨大分子がメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞複製と関連していることが示される。ある種の実施形態では、候補巨大分子は、検出可能に標識した抗体を用いて検出される。いくつかの実施形態では、その時点で大量のｄｓＲＮＡ／ＤＮＡを含むことが知られており、無糸分裂を行っているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）核について、たとえば、顕微鏡下で特定の巨大分子または生化学的経路が存在するかどうか調査する。特定の巨大分子の可視化は、ヒトゲノムによりコードされた

任意の遺伝子産物に特異的な検出可能に標識した抗体と、サンプルの細胞を接触させた結果であってもよい。より詳細な実施形態では、抗体は蛍光標識される。他の実施形態では、細胞は、間接免疫蛍光法により、たとえば、検出可能に標識した二次抗体に特異的な抗体と細胞を接触させてから、検出可能に標識した二次抗体を用いて一次抗体を検出することにより可視化する。これらの特定の実施形態の例として、出願人らは、各々大量に見出され（１核当たり≧１００，０００分子）、ゲノムの複製および分離を行っているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）核には共局在するが、間期メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）核または任意の真核細胞核では検出されない、自ら発見した３つの特定の巨大分子：ＤＮＡポリメラーゼβ、ＤＮＡポリメラーゼζおよびＲＮＡｓｅ　Ｈ１を提供する。出願人らにより、これらおよび他の巨大分子は、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の無糸分裂により別々の核に分離した後、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡをｄｓＤＮＡ／ＤＮＡの形に変換する生化学的経路の不可欠な部分であるとの仮説が立てられきた。

【００１２】

別の実施形態では、酵素などの特定の巨大分子の存在は、大量のｄｓＲＮＡ／ＤＮＡを含む無糸分裂の際にメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）核を含む細胞内の着色もしくは蛍光酵素基質または着色もしくは蛍光酵素生成物の形成または破壊を可視化することにより検出することができる。

【００１３】

別の実施形態では、特定のＲＮＡ配列、たとえばｍＲＮＡ、ｉＲＮＡなどの特定の巨大分子の存在は、所望の各ＲＮＡ配列に特異的な標識プローブとのハイブリダイゼーションにより検出することができる。あるいは、ＲＮＡ配列は、ｉｎ　ｓｉｔｕ　ＰＣＲなどの方法により検出してもよい。

【００１４】

これらおよび類似の技術の当業者であれば、科学文献に提供される方法または通常の実験から考案された方法を適合させて、こうした免疫学的または化学的アッセイを容易に応用することができる。

【００１５】

これらの方法は、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂を行っている釣鐘型の核を持つメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を含む細胞を候補作用物質と接触させるステップ、およびサンプル中の細胞の核を可視化するステップを含み、サンプルは、約５０ミクロンまでの最大直径を有する核の核構造の完全性を実質的に維持する方法により調製され、さらに、細胞においてメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂を行っている釣鐘型の核の存在および／または数を判定するステップを含む。候補作用物質と接触した細胞においてメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂を行っている釣鐘型の核の存在および／または数を、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を含むが、候補作用物質と接触させていない対照細胞においてメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂を行っている釣鐘型の核の存在および／または数と比較することにより、当業者は、たとえば、候補作用物質と接触させていない対照細胞と比較して、候補作用物質と接触した細胞において中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムと関連する無糸分裂を行っている釣鐘型の核の数の変化を検出することにより、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞において中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムと関連する無糸分裂を調節し、それによりメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の増殖、遊走、複製または生存を調節する作用物質を同定することができる。様々な用途において、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の増殖、遊走、複製または生存の増加または減少は、望ましい場合がある。

【００１６】

別の態様では、本発明は、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の増殖、遊走、複製、および／または生存を阻害する作用物質を同定する方法を提供する。さらに詳しくは、本発明は、作用物質が、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞

が幹細胞系統を含む病的増殖における細胞数の増加に必要な無糸分裂のプロセスに干渉するかどうかを発見する方法を提供する。こうした方法は、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂を行っている釣鐘型の核を持つメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を含む細胞を候補作用物質と接触させるステップ、およびサンプル中の細胞の核を可視化するステップを含み、サンプルは、約５０ミクロンまでの最大直径を有する核の核構造の完全性を実質的に維持する方法により調製され、さらに、細胞においてメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂を行っている釣鐘型の核の存在および／または数を判定するステップを含む。候補作用物質と接触した細胞においてメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂を行っている釣鐘型の核の存在および／または数を、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を含むが、候補作用物質と接触させていない対照細胞においてメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂を行っている釣鐘型の核の存在および／または数と比較することにより、当業者は、たとえば、候補作用物質と接触させていない対照細胞と比較して、候補作用物質と接触した細胞において中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムと関連する無糸分裂を行っている釣鐘型の核の数の変化を検出することにより、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞において中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムと関連する無糸分裂を調節し、それによりメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の増殖、遊走、複製または生存を調節する作用物質を同定することができる。より詳細には、ゲノムの複製中間体としてｄｓＲＮＡ／ＤＮＡを利用して無糸分裂を行っているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）核の数は、大量のｄｓＲＮＡ／ＤＮＡを含む核を検出するための上掲の任意の手段により検出し、数えることができる。たとえば大量のｄｓＲＮＡ／ＤＮＡを含むメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）核の数は、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡの免疫蛍光アッセイ、ＲＮＡｓｅ処理した調製物の核の鮮やかなオレンジ色の蛍光、またはＤＡＰＩまたはＨｏｅｃｈｓｔ３３２５８などの色素で処理した調製物中の核の蛍光の非存在または顕著な減少により検出することができる。より詳細な実施形態では、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドゲノムの形成過程にある、または分離した姉妹核においてｄｓＲＮＡ／ＤＮＡのｄｓＤＮＡ／ＤＮＡの形への変換過程にあるメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）核は、ｄｓＤＮＡ／ＤＮＡおよびｄｓＲＮＡ／ＤＮＡの両方を同時に可視化することにより、たとえば、固定組織または細胞を、ｄｓＤＮＡ／ＤＮＡにはＤＡＰＩで、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡには特異的な蛍光抗体で同時に染色することにより、抗体に付着または結合した前記蛍光標識がＤＡＰＩの青色蛍光と区別できる波長で蛍光を発することから、検出することができる。

【００１７】

ある種の実施形態では、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の観察の前に培養細胞を処理して大部分の真核非幹細胞を優先的に殺し、観察から除外する。こうした処理の例として、４００ｒａｄより大きい線量でのｘ線照射、または真核非幹細胞の死を引き起こすが、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞の死を引き起こす程度が著しく低いことが分かっている濃度での化学薬品（たとえば５－フルオロウラシル、メトトレキサート、コルヒチン）への曝露が挙げられる。

【００１８】

いくつかの実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞である。より詳細な実施形態では、哺乳動物細胞は、インビボで候補作用物質と接触させ、さらにより詳細な実施形態では、哺乳動物細胞は、異種移植充実性腫瘍から採取される。

【００１９】

核は、インビボスクリーニング法およびインビトロスクリーニング法のどちらでも、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｅ）を同定する上述の方法のいずれかまたは本出願に開示された任意の他の方法により、可視化することができる。

【００２０】

本発明により提供されるスクリーニング法は、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の増殖、遊走、複製または生存を調節する種々の作用物質を同定することが

できる。いくつかの実施形態では、候補作用物質は、ＤＮＡポリメラーゼβ、ＤＮＡポリメラーゼζおよび／またはＲＮＡｓｅ　Ｈ１から選択される分子を含む複製複合体を標的とする。より詳細な実施形態では、候補作用物質は、ＤＮＡポリメラーゼβ、ＤＮＡポリメラーゼζまたはＲＮＡｓｅ　Ｈ１と中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムとの結合を破壊する、あるいは、ＤＮＡポリメラーゼβを介したおよび／もしくはＤＮＡポリメラーゼζを介した、中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムからのＤＮＡ複製、ならびに／または、ＲＮＡｓｅ　Ｈ１を介した、中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムからのＲＮＡの除去を妨げる。本発明により提供されるスクリーニング法は、種々の方法でメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｅ）の増殖、遊走、複製および／または生存を調節する作用物質を同定する。いくつかの実施形態では、候補作用物質と接触した細胞においてメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂を行っている釣鐘型の核の数の増加が検出される。たとえば、作用物質は複製の完了を阻害して複製中間体を蓄積させるか、あるいは、作用物質は、複製を行っているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の数の増加を刺激する。他の実施形態では、候補作用物質と接触した細胞においてメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂を行っている釣鐘型の核の数の減少が検出される。たとえば、作用物質は、複製の開始を阻害する、あるいは、複製中間体の排除につながる異常な複製を誘発する。他の実施形態、たとえば、手術後の再狭窄などの創傷治癒状態または起炎状態では、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂を行っている遊走性メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の数を調節する作用物質を同定する。たとえば、作用物質は、遊走性メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の数を増加または減少させる。

【００２１】

別の態様では、本発明は、哺乳動物被検体、たとえば、ヒトの障害を処置する方法を提供する。こうした方法は、被検体のメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の増殖、遊走、複製または生存を調節する作用物質と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、作用物質は、ＤＮＡポリメラーゼβ、ＤＮＡポリメラーゼζおよび／またはＲＮＡｓｅ　Ｈ１から選択される分子を含む複製複合体を阻害する。典型的には、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞は、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂を行っている釣鐘型の核を含む。より詳細な実施形態では、作用物質は、ＤＮＡポリメラーゼβ、ＤＮＡポリメラーゼζ、および／またはＲＮＡｓｅ　Ｈ１と中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムとの結合を阻害する化学薬品である。

【００２２】

いくつかの実施形態では、作用物質は、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖結合部分を含む。より詳細な実施形態では、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖結合部分は、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖に特異的なモノクローナル抗体またはそのフラグメントである。他のより詳細な実施形態では、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖結合部分は、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖に特異的なポリクローナル抗体またはそのフラグメントである。特定の実施形態では、本発明により提供される方法に使用される抗体またはそのフラグメントは、ポリ（Ａ）／ポリ（ｄＴ）、ポリ（ｄＣ）／ポリ（Ｉ）、およびφＸ１７４　ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドから選択される少なくとも１つの免疫原に結合することができる。

【００２３】

いくつかの実施形態では、本発明により提供される処置方法に使用される作用物質は、第２の部分を含む。より詳細な実施形態では、第２の部分は、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖を分解または化学修飾する。いくつかの実施形態では、第２の部分は放射性である。

【００２４】

特定の実施形態では、本発明により提供される方法で処置される障害は、腫瘍または病変を含み、病変は、創傷治癒障害または非癌性過剰増殖性障害である。より詳細な実施形態では、病変はアテローム硬化病変または静脈硬化病変である。他の実施形態では、病変は、再狭窄病変などの創傷治癒障害と関連している。本発明により提供される方法で処置

される障害として、単クローン性障害（単一の異常なメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞により引き起こされる）および多クローン性障害（２種以上の異常なメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞により引き起こされる）の両方を挙げることができる。

【００２５】

別の態様では、本発明は、無糸分裂で分離されるｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ複製（ｒｅｐｌｉｃａｔｉｎｇ）中間体をメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞が利用することを出願人らが教示する、哺乳動物被検体の腫瘍、非癌性過剰増殖性障害または創傷治癒障害を診断する方法を提供する。こうした方法は、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂を行っている釣鐘型の核を持つメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を含む細胞を候補作用物質と接触させるステップ、およびサンプル中の細胞の核を可視化するステップを含み、サンプルは、約５０ミクロンまでの最大直径を有する核の核構造の完全性を実質的に維持する方法により調製され、さらに、細胞においてメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂を行っている釣鐘型の核の存在および／または数を判定するステップを含む。当業者は、外科的切除サンプルまたは生検標本において中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムを含む核を同定することができる。より詳細には、ゲノムの複製中間体としてｄｓＲＮＡ／ＤＮＡを利用して無糸分裂を行っているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）核の数を検出し、数えることができる。たとえば、大量のｄｓＲＮＡ／ＤＮＡを含むメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）核の数は、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡの免疫蛍光アッセイ、ＲＮＡｓｅ処理調製物中のアクリジンオレンジ処理した核の鮮やかなオレンジ色の蛍光、またはＤＡＰＩまたはＨｏｅｃｈｓｔ３３２５８などの色素で処理した調製物中の核の蛍光の非存在または顕著な減少により検出することができる。より詳細な実施形態では、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドゲノムの形成過程にある、または分離した姉妹核においてｄｓＲＮＡ／ＤＮＡのｄｓＤＮＡ／ＤＮＡの形への変換過程にあるメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）核は、ｄｓＤＮＡ／ＤＮＡおよびｄｓＲＮＡ／ＤＮＡの両方を同時に可視化することにより、たとえば固定組織または細胞を、ｄｓＤＮＡ／ＤＮＡにはＤＡＰＩで、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡには特異的な蛍光抗体で同時に染色することにより、抗体に付着または結合した前記蛍光標識がＤＡＰＩの青色蛍光と区別できる波長で蛍光を発することから、検出することができる。大量のｄｓＲＮＡ／ＤＮＡを含む前記核の存在は、癌性病変もしくは前癌病変、または病的な過剰増殖性障害、たとえばアテローム性動脈硬化症もしくは静脈硬化症、または創傷治癒障害、たとえば手術後の再狭窄の診断指標となる。

【００２６】

より詳細な実施形態では、こうした方法の判定ステップは、サンプルにおいてｄｓＲＮＡ／ＤＮＡゲノムの複製中間体を利用するメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂を行っているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の数および／または分布を判定することを含む。ある種の実施形態では、本方法は、被検体（たとえば、ヒト）の予後を診断するステップをさらに含んでもよく、サンプル中のメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂を行っている細胞の数および／または分布から、腫瘍、非癌性過剰増殖性障害または創傷治癒障害の予後が良好、中等度または不良であること、たとえば、前立腺の外科生検から、無秩序な過剰増殖の状態ではなく初期の悪性腫瘍になると疑われることが示される。より詳細な実施形態では、本方法は、被検体に好適な予防を施すステップをさらに含んでもよい。たとえば、被検体に腫瘍が存在する際、被検体は、手術のほか、アジュバント療法、たとえば化学療法を受けてもよい。特定の実施形態では、被検体は、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の増殖、遊走、複製または生存を調節する、本明細書に開示されたような作用物質の投与を受けても、および／または、本明細書に開示された治療方法のいずれかの処置を受けてもよい。より詳細には、投与される作用物質は、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドゲノムの形成および分離の阻害剤でも、あるいはｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ阻害剤を間期ｄｓＤＮＡ／ＤＮＡゲノム形態に変換するプロセスの阻害剤でもよい。なおより詳細には、作用物質は、出願人らに

より発見された酵素、ＤＮＡポリメラーゼβ、ＤＮＡポリメラーゼζまたはＲＮＡｓｅＨ１など、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドゲノムと物理的に結合することが判明した酵素のいずれかの機能を阻害してもよい。

【００２７】

本特許ファイルまたは出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも１つの図面を含んでいる。カラー図面（単数または複数）による本特許または特許出願公開の写しは、請求に応じて、必要な手数料が支払われた場合に、米国特許商標庁により提供される。

【図面の簡単な説明】

【００２８】

【図１】図１は、ヒト胎児結腸メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞（５～７週）の対称無糸分裂を示す顕微鏡写真である。これは、ヒトの器官形成、発癌および病原性血管病変に使用される対称無糸分裂の一般的な型の１つ「カップ積層型」を示す。Ｇｏｓｔｊｅｖａ ｅｔ ａｌ．，２００６，２００９。

【図２】図２は、胎児（胎仔）結腸メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の非対称無糸分裂を示す顕微鏡写真である。（５～７週）。非対称分裂は、幹細胞の本質的な性質である。Ｇｏｓｔｊｅｖａ ｅｔ ａｌ．，２００６，２００９。

【図３】胎児（胎仔）器官（５～９週）のメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の対称無糸分裂中または対称無糸分裂後のＤＮＡ量の定量フォイルゲンサイトメトリーを示す（上図、紫色；下のグラフに定量）。データから、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂中および無糸分裂後すぐにＤＮＡが倍増する（ｙ軸に示すように１ｘから２ｘに増加する）ことが立証されたが、ゲノムの中間体形態の生化学的性質は、明らかにならなかった。Ｇｏｓｔｊｅｖａ ｅｔ ａｌ．，２００９。釣鐘の口で凝縮したＤＮＡの２つの環が最初にＤＮＡの倍加を示すことに留意されたい。これらの画像から、ゲノムＤＮＡの倍加および分離が無糸分裂中に同時に起こっていたことが確認されるが、１つの説明としては、特に、ＤＮＡヘリックスの逆鎖が姉妹核に分離し、その後コピーによりｄｓＤＮＡ／ＤＮＡゲノムが再生されると考えられる。

【図４】メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）複製の顕微鏡写真を示す。左図（Ａ）：２つのメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂。初期胎児（胎仔）期によく見られるメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂のもう１つの形、「釣鐘のキス（ｋｉｓｓｉｎｇ ｂｅｌｌ）」であり、透過光による定量フォイルゲン染色を使用（ＤＮＡは紫色）。右の２図（ＢおよびＣ）：ｓｓＤＮＡの検出を妨害すると考えられるリボソームＲＮＡを除去するためＲＮＡｓｅで前処理してから、アクリジンオレンジで標識した「釣鐘のキス（ｋｉｓｓｉｎｇ ｂｅｌｌ）」形の２つのメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂である。こうしたＲＮＡｓｅ処理サンプル中で緑色蛍光は二本鎖ＤＮＡを示し、オレンジ色の蛍光は一本鎖ＤＮＡを示す。ＲＮＡｓｅによる前処理により、この場合、二本鎖ＲＮＡ／ＤＮＡが一本鎖ＤＮＡに変換されることが後で分かった。矢印は、二本鎖ＲＮＡ／ＤＮＡ中間体の形成が、釣鐘型の核の口で凝縮したＤＮＡの２つの環から始まり、その後２つの姉妹核の分離前に核本体のゲノムの約９０％に「広がる」続ける、という本発明者らの解釈を示す。

【図５】初期ヒト胎児発生の２つのメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）多核シンシチウムの蛍光顕微鏡写真を示す。検体は、ＲＮＡｓｅで前処理してからアクリジンオレンジで染色した。上図（Ａ）：処理により核がオレンジ色に標識されなかったシンシチウムである。これは、サンプリングおよびＲＮＡｓｅ処理時にゲノムの複製を行っていないシンシチウムの例である。下図（Ｂ）：核を釣鐘の口でオレンジ色に標識してあるシンシチウムであり、サンプリングおよび染色時に核のこの部分に大量のｄｓＲＮＡ／ＤＮＡが存在することを示す。この顕微鏡写真はさらに、同じシンシチウム内の核が、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドゲノムによるゲノム倍加を伴う同調した無糸分裂を行うことも示す。釣鐘型のメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）核を含むシンシチウムの同調した無糸分裂は、フォイルゲンサイトメトリーにより以前に観察された（Ｇｏｓｔｊｅｖａ ｅｔ ａｌ．，２００６）。

【図６】図５で調査した同じ組織を使用した、初期胎児発生の多核シンシチウムの２つの蛍光顕微鏡写真を示す。一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）に対する抗体は、ＲＮＡｓｅ前処理後の単核およびシンシチウムのメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞におけるｓｓＤＮＡ（緑色蛍光）を示す。本発明者らは、（Ａ）の釣鐘型の鋳型と（Ｂ）の矢印とを重ね合わせて釣鐘形状がメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）核を示すことを示した。ＲＮＡｓｅで処理していない同じ検体では、シグナルが観察されなかった。青色蛍光は、二本鎖ＤＮＡに結合した色素ＤＡＰＩから生じる。これは、ＲＮＡｓｅ処理後、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）核の無糸分裂像が大量の一本鎖ＤＮＡ成分を含むことを証明する独立の手段となる。

【図７】２つの蛍光顕微鏡写真を示す。図５および６で使用した同じヒト胎児検体由来のシンシチウムをＲＮＡｓｅで前処理し、次いで一本鎖ＤＮＡに対する緑色蛍光抗体（Ａ）、または一本鎖ＤＮＡに結合するとオレンジ色の蛍光を発するアクリジンオレンジ（Ｂ）で標識した。この図は、ＲＮＡｓｅ処理および一本鎖ＤＮＡに対する独立のプローブによる染色後の、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂の標識分布の本質的な情報を示す。ＲＮＡｓｅ処理した無糸分裂を行っているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）核内のｓｓＤＮＡを認識する２つの物理的に独立した手段の使用を試験して、ＲＮＡが無糸分裂中に作られるメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）ゲノム中間体に何らかの形で関与するという仮説が裏付けられた。

【図８】胎児組織の管状シンシチウムにおけるメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）釣鐘型核内のｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖の分布を示す。図８Ａは、５つのシンシチウムの釣鐘型の核が、ｄｓＤＮＡ／ＤＮＡ（ＤＡＰＩ、青色）、およびｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ（ＴＲＩＴＣ、赤色）、ｄｓＲＮＡ／ＮＡ二重鎖に特異的な標識した抗体複合体を含むを示す。これらの５つの釣鐘型の核はシンシチウム内に整列し、シンシチウム内で分裂している「釣鐘」との結合を示す。図８Ｂは、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖結合（ＴＲＩＴＣ、赤色）の存在を示す赤色蛍光を示し、同じ５つの釣鐘型の核内にｄｓＤＮＡ／ＤＮＡのＤＡＰＩ染色由来の青色蛍光は示されなかった。図８Ｃは、同じ５つのシンシチウムの核の非染色画像を示し、それらが釣鐘型でなかった他のいくつかの核と異なり釣鐘型の核であったことを示す。スケールバー－５ｕｍ。ヒト胎児（９週）、脊髄、シンシチウム。ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖に対する免疫蛍光染色（ＡＢ　ｎ３およびＴＲＩＴＣ－赤色）。対比染色は、ＤＡＰＩ（核－青色）で行った。

【図９】胎児組織において無糸分裂で分裂しているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）釣鐘型核内のｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖の分布を示すもう１つの画像セットを示す。図９Ａは、４つのシンシチウムの釣鐘型の核がすべてｄｓＤＮＡ／ＤＮＡ（ＤＡＰＩ、青色）、およびｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ（ＴＲＩＴＣ、赤色）、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖に特異的な標識した抗体複合体を含むことを示す。これらの４つの釣鐘型の核は、シンシチウム内に整列し、シンシチウム内で分裂している「釣鐘」との結合を示す。図９Ｂは、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖結合（ＴＲＩＴＣ、赤色）の存在を示す赤色蛍光を示し、同じ４つの釣鐘型の核内にｄｓＤＮＡ／ＤＮＡのＤＡＰＩ染色由来の青色蛍光は示されかなった。図９Ｃは、同じ４つのシンシチウムの核の非染色画像を示し、それらが釣鐘型でなかったもう１つの核（左上）と異なり釣鐘型の核であったことを示す。スケールバー－５ｕｍ。ヒト胎児（９週）、脊髄、シンシチウム。ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖に対する免疫蛍光染色（ＡＢ　ｎ３およびＴＲＩＴＣ－赤色）。対比染色は、ＤＡＰＩ（核－青色）で行った。

【図１０】ＨＴ－２９ヒト結腸腺癌由来の細胞株の細胞に見られる単核メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞の非対称無糸分裂における釣鐘型核および釣鐘型由来の球状核の画像を示す。図１０Ａは、ＤＡＰＩ陽性の青色釣鐘型の核（左）、およびＴＲＩＴＣ標識抗体複合体、赤色の球状真核（右）を示す。この画像は、場合によっては、非対称無糸分裂の一方の核は間期ｄｓＤＮＡ／ＤＮＡの形に変換されることがあるのに対し、他方の核は少なくとも一時的に複製中間体のｄｓＲＮＡ／ＤＮＡの形のままであることを教示する。画像はまた、無糸分裂により生み出される姉妹細胞のゲノムの１００％が本質

的にｄｓＲＮＡ／ＤＮＡからなる場合があることも教示する。図１０Ｂは、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ塊（矢印）の存在を検出しない１つの釣鐘型の核を示す非染色画像を示す。スケールバー－５ｕｍ。ただし、ＨＴ－２９細胞（ヒト結腸腺癌細胞株）。ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖に対する免疫蛍光染色（ＡＢ　ｎ２およびＴＲＩＴＣ－赤色）。対比染色は、ＤＡＰＩ（核－青色）で行った。

【図１１】ヒト結腸腺癌由来の細胞株ＨＴ－２９の生きている非染色コロニーの画像を示す。紫色の釣鐘型の物体が、釣鐘の口に卵形体として見られる真核細胞核を生み出したばかりメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）癌幹細胞の核であった。この画像は、固定または色素なしで、通常の顕微鏡光学系または位相差光学系を用いて無糸分裂の最中のメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞核が観察されたことを教示する。

【図１２】図１１に示すような細胞株ＨＴ－２９のメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞の紫色の釣鐘型の核が、Ｈｏｅｃｈｓｔ色素、たとえばＨｏｅｃｈｓｔ３３３４２または３３２５８の存在下で特に染色されなかったことを示す。一部を示したコロニー内の真核細胞の核はすべて、真核ゲノムを含む（図示せず）有糸分裂を行っている真核細胞のｄｓＤＮＡに色素が結合したことにより鮮やかな青色になった。左図の上の列および下の列では、紫色の釣鐘型の核（矢印）が、その後有糸分裂を行ったほぼ球状の真核を生み出したところである。中央の図の両列では、青色蛍光の光を発しなかったため、その現象を最初に観察したとき本出願人らが「ブラックホール（ｂｌａｃｋ　ｈｏｌｅ）」と呼んだ釣鐘型のメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞核を除いて、Ｈｏｅｃｈｓｔ３３３４２色素がすべての核を青色に染色するのが認められた。右図の両列は、左図と中央図との合成図であり、２つの画像が同じもの、釣鐘型のメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）核の核を特定していることを示す。出願人らは、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂において出願人らにより発見されたｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドゲノムが主に「Ａ」型の核酸ヘリックスであると考えられ、たとえばＨｏｅｃｈｓｔ色素もしくはＤＡＰＩ、またはｄｓＤＮＡなどの「Ｂ」型の核酸ヘリックスに特異的に蛍光を発する他の色素などの色素により、蛍光を発するようにならないと予想されると考えられると指摘している。

【図１３】無糸分裂およびゲノム複製と関連する巨大分子、ここでは酵素が、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡゲノムの複製中間体を利用する無糸分裂を行っているヒトメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）胎児細胞において、酵素をその抗原性により観察することによって同定されたことを示す。そのようにして３つの酵素が同定され、例として、図１３のａ、ｄ、ｇ：特異的蛍光（ＦＩＴＣ－緑色）を発するヒトＰＯＬ　β抗体複合体で染色したＤＮＡポリメラーゼβ、図１３のｂ、ｅ、ｈ：特異的蛍光（ＴＲＩＴＣ－赤色）を発するヒトＰＯＬ　ζ抗体複合体で染色されたＤＮＡポリメラーゼζ、図１３のｃ、ｆ、ｉ：特異的蛍光（ＦＩＴＣ－緑色）を発するヒト抗体ＲＮＡｓｅ　Ｈ１抗体複合体で染色されたＲＮＡｓｅ　Ｈ１がある。図１３のａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉは、ヒト胎児、脊髄神経節、９週である。図１３のａ、ｂ、ｃは、分裂している釣鐘型の核を含むメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）管状シンシチウムを示す。図１３のｄ、ｅ、ｆは、「釣鐘のキス（ｋｉｓｓｉｎｇ－ｂｅｌｌ）」形における対称無糸分裂を示す。図１３のｇ、ｈ、ｉは、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）釣鐘型核の様々な形の対称および非対称無糸分裂を示す。

【００２９】

上記は、添付図面に示した、以下の本発明の典型的な実施形態のより詳細な説明から明らかになるであろう。添付図面では、異なる図面であっても、同じ参照文字は同じ要素を示す。図は必ずしも縮尺どおりであるとは限らない。代わりに、本発明の実施形態を説明するため強調がなされている。

【発明を実施するための形態】

【００３０】

本発明の典型的な実施形態の説明を以下に記載する。

【００３１】

科学者らは、幹細胞には、器官および腫瘍を発現する非幹細胞と幹細胞を区別する生理学的特徴があるのではないかと長い間考えてきた。そして、ヒトまたは実験動物への導入時に組織、すなわち、白血球生成系または腫瘍を再構成する能力により、幹細胞を確実に含む組織サンプルまたは腫瘍から幹細胞を濃縮する間接的手段を考案してきた。一方、出願人らはこれまで、これらの器官形成および発癌に関連する幹細胞が、その特徴的な核の形状、対称および非対称無糸分裂の核分裂への関与、およびフォイルゲン試薬により鮮やかな蛍光を発する細胞質オルガネラの付属部分に基づき、直接的かつ特異的に認識可能であることを発見した。これらの予想外の特徴は、癌性状態または前癌状態の診断のため組織生検標本において幹細胞を認識して数える際に、および作用物質または作用物質の組み合わせが、増殖能を限定するおよび／または病原性幹細胞を殺すことができるかどうかを試験する際に有用であることが分かった。組織または腫瘍の細胞の大部分を構成する真核細胞と上記の非有糸分裂幹細胞との明確な相違から、それらを特徴的な細胞の生存形態：メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞と呼んだ。

【００３２】

また、ヒトの遺伝系統は、二本鎖ＤＮＡヘリックス（ｄｓＤＮＡ／ＤＮＡ）をコピーして２つの姉妹ｄｓＤＮＡ／ＤＮＡヘリックスの形で２つのコピーを形成することにより作られることも広くに受け入れられている。生殖細胞の形成においては、姉妹ｄｓＤＮＡ／ＤＮＡヘリックスはその後、減数分裂のプロセスにより分離される。一般に植物および動物の組織細胞の９９％超を構成する実質細胞においては、姉妹ｄｓＤＮＡ／ＤＮＡヘリックスは有糸分裂のプロセスにより分離される。成長および発生を担う器官形成の幹細胞も同様に、ゲノム複製においてｄｓＤＮＡ／ＤＮＡヘリックスのみを利用し、その後有糸分裂により分離すると推察されてきた。しかしながら、出願人らは現在、ヒト胎児器官形成の幹細胞およびヒト発癌性幹細胞は最初に、２つのｄｓＲＮＡ／ＤＮＡヘリカルのコピーの形で親のｄｓＤＮＡ／ＤＮＡゲノムのパンゲノムコピーを作り、それらが後でいくつかの無糸分裂様式のいずれかにより２つの子孫細胞に分離されることを発見した。無糸分裂の分離プロセスの間およびその後に、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡゲノムの複製中間体は、ＲＮＡｓｅ－Ｈ１、ＤＮＡポリメラーゼβおよびＤＮＡポリメラーゼζなどの酵素、および他の分子と物理的に結合し、同時にｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ中間体のｄｓＤＮＡ／ＤＮＡヘリックスへの変換が起こる。

【００３３】

本明細書では、無糸分裂像の核内に認識可能なｄｓＲＮＡ／ＤＮＡの塊が存在することに基づき、細胞分裂を行っているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を認識し、数える独立の手段であり、したがって癌性状態または前癌状態の診断のため組織生検標本の幹細胞認識して数える際のほか、細胞分裂およびゲノム複製においてメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｅ）により使用されるが、真核生物には使用されない、治療の標的となり得る他の巨大分子および生化学的経路を同定する際、および作用物質または作用物質の組み合わせが増殖能を限定するまたは病原性幹細胞を殺すことができるかどうかを試験する際に有用である、独立の手段が開示される。さらに、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドゲノムの形成および分離に必要な分子、およびｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドゲノムのｄｓＤＮＡ／ＤＮＡの形への変換に必要な分子と同様に、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡヘリックスがそれ自体、治療薬の設計および／または選択に特定の標的となることも開示される。

【００３４】

本発明は、特異な形式で分裂し、癌などの過剰増殖性障害を引き起こすメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞が、釣鐘型の核を特徴とし、独特の形式の複製を行うという以前の発見に関する。Ｇｏｓｔｊｅｖａ，Ｅ．Ｖ．ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅｔ．Ｃｙｔｏｇｅｎｅｔ．，１６４：１６－２４（２００６）；Ｇｏｓｔｊｅｖａ，Ｅ．Ｖ．ａｎｄ Ｔｈｉｌｌｙ，Ｗ．Ｇ．，Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｒｅｖ．，２４３－２５２（２００５））を参照されたい。釣鐘型の核は、ヒト結腸腫瘍および膵腫瘍において非有糸分裂プロセスにより対称分裂と非対称分裂との両方を行う。Ｇｏｓｔｊｅｖ

ａ，Ｅ．Ｖ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｇｅｎｅｔ．Ｃｙｔｏｇｅｎｅｔ．，１６４：１６－２４（２００６）；Ｇｏｓｔｊｅｖａ，Ｅ．Ｖ．ａｎｄ　Ｔｈｉｌｌｙ，Ｗ．Ｇ．，Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｒｅｖ．，２４３－２５２（２００５）。こうした釣鐘型の核は、５～７週の胚の後腸（釣鐘型の核は管状シンシチウムに包まれ、たとえば、全核の３０％を構成する）と、腫瘍組織（釣鐘型の核は「未分化の」ニッチに多く存在する）との両方に多く出現する。釣鐘型の核は、いくつかの幹細胞様性質、特に非対称分裂と、ヒト結腸の新生物発生前の組織および新生物組織の増殖速度と一致する核分裂頻度という特有の特徴を有する（Ｈｅｒｒｅｒｏ－Ｊｉｍｅｎｅｚ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｕｔａｔ．Ｒｅｓ．４００：５５３－７８（１９９８）；Ｈｅｒｒｅｒｏ－Ｊｉｍｅｎｅｚ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｕｔａｔ．Ｒｅｓ．４４７：７３－１１６（２０００））；特に、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｅ）が幹細胞であることを立証している米国特許第７，４２７，５０２号明細書も参照されたい。特異なメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｅ）の癌幹細胞としての役割を踏まえ、さらに癌幹細胞が典型的には標準的な放射線療法および化学療法を行っても生き延びるということを勘案すると、これまで認識されていなかった核形態を持つこうした細胞は、治療戦略の標的となる。

【００３５】

こうした釣鐘型の核には、ゲノムの全部または相当部分が中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムとして現れる段階があるという本観察から、釣鐘型の核を同定する方法、診断方法および予後診断方法、治療処置剤のスクリーニング方法のほか、たとえば、無糸分裂の細胞分裂中に釣鐘型の核の二本鎖ＤＮＡへの複製に関与するＤＮＡポリメラーゼを標的とすることにより、釣鐘型の核を標的とし、破壊する方法が可能になる。ある種の実施形態では、本発明において、ＤＮＡポリメラーゼβおよび／またはＤＮＡポリメラーゼζを含む複製複合体を標的とする。これらのポリメラーゼを含む複製複合体は、たとえば、ポリメラーゼを個々にあるいは一緒に直接標的とすることにより標的とすることができる。このため、本発明により提供される方法は、ＤＮＡポリメラーゼβ活性、ＤＮＡポリメラーゼζ活性、またはＤＮＡポリメラーゼβ活性およびＤＮＡポリメラーゼζ活性の両方を実質的に同時にまたは経時的に阻害し、したがってメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の複製を阻害することができる。いくつかの実施形態では、たとえば、ＲＮＡｓｅ　Ｈ－１自体を標的とすることにより、ＲＮＡｓｅ　Ｈ－１を含む複製複合体を標的とする。より詳細な実施形態では、ＤＮＡポリメラーゼβおよび／またはζと協調してＲＮＡｓｅ　Ｈ－１を標的とする。

【００３６】

メタカリトート（Ｍｅｔａｋａｒｙｔｏｔｉｃ）細胞

メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞は、目を引くが、つい最近になって認識された核形態型、中空の釣鐘型の核を示す。概説として、Ｇｏｓｔｊｅｖａ　ａｎｄ　Ｔｈｉｌｌｙ，Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　２：２４３－２５２（２００５）を参照されたい。また、その全体をやはり援用する米国特許第７，４２７，５０２号明細書の図１、図２、図３、図６および図７、ならびにその説明も参照されたい。こうした細胞も対称（追加の釣鐘型の核が生じる）および非対称（非釣鐘型の核が生じる）「無糸分裂」、すなわち標準的な有糸分裂および十分な中期染色体凝縮が起こらない分裂を行う。これらの無糸分裂により、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞から、釣鐘型、葉巻状、縮合した球状、球状、卵形、ソーセージ型、腎臓状、弾丸型、通常と異なる紡錘形、およびこれらの組み合わせなど異型の核形態型が生じ得る。たとえば、米国特許第７，４２７，５０２号明細書の図１を参照されたい。「メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｅ）」、「メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞」、「メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞」、「創傷治癒メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｅ）」および同種のものは、中空の釣鐘型の核を持つ細胞をいい、細胞は、無糸分裂により対称分裂あるいは非対称分裂する。メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｅ）は、動物細胞と植物細胞との両方で観察されてきた。

【００３７】

当業者であれば、本発明により提供される方法を実施すると、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を容易に同定することができる。たとえば、本明細書に提供される同定方法、スクリーニング方法、診断方法、予後診断方法および処置方法は、中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムを検出ことにより、組織サンプルまたは培養細胞中のメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を検出するステップを含んでもよい。本発明の方法により可視化される培養細胞または組織サンプル中の細胞は、約１０ミクロン、約２０ミクロン、約３０ミクロン、約４０ミクロン、約５０ミクロン、約６０ミクロンまたは約７０ミクロンまでの最大直径、より詳細な実施形態では約５０ミクロンまでの最大直径を有する核の核構造を完全性を実質的に維持するように調製される。細胞の調製方法も、その教示内容の全体を援用する米国特許第７，４２７，５０２号明細書に記載されている。ある種の実施形態では、この調製は、約１０～１５ミクロンの核の核構造の完全性を実質的に維持するものである。たとえば、いくつかの実施形態では、組織サンプルは、少なくとも厚さ約２０ミクロン、約３０ミクロン、約４０ミクロン、約５０ミクロン、約６０ミクロン、約７０ミクロン、約８０ミクロン、約９０ミクロン、約１００ミクロン、約１５０ミクロン、約２００ミクロン、約２５０ミクロン、約３００ミクロン、約３５０ミクロン、約４００ミクロン、約４５０ミクロン、約５００ミクロン、約７５０ミクロン、約１０００ミクロン、約１２５０ミクロン、約１５００ミクロンまたはそれを超える調製物として解析することができる。ある種の実施形態では、組織サンプルは解析に備えて、たとえば、約４５％（たとえば、約２５％、３０％、３５％、４０％、４２％、４５％、４７％、５０％、５５％、６０％または６５％）酢酸中のインキュベーションにより解離する。

【００３８】

いくつかの実施形態では、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｅ）をさらに検出しやすくするため、培養細胞または組織サンプルを染色してもよい。特定の実施形態では、染色は、たとえば、シッフ塩基試薬、フォイルゲン試薬またはフクシンによる染色を含んでもよい。より詳細な実施形態では、組織サンプルは、第２の染色でさらに染色してもよい。さらにより詳細な実施形態では、第２の染色はギムザ染色であってもよい。

【００３９】

ある種の実施形態では、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞は、非蛍光染色、たとえばシッフ試薬による処理後、その細胞質の蛍光により検出することができる。たとえば、その全体を援用する、実施例５、図２０～２７およびそれらの説明を含む米国特許出願公開第２０１０／００７５３６６Ａ１号明細書を参照されたい。本発明では、「創傷治癒障害と関連するメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞」、「創傷治癒メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｅ）」、および同種のものは、たとえば、米国特許出願公開第２０１０／００７５３６６Ａ１号明細書に記載されたメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の大きな風船状の細胞質とは異なり、風船状の細胞質を示さないメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞である。

【００４０】

メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）「細胞質オルガネラ」

これまでに発見された非分裂のメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞は、釣鐘の口の縁にＤＮＡの二重紐を持つ中空の凹状核（釣鐘型の核）を有する。釣鐘の口の直径は通常、約１２～１５ミクロンであるが、釣鐘型の核の奥行きは、ある種の組織型および組織由来の癌、たとえば骨髄由来の造血細胞調製物または末梢循環中の白血病細胞の３～５ミクロンから、腫瘍、たとえばヒト結腸腺癌の一部のメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｅ）では１５～２５ミクロンなど多岐にわたる。

【００４１】

真核生物では、核は、外側の細胞膜に仕切られた内側にオルガネラとして核膜に囲まれている。通常、核は、中央または中央付近に位置し、核膜は細胞膜と接触していない。一方、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞では、明らかな核膜が存在せず、中空の核は、この細胞質オルガネラを囲む膜に囲まれているというより、むしろ付加され

ているように見える。ヒト胎児組織または腫瘍の特定の処理、たとえば、ＭＡＴＲＩＳＰＥＲＳＥ（商標）により２４時間凍結温度で処理すると、釣鐘型の核は細胞質オルガネラから分離される。

【００４２】

メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）核が通常と異なる形で結合する細胞質オルガネラは、大きさおよび寸法が異なる。フォイルゲン試薬（フクシン）による処理により、ほとんどすべての細胞質オルガネラが蛍光を発するようになり、胎児（胎仔）／癌性ムチンの抗体で強力に標識される。細胞質オルガネラにおいてムチンの強力な標識の例外は、胎児（胎仔）器官の血管新生反応および手術後の再狭窄の病理学的状態において平滑筋細胞を生じさせるメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞である。

【００４３】

細胞質オルガネラは、奥行きのない釣鐘型の核と結合したほぼ球体である場合がある。これらは、出願人らにより観察された直径１５ミクロン未満の最も小型のメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞である。出願人らは、ほぼ球状の細胞質オルガネラと、ヤムルカ（スカルキャップ）に似た奥行きのない釣鐘型の核としてオルガネラに付加された核とを持つこれらの最も小型のメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞は、一部の器官、たとえば胃小窩と、造血と、特定の造血疾患、たとえば、白血病との発生において認められることが多い「印鑑」細胞として文献で説明される細胞であることを教示する。出願人らは、これらの最も小型のメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｅ）は、それらが認められる組織または白血病などの疾患状態において重要な幹細胞系統を構成することを教示する。

【００４４】

また、細胞質オルガネラは、非常に長い長球または風船状であってもよい。ヒト腫瘍において２００ミクロンを超えるメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞質オルガネラの例が、出願人らにより観察されたことがある。

【００４５】

さらに、いくつかの実施形態では、「濃縮された」細胞材料の移植アッセイおよび異種移植アッセイにより存在すると推測される幹細胞の骨髄サンプル、固形組織サンプルまたは腫瘍サンプルを濃縮する間接的な方法に有用であることが立証されている特定のマーカー遺伝子を検出することにより、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｅ）を検出する、および／または、詳細に特徴付けを行うことができる。特定の実施形態では、マーカー遺伝子は、ＣＤ１３３（ｐｒｏｍｉｎｉｎ　１；ヒトＧｅｎｅＩＤ　８８４２、最も長いアイソフォームの参照用ｍＲＮＡおよびタンパク質はそれぞれＮＭ＿００６０１７．２およびＮＰ＿００６００８．１である）およびＣＤ４４（ヒトＧｅｎｅＩＤ　９６０、アイソフォーム１前駆体の参照用ｍＲＮＡおよびタンパク質の配列はそれぞれＮＭ＿０００６１０．３およびＮＰ＿０００６０１．３である）の１つまたは複数を含んでもよい。マーカー遺伝子は、核酸（たとえば、ＲＮＡ）レベルまたはタンパク質レベルで検出することができる。より詳細な実施形態では、マーカー遺伝子は、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｅ）の風船状細胞質の周辺で検出することができる。前述のＧｅｎｅＩＤを使用して、一般に入手可能な注釈付きｍＲＮＡ配列またはタンパク質配列をＮＣＢＩウェブサイトから検索することができる。これらのＧｅｎｅＩＤに関連する情報、たとえば参照用配列およびそれに関連するアノテーションはすべて援用する。他の生物由来の参照用配列も、同様にＮＣＢＩウェブサイトから取得することができる。ただし、出願人らは、ＣＤ１３３およびＣＤ４４などのマーカーが、非メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞と関連する組織および腫瘍、ならびに他の非細胞構造体において認められることもさらに教示する。

【００４６】

本発明は１つには、意外にも中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムと関連する無糸分裂の中間体を検出することにより、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を特異的に同定することができるという発見に基づく。「中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重

鎖ゲノム」または「中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドゲノム」または「ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドゲノム」および同種のものは、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の複製中間体であり、前述のｄｓＤＮＡ／ＤＮＡ核ゲノムのかなりの割合が、一方の鎖のリボ核酸がデオキシリボ核酸の相補鎖にハイブリダイズした二本鎖核酸、すなわちｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖の形をとる。かなりの割合とは、核ＤＮＡの少なくとも０．２％、０．３％、０．４％、０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、４２％、４５％、４７％、５０％、５２％、５５％、５７％、６０％、６２％、６５％、６７％、７０％、８０％、９０％、９５％または９９％以上がｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖の形であることをいう。特定の実施形態では、かなりの割合とは、核ＤＮＡの少なくとも５０％、９０％、９５％または９９％以上がｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖の形であることをいう。他の実施形態では、かなりの割合は、約１～２４ピコグラム、たとえば、約０．５ｐｇ、１ｐｇ、２ｐｇ、３ｐｇ、４ｐｇ、５ｐｇ、６ｐｇ、７ｐｇ、８ｐｇ、９ｐｇ、１０ｐｇ、１２ｐｇ、１４ｐｇ、１６ｐｇ、１８ｐｇ、２０ｐｇ、２２ｐｇまたは２４ｐｇである。この独特の構造は、たとえば、特に、極めて小さなｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドゲノムを利用し得るウイルスゲノムと非常に対称的である。さらに、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムは、たとえば、転写中の真核細胞のｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドの報告と容易に区別される。こうした報告は、複製中間体の報告ではないためである。さらに、比較的に小さな割合のゲノムのみがｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖である（０．０１～０．１％）とも推定されてきた。たとえば、Ｓｚｅｓｚａｋ ａｎｄ Ｐｉｈｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ ２４７：３６３－６７（１９７１），Ａｌｃｏｖｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍａ ８：２６３－７７（１９８２）を参照されたい。以上より、本出願に使用し得るように、「メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂」は、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｅ）の無糸分裂（対称分裂あるいは非対称分裂）であり、中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムと関連する。

【００４７】

中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムの検出

メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の複製中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムは、種々の手段、たとえば無糸分裂（以下で考察）に関与するタンパク質の検出、および／またはｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖自体の検出により検出することができる。

【００４８】

ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖は、一本鎖核酸と二本鎖核酸とを識別する核酸色素の使用により検出することができる。「一本鎖核酸と二本鎖核酸とを識別する」色素は、一本鎖核酸と二本鎖核酸とに結合すると、一本鎖核酸および二本鎖核酸に対して親和性差を示し、および／または、異なるスペクトル特性（たとえば、励起スペクトル、吸着スペクトルまたは発光スペクトル）を示す。ある種の色素は比色分析色素、たとえば、蛍光色素であるのに対し、他の色素は比色分析色素ではないが、特定の核酸に対して親和性を有しており、したがって可視化のため追加の分子にコンジュゲートしてもよい。

【００４９】

たとえば、いくつかの実施形態では、一本鎖核酸と二本鎖核酸とを識別する色素は、二本鎖核酸に対してより高い親和性を示すものであり、ＤＡＰＩ色素またはＨｏｅｃｈｓｔ色素、たとえばＨｏｅｃｈｓｔ３３３４２またはＨｏｅｃｈｓｔ３３２５８などの色素が挙げられる。たとえば、ＤＡＰＩは、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡを染色せずに、ｄｓＤＮＡ／ＤＮＡの方を染色する。メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）核が１００％ｄｓＤＮＡ／ＤＮＡの形である場合、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）核は青色に見えるのに対し、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡの形が約１００％の核は検出可能なＤＡＰＩ染色を示さない。他の実施形態では、一本鎖核酸と二本鎖核酸とを識別する色素は、一本鎖核酸に対してより高い親和性を示すものであり、ＴＯＴＯ（登録商標）３およびＯＬＩＧＲＥＮ（登録商標）（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ（登録商標））などの色素が挙げられる。一本

鎖核酸と二本鎖核酸とを識別する他の色素は、一本鎖核酸または二本鎖核酸に結合すると、様々なスペクトル特性を示すものであり、一本鎖核酸に結合すると赤色の蛍光を発し、二本鎖核酸に結合すると緑色蛍光を発するアクリジンオレンジが挙げられる。いくつかの実施形態では、一本鎖核酸と二本鎖核酸とを識別する色素はやはりｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドに対して高い親和性を有するものであってもよく、その全体を援用するＳｈａｗ　ａｎｄ　Ａｒｙａ　Ｂｉｏｃｈｉｍｉｅ　９０：１０２６－３９（２００８）の表３に記載されている分子が挙げられ、たとえばエチジウムプロミド、ヨウ化プロピジウム、エリプチシン、アクチノマイシンＤおよび誘導体（Ｎ８　ＡＭＤまたはＦ８　ＡＭＤなど）、パロモマイシン、リボスタマイシン、ネオマイシン、およびネオマイシン－メチジウムクロリドコンジュゲート「ＮＭ」のほか、レキシトロプシンおよびポリアミド、たとえばジスタマイシン（ビス－ジスタマイシン、特にオルト／パラなど）およびネトロプシンがある。

【００５０】

一本鎖核酸と二本鎖核酸とを識別する色素は、単独で使用しても、あるいは、可視化しやすくするため（たとえばそれ自体が比色分析色素でない色素の場合）コンジュゲートと一緒に使用してもよく、さらにＲＮＡｓｅと協調して使用してもよい。たとえば、ＲＮＡｓｅは、上記で論じた特定の色素に予想される比色反応の変化の検出によりｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖を同定する際に有用である場合がある。特定の例として、アクリジンオレンジが二本鎖核酸ではなく一本鎖核酸に結合する際に観察されるスペクトルシフトがある。したがって、ある種の実施形態では、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖は、二重鎖のうち一本鎖ＤＮＡのみを残すＲＮＡｓｅ処理後にアクリジンオレンジ染色によりにより検出する。本発明により提供される方法に使用できるように、他の類似のアプローチを適合させてもよい。たとえば、以下の表１は、一本鎖ＤＮＡに結合することができ、したがってＲＮＡの分解（たとえば、アルカリ処理、または好ましくは、ＲＮＡｓｅ処理）後、本発明により提供される方法に使用してもよい作用物質を提供する。

【００５１】

【表１】

化学薬品	メカニズム
アクチノマイシンＤ	詳しく研究された抗腫瘍薬。一本鎖 DNA を豊富に含むヘアピン DNA 構造に結合する。DNA 鋳型の RNA 合成を阻害する。可能な dsRNA/DNA 結合剤。
ブロモアセトアルデヒド	アデニンとシトシンの塩基対形成位置で反応する。一本鎖ループおよび十字型内の塩基と優先的に反応する。
クロロアセトアルデヒド	一本鎖 DNA と容易に相互作用して主にエテノ損傷を形成する塩化ビニルの代謝産物。
ジエチルピロカルボネート	N-7 位でプリンをカルボキシエチル化し、イミダゾール環を開環する。実質的に DNA の一本鎖領域と反応。
四酸化オスミウム	ピリジンの存在下でピリミジンの C-5、C-6 二重結合を付加してオスメートエステルを形成する。二本鎖 DNA より一本鎖 DNA とかなり高い反応性を示す。
過マンガン酸カリウム	ピリミジン特異的かつ一本鎖特異的。酸化により塩基を修飾する。

表 1:一本鎖 DNA に結合する化学薬品

【００５２】

ある種の実施形態では、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖は、抗体を用いて検出する。「抗体

」という用語は、本明細書で使用する場合、免疫グロブリンまたはその抗原結合フラグメントをいい、供給源、産生種、作製方法または特徴を問わず、抗原結合部位を含む任意のポリペプチドを包含する。非限定的な例として、「抗体」という用語は、ヒト抗体、オランウータン抗体、ウサギ抗体、マウス抗体、ラット抗体、ヤギ抗体、ヒツジ抗体およびニワトリ抗体を含む。この用語は、以下に限定されるものではないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単一特異性抗体、多特異性抗体、非特異的抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、単鎖抗体、キメラ抗体、合成抗体、組換え抗体、ハイブリッド抗体、変異型抗体およびＣＤＲグラフト抗体を含む。本発明において、抗体は、他に記載がない限り、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、Ｆｄ、ｄＡｂ、ＶＨＨ（ナノボディとも呼ばれる）、および抗原結合機能を保持する他の抗体フラグメントなどの抗体フラグメントをさらに含む。抗体は、以下に詳述するように免疫グロブリンに基づかない抗原結合分子をさらに含む。

【００５３】

抗体は、たとえば、伝統的なハイブリドーマ技術（Ｋｏｈｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５－４９９（１９７５））、組換えＤＮＡ法（米国特許第４，８１６，５６７号明細書）、または抗体ライブラリーを用いたファージディスプレイ技術（Ｃｌａｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３５２：６２４－６２８（１９９１）；Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：５８１－５９７（１９９１））により作製することができる。様々な他の抗体作製技術については、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，ｅｄｓ．Ｈａｒｌｏｗ ｅｔ ａｌ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，１９８８を参照されたい。

【００５４】

いくつかの実施形態では、「抗体」という用語は、免疫グロブリン以外のスキャフォールドに基づく抗原結合分子を含む。たとえば、当該技術分野において公知の非免疫グロブリンスキャフォールドとして、ＳＭＩＰ（ｓｍａｌｌ ｍｏｄｕｌａｒ ｉｍｍｕｎｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ）（たとえば、それぞれ２００８年７月３１日および２００８年９月１８日に公開された米国特許出願公開第２００８／０１８１８９２号明細書および米国特許出願公開第２００８／０２２７９５８号明細書を参照されたい）、テトラネクチン、フィブロネクチンドメイン（たとえば、ＡｄＮｅｃｔｉｎ、２００７年４月１２日に公開された米国特許出願公開第２００７／００８２３６５号明細書を参照されたい）、プロテインＡ、リポカリン（たとえば、米国特許第７，１１８，９１５号明細書を参照されたい）、アンキリンリピートおよびチオレドキシンが挙げられる。非免疫グロブリンスキャフォールドに基づく分子は一般に、ファージディスプレイによるライブラリーのインビトロでの選択（たとえば、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ，Ｍｅｔｈｏｄ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１７８：１－３７（２００２）を参照されたい）、リボソームディスプレイ（たとえば、Ｈａｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．４５０：１０５－１１０（１９９９）およびＨｅ ａｎｄ Ｔａｕｓｓｉｇ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２９７：７３－８２（２００５）を参照されたい）、または高親和性結合配列を同定するため当該技術分野において公知の他の技術（Ｂｉｎｚ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２３：１２５７－６８（２００５）；Ｒｏｔｈｅ ｅｔ ａｌ．，ＦＡＳＥＢ Ｊ．２０：１５９９－１６１０（２００６）；および米国特許第７，２７０，９５０号明細書；６，５１８，０１８号明細書；および６，２８１，３４４号明細書も参照されたい）により作製される。

【００５５】

本発明により提供される方法に有用なｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖に特異的な抗体を作製するための免疫源には、たとえば、ポリ（Ａ）／ポリ（ｄＴ）（たとえば、援用するキタガワ（Ｋｉｔａｇａｗａ）ａｎｄ Ｓｔｏｌｌａｒ Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９：４１３－２０（１９８２）および米国特許第４，７３２，８４７号明細書の６：２－１４を参照されたい）、ポリ（ｄＣ）／ポリ（Ｉ）（たとえば、キタガワ（Ｋｉｔａｇａｗａ）

ａｎｄ　Ｓｔｏｌｌａｒ　１９８２を参照されたい）、およびφＸ１７４　ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッド（たとえば、援用するナカザト（Ｎａｋａｚａｔｏ）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　１９：２８３５－４０（１９８０）または米国特許第５，２００，３１３号明細書の１４：５３－１５：１３を参照されたい）がある。したがって、ある種の実施形態では、本発明の方法に使用する抗体は、ポリ（Ａ）／ポリ（ｄＴ）、ポリ（ｄＣ）／ポリ（Ｉ）、およびφＸ１７４　ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドから選択される少なくとも１つの抗原；または相補的混合塩基配列を持つ一本鎖のＲＮＡおよび一本鎖のＤＮＡを含む別の二本鎖核酸分子に結合する。特定の実施形態では、抗体は、約１×１０^{6}Ｍ$^{-1}$、約５×１０^{6}Ｍ$^{-1}$、約１×１０^{7}Ｍ$^{-1}$、約５×１０^{7}Ｍ$^{-1}$、約１×１０^{8}Ｍ$^{-1}$、約５×１０^{8}Ｍ$^{-1}$または約１×１０^{9}Ｍ$^{-1}$以上より大きいＫａでこれらの抗原の１つまたは複数に結合する。本発明により提供される方法に使用される特異抗体は、受託番号ＡＴＣＣ　ＨＢ　８７３０、ＨＢ　８０７６、ＨＢ　８０７７およびＨＢ　８０７８でＡＴＣＣ（登録商標）（アメリカンタイプカルチャーコレクション（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ））に寄託されたハイブリドーマにより作製された抗体のほか、これらの抗体のキメラ変異体およびＣＤＲグラフト変異体を含む。

【００５６】

他の実施形態では、一本鎖ＤＮＡに特異的な抗体は、二重鎖のうちのＲＮＡの分解後、たとえばＲＮＡｓｅ処理後、本発明により提供される方法に使用してもよい。ｓｓＤＮＡ結合抗体の作製に好適な免疫源として、ＤＮＡの変性調製物、たとえばウシ胸腺ＤＮＡが挙げられる。ｓｓＤＮＡ特異抗体は、メチル化ＢＳＡ複合体およびｓｓＤＮＡの複合体（Ｐｌｅｓｃｉａ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ，５２：２７９，１９６４）、または合成ｓｓポリヌクレオチド（Ｓｅａｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，４：２０９１，１９６５）、またはタンパク質にコンジュゲートしたＤＮＡのフラグメント（Ｔａｂｌｅ　１　ｏｆ　Ｓｔｏｌｌａｒ，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ａｎｔｉｇｅｎｓ，ｉｎ　Ｔｈｅ　Ａｎｔｉｇｅｎｓ　Ｖｏｌ　１，Ｍ．Ｓｅｌａ　Ｅｄ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，１９７３）で動物を免疫することにより誘導することができる。ｓｓＤＮＡ特異抗体はまた、全身性紅斑性狼瘡の一部の患者（Ｓｔｏｌｌａｒ　ａｎｄ　Ｌｅｖｉｎｅ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，８７：，４７７，１９６１，Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ．１０１：４１７，１９６３）またはループスマウス（Ｍｕｎｎｓ　ａｎｄ　Ｆｒｅｅｍａｎ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２８：１００４８，１９８９））の血清からポリクローナルな自己抗体として；またはヒトもしくはマウスのハイブリドーマからモノクローナルな自己抗体として（Ｓｈｏｅｎｆｅｌｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．，７０：２０５，１９８２；Ａｎｄｒｚｅｊｅｗｓｋｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ，１２６，２２６，１９８１；Ｅｉｌａｔ，Ｄ　Ｍｏｌｅｃ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．３１：１３７７，１９９４）得てもよい。

【００５７】

特定の実施形態では、ｓｓＤＮＡの抗体は、モノクローナル抗体Ｍａｂ　Ｆ７－２６（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ（登録商標）カタログ番号ＭＡＢ３２９９）などのモノクローナル抗体、またはそのキメラ変異体もしくはＣＤＲグラフト変異体である。また、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドからＲＮＡを除去した後、ｓｓＤＮＡ結合特異性を持つ他の作用物質、たとえば一本鎖オリゴヌクレオチド（ｓｓＤＮＡ、ＲＮＡ、ＰＮＡまたはｓｓＤＮＡにハイブリダイズできる他の人工核酸）、あるいは、ｓｓＤＮＡ特異性を持つタンパク質、たとえば、ポリ（ＡＤＰ－リボース）ポリメラーゼ、ｈｎＲＮＰタンパク質、一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質およびＲｅｃＡを使用して、ｓｓＤＮＡを検出してもよい。

【００５８】

ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖抗体またはｓｓＤＮＡ抗体など本発明により提供される方法に使用される作用物質のいずれかを、検出可能に標識してもよい。あるいは、作用物質は、標識しなくてもよく、第２の作用物質、たとえば、検出可能に標識した二次抗体を用いて間接的に検出してもよい。検出可能な標識は、酵素標識（たとえば、ＨＲＰまたはアル

カリホスファターゼ）、蛍光標識、放射能標識、化学部分（ビオチンなどの小分子）、タンパク質部分（たとえばアビジンまたはポリペプチドタグ）などであってもよい。

【００５９】

無糸分裂に関与するタンパク質

本発明により、出願人らは、ＤＮＡポリメラーゼβ、ＤＮＡポリメラーゼζ、およびＲＮＡｓｅＨ１など、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｅ）の無糸分裂による複製に関与している可能性がある分子のいくつかを同定した。したがって、本発明により提供される方法では、中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムは、たとえば、上述の方法によりｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖自体を検出することにより同定しても、あるいは、ポリメラーゼβおよびポリメラーゼζ、ＲＮＡｓｅＨ１、ならびに、たとえばｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖の検出と協調した組み合わせを含む、これらの組み合わせなど、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の複製に関与する遺伝子の発現産物（核酸レベルまたはタンパク質レベル）を検出することにより同定してもよい。

【００６０】

ＤＮＡポリメラーゼβは、塩基除去修復（ＢＥＲ）経路における主要なＤＮＡ修復ポリメラーゼの１つである。ＤＮＡポリメラーゼβは、３９ｋＤａのタンパク質で、主要なＢＥＲポリメラーゼ（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＭ　００２６９０）であるが、忠実度の高い複製型ＤＮＡポリメラーゼとは異なり、ＤＮＡポリメラーゼβには、３’→５’方向のエキソヌクレアーゼ活性および校正能力がないため、忠実度が低い。Ｃｈｙａｎ，Ｙ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．ｖｏｌ．２２，ｎｏ．１４，ｐｐ．２７１９－２７２５（１９９４）。ＤＮＡポリメラーゼβ遺伝子は、表２に示したものなど、多くの生物で同定されてきた。

【００６１】

【表２】

種	GeneID
ヒト (Homo sapiens)	5423
ハツカネズミ (Mus musculus)	18970
ドブネズミ (Rattus norvegicus)	29240
ウシ (Bos taurus)	614688
ニワトリ (Gallus gallus)	426794
チンパンジー (Pan troglodytes)	737210
イヌ (Canis lupus familiaris)	494001

表 2:Polβ 遺伝子

【００６２】

ｅｒｒｏｒ－ｐｒｏｎｅ　ＤＮＡポリメラーゼの例には、Ｒｅｖ３遺伝子によりコードされた１７３ｋＤａのタンパク質ＤＮＡポリメラーゼζがある（Ｇｉｂｂｓ，Ｐ．Ｅ．Ｍ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，ｖｏｌ．９５，ｐｐ．６８７６－６８８０（１９９８）；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＦ０５８７０１））。ＤＮＡポリメラーゼζは、損傷乗り越え複製ポリメラーゼであり、このポリメラーゼは、損傷配列を修復するのではなく損傷配列の反対側にヌクレオチドを組み込むことによりＤＮＡ損傷を乗り越え、合成の継続を可能にするが、ミスマッチヌクレオチドが配列内に残る（Ｇａｎ，Ｇ．Ｎ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　Ｒｅｓ．１８：１７４－１８３（２００８））。ポリメラーゼζ遺伝子は、表３のものなど多くの生物で同定されてきた。

【００６３】

【表３】

種	GeneID
ヒト (Homo sapiens)	5980
サッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)	855936
チンパンジー (Pan troglodytes)	462942
ドブネズミ (Rattus norvegicus)	309812
ハツカネズミ (Mus musculus)	19714
アカゲザル (Macaca mulatta)	695894
ジャイアントパンダ (Ailuropoda melanoleuca)	100466621
イヌ (Canis lupus familiaris)	481963
アフリカツメガエル (Xenopus laevis)	100316923

表 3 Polζ/REV3L 遺伝子

【００６４】

ＲＮＡｓｅ　Ｈ１は、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖のＲＮＡ鎖を切断する。ＲＮＡｓｅＨ１活性のアッセイは、当該技術分野において公知であり、たとえば、援用する米国特許出願公開第２００５／００１４７０８Ａ１号明細書の段落３２に記載されている。ＲＮＡｓｅＨ遺伝子は、表４に報告するものなど種々の生物で同定されてきた。さらに、ＭＭＤＢＩＤ：６３２９４も、ヒトＲＮＡｓｅ　Ｈ１のハイブリッド結合ドメインと１２ｍｅｒＲＮＡ／ＤＮＡとの複合体の構造を提供する。この構造は、たとえば、本発明により提供される方法に使用される療法剤の合理的設計および選択に使用することができる。

【００６５】

【表４】

種	GeneID
ヒト(Homo sapiens)	246243
ハツカネズミ(Mus musculus)	19819
ドブネズミ(Rattus norvegicus)	298933
ウマ(Equus caballus)	100072832
チンパンジー(Pan troglodytes)	743012
ウシ(Bos taurus)	613354
ニワトリ(Gallus gallus)	395848
ゼブラフィッシュ(Danio rerio)	436932

表 4:RNAse H1 遺伝子

【００６６】

これらの表２～４の遺伝子識別子を使用すれば、特にＮＣＢＩウェブサイト、／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ．などの入手先から一般に入手可能な注釈付きｍＲＮＡ配列またはタンパク質配列を検索することができる。参照用配列およびそれに関連するアノテーションなど、これらの識別子に関連する情報はすべて援用する。ＩＤを変換するまたは遺伝子に関する追加情報を得るための他の有用なツールも当該技術分野において公知であり、たとえば、ＤＡＶＩＤ、Ｃｌｏｎｅ／ＧｅｎｅＩＤコンバーターおよびＳＮＡＤが挙げられる。Ｈｕａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｐｒｏｔｏｃ．４（１）：４４－５７（２００９），Ｈｕａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．３７（１）１－１３（２００９），Ａｌｉｂｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，ＢＭＣ　Ｂ

ｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　８：９（２００７），Ｓｉｄｏｒｏｖ　ｅｔ　ａｌ．，ＢＭＣ　Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　１０：２５１（２００９）を参照されたい。

【００６７】

メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂に関与する他の巨大分子、たとえばタンパク質（さらに脂質、炭水化物および核酸）も、本発明により提供される方法により、たとえば、中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムとの共局在によって候補巨大分子を検出することにより同定することができる。巨大分子（およびそれに関連する生化学的経路）は、たとえば、次のセクションに記載されているように標的としてもよい。

【００６８】

無糸分裂に関与するタンパク質の阻害剤

ポリメラーゼβおよびζのほか、ＲＮＡｓｅＨ１は、中和抗体、ドミナントネガティブ変異体、および核酸を用いた技術、たとえばアンチセンス、ｓｉＲＮＡおよび三重鎖形成オリゴヌクレオチドなど当該技術分野における通常の手段により阻害することができる。他の阻害剤も当該技術分野において公知である。

【００６９】

ＤＮＡポリメラーゼβの阻害剤として、たとえば、援用する米国特許出願公開第２０１０／００４８６８２号明細書の段落４９、５０および表１に記載されたものが挙げられる。他のＤＮＡポリメラーゼβ阻害剤としては、Ｗｉｌｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　Ｍｏｌ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉ．６７（２１）：３６３３－４７（２０１０）およびヤマグチ（Ｙａｍａｇｕｃｈｉ）　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｓｃｉ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．７４（４）：７９３－８０１（２０１０；新規なテルペノイドおよびトリコデロン酸（ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｏｎｉｃ　ａｃｉｄ）ＡおよびＢについて記載）に記載されたものがある。

【００７０】

ＲＮＡｓｅ　Ｈ１阻害剤として、三重鎖形成オリゴヌクレオチド（国際公開第９４／０５２６８号パンフレット、Ｄｕｖａｌ－Ｖａｌｅｎｔｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８９：５０４－５０８（１９９２）；Ｆｏｘ，Ｃｕｒｒ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，７：１７－３７（２０００）；Ｐｒａｓｅｕｔｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ，１４８９：１８１－２０６（２０００）を参照されたい）。他の阻害剤としては、１－ヒドロキシ－１，８－ナフチリジン化合物、たとえば援用する米国特許出願公開第２０１０／００５６５１６Ａ１号明細書の段落４３～１０１に開示されたもの、および援用する米国特許第７，５０１，５０３号明細書の発明の概要に開示された化合物が挙げられる。他のＲＮＡｓｅＨ１阻害剤として、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖を標的とする作用物質、たとえばネオマイシン、カナマイシン、パロモマイシン、トブラマイシンおよびリボスタマイシンなどのアミノグリコシド系抗生物質を挙げることができる。

【００７１】

他のＲＮＡｓｅＨ１阻害剤としては、置換チエンなど米国特許出願公開第２０１０／００５６５１６Ａ１号明細書の背景技術に引用されたもの（たとえば、国際公開第２００６／０２６６１９Ａ２号パンフレットを参照されたい）、ジチオカルバメート（たとえば、米国特許出願公開第２００５／０２０３１７６Ａ１号明細書を参照されたい）、ジヒドロキノリン誘導体（たとえば、米国特許出願公開第２００５／０２０３１２９Ａ１号明細書を参照されたい）、ヒダントイン誘導体（たとえば、米国特許出願公開第２００５／０２０３１５６Ａ１号明細書を参照されたい）、オリゴヌクレオチド剤（たとえば、米国特許出願公開第２００４／０１３８１６６Ａ１号明細書を参照されたい）、マッピシン関連化合物（たとえば、米国特許第５，５２７，８１９号明細書を参照されたい）、チオフェン誘導体（たとえば、国際公開第２００６／０２６６１９Ａ２号パンフレットを参照されたい）、カルバメート誘導体（たとえば、米国特許出願公開第２００５／２０３１７６Ａ１号明細書を参照されたい）、ヒダントイン（たとえば、米国特許出願公開第２００５／２０３１５６Ａ１号明細書を参照されたい）、１，２－ジヒドロキノリン誘導体（たとえば

、米国特許出願公開第２００５／２０３１２９Ａ１号明細書を参照されたい）、ラクトン（たとえば、Ｄａｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｎａｔｕｒａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，７０：．８３９－８４１（２００７）を参照されたい）、ヒドロキシル化トロポロン（たとえば、Ｄｉｄｉｅｒｊｅａｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂｉａｌ　Ａｇｅｎｔｓ　ａｎｄ　Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ，４９：４８８４－４８９４（２００５）を参照されたい）、ヒドロキシル化トロポロン（たとえば、Ｂｕｄｉｈａｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．３３：１２４９－５６（２００５）を参照されたい）、ＤＮＡチオアプタマー（たとえば、Ｓｏｍａｓｕｎｄｅｒａｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　４４：１０３８８－９５（２００５）を参照されたい）、ジケト酸（たとえば、Ｓｈａｗ－Ｒｅｉｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　４４：１５９５－１６０６（２００５）およびＳｈａｗ－Ｒｅｉｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７８：２７７７－８０（２００３）を参照されたい）、オリゴヌクレオチドヘアピン（たとえば、Ｈａｎｎｏｕｓｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．３２：６１６４－６１７５（２００４）を参照されたい）、２－ヒドロキシイソキノリン－１，３（２Ｈ，４Ｈ）－ジオン（たとえば、Ｋｌｕｍｐｐ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．３１：６８５２－５９（２００３）およびＱｉ　Ｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．３１７：３２１－２９（２００４）を参照されたい）、アシルヒドラゾン（たとえば、Ｇ．Ｂｏｒｋｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３６：３１７９－３１８５（１９９７）を参照されたい）、ノベナミン（たとえば、Ａｌｔｈａｕｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔｉａ　５２　Ｂｉｒｋｈａｕｓｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，ｐｐ．３２９－３３５）（１９９６）を参照されたい）、ナフタレンスルホン酸誘導体（たとえば、Ｍｏｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，３７：２５１３－２５１９（１９９４）を参照されたい）、セファロスポリン分解物（たとえば、Ｐ．Ｈａｆｋｅｍｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１９：４０５９－６５（１９９１）を参照されたい）、およびキノン（たとえば、Ｌｏｙａ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂｉａｌ　Ａｇｅｎｔｓ　ａｎｄ　Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．３４：２００９－１２（１９９０）を参照されたい）が挙げられる。

【００７２】

本発明により提供される方法では、上記の化合物は、上記の化合物の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つまたはそれを超えるなどその組み合わせを含め、ＤＮＡポリメラーゼβもしくはζおよび／またはＲＮＡｓｅＨ１の１つまたは複数を含む中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムと結合した複製複合体を阻害するのに使用することができる。

【００７３】

方法

本発明は、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞を含む任意の生物の種々の障害の診断方法、予後診断方法および処置方法を提供する。例示的な方法として、腫瘍、非癌性過剰増殖性障害および創傷治癒障害の診断法、予後診断法および／または処置のほか、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を同定する方法、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の増殖、遊走、複製および／または生存を調節するため、本発明により提供される処置方法に使用できる作用物質をスクリーニングする方法、およびｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドゲノムを含む無糸分裂のメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞に存在または発現する巨大分子または生化学的経路を発見することにより抗幹細胞療法の追加標的を同定する方法が挙げられる。本発明の方法は、中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドゲノムと関連する無糸分裂、すなわち、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂を行っているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を同定するステップを含む。メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞を同定する方法のほか、作用物質をスクリーニングする方法または巨大分子または生化学的経路得を発見する方法には、任意のメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞、たとえば、動物または多細胞植物（Ｇｏｓｔｊｅｖａ　ｅｔ　ａｌ

．，２００９）を使用することができる。

【００７４】

被検体および組織サンプル

本発明により提供される方法による診断、予後診断、スクリーニングまたは処置の対象となる被検体には、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞を含む任意の生物が含まれる。ある種の実施形態では、生物は、多細胞動物、たとえば脊椎動物である。特定の実施形態では、被検体は、哺乳動物、たとえば霊長類でも、齧歯動物でも、イヌでも、ネコでも、ブタでも、ヒツジでも、ウシでも、あるいはウサギでもよい。さらにより詳細な実施形態では、被検体は霊長類、たとえば、ヒトである。他の実施形態では、被検体は齧歯動物である。

【００７５】

他の実施形態では、被検体は植物であり、たとえば、本発明は、植物の病理学的病態および疾患メカニズムを同定する方法を提供し、他の態様では、植物においてメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の増殖、遊走および／または増殖を調節する作用物質、たとえば、除草剤を同定する方法を提供する。

【００７６】

本発明は、腫瘍、非癌性過剰増殖性障害および創傷治癒障害の診断方法、予後診断方法および処置方法のほか、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の増殖、遊走、複製および／または生存を調節し、したがって本発明により提供される処置方法に使用することができる作用物質をスクリーニングする方法を提供する。本発明の方法は、中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドゲノムと関連する無糸分裂、すなわち、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂を行っているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を同定するステップを含む。

【００７７】

被検体は、どの発達段階、たとえば、胚、胎児、新生児、乳児、小児、青年、成人または高齢者であってもよい。特定の実施形態では、被検体は、小児、青年、成人または高齢者である。さらにより詳細な実施形態では、被検体は成人または高齢者である。ある種の実施形態では、被検体は、少なくとも約１歳、約２歳、約３歳、約４歳、約５歳、約１０歳、約２０歳、約２５歳、約３０歳、約３５歳、約４０歳、約４５歳、約５０歳、約５５歳、約６０歳、約６５歳、約７０歳、約７５歳またはそれを超える歳、たとえば、約１～５歳、約５～１０歳、約１０～２０歳、約１８～２５歳、約２５～３５歳、約３５～４５歳、約４５～５５歳、約５５～６５歳もしくは約６５～７５歳またはそれ超える歳である。ある種の実施形態では、被検体は死亡している、すなわち、本方法は死後診断法である。

【００７８】

ある種の実施形態では、被検体由来の組織サンプルは、たとえば、移植、血管形成術またはステント留置などの手術中に外科的に、あるいは、生検法で採取する。組織サンプルは、腫瘍組織、非腫瘍組織またはこれらの組み合わせを含んでもよく、さらに血液、血管組織、脂肪組織、リンパ組織、結合組織（たとえば、帯膜、靭帯、腱）、外膜、漿膜、腱膜、内分泌組織、粘膜組織、肝臓、肺、腎臓、脾臓、胃、膵臓、結腸、小腸、膀胱、生殖腺、乳腺組織、中枢神経系組織、末梢神経組織、皮膚、平滑筋、心筋または骨格筋組織などの組織を含んでもよい。いくつかの実施形態では、組織サンプルは、上記の組織の１つ、２つ、３つ、４つまたは５つ以上を含んでもよい。より詳細な実施形態では、組織サンプルは、主に１つの組織を含んでもよいし、あるいは、主に１つの組織から本質的になってもよく、たとえば、組織サンプルは、単一の組織の約１０重量％、約２０重量％、約３０重量％、約４０重量％、約５０重量％、約６０重量％、約７０重量％、約８０重量％、約９０重量％、約９５重量％、または約１００重量％である。より詳細な実施形態では、組織サンプルは血管組織を含み、さらにより詳細な実施形態では、血管壁を含む。いくつかの実施形態では、組織サンプルは血管組織から本質的になる。ある種の実施形態では、血管組織は外膜をさらに含む。より詳細な実施形態では、血管組織は外膜および血管組織

から本質的になる。ある特定の実施形態では、組織サンプルは腫瘍の疑いがある組織を含む。

【００７９】

診断方法

本発明により提供される診断方法は、被検体由来の組織サンプルにおいてメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の存在および／または量および／または遊走を判定（たとえば、測定）して、腫瘍、創傷治癒障害または非癌性過剰増殖性障害など被検体の障害を診断することを含む。特定の実施形態では、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）無糸分裂を行っているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の存在および／または量および／または分布を判定する。

【００８０】

診断の対象となる障害

本発明により提供される方法を用いて、腫瘍、創傷治癒障害および非癌性過剰増殖性障害など種々の障害を診断することができる。

【００８１】

「創傷治癒障害」は、外科的介入、感染症（人喰いバクテリア感染など）からの回復および／または急性外傷の後の、組織および／または器官の損傷の修復における異常な組織産生を特徴とする疾患または障害であり、異常な組織産生は非癌性かつ非前癌性である。「非癌性」および「非前癌性」増殖（単数または複数）の体細胞は、培養すると通常の（野生型）染色体核型および通常の接触阻止を示す。いくつかの実施形態では、創傷治癒障害は、異常に過剰な組織産生を特徴とする。他の実施形態では、創傷治癒障害は、異常に不十分な組織産生を特徴とする。例示的な創傷治癒障害として、血管の創傷治癒障害、脊髄の創傷治癒障害、臓器移植および外傷性損傷に関連する創傷に関連する創傷治癒障害がある。より詳細な実施形態では、創傷治癒障害は手術後に起こる。たとえば、心臓、肝臓、肺、角膜などの臓器移植のような手術、または血管形成術、ステント留置などの外科的介入は、再狭窄（動脈または静脈）を来すことが多い。こうした再狭窄は、移植レシピエントの死亡の原因になることが多い。急性外傷としては、たとえば、熱傷、切り傷および銃創を挙げることができる。

【００８２】

「血管の創傷治癒障害」は、血管組織の創傷治癒障害である。ある種の実施形態では、血管の創傷治癒障害は、血管組織、特に内膜などの管腔表面における異常に過剰な平滑筋産生および／またはメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞の増殖を特徴とする。例示的な血管の創傷治癒障害として、たとえば、損傷により誘発される新生内膜過形成および再狭窄（たとえば、移植または外傷の後）が挙げられる。より詳細な実施形態では、血管壁障害は再狭窄である。「再狭窄」とは、典型的には外科的介入後、たとえば血管形成術、ステント留置または移植の後の内膜表面の肥厚による動脈の再狭小化をいう。いくつかの実施形態では、血管壁障害は、手術、感染症または急性外傷の後に起こる。より詳細な実施形態では、血管壁障害は手術後に起こる。

【００８３】

したがって、本発明により提供される診断方法または予後診断方法のいくつかの実施形態では、被検体は、創傷治癒障害を有する疑いがある。より詳細な実施形態では、被検体は、血管の創傷治癒障害を有する疑いがある。

【００８４】

ある種の実施形態では、創傷治癒障害を有する疑いがある被検体は、以前に手術を受けたことがある。より詳細な実施形態では、手術は、ステント留置および／またはバルーン血管形成術である。さらにより詳細な実施形態では、被検体は、以前にステント術を２回以上、たとえば、ステント術を少なくとも２回、３回、４回または５回以上受けたことがある。こうした実施形態では、ステント術は、薬剤溶出ステント術（たとえば、シロリムスまたはパクリタキセル（これらのアナログを含む）溶出ステント術；および抗ＣＤ－３４抗体または抗ＶＥＧＦ抗体コーティングステント術）でも、非薬剤溶出ステント術でも

、あるいはこれらの組み合わせでもよい。

【００８５】

いくつかの実施形態では、創傷治癒障害を有する疑いがある被検体は、以前に移植、たとえば、同種移植、自家移植または異種移植を受けたことがある。特定の実施形態では、被検体は、完全または部分的な臓器移植（たとえば、心臓、肝臓、腎臓、膀胱、皮膚、肺または角膜の移植）、または弁移植もしくは血管移植を受けたことがある。移植された血管は、動脈および／または静脈であってもよい。特定の実施形態では、被検体は、手術の再狭窄を有する疑いがある。

【００８６】

当業者であれば、本発明において新規障害、たとえばアテローム性動脈硬化症が創傷治癒障害ではないことを理解するであろう。しかしながら、本発明は、ある種の実施形態では、本発明の方法によって非癌性の過剰増殖病変を含む疑いがある組織を可視化することにより、非癌性過剰増殖性障害、たとえばアテローム性動脈硬化症を診断する方法を提供する。たとえば、生検標本などのサンプル中の細胞の核を可視化し、中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムと関連する無糸分裂を行っている釣鐘型の核の存在を判定する。

【００８７】

「腫瘍」とは、腫瘍性増殖物をいい、増殖速度、正常な組織浸潤の位置程度、転移、ならびに活発に分裂する有糸分裂細胞および不規則な形で染色される変則的に形成された核を持つ細胞の存在に基づき、外科病理医により認識される良性腫瘍および悪性腫瘍の両方を包含する。病理学者は、本発明を実施すれば、抗ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ抗体またはｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ分子を特異的に染色する色素と強く反応する検体の核を観察し、数えることができるであろう。結腸などの典型的な腺癌では、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞は、対称有糸分裂または非対称有糸分裂を約１２日ごとに行い、腫瘍標本においてメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞の約０．２～２％を構成すると予想される。Ｈｅｒｒｅｒｏ－Ｊｕｍｉｎｅｚ ｅｔ ａｌ．１９８８，２０００より。

【００８８】

「前癌病変」とは、その組織の転移する可能性がある腺癌を含む結腸の腺腫性ポリープの場合のように、推定上の前駆部として腫瘍と関連する、増殖速度の遅い小さな扁平上皮部または腺腫部をいう。前癌幹細胞の対称分裂は５～６年に１回と予想されるので、非対称分裂の頻度が約４０日ごとに１回であることから、前癌病変、たとえば腺腫性結腸ポリープにおいてｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドゲノムと共に見出されるメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）核は約１／４０００に過ぎないと予想されよう。

【００８９】

いくつかの実施形態では、障害は単クローン性である。この障害は、異常に過剰な組織増殖を形成する非対称分裂と異なり、単一のメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞からの直線的増殖により生じる。他の実施形態では、障害は、多クローン性である。すなわち、手術後の再狭窄などのこの障害は、対称分裂および非対称分裂の両方により２つ以上のメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞から生じる。

【００９０】

スクリーニング法

本発明は、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の増殖、複製、遊走および／または生存を調節する作用物質をスクリーニングするインビトロ法およびインビボ法の両方を提供する。インビトロ法およびインビボ法のどちらも、候補作用物質について、中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムと関連する無糸分裂を行っている釣鐘型の核を含む細胞の数および／または遊走を調節するその能力を評価する。候補作用物質は、小分子医薬品または生物学的製剤、たとえばタンパク質（たとえば、増殖因子、抗体またはアプタマー）、核酸（アンチセンス分子およびアプタマーなど）、脂質、炭水化物またはこれらの組み合わせなど任意の化学物質を含んでもよい。作用物質は典型的には、培養物または生体において中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ゲノムと関連する無糸分裂を行ってい

る釣鐘型の核の数に対して作用を引き起こすような用量または一定範囲の用量で、たとえば、２回、３回、４回、５回または６回以上投与する。

【００９１】

インビトロスクリーニング法は、増殖しているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を含む培養細胞を候補作用物質と接触させることを含む。より詳細な実施形態では、細胞は、動物、たとえば脊椎動物、たとえば哺乳動物、たとえば霊長類、齧歯動物、イヌ、ネコ、ブタ、ヒツジ、ウシまたはウサギから採取する。さらにより詳細な実施形態では、細胞はヒトから採取する。ある種の実施形態では、培養細胞は、臍帯、外膜、間葉系組織または大動脈弓から採取する。他の実施形態では、培養細胞は、腫瘍、たとえば充実性腫瘍、たとえば乳房腫瘍、前立腺腫瘍、肺腫瘍または結腸腫瘍から採取する。特定の実施形態では、培養細胞は、そのすべてを援用する、図２８～３０およびその説明を含む米国特許出願公開第２０１０／００７５３６６Ａ１号明細書の実施例６に記載されているようなＨＴ２９ヒト結腸腺癌細胞である。なお他の実施形態では、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞は植物由来である。こうした実施形態では、たとえば、好ましくない植物（たとえば雑草）に特有であるが、好ましい植物（たとえば、作物）には特有でないメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞を標的とする除草剤のスクリーニングを行うことができる。

【００９２】

ある特定の実施形態では、培養細胞は、増殖しているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞および筋細胞を含む。さらにより詳細な実施形態では、細胞は初代細胞である。より詳細な実施形態では、初代細胞は臍帯、血管外膜または大動脈弓から採取する。

【００９３】

培養物中のメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞は、種々の方法で濃縮してもよい。ある種の実施形態では、培養物を電離放射線、たとえば大部分の真核細胞を殺すが、その並外れた放射線抵抗性のためメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を殺さないほどの線量でＸ線処理する。特定の実施形態では、１５０ｒａｄ、２００ｒａｄ、２５０ｒａｄ、３００ｒａｄ、３５０ｒａｄ、４００ｒａｄ、５００ｒａｄ、６００ｒａｄ、７００ｒａｄ、８００ｒａｄ、１０００ｒａｄ、１６００ｒａｄまたはそれを超える線量で細胞にｘ線照射する。より詳細な実施形態では、４００ｒａｄより大きい、たとえば８００ｒａｄまたは１６００ｒａｄの線量で細胞にｘ線照射する。

【００９４】

インビボスクリーニング法は、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を含む生物、たとえば、動物または植物に候補作用物質を投与することを含む。特定の実施形態では、生物は動物であり、さらにより詳細な実施形態では、哺乳動物である。なおより詳細な実施形態では、哺乳動物は非ヒト哺乳動物である。さらにより詳細な実施形態では、哺乳動物は非ヒト霊長類、齧歯動物、イヌ、ネコ、ブタ、ヒツジ、ウシまたはウサギである。なおさらにより詳細な実施形態では、哺乳動物は齧歯動物、たとえばマウス、ラットまたはモルモットである。さらにより詳細な実施形態では、哺乳動物はモルモットである。いくつかの実施形態では、哺乳動物は、創傷治癒障害、非癌性過剰増殖性障害または腫瘍を（たとえば、遺伝的にまたは食事もしくは薬剤処置により）発症しやすい。たとえば、ある種の実施形態では、創傷治癒障害は、外科的介入、たとえば、外科的侵襲、たとえば移植、血管形成術、ステント留置、あるいは、たとえば、化学固定、放射線、過度の高温もしくは低温、梗塞、穿刺、切断または鈍的外傷による意図的な組織の直接損傷から起こる。より詳細な実施形態では、哺乳動物は、創傷治癒障害を発症しやすいと同時に、外科的介入を受けている。ある種の実施形態では、創傷治癒障害は血管の創傷治癒障害である。より詳細な実施形態では、血管の創傷治癒障害は再狭窄である。

【００９５】

他の実施形態では、生物は、腫瘍を発症しやすいかまたは腫瘍を有する。より詳細な実施形態では、生物は、動物、たとえば、腫瘍を発症しやすいまたは腫瘍を有する哺乳動物

である。ある種の実施形態では、哺乳動物は、オンコジーン（たとえば、ＲＡＳまたはＨＥＲ２）を発現するように操作されたトランスジェニック動物であってもよいし、あるいは、腫瘍抑制因子遺伝子（たとえば、ｐ５３）のノックアウトもしくはハイポモルフまたはこれらの組み合わせであり、および／または、変異原処理が行われいてもよい。他の実施形態では、生物は、異種移植モデルであり、たとえば、ヒト腫瘍細胞を移植されている。より詳細な実施形態では、腫瘍細胞は充実性腫瘍由来である。特定の実施形態では、哺乳動物は齧歯動物、たとえばラット、マウスまたはモルモットである。異種移植は充実性腫瘍に成長させ、その後切除して詳細に研究してもよい。こうした実施形態では、齧歯動物は典型的には免疫力が低下する。当業者は、異種移植技術に通じている。

【００９６】

処置方法

上述のスクリーニング法により、異常なメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞活性により引き起こされた障害、たとえば創傷治癒障害、非癌性過剰増殖性障害、または腫瘍の処置に使用できる作用物質が得られる。したがって、本発明また、異常なメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞活性により引き起こされた障害を有する被検体を処置する方法も提供する。たとえば、任意の創傷治癒障害の被検体に、たとえば、増殖しているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の数、または増殖しているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の遊走を調節する有効量の作用物質を投与してもよい。たとえば、異常に過剰な組織産生を特徴とする創傷治癒障害では、増殖しているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の数、または増殖しているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の遊走を減少させる作用物質を被検体に投与する。逆に、異常に不十分な組織産生を特徴とする創傷治癒障害では、増殖しているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の数、または増殖しているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の遊走を増加させる有効量の作用物質を被検体に投与する。「作用物質」とは、単一の活性剤化合物と活性剤の組み合わせとの両方をいう。

【００９７】

腫瘍のある被検体の場合、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の数、遊走、複製または生存を調節する作用物質を被検体に投与する。特定の実施形態では、作用物質は、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の数、遊走、複製または生存を低下させる。より具体的な実施形態では、作用物質は、中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドゲノムと関連する無糸分裂を行っている複製しているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞の数を減少させる。他のより具体的な実施形態では、作用物質は、中間体ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドゲノムと関連する無糸分裂を行っている複製しているメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）細胞の数を一時的に増加させるが、複製の完了を阻害する。

【００９８】

「処置」という用語は、障害に関連する症状を軽減すること、たとえば、癌腫の転移を減少、予防または遅延させること；１つまたは複数の腫瘍の数、容積および／もしくは大きさを減少させること；ならびに／または癌腫もしくは病状の症状の重症度、持続期間または頻度を低下させることのほか、メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の数、増殖している（対称無糸分裂または非対称無糸分裂により）メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の数、および／またはメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞の遊走を調節することをいう。

【００９９】

一般に、真核ｄｓＤＮＡ／ＤＮＡ合成および有糸分裂を阻害する作用物質／条件は、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡからｄｓＤＮＡ／ＤＮＡへのメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）プロセスと、対称無糸分裂および／または非対称無糸分裂のプロセスとを阻害する一連の作用物質／条件と重ならないのが一般的であると予想される。これは、臨床の現場で腫瘍を縮小させることが分かっているが、その後腫瘍の再発を伴う化学物質は、メタカリ

オート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｉｃ）幹細胞を殺す、または最終的に癌を治癒させるには有用でないと予想されるためである。これは、前記メタカリオ（ｍｅｔａｋａｒｙｏｉｃ）細胞が、ｘ線照射と、放射線類似薬剤、たとえばアルキル化剤、および有糸分裂またはメタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｅ）が利用しない真核ＤＮＡ複製様式を攻撃する作用物質を用いた処置とによる殺傷に対して強い抵抗性を示すためである。

【０１００】

しかしながら、いくつかの実施形態では、本発明により提供される腫瘍のある被検体の処置方法を、手術、ホルモン抑制療法、放射線治療または化学療法の１つまたは複数と共に使用する。本発明による化学療法剤および化学療法、ホルモン剤およびホルモン療法ならびに／または放射線治療薬および放射線療法は、同時に投与しても、別々に投与しても、あるいは連続的に投与してもよい。たとえば、いくつかの実施形態では、被検体は、腫瘍幹細胞を除去する１種または複数種の「メタカリオシド（ｍｅｔａｋａｒｙｏｃｉｄｅ）」（メタカリオート（ｍｅｔａｋａｒｙｏｔｅ）を殺すまたはその数を減少させる作用物質）、および非幹細胞の腫瘍塊を除去する療法で処置してもよい。

【０１０１】

ある種の実施形態では、本発明により提供される方法に使用される治療薬は、活性剤成分／部分および標的化剤成分／部分を含む。標的化剤成分は、本明細書に記載するようなｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖に特異的に結合する作用物質であるか、またはそれを含む。特定の実施形態では、標的化剤は、上述の作用物質のいずれか、たとえば抗体またはその抗原結合フラグメントを含む。標的化剤成分は、活性剤成分に結合している。たとえば、標的化剤成分は、互いに直接またはリンカー分子を介して共有結合することができる。この２つが共有結合により互いに結合している場合、その結合は、各部分の活性基を介して好適な共有結合を形成することにより形成してもよい。たとえば、一方の化合物の酸性基を他方の化合物のアミン、酸またはアルコールと縮合させ、それぞれ対応するアミド、無水物またはエステルを形成してもよい。カルボン酸基、アミン基およびヒドロキシル基に加えて、標的化剤成分と活性剤成分との結合を形成するのに他の好適な活性基として、スルホニル基、スルフヒドリル基、ならびにカルボン酸のハロ酸誘導体および酸無水物誘導体が挙げられる。

【０１０２】

別の実施形態では、治療薬は、２種以上の部分または成分、典型的には標的化剤部分と１つまたは複数の活性剤部分とを含む。リンカーを使用すれば、活性剤を標的化剤成分に結合することができ、標的化剤は、ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドと特異的に相互作用し、それにより活性剤を複製中間体構造に送達し、釣鐘型の核のそれ以上の複製を阻害する。

【０１０３】

標的化剤成分に結合した活性剤成分は、所望の治療結果を達成する任意の作用物質、たとえば作用物質：放射性核種（たとえば、Ｉ１２５、Ｉ１２３、Ｉ１２４、Ｉ１３１または他の放射性医薬品）；化学療法剤（たとえば、抗生物質、抗ウイルス薬または抗真菌薬）；免疫刺激剤（たとえば、サイトカイン）；抗腫瘍薬：抗炎症薬；アポトーシス促進剤（たとえば、ペプチド）；トキシン（たとえば、リシン、エンテロトキシン、ＬＰＳ）；抗生物質；ホルモン；タンパク質（たとえば、界面活性タンパク質、凝固タンパク質のほか、増殖因子）；溶解剤；小分子（たとえば、無機小分子、有機小分子、小分子の誘導体、複合小分子）；ナノ粒子（たとえば、脂質または非脂質を用いた製剤）；脂質；リポタンパク質；リポペプチド；リポソーム；脂質誘導体；天然リガンド；改変タンパク質（たとえば、アルブミンまたは他の血液キャリアタンパク質を用いた送達系）；核酸分解酵素；腫瘍幹細胞の増殖または遊走を調節する作用物質；遺伝子または核酸（たとえば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）；ウイルス性もしくは非ウイルス性の遺伝子送達ベクターまたは遺伝子送達系；またはプロドラッグまたはプロ分子であってもよいし、あるいは、それらを含んでもよい。当業者は、活性剤の設計および応用に精通している。

【０１０４】

腫瘍細胞集団が損傷を受けやすく、限られている中でｄｓＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドの選択的標的化を行う際に、有効性の改善ため投与レジメンを修正してもよいと考えることは、合理的である。

【０１０５】

以下の例は、本発明を説明するために提供するものであり、いかなる意味においても限定的であることを意図するものではない。

【実施例】

【０１０６】

各図に示し、本明細書に記載したデータの作成には、以下の一般的なプロトコルを使用した。実験条件を表５にまとめてある。

【０１０７】

【表５】

表5.

プロトコル	0.1%トリトン-X-100	ブロッキング溶液n1	ブロッキング溶液n2	一次抗体	二次抗体	DAPI
N1	1h 30’	1%BSA+ 3滴の正常ヤギ血清	なし	1:10、冷蔵庫に一晩	ロバ抗ヤギ IgG-TRITC、1:200、1h、室温	1:1000
N2	シンシチウムの場合、40’; 細胞の場合、20’	1%BSA、1h	5%正常ウシ血清、1h	1:10、冷蔵庫に一晩	ウシ抗ヤギ IgG-TRITC、1:200、1h、室温	1:1000
N3	40’	1%BSA、1h	5%、正常ヤギ血清、1h	1:10、冷蔵庫に一晩	ロバ抗ヤギ IgG-TRITC、1:200、1h、室温	1:1000
N4	シンシチウムの場合、40’; 細胞の場合、20’	1%BSA、1h	5%、正常ヤギ血清、1h	1:10、冷蔵庫に一晩	ロバ抗ヤギ IgG-TRITC、1:200、1h、室温	1:1000
N5	シンシチウムの場合、40’; 細胞の場合、20’	1%BSA	5%、正常ヤギ血清、1h	1:20、冷蔵庫に一晩	ロバ抗ヤギ IgG-TRITC、1:200、1h、室温	1:1000
N6	シンシチウムの場合、40’; 細胞の場合、20’	1%BSA	5%、正常ヤギ血清、1h	1:20、冷蔵庫に一晩	ロバ抗ヤギ IgG-TRITC、1:200、1h、室温	1:1000
N7	1h20’	1%BSA	5%正常ロバ血清、1h	1:20、冷蔵庫に一晩	ロバ抗ヤギ IgG-TRITC、1:200、1h、室温	1:1000
N8	20’	1%BSA	5%正常ロバ血清、1h	1:20、冷蔵庫に一晩	ロバ抗ヤギ IgG-TRITC、1:200、1h、室温	1:1000

【０１０８】

シンシチウムの自己蛍光は高いバックグランドノイズの原因となるうえ、シンシチウムの細胞壁が厚く、抗体が壁を通過できないため、シンシチウムの染色には、トリトン－Ｘ－１００とインキュベートして細胞膜を透過処理する必要があった。さらに、第２のブロッキング剤を加えてバックグランドノイズを低下させる必要もあった（表５のブロッキング溶液ｎ２）。

【０１０９】

ｄｓＲＮＡ－ＤＮＡ二重鎖の検出実験は、以下の抗体を用いて行った：１）ヤギ４Ａ－Ｅ、ポリ（ｄＴ）を含むＩｇＧ、ロットＪＨ０１２６８０、１．０７ｍｇ／ｍｌ原液、１：２０および１：１０希釈でそれぞれ０．０５ｍｇ／ｍｌおよび０．１ｍｇ／ｍｌの最終

アッセイ濃度；２）ヤギ４Ｈ、ポリ（ｄＴ）、ポリ（Ａ）およびポリ（Ａ）を含むＩｇＧ。変性ＤＮＡまたはｄｓＲＮＡとの任意の反応性の除去にはポリ（Ｕ）、Ａ２８０＝３．４、２．４ｍｇ／ｍｌ原液、１：２０希釈で０．１２ｍｇ／ｍｌの最終アッセイ濃度；および３）ヤギ４Ａ－Ｅ、ポリ（ｄＴ）を含むＩｇＧ、ロット０２１５８０、Ａ２８０＝３．２、２．３ｍｇ／ｍｌ原液、１：２０希釈で０．１２ｍｇ／ｍｌの最終アッセイ濃度。

【０１１０】

前述の３種の抗体をそれぞれ、以下の組織について別々に試験した：１）ヒト胎児組織、９～１０週、脊髄または肋間筋調製物；２）ヒト胎児結腸；３）ヒト結腸腺癌、Ｍ．６８；４）ＨＴ－２９細胞株、ＤＭＥＭ（ダルベッコ変法イーグル培地）、５％ウマ血清またはＤＭＥＭ、１０％ＢＳＡ；および５）ＨＴ－２９細胞株、ＤＭＥＭ、５％ウマ血清、１６００ＲＡＤを照射。

【０１１１】

ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡの固定およびＩＦ（免疫蛍光法）染色には、以下のプロトコルを使用した。ＨＴ－２９細胞、胎児組織および新生物組織を含む全組織をカルノア固定液で３時間固定した。カルノア溶液は３：１のエタノール（４℃）：氷酢酸とした（固定の直前に混ぜ合わせた）。固定液は３時間の間に新鮮なサンプルと３回交換した。カルノア固定液を７０％メタノールと交換し、４℃で保存した。スライドは、胎児組織または新生物組織を展開して調製した（組織とコラゲネーゼ　ＩＩ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、１００ｍｇ（活性２７７Ｕ／ｍｇ）、１５Ｕ／ｍｌの使用濃度に希釈）との３７℃、１時間のインキュベーション後、比較的穏和な解離条件を達成するため４５％酢酸の液滴中に展開した）。この展開／解離ステップは、ＨＴ－２９細胞を用いた実験では省略した。

【０１１２】

次いで組織を含むスライドを風乾させた。次にスライドを１×ＰＢＳ緩衝液に５分間移してから、０．１％トリトンＸ－１００を含む１×ＰＢＳで室温にて２０～８０分間処理した（表５を参照）。次に、スライドを１×ＰＢＳ洗浄用緩衝液で５分間２回洗浄した。次いで１％ＢＳＡを含む１×ＰＢＳ（ブロッキング溶液ｎ１）を６０分間室温で加えた。次いで５％ロバ血清を含む１×ＰＢＳ（ブロッキング溶液ｎ２）を６０分間室温で加えた。

【０１１３】

一次ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ特異抗体を、０．１％ＢＳＡを含む１×ＰＢＳ溶液で使用濃度に希釈し（１：２０～１：１０により、調製物１、２および３に対して、それぞれ０．０５ｍｇ／ｍｌ（場合によっては、１：１０希釈で０．１ｍｇ／ｍｌ）、０．１２ｍｇ／ｍｌおよび０．１２ｍｇ／ｍｌの使用濃度を得た）、冷蔵庫（４℃）で一晩インキュベートした。

【０１１４】

次に、スライドを１×ＰＢＳ緩衝液で３回（各１０分）洗浄した。１×ＰＢＳで希釈した二次抗体（ＴＲＩＴＣコンジュゲート型、Ｓａｎｔａ－Ｃｒｕｚ）を使用直前に調製し（１：２００）、スライドと６０分間室温でインキュベートした。スライドを１×ＰＢＳ緩衝液で３回（各１０分）洗浄した。

【０１１５】

組織をＤＡＰＩ（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ（登録商標）Ｃｏｒｐ．、０．１ｍｇ／ｍｌ原液、１：１０００に希釈）と１～５分間室温でインキュベートし、その後組織を１×ＰＢＳ緩衝液で３回（各５～１０分）洗浄して、核の対比染色を行った。

【０１１６】

抗体による染色の特異性は、ポリ（Ａ）－ポリ（ｄＴ）を用いたブロッキング試験により調べたが、これは、以下の通り実施した：
ポリ（Ａ）－ポリ（ｄＴ）をブロッカーとして１０ｕｇ／ｍｌで試験する。

【０１１７】

等量のポリ（Ａ）－ポリ（ｄＴ）（２０ｕｇ／ｍｌ）および抗体（１／１０）を混合して最終濃度１０ｕｇ／ｍｌのＡ．ｄＴおよび１／２０の血清（抗体）を得た。対照には、

ポリ（Ａ）－ポリ（ｄＴ）の代わりにＰＢＳを使用した。各サンプルは、１０～１５分間室温でインキュベートした。

【０１１８】

様々な濃度のポリ（Ａ）－ポリ（ｄＴ）の試験

次いで１０マイクログラム／ｍｌ、２．０マイクログラム／ｍｌ、０．５マイクログラム／ｍｌおよび０．０８マイクログラム／ｍｌの最終濃度でサンプルを試験し、いずれの場合も、上記のように最終濃度の２倍とした等量のポリヌクレオチドおよび抗体をインキュベートした。ｄｓＲＮＡ／ＤＮＡ特異抗体による染色は、陰性であり、１０マイクログラム／ミリリットルのポリ（Ａ）－ポリ（ｄＴ）の添加により完全にブロックされた。

【０１１９】

「約」、「少なくとも」、「未満」および「超」など、本出願のあるパラメーターを説明するどの数値範囲も、その説明には、記載された各値により限定される任意の範囲も必ず包含されることを理解すべきである。したがって、たとえば、少なくとも１、２、３、４または５という記述は、特に、１～２、１～３、１～４、１～５、２～３、２～４、２～５、３～４、３～５および４～５などの範囲も表す。

【０１２０】

本明細書に引用するすべての特許、出願または他の参考文献、たとえば非特許文献および参照用配列情報については、あらゆる目的において、さらには記載した説においても、その全体を援用することを理解すべきである。援用する文書と本出願との間に何らかの矛盾がある場合、本出願が優先する。本出願に開示された参照用遺伝子配列に関連する情報、たとえばＧｅｎｅＩＤまたは受託番号（典型的にはＮＣＢＩ受託番号を引用）、たとえば、ゲノム座位、ゲノム配列、機能アノテーション、対立遺伝子変異体および参照用ｍＲＮＡ（たとえば、エクソン境界または応答エレメントを含む）およびタンパク質配列（保存されたドメイン構造など）はすべて、その全体を本明細書に援用する。

【０１２１】

本出願に使用した見出しは、単に便宜上のものであり、本出願の解釈に影響を与えるものではない。

【０１２２】

本発明について、その好ましい実施形態を参照しながら詳細に図示して記載してきたが、添付の特許請求の範囲により包含される本発明の範囲から逸脱しない範囲で、本発明の形式および細部に様々な変更が可能であることが、当業者により理解されよう。

【図１】



FIG. 1

【図２】

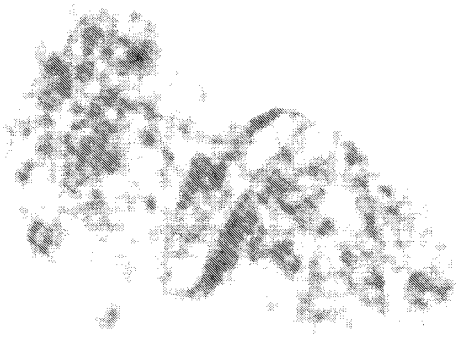


FIG. 2

【図３】

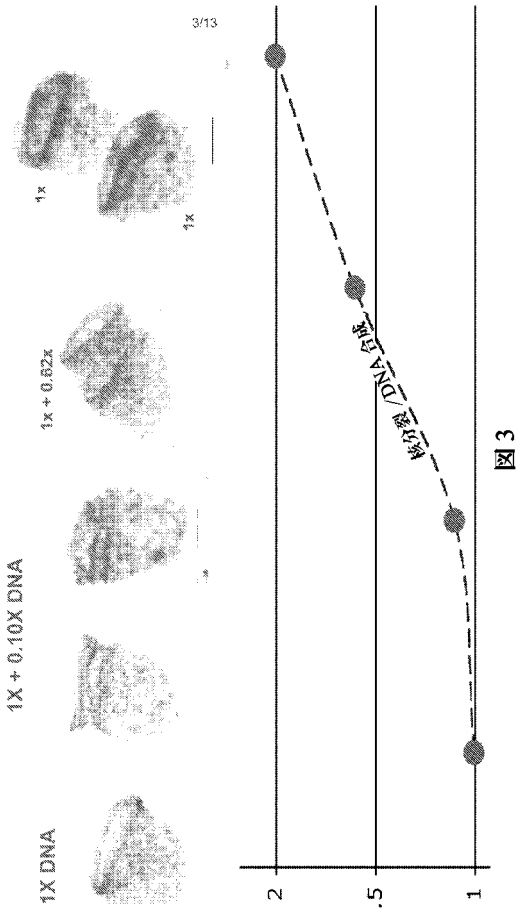


図３

【図４】

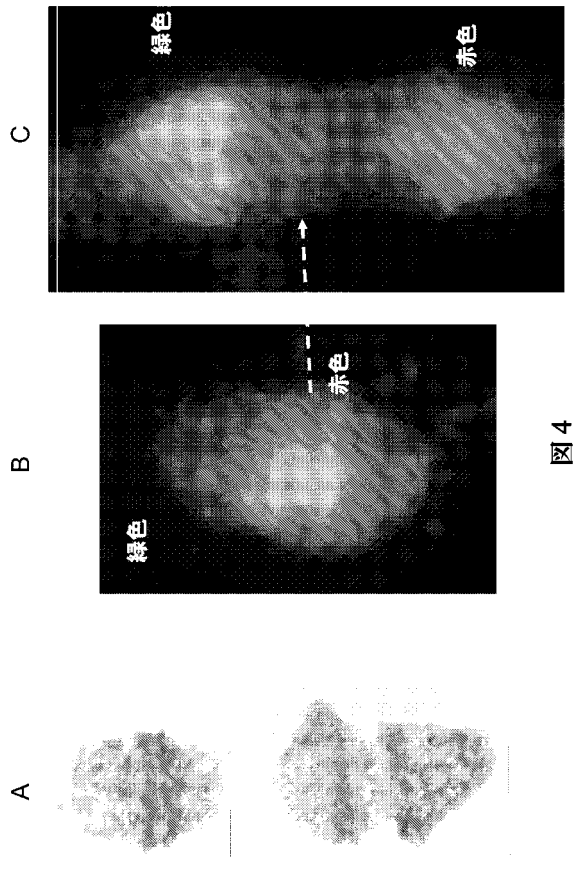
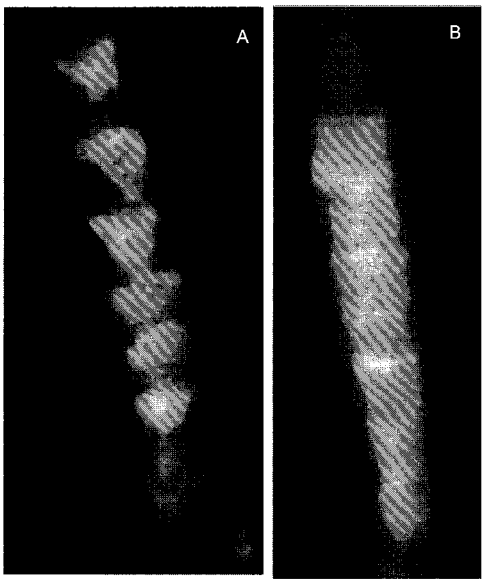


図４

【図５】

FIG. 5



【図６】

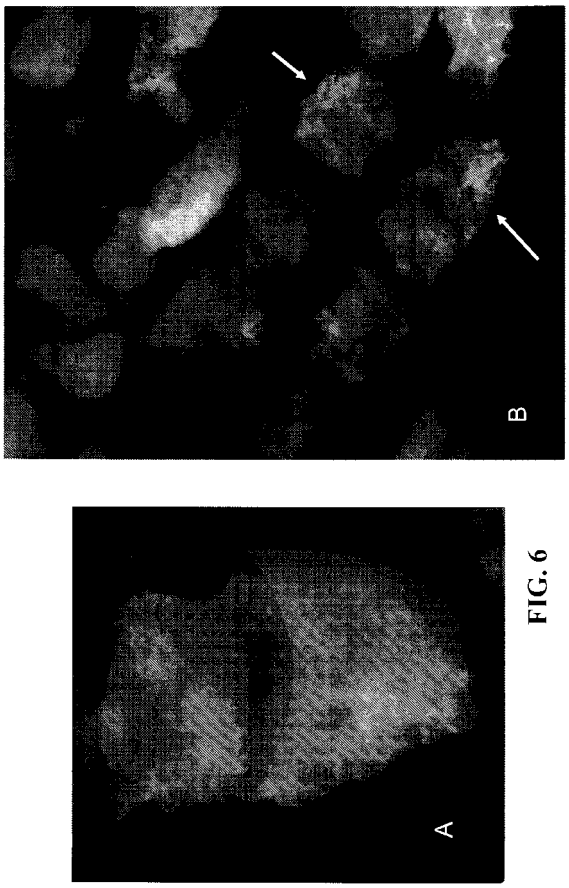


FIG. 6

【図７】

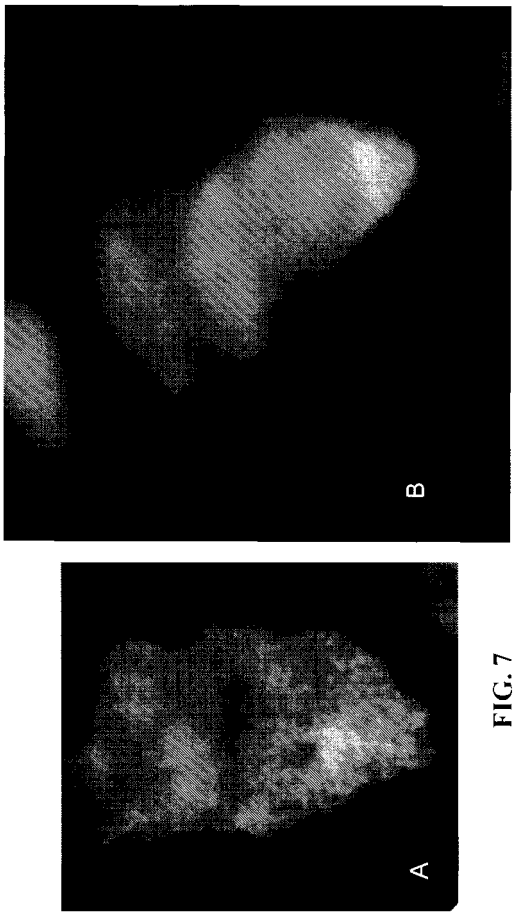


FIG. 7

【図８】

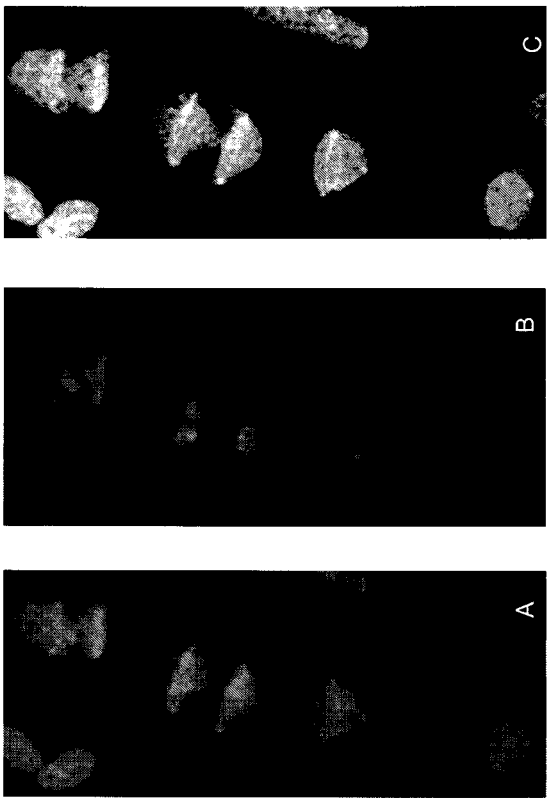


FIG. 8

【図９】

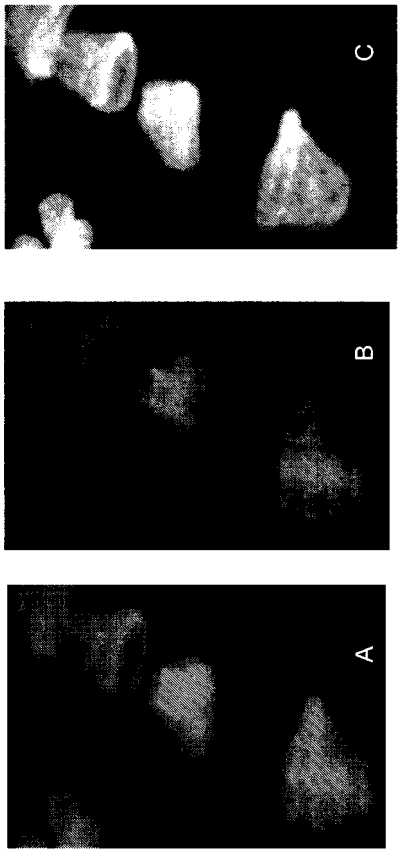


FIG. 9

【図１０】

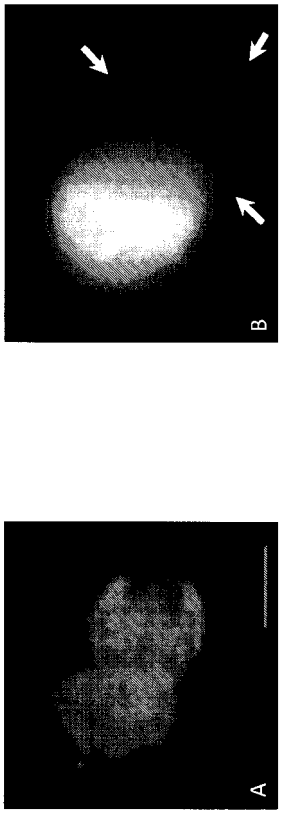


FIG. 10

【図１１】

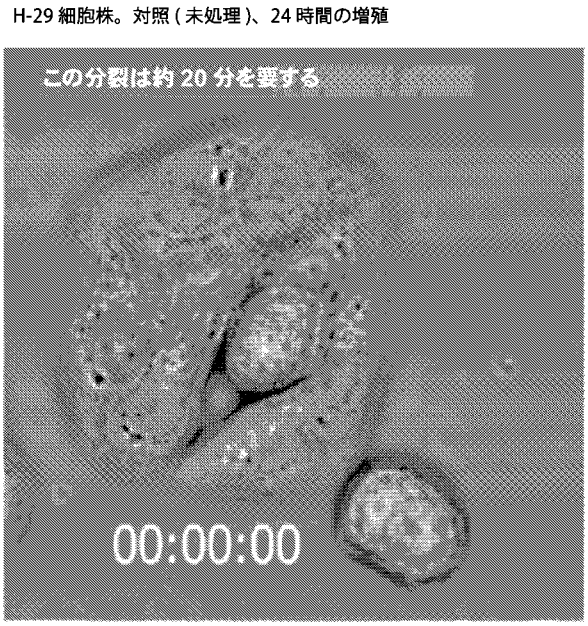


図 11

【図１２】

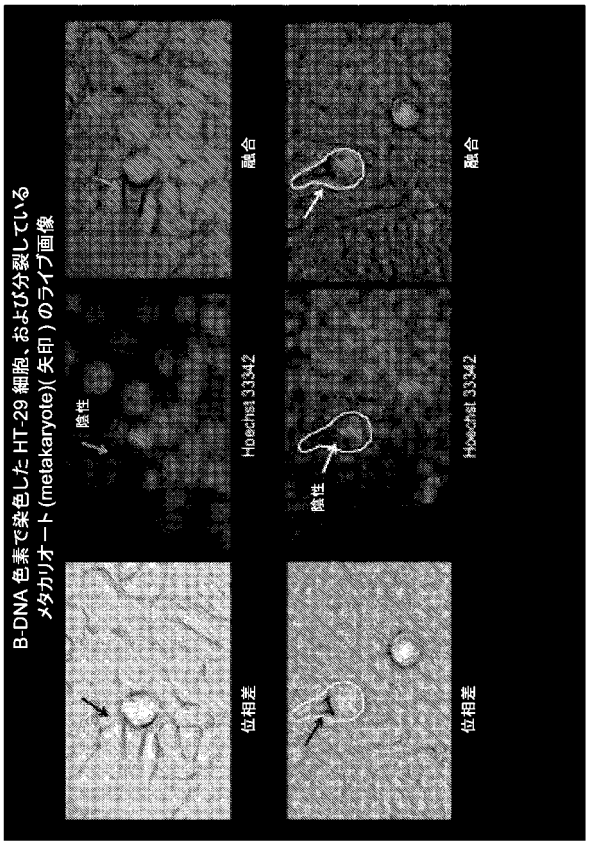


図 12

【図１３】



FIG. 13

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/040361

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/50 C12Q1/68
ADD.

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)
G01N C12Q

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)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	WO 2012/061073 A1 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]; GOSTJEVA ELENA V [US]; THILLY WILL) 10 May 2012 (2012-05-10) page 17, paragraph 2 - page 18, paragraph 1 -----	1-34
Y,P	William G. Thilly: "Metakaryotic biology, a revolution in cancer stem cell research", , 6 January 2012 (2012-01-06), XP002681011, Retrieved from the Internet: URL:http://www.med.uio.no/klinmed/english/research/news-and-events/events/guest-lectures-seminars/2012/william-thilly.html [retrieved on 2012-07-26] the whole document ----- -/--	1-34

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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	Date of mailing of the international search report
19 September 2012	01/10/2012

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Hoff, Céline

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/040361

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Paulo Refinetti: "Analysis of familial risk for prostate, colon and femalebreast cancer in Sweden", Master's project in Bioengineering and Biotechnology , 2011, pages 1-109, XP002681012, Retrieved from the Internet: URL:http://infoscience.epfl.ch/record/173435/files/Master_thesis_Final.pdf [retrieved on 2012-07-26] page 10, paragraph 1	1-34
A	GRUHL A N ET AL: "Human fetal/tumor metakaryotic stem cells: pangenomic homologous pairing and telomeric end-joining of chromatids", CANCER GENETICS AND CYTOGENETICS, vol. 203, no. 2, 1 December 2010 (2010-12-01), pages 203-208, XP027557038, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHING, NEW YORK, NY, US ISSN: 0165-4608 [retrieved on 2010-12-01] the whole document	1-34
A	US 2010/075366 A1 (GOSTJEVA ELENA V [US] ET AL) 25 March 2010 (2010-03-25) the whole document	1-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2012/040361

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012061073 A1	10-05-2012	NONE	
US 2010075366 A1	25-03-2010	CA 2738133 A1	01-04-2010
		CN 102216777 A	12-10-2011
		EP 2344880 A1	20-07-2011
		JP 2012503475 A	09-02-2012
		KR 20110079674 A	07-07-2011
		US 2010075366 A1	25-03-2010
		WO 2010036322 A1	01-04-2010

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
G01N 33/15	*(2006.01)*	G01N 33/50	Z	
		G01N 33/15	Z	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,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,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

(72)発明者 ティリー，ウィリアム，ジー.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１８９０ ウィンチェスター，サウス ボーダー ロード ４３８
(72)発明者 ゴストジェバ，エレナ，ブイ.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１８９０ ウィンチェスター，サウス ボーダー ロード ４３８
(72)発明者 ストラー，ビー.，デービッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４５９ ニュートン，クラーク ストリート １５８

Fターム(参考) 2G045 BB20 CA01 DA13 DA14 DA20 FB03 FB12
4B063 QA18 QQ08 QQ42 QQ52 QR48 QR55 QR66 QR72 QR77 QS03
QS28 QS34 QS36 QS39 QX01